

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI YAĞLARLA BESLENEN RATLARDAN
ELDE EDİLEN TORASİK LENF İNTESTİNAL
VLDL'LERİNİN HİDROFOBİK
ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ÖZLEM İŞİKGİL

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. TAYFUN GÜLDÜR

MALATYA-2011

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI YAĞLARLA BESLENEN RATLARDAN
ELDE EDİLEN TORASİK LENF İNTESTİNAL
VLDL'LERİNİN HİDROFOBİK
ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

ÖZLEM İŞİKGİL
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF. DR. TAYFUN GÜLDÜR

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2008/73 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA – 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İsmail TEMEL
İnönü Üniversitesi

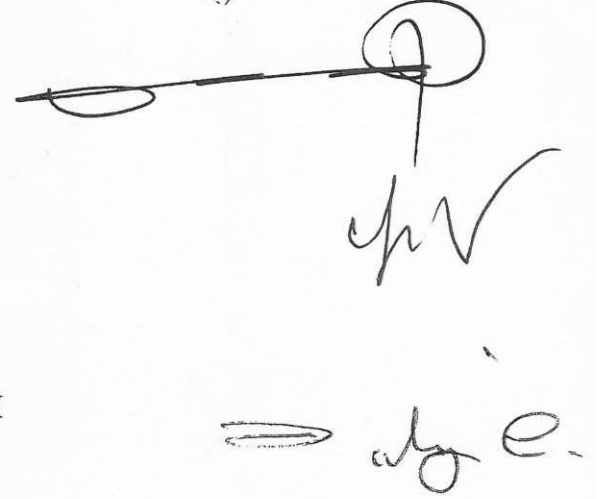
Danışman: Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR
İnönü Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU
İnönü Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Yavuz SİLİĞ
Cumhuriyet Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇIĞLI
İnönü Üniversitesi

İmza



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu/...../ 2011 tarih ve 2011 /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yapmış olduğum doktora tez çalışmam süresince birlikte çalışma onuruna eriştiğim, her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, büyük özveri ile bilgi ve birikimlerini aktarmaya çalışan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR'e, deney hayvanları temini ve yardımlarından dolayı İ.Ü. Deneysel Araştırmalar Birimi'ne ve personeline, yağların yağ asidi kompozisyonlarının analizlerini yapan Mersin İl kontrol Laboratuvarı personeli Sayın Mustafa Şimşek'e, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve personeline, laboratuvar çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı personeline, Eczacılık Fakültesi personeline ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, desteğinden ve fedakarlıklarından dolayı eşime sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Torasik lenf, şilomikronlara ek olarak önemli miktarda daha yoğun, triaçilgliserolden zengin bir fraksiyon olan intestinal VLDL'i (ya da küçük şilomikron) içerir. İntestinal VLDL, şilomikronlardan metabolizmasının yanısıra flotasyon, lipid ve apolipoprotein kompozisyonları açısından da farklıdır. Açlık durumunda ve lipid absorpsiyonu sırasında enterositler tarafından sentez edilirler. Absorbe edilmiş besinsel yağ asitleri, α -gliserofosfat yolu üzerinden triaçilgliserol oluşturmak için kullanılırlar ve daha sonra pre-VLDL içerisinde paketlenir ve Golgi'de daha ileri işleme tabi tutulurlar. Oluşan partiküller, torasik lenf içerisine sekrete edilirler.

Tipik bir lipoprotein yapısı örneğın intestinal VLDL, triaçilgliserol ve kolesteril esteri gibi temelde apolar lipidler içeren bir lipid çekirdekten oluşur ve serbest kolesterol, fosfolipid ve apolipoprotein içeren amfipatik lipidler tarafından çevrilir. Amfipatik lipidlerin polar grupları akuöz faza maruz kalır, oysaki apolar grupları hidrofobik lipid çekirdeğine doğru yerleşirler. Lipoprotein yapısı bu konuda misel organizasyonunu taklit eder.

Bir lipoproteinın hidrofobik özellikleri, lipoprotein agregasyonuna yol açar. Lipoproteinlerin agregasyonu, aterosklerozisin altında yatan nedenlerden biri olarak rapor edilmiştir. Bu amaçla intestinal VLDL, ayçiçek yağı, zeytin yağı, palm yağı, tereyağı, margarin ve balık yağı verilen ratlardan ultrasantrifügasyon ile izole edildi ve hidrofobik özellikleri, vorteksle indüklenmiş agregasyon ve hidrofobik interaksiyon kromatografisi ile karşılaştırıldı. Aynı zamanda pH, tuz eklenmesi veya dilüsyon gibi misel yapısı üzerine etkisi olduğu bilinen farklı koşullar altında, farklı besinsel yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in vorteksle indüklenmiş agregasyona karşı cevabı karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak önemsiz olmasına rağmen, doymuş yağlardan elde edilen intestinal VLDL, doymamış yağlardan elde edilenlerden daha fazla agregate oldu. Bunun tersine, doymuş yağlardan elde edilen intestinal VLDL, hidrofobik sabit fazla (bütil sefaroze) diğerlerinden daha az etkileşime girdi. Oysaki balık yağı intestinal VLDL'i, diğer besinsel lipidlerden elde edilen lipoproteinler ile karşılaştırıldığında hidrofobik medyumla daha güçlü bir

şekilde etkileşime girdi. Balık yağından elde edilen intestinal VLDL, misel yapısını etkileyen faktörlere karşı daha fazla duyarlılık gösterdi.

Sonuç olarak lipoproteinlerin doymuşluk dereceleri, hidrofobik özelliklerini belirlemede tek faktör olmayabilir. Yağların minör bileşenleri de lipoproteinlerin hidrofobik özelliklerinde rol alabilirler. Ateroskerozu önlemede balık yağının yararlı etkileri dikkate alındığında, misel yapısını etkileyen faktörlere karşı bir lipoprotein duyarlılığı, bir lipoprotein partikülünün aterojenitesini belirleyen ilave bir faktör olabilir, fakat bu gelecekteki çalışmalarla daha net anlaşılabilir.

Anahtar kelimeler: Hidrofobisite, Lipoproteinler-VLDL, Ateroskleroz, Bağırsak, Agregasyon

**THE COMPARISON OF THE HYDROPHOBIC PROPERTIES OF
THORACIC LYMPH INTESTINAL VLDL FROM RAT FED VARIOUS
DIETARY OILS AND FATS**

ABSTRACT

Thoracic lymph contains, in addition to chylomicrons, a significant amount of another more dense, triacylglycerol rich fraction, the intestinal VLDL (or small chylomicrons). Intestinal VLDL differ from chylomicrons in terms of flotation, lipid and apolipoprotein composition as well as metabolism. They are synthesized by enterocytes during fasting state and lipid absorption. Absorbed dietary fatty acids are used to form triacylglycerol via the α -glycerophosphate pathway which is then packed into preVLDL particles and further processed in Golgi. The resulting particles are then secreted into thoracic lymph.

A typical lipoprotein structure e.g. intestinal VLDL, comprises a lipid core containing mainly apolar lipids e.g. triacylglycerols and cholesterol esters, which is surrounded by amphipathic lipids including free cholesterol, phospholipids and apolipoproteins. Polar groups of amphipathic lipids expose to aqueous phase whereas their apolar groups are located towards hydrophobic lipid core. Lipoprotein structure mimics micellar organization in this respect.

Hydrophobic properties of a lipoprotein give rise to lipoprotein aggregation. Aggregation of lipoproteins have been reported to be one of the underlying causes of atherosclerosis. To this end, intestinal VLDL were isolated by ultracentrifugation from rats given, sunflower, olive oil, palm oil, butter, margarine and fish oil and their hydrophobic properties were compared by vortex induced aggregation and hydrophobic interaction chromatography. Responses of intestinal VLDL from different dietary fats to vortex induced aggregation under different conditions known to have an effect on the micellar structure e.g. pH, salt addition and dilution, were also compared. Although statistically insignificant, intestinal VLDL from saturated fats aggregated more than that from unsaturated fats.

On the contrary, intestinal VLDL from saturated fats interacted with hydrophobic stationary phase (butyl-sepharose) less than the others whereas fish oil

intestinal VLDL interacted more strongly compared to the lipoproteins from other dietary fats. Intestinal VLDL from fish oil exhibited more susceptibility to factors affecting miscellar structure.

As a result saturation degree of a lipoproteins may not be a unique factor determining the hydrophobic properties. Minor components of lipids may also take part in lipoproteins' hydrophobic properties. Considering the beneficial effect of fish oil for the prevention of atherosclerosis, susceptibility of a lipoprotein to the factors effecting miscellar structure might be an additional factor determining the atherogenicity of a lipoprotein particle but this can be understood more clearly with the future investigations.

Key words: Hydrophobicity, Lipoproteins-VLDL, Atherosclerosis, Intestine, Aggregation

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2. 1. Lipoproteinler	4
2. 1. 1. Şilomikron	4
2. 1. 2. VLDL (Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)	5
2. 1. 3. LDL (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)	5
2. 1. 4. HDL (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein)	6
2.1.5. Lipoprotein (a)	7
2.2. Apolipoproteinler	7
2. 2. 1. Apoprotein A-I (ApoA-I)	7
2. 2. 2. Apoprotein A-II (Apo A-II)	7
2. 2. 3. Apoprotein A-IV (Apo A-IV)	7
2. 2. 4. Apoprotein B-100 (Apo B-100)	8
2. 2. 5. Apoprotein B-48 (Apo B-48)	8
2. 2. 6. Apoprotein C-I, C-II, C-III (Apo C-I, C-II, C-III)	8
2. 2. 7. Apoprotein E (Apo E)	8
2. 3. Besinsel Lipidlerin Sindirimi	8

2. 3. 1. Besinsel Yağ Asitlerinin Endoplazmik Retikulum Hareketi	10
2. 3. 2. Şilomikronların Endoplazmik Retikulum İçinde Oluşumu	12
2. 3. 3. Pre-Şilomikronların Endoplazmik Retikulumdan Ayrılması	14
2. 3. 4. Pre-Şilomikron Transport Vezikülünün Biyogenesi	15
2. 3. 5. Pre-Şilomikron Transport Vezikülünün Biyogenesinin Düzenlenmesi	16
2. 3. 6. Pre-Şilomikron Transport Vezikülünün cis-Golgi İle Birleşmesi	16
2. 3. 7. Şilomikronların Golgide Transformasyonu ve Post-Golgi Transportu	16
2. 4. İntestinal VLDL (Küçük Şilomikron)	17
2. 4. 1. İntestinal VLDL Metabolizması	20
2. 5. Ateroskleroz	24
2.6. Misel Yapılar ve Hidrofobik Etki	24
2.7. Şilomikronların Yağ Asidi Kompozisyonları ve Yağ Asitlerinin Birbirine Dönüşümü	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Ratların Temini	28
3.2. Ratların Muhafaza Koşulları	27
3. 3. Yağların Hazırlanması ve Verilmesi	29
3. 4. Ratların Hazırlanması ve Anestezisi	29
3. 5. Deney Gruplarının Oluşturulması	29
3. 6. Torasik Lenf Kanülasyonu ve Lenf Sıvısının Toplanması	30
3.7. İntestinal VLDL'in Lenf Sıvısından İzolasyonu	31
3. 8. İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi İle Analizleri	32
3. 8. 1. Prensibi	32
3. 8. 2. Kolonun Hazırlanması	33

3. 8. 3. Numunenin Uygulanması	34
3.8.4. Pik Alanlarının Hesaplanması	34
3.8.5. Kapasite Faktörünün Hesaplanması	34
3.9. İntestinal VLDL'in Elektroforetik Analizleri	36
3.9.1. Agaroz Jel Elektroforezi	36
3.9.1.1. Kullanılan Ayıraçlar	37
3.9.1.2. Jellerin Hazırlanması ve Numunenin Uygulanması	38
3.9.1.3. Elektroforezin Yapılışı	38
3.10. İntestinal VLDL'in Türbidite Analizleri	38
3.10.1. Soğğun İntestinal VLDL Agregasyonu Üzerine Etkisi	38
3.10.2. Farklı Yağlar Verilerek Elde Edilen İntestinal VLDL'in Misel Yapılarının, Misel Yapısına Etki Eden Faktörler Açısından Karşılaştırılması	39
3.10.3. İntestinal VLDL'in Jel Filtrasyon (Size Exclusion) Kromatografisi İle Analizleri	39
3.11. Lipid ve Protein Analizleri	41
3.11.1. Triaçilgliserol Miktar Tayini	41
3.11.1.1. Kullanılan Ayıraçlar	41
3.11.1.2. Deneyin Yapılışı	42
3.11.2. Fosfolipid Miktar Tayini	42
3.11.2.1. Kullanılan Ayıraçlar	42
3.11.2.2. Deneyin Yapılışı	43
3.11.2.3. Numunenin Ekstraksiyonu	43
3.11.3. Protein Miktar Tayini	44
3.11.3.1. Kullanılan Ayıraçlar	44
3.11.3.2. Deneyin Yapılışı	45
3.12. Verilen Yağlarda Yağ Asidi Analizleri	46
3.13. İstatistiksel Değerlendirme	46

4. BULGULAR	47
4.1. Yağların ve Şilomikronların Yağ Asidi Kompozisyonları	47
4.2. Farklı Yağlardan Elde Edilen İntestinal VLDL'e Ait Türbidimetrik Analizler	52
4.3. Sıcaklığın Farklı Yağlardan Elde Edilen İntestinal VLDL'nin Vorteksle Agregasyonuna Etkilerinin Karşılaştırılması	54
4.3.1. İntestinal VLDL'nin Vorteksle Agregasyonuna +4 °C'nin Etkilerinin Karşılaştırılması	54
4.3.2. İntestinal VLDL'in Vorteksle Agregasyonuna - 20 °C'nin Etkilerinin Karşılaştırılması	55
4.4. Farklı Yağlardan Elde Edilen Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'nin Yüzey Hidrofobisitelerinin Bütil Sefaroz Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi İle Karşılaştırılmaları	56
4.4.1. İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi (HİK) ile Yüzey Hidrofobisitelerine Göre Fraksiyonları	56
4.4.2. İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatogramı Pik Alanlarının Birbirlerine Oranları	56
4.4.3. İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi Sonucunda Ayrılan Fraksiyonlarının Kapasite Faktörü (k) Değerleri	57
4.5. Misel Yapısına Etki Eden Faktörlerin Altı Farklı Yağdan Elde Edilen İntestinal VLDL Üzerine Etkisi	61
4.5.1. 1mmol NaCl'nin Etkisi	61
4.5.2. 0,1 N HCl'nin Etkisi	62
4.5.3. 0,1 N NaOH'nin Etkisi	63

4.5.4. 1/3, 1/5 ve 1/7 Oranlarında Sulandırmanın Etkisi	64
4.6. Torasik Lenf İntestinal VLDL'nin ve HİK Fraksiyonlarının Elektroforetogramları	67
4.7. İntestinal VLDL'in Lipid-Protein Oranları	71
4.8. İntestinal VLDL'in Jel Filtrasyon Kromatografisine Ait Kromatogramlar	72
5.TARTIŞMA	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR	86
EK : Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı	93
ÖZGEÇMİŞ	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TAG	: Triaçilgliserol
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler
IDL	: Ara Yoğunluklu Lipoproteinler
KETP	: Kolesterol Ester Transfer Protein
KE	: Kolesteril Esteri
HL	: Hepatik Lipaz
HMG-KoA	: Hidroksimetil Glutaril Koenzim A
ACAT	: Kolesterol Açıl Transferaz
Lp(a)	: Lipoprotein (a)
LCAT	: Lestin Kolesterol Açıl Tranferaz
YABP	: Yağ Asidi Bağlayıcı Protein
KYABP	: Karaciğer Yağ Asidi Bağlayıcı Protein
BYABP	: Bağırsak Yağ Asidi Bağlayıcı Protein
YABP-IV	: Yağ Asidi Bağlayıcı Protein-IV
MAG	: Monoaçilgliserol
MAGT	: Monoaçilgliserol Açıl Transferaz
DAG	: Diaçilgliserol
ER	: Endoplazmik Retikulum
MTP	: Mikrozomal Transfer Protein
HSP70	: Henoch-Shöenlein purpurası
COP II	: Coat Protein Kompleks II
PŞTV	: Pre-Şilomikron Transport Vezikül
SNARE	: N-etilmalemid Sensitive Factor Protein
Sf	: Svedberg Flotasyon Oranı
PC	: Fosfatidil Kolin
L-81	: Pluronik L-81
Na-EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit Sodyum Tuzu
Na-Azid	: Sodyum Azid

HİK	: Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi
TBE	: Tris-Borat-EDTA
HClO	: Hipoklorik Asit
HNO ₃	: Nitrik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
HClO ₄	: Perklorik Asit
Na ₂ CO ₃	: Sodyum Karbonat
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır Sülfat 5 Hidrat
BSA	: Bovine Serum Albumin
GC	: Gaz Kromatografisi
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
DHA	: Dokosahegzaenoik Asit
KMK	: Kritik Misel Konsantrasyonu
AYŞ	: Ayçiçek Yağından Elde Edilen Şilomikron
ZYŞ	: Zeytin Yağından Elde Edilen Şilomikron
PLMŞ	: Palm Yağından Elde Edilen Şilomikron
TRYŞ	:Tereyağından Elde Edilen Şilomikron
MRGŞ	: Margarin Yağından Elde Edilen Şilomikron
BLKŞ	: Balık Yağından Elde Edilen Şilomikron
AYIV	: Ayçiçek Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL
ZYIV	: Zeytin Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL
PLMIV	: Palm Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL
TRYIV	: Tereyağından Elde Edilen İntestinal VLDL
MARGIV	: Margarin Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL
BLKIV	: Balık Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Besinsel Lipidlerin Absorbsiyonu ve Triaçilgliserollere Dönüşümü	11
Şekil 2.2 Şilomikron Oluşumu	14
Şekil 2.3. Preşilomikronun Hücreler Arası Taşınımı	15
Şekil 2.4. Pre-ŞM ve pre-VLDL Partiküllerinin İnce Bağırsağın Enterositleri Tarafından Paketlenmesi	22
Şekil 2.5. İntestinal VLDL'in ve Şilomikronun Sekresyonu ve Paketlenmesi	23
Şekil 2.6. Stearik Asidin Oleik Aside Dönüşümü	26
Şekil 2.7. Yağ Asitlerinin Birbirine Dönüşümü	26
Şekil 3.1. Ratların Genel Karın Boşluğu Anatomisi	30
Şekil 3.2. Torasik Lenf Kanülasyonu Şematik Gösterim	31
Şekil 3.3 Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisinde Hidrofobik Yüzey (HİK medyum) ile Proteinler Arasındaki Hidrofobik Etkileşim	33
Şekil 3.4. Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi şematik gösterimi	35
Şekil 3.5. Elektroforez İşlemi Aparatları ve Şematik Gösterimi	41
Şekil 3.6. Agarozun Kimyasal Yapısı	41
Şekil 3.7. Jel Filtrasyon (Size Exclusion) Kromatografisinde Moleküllerin Ayrılması	40
Şekil 3.8. Triaçilgliserol Kalibrasyon Grafiği	42
Şekil 3.9. Fosfor Kalibrasyon Grafiği	44
Şekil 3.10. BSA Kalibrasyon Grafiği	46

Şekil 4.1 Ayçiçek yağı (A), Zeytinyağı (B), Palm Yağı (C), Tereyağı (D), Margarin (E), Balık yağı (F) Verilerek Elde Edilen Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'nin Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi Analizine Ait Kromatogramlar	61
Şekil 4.2 Altı Farklı Yağ Verilerek Elde Edilen Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'inin 1/3, 1/5 ve 1/7 Oranlarında Distile Su İle Sulandırılarak Vortekslenedikten Sonraki Absorbanslarının Vortekslenmeden Önceki Absorbanslarına Oranları	68
Şekil 4.3. Ayçiçek Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram	68
Şekil 4.4 Zeytinyağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram	68
Şekil 4.5. Palm Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram	69
Şekil 4.6. Tereyağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram	69
Şekil 4.7. Margarinden Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram	70
Şekil 4.8. Balık Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram	70
Şekil 4.9. Ayçiçek yağından Elde Edilen Biri Şilomikron (A) Diğeri İntestinal VLDL'e (B) Ait Birleştirilmiş İki Elektroforetogram	71
Şekil 4.10. İntestinal VLDL'in Jel Filtrasyon (Size Exclusion) Kromatografisine Ait Kromatogramları	73

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Ratların yem kompozisyonu	27
Tablo 4.1. Altı Farklı Yağın ve Bu Yağlardan Elde Edilen Torasik Lenf Şilomikronlarının Yağ Asitlerinin % Kompozisyonları	49
Tablo 4.2. Farklı Yağlardan Elde Edilen Torasik Lenf Şilomikronlarının YağAsidi Kompozisyonlarının Karşılaştırılması	51
Tablo 4.3. Farklı yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in Vorteksleme Sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamaları	53
Tablo 4.4. + 4 ⁰ C'de Bekletilen İntestinal VLDL'in Vorteksleme Sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamaları	55
Tablo 4.5. -20 ⁰ C'de Dondurulan İntestinal VLDL'in Çözüldükten Sonra Vorteksleme sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamalar	56
Tablo 4.6. Altı Farklı Yağdan Elde Edilen Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi Sonrasında Oluşan Piklerinin Alanlarının Birbirlerine Oranları.	57
Tablo 4.7. Altı Farklı Yağdan Elde Edilen Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi Sonrasında Oluşan Kapasite Faktörü (k) Değerlerinin Birbirlerine Oranları.	58
Tablo 4.8. 1mmol NaCl Eklenilen İntestinal VLDL'in Vorteksleme Sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamaları	62
Tablo 4.9. 0,1 N HCl Eklenilen İntestinal VLDL'in Vorteksleme Sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamaları.	63

Tablo 4.10. 0,1 N NaOH Eklenilen İntestinal VLDL'in Vorteksleme Sonrası A ₄₀₀ /0. dk A ₄₀₀ Oranlarının Ortalamaları	64
Tablo 4.11. Distile Su İle 1/3 Oranında Sulandırılan Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'in Vortekslenmekten Sonraki Absorbanslarının (A ₄₀₀) Vortekslenmeden Önceki (0.dk) Absorbanslarına Oranları.	65
Tablo 4.12. Distile Su İle 1/5 Oranında Sulandırılan Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'inin Vortekslenmekten Sonraki Absorbanslarının (A ₄₀₀) Vortekslenmeden Önceki (0.dk) Absorbanslarına Oranları.	66
Tablo 4.13. Distile Su İle 1/7 Oranında Sulandırılan Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'in Vortekslenmekten Sonraki Absorbanslarının (A ₄₀₀) Vortekslenmeden Önceki (0.dk) Absorbanslarına Oranları.	67
Tablo 4.14. İntestinal VLDL'in Triaçilgliserol/Protein Oranları	72
Tablo 4.15. İntestinal VLDL'in Fosfor/Triaçilgliserol Oranları	73

1. GİRİŞ

Lipidler, plazmada lipoproteinler halinde taşınmaktadır ve dört ana lipid grubu tanımlanmıştır. Bunlar triaçilgliserol (TAG), fosfolipid, kolesterol, kolesteril esteri ve serbest yağ asitleridir. Kompleks lipidler kanda lipoprotein adı verilen suda çözünür makromolekül kompleksleri halinde taşınırlar. Lipoproteinlerin genel fonksiyonu, çözünmeyen lipidlerin su ile karışabilir lipid ve protein kompleksleri halinde taşınmasını sağlamaktır. Plazma lipoproteinlerinin sentez edildiği başlıca yerler arasında bağırsak ve karaciğer bulunmaktadır. Lipoproteinler yoğunlukları ve elektroforetik alandaki hareketlerine göre sınıflandırılırlar. Yoğunluklarına göre lipoproteinler şilomikronlar, çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL), düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL), yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) olarak adlandırılırlar (1).

Lipid metabolizması aterosklerozun teşhis ve tedavisi yönünden son derece önemlidir. Ateroskleroz, arteriyel duvarın iç yüzünü örten tabakada lipid birikmesi sonuncu oluşan bir hastalıktır. Bu lipid birikim plak oluşumuna ve kan damarlarının daralmasına katkıda bulunduğu için ateroskleroz potansiyel olarak hayatı tehdit eden bir durumdur (1,2).

Lipidlerin sindirimi midede başlar. Midedeki sindirim, büyük kısmının dilin arkasındaki bezlerden kaynaklandığı düşünülen asite dayanıklı lipaz tarafından katalize edilir. Lipidler bu bölgede henüz emülsifiye halde olmadıklarından hidrolizin hızı düşüktür ve enzim sadece lipid-su arayüzeyindeki triaçilgliserolleri parçalayabilir. Kısa veya orta zincirli yağ asitleri içeren triaçilgliserol molekülleri ayrı bir enzim olan gastrik lipaz tarafından parçalanırlar. Lipidlerin sindirimi ve emiliminden sonra, ince bağırsak mukoza hücrelerinde 2-monoaçilgliserollerden ekzojen triaçilgliseroller oluşur. Bu ekzojen triaçilgliseroller, az miktarda serbest kolesterol, kolesteril esteri ve fosfolipid ile bir araya gelirler, bir protein tabakasıyla da kaplanarak suda çözünebilir ve transport edilebilir şilomikronları oluştururlar. Şilomikronlar da lenf sistemi yoluyla dolaşıma katılırlar. Kan dolaşımına verilen

şilomikronlar, lipoprotein lipaz etkisi ile triaçilgliserol içeriklerinin yaklaşık %90'ını kaybederek şilomikron remnant haline dönüşürler. Şilomikron remnantlar yapılarındaki Apo E'den dolayı karaciğer tarafından tanınarak alınır (2). Herhangi bir nedenden dolayı karaciğer tarafından alınamayan şilomikronlar arter duvarı da dahil olmak üzere diğer dokulara dağılıbilirler. Arter duvarına dağılan şilomikron remnantların ateroskleroza hızlandırması muhtemeldir.

Eğer intestinal kaynaklı lipoprotein metabolizması ve transportu normal ise diyetdeki triaçilgliserol; adiposit ve kas hücrelerine yağ asitleri şeklinde taşınır ve besinsel kolesterol karaciğere taşınarak safra asidi ve membran sentezinde kullanılır ya da safra kolesterolü veya lipoprotein kolesterolü olarak yeniden salgılanır. Besinsel kolesterol ayrıca endojenik hepatik kolesterol sentezini de düzenler. Bununla beraber eğer transport ve metabolizması anormal ise şilomikronlar da aterojenik prosese katılabilir. Şilomikron ve şilomikron remnantlarının damar duvarına, plazmadan göç eden monosit kaynaklı makrofajları içeren damar duvarı hücrelerince alınabileceği görülmüştür. Kolesteril esterlerinin bu monosit kaynaklı makrofajlarda birikimi onları köpük hücrelerine (foam cells) çevirir. Bu da aterosklerotik plağın en erken hücreselezyonudur. Eğer postprandial şilomikron ve artıklarının düzeyi yükselirse ve bu lipoproteinler plazmada normalden daha uzun süre sirküle olursa arter duvarına kolesterol taşınımı olasılığı yükselebilir. Şilomikron remnant düzeyleri Apo E'nin düzenli fonksiyon yapmadığı durumlarda yükselebilir. Son yapılan çalışmalarda, şilomikron ve şilomikron remnantları metabolizması anormalliklerinin koroner arter hastalığının varlığıyla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (3).

Yağ absorpsiyonu sırasında endojen lipidler şilomikronlarla taşınmaktadır. Düşük oranda yağ emilimi ve açlık sırasında ise özellikle VLDL büyüklüğündeki partiküllerin bağırsak tarafından sentezlendiği elektron mikroskopik çalışmalarda intestinal lenfte gösterilmiştir. Bu partiküller intestinal very low density lipoproteins (intestinal VLDL) olarak diğer adıyla da küçük şilomikronlar olarak adlandırılırlar (4).

İntestinal VLDL'in, sirkülasyonda LDL'ye dönüşebileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Büyük şilomikron remnantlar karaciğer tarafından süratle uzaklaştırılıp metabolize edilmelerine karşın intestinal VLDL remnantlar daha yavaş

bir şekilde uzaklaştırılmaktadır. Bu muhtemelen Apo B kompozisyonlarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, intestinal VLDL'in Apo B48 yanında Apo B100 de içerdiği, oysa büyük şilomikronların sadece Apo B48 içerdikleri tespit edilmiştir (4).

Lipoproteinlerin hidrofobisiteleri ateroskleroz oluşumuna neden olan en önemli faktörlerden biridir. Lipoproteinlerin hidrofobik özellikleri partikül agregasyonuna sebep olarak aterosklerozu tetikler (5). Besinlerle alınan lipidlerin yağ asidi kompozisyonlarındaki farklılıklar onların hidrofobisitesini etkiler. Bu durum yağların ateroskleroz üzerindeki etkilerinin de farklı olmasına neden olur.

Çalışmamızda ratlar altı farklı yağla beslenmiştir. Yağlardan elde edilen intestinal VLDL (küçük şilomikronlar) analiz edilmiştir. Şilomikron kompozisyonu direkt olarak besinlerle alınan lipit kompozisyonundan etkilendiği için önemlidir. Bu nedenle yağ asidi kompozisyonu, doymuşluk/doymamışlık özellikleri ve mikronütrient içerikleri farklı çeşitli yağlarla beslenen ratların intestinal VLDL'i hidrofobik özellikleri yönünden incelenerek besinlerle alınan lipitlerin intestinal VLDL hidrofobisitesini nasıl etkilediği ortaya koyulmaya ve aterosklerozis ile bağlantıları değerlendirilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Lipoproteinler

Besinsel alınan ve emilen lipidler (eksojen) ile karaciğer ve adipoz dokuda sentezlenen lipidler (endojen), çeşitli dokular arasında kullanılmak ve depolanmak üzere taşınırlar. Lipidler suda çözünmediğinden bunlar sulu bir ortam olan plazmada lipoproteinlerle taşınırlar. Apolar (triaçilgliserol ve kolesterol esterleri) ve amfipatik lipidler (fosfolipidler ve kolesterol) ile proteinlerin suda misel şeklinde yapı oluşturmaları sonucu lipoproteinler ortaya çıkmaktadır. Lipoproteinler, elektroforetik mobilitelerine, yoğunluklarına, flotasyon hızlarına ve büyüklüklerine göre sınıflandırılırlar (7).

Lipoproteinler, ultrasantrifüj ile yoğunluklarına göre şilomikronlar, VLDL, IDL, LDL, HDL, Lp (a) şeklinde alt gruplara ayrılırlar. Bunların yoğunlukları şilomikronda (en düşük yoğunluklu), yüksek yoğunluklu lipoproteine (HDL) doğru artar (8).

Serum ya da plazma lipoproteinleri, alkali pH'da selüloz asetat veya agaroz jel elektroforezi yapılarak da birbirlerinden ayrılabilirler. Elektroforez sonucunda birlikte göç ettikleri globulin fraksiyonunununa göre sınıflandırılırlar; şilomikron uygulanma noktasında kalır, göçme hızındaki artışa göre sırasıyla β -lipoprotein (LDL), pre- β -lipoprotein (VLDL) ve α -lipoprotein (HDL) anoda doğru hareket eder (8).

2.1.1. Şilomikron

Şilomikronlar plazma lipoproteinlerinin en büyük olanlarıdır ve % 98-99 lipid (% 85-90 triaçilgliserol) ve % 1-2 proteinden oluşmaktadır (1). Şilomikronlar, enterositlerde sentezlenirler. Daha sonra torasik lenf kanalına oradan da dolaşıma katılırlar. Eksojen (diyet) yağların başlıca taşınma biçimleridir (7).

2.1.2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (VLDL)

Çapı 300 ile 700 Å⁰ arasında olan bu partiküller % 85-90 (% 55 triaçilgliserol, % 20 kolesterol) ve % 10-15 proteinden oluşmaktadır (1).

Karaciğerde hepatositlerde triaçilgliserol (TAG) ve kolesterol, düz endoplazmik retikulum membranlarına bağlı enzimler aracılığıyla sentezlenir. Apo B-100 ise granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenir. Apo B-100 ve bir miktar apo E, düz endoplazmik retikuluma doğru geçer, granüllü ve düz endoplazmik retikulumun birleştiği bölgede lipid bileşenleriyle birleşerek VLDL tanecikleri halinde birikir. Daha sonra sekresyon veziküllerin golgi cisimciğinden kopmasıyla hücrenin yüzeyine doğru geçerler ve hücre membranına karışarak dolaşıma girerler. Dolaşıma giren yeni sentezlenmiş öncü VLDL, şilomikron öncüsüne benzer. Plazmada HDL'den apo C ve apo E alarak olgun VLDL haline döner. VLDL dolaşımında HDL'den kolesterol ester transfer protein (KETP) aracılığıyla kolesterol alır ve karşılığında HDL'ye TAG verir. Böylece VLDL'in çekirdeği kolesterol esterlerinden (KE) zengin hale döner. VLDL ekstra hepatik dokuların kapillerlerinin endotelinde bulunan lipoprotein lipazın (LPL) kataliziyle TAG'lerinin bir kısmını kaybeder ve VLDL remnant haline (IDL) dönüşür. Bu arada apo C'lerini de HDL'ye geri verir. VLDL artığının bir kısmı karaciğer tarafından LDL reseptörü (apo B, E reseptörü) yoluyla alınır. Geri kalanı ise dolaşımda kalır. Dolaşımdaki VLDL artıklarının (IDL) yoğunluğu 1.0006-1.019 arasındadır. IDL'nin iki akıbeti vardır: (1) % 60-70'i LDL reseptörü aracılığıyla karaciğere girer ve yıkılır. Bu girişten apo E sorumludur. % 30-40'ı LDL'ye dönüşür (8).

2.1.3. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)

LDL (β -lipoprotein): LDL, plazmanın kolesterol taşıyan başlıca lipoproteinidir. Plazmadaki toplam kolesterolün yaklaşık % 70'i LDL'de bulunmaktadır. Çapları yaklaşık 200 Å⁰'dur. LDL yaklaşık %75 lipid (% 35 kolesterol esterleri, %10 serbest kolesterol, % 10 triaçilgliserol ve % 20 fosfolipid) ve %25 proteinden oluşmaktadır (1).

LDL'ler, VLDL'den köken alan lipoproteinlerdir. (4) IDL'nin LDL'ye dönüşümünden hepatik lipaz (HL) sorumludur. HL hem TAG hem de fosfolipidleri

hidroliz eder. Karaciğer endotel hücrelerinde bulunan bu enzim sayesinde IDL karaciğer endotel hücrelerinin içine girmeden fosfolipid, TAG ve apo E'lerini kaybederek LDL haline dönüşür. LDL yapısında apoprotein olarak sadece apo B-100 içerir (8).

LDL'ler bir reseptör bağımlı işlem yardımıyla karaciğer ve öteki dokulara alınırlar; bu proste LDL reseptörüyle tanınan apoB 100 en önemli faktördür. Reseptör aracılığıyla hücreye geçen LDL partikülleri, bu kez hücrede lizozomal enzimlerin etkisiyle hidroliz geçirirler. Bu hidrolizlerin sonucunda kolesterol serbestleşir. Serbestleşen kolesterol; hidrosimetilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktazı inhibe eder. Bu basamak kolesterol sentezinde hız sınırlayıcı basamaktır. LDL reseptörü sentezini inhibe eder. Açıl CoA: kolesteril açıl transferaz (ACAT) enziminin aktivitesini artırarak kolesterolün esterleşmesini uyarır (7).

Dolaşımdaki monositlerden türeyen makrofajlar, reseptörleriyle LDL'leri alabilmektedirler. Arteriyel duvarda makrofajlar tarafından LDL'lerin alınması, aterosklerozisin patogenezisinde önemli bir olaydır. Makrofajlar, KE'ler ile fazla yüklenince, köpük hücrelerine dönüşürler. Köpük hücreleri, ateromatöz plakların klasik bileşenidir (9).

2.1.4. Çok Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (HDL)

Çapları en küçük ve yoğunlukları en fazla olan lipoprotein partikülüdür. Yaklaşık % 50 lipid (% 25 fosfolipid, % 15 KE, % 5 serbest kolesterol ve % 5 TAG) ve % 50 protein içerir. HDL sentezinde başlıca üç kaynak vardır; 1. Karaciğer, olgunlaşmamış "HDL" adı verilen bir apolipoprotein A-I fosfolipid plağı (diski) salgılar. 2. Bağırsaklar da küçük bir apolipoprotein A-I "HDL" partikülünü doğrudan sentez edebilir. 3. "HDL" şilomikronlardan ve VLDL'den gelen yüzey maddesinden üretilir. HDL, anti-aterojen bir lipoprotendir. Yapılan çeşitli araştırmalar HDL kolesterol düzeyleri ile koroner kalp hastalığı insidansı oranında ters bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur HDL çevre dokulardaki aşırı kolesterolün karaciğere taşınarak uzaklaştırılmasından sorumlu ters kolesterol transportunda rol alır (1).

2.1.5. Lipoprotein (a)

Lp (a) , LDL'ye kıyasla daha büyüktür ve yoğundur. Ancak, yapısında her apo B-100 molekülü başına bir molekül apo(a) bulundurması dışında LDL'ye kompozisyon olarak benzerdir. Lp(a) lipoproteininin, miyokard infarktüsü vakalarında, plazma düzeyleri her zaman yüksek bulunmuştur. Daha sonraki yıllarda, koroner arter hastalığıyla direkt ilişkili olduğu ve kalp hastalıkları için bağımsız bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir. Lp(a) molekülündeki yapı, düşük yoğunluklu lipoproteinlerle oldukça benzerlik göstermektedir: Lp(a), apo(a) ve apoB-100 proteinini taşır (9).

2.2. Apolipoproteinler

Apolipoproteinler, enzim aktivitesinin düzenlenmesi, lipoproteinlerin yapısal bileşeni olmak veya lipoprotein reseptörlerince tanınan bölgeleri bulundurmak gibi farklı fonksiyonlara sahiptir.

Appoprotein A: Lipoproteinlerin yapısında Apo A-I, A-II ve A-IV olmak üzere üç tip apoprotein A bulunur (8).

2.2.1. Apoprotein A-I (Apo A-I): Apo A-I insan HDL'sinin temel yapısal proteindir. Şilomikron yapısında da bulunur. Lesitin kolesterol açıl transferazın (LCAT) aktivatörüdür. Lipoprotein metabolizmasında HDL'nin en önemli rolü, tersine kolesterol transportudur ve apo A-I, HDL'nin bu anti-aterojenik aktivitesinde LCAT'ın kofaktörü olarak rol oynamaktadır (8).

2.2.2. Apoprotein A-II (Apo A-II): İnsan Apo A-II'si HDL'nin yapısında en çok bulunan ikinci proteindir ve karaciğerde sentezlenir. Apo A-II, HDL'de apo A-I ile yer değiştirerek HDL'nin hücrelerle, diğer lipoproteinlerle olan ilişkisini düzenler (8).

2.2.3. Apolipoprotein A-IV (Apo A-IV): Şilomikronun major, HDL'nin ise minör bileşeni olan apo A-IV bağırsakta sentezlenir. Plazmada lipoproteinler arasında aktarılabilen bir proteindir. Lipoprotein metabolizmasındaki rolü henüz açıklık kazanmamakla birlikte apo A-I'le ileri derecedeki yapısal benzerliği HDL

metabolizmasında ve tersine kolesterol transportunda apo A-I ile sinerjik etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir (8).

2.2.4. Apoprotein B-100 (Apo B-100) : Sentez yeri esas olarak karaciğerdir. LDL'deki proteinin %95'i apoB-100'dür. VLDL ve IDL'deki proteinlerin yapısında da önemli miktarda bulunur. LDL reseptörünün ligantıdır (1,9).

2.2.5. Apoprotein B-48 (Apo B-48) : Bağırsaklarda sentezlenir. Sadece şilomikron ve şilomikron remnantlarında bulunur. Bu proteini taşıyan büyük lipoprotein partikülleri monosit, makrofaj ve endotel hücresi yüzeyinde tanımlanmış olan apoB-48 reseptörüne bağlanarak bu hücrelerin köpük hücre şeklinde değişmesine sebep olabilir. (9).

2.2.6. Apoprotein C-I, C-II, C-III (Apo C-I, C-II, C-III) : Her üçü de karaciğerde sentezlenir. Yine üçü de şilomikron, VLDL, IDL ve HDL'nin minör komponentidir. Apo C-I, lesitin kolesterol açıl transferazın aktivatörüdür. Apo C-II lipoprotein lipaz aktivitesi için gereklidir. Apo C-III, VLDL'in major proteinidir. Hem lipoprotein lipazın aktivitesini baskılar hem de şilomikron ve VLDL artıklarının karaciğer tarafından alınmasını engeller (9).

2.2.7. Apoprotein E (Apo E) : Karaciğerde sentezlenen bu protein LDL hariç tüm lipoproteinlerin yapısında bulunur. Şilomikron ve VLDL'in protein yapıtaşıdır. Apo E bu lipoproteinlere HDL'den sağlanır. Plazmadaki apo E'nin yaklaşık yarısını taşıyan HDL aynı zamanda apo E'nin önemli fonksiyonlarından biri olan lipidlerin ihtiyaç fazlası olduğu yerlerden ihtiyaç duyulan hücrelere taşınmasını sağlar (9).

2.3. Besinsel Lipitlerin Sindirimi

Besinsel lipidlerin temel bileşeni triaçilgliserollerdir. İnsanda besinsel TAG'lerin sindirimi asid lipaz enzimi ile midede başlar. Bu enzim kemirgenlerde, tükürükte salgılanır. Hayvanlar asid lipazın dominant formlarından (lingual lipaz ve gastrik lipaz) yalnız birine sahiptir. Dilin arkasındaki bezlerden köken aldığı düşünülen lingual lipaz midede sindirimi başlatır. Ancak midede emülsifikasyon olmadığı için sindirim yavaştır. Kısa ve orta zincirli TAG'ler, gastrik lipazla yıkılır. Yeni doğan ve bebeklerde, pankreatik lipaz sistemi henüz tam olarak oluşmadığı için

gastrik lipazın etkisi önemlidir. Erişkinlerde besinsel lipitlerin ağız ya da midede pek değişikliğe uğramadan bağırsağa geçtiği belirtilmektedir. Midede TAG'lerin yaklaşık % 30'u sindirilir (2,10).

Besinsel lipidler mideden sonra duodenuma geçerler ve duodenal mukozadan pek çok hormonun salgılanmasına neden olurlar. Üst ince bağırsak lümenine ulaşan ve kısmen sindirilmiş olarak gelen proteinler, hepatokinin salgılanmasına neden olurlar bu hormon karaciğerde safra yapımını uyarır. Sindirim sırasında salgılanan diğer bir hormon kolesistokinindir. Kolesistokinin safra kesesinin kasılmasına ve safra salgılamasına, pankreasın ekzokrin hücrelerinin sindirim enzimleri salgılamasına neden olur. Ayrıca mide hareketlerini azaltır, böylece mide içeriği yavaş yavaş bağırsağa geçer. Sonrasında gastrik HCl'nin bağırsağa gelmesiyle sekretin hormonu salgılanır. Bu hormon mideden bağırsağa akan sıvının düşük pH'sına yanıt olarak salgılanır ve pankreasın bikarbonattan zengin bir sıvı salgılamasını sağlar. Bu sıvı bağırsak içeriğinin pH'sının nötralleşmesini sağlar ve böylece pH, sindirim sistemi enzimatik aktivitesi için uygun hale gelir. Lipit sindirimi sırasında duodenuma akan safra asitleri, pankreatik lipazı inaktive eder. Pankreas sıvısı içinde bulunan kolipaz, bu inaktivasyonu önler. Kolipaz hem lipid-su ara yüzeyine hem de pankreatik lipaza bağlanarak lipaz aktivitesini sağlar. Pankreatik lipaz TAG'in 1. ve 3. karbonundaki yağ asitlerini hidroliz eder ve 2 mol yağ asidi ve 2-monoaçilgliserol (2-MAG) meydana gelir. Bu hidroliz lipid damlacığı ve onu çevreleyen sulu fazın arasındaki yüzeyde meydana gelir. Besinsel lipidlerin bağırsağa geçmesinin arkasından safra tuzları da bağırsağa geçer ve lipidlerin emülsifiye olmasını sağlarlar. Emülsifikasyon, lipid damlacığının yüzey alanını artırır, böylece sindirim enzimleri daha etkin olarak aktivite gösterirler. Kolesterol esterleri, pankreatik kolesterol ester hidrolaz enzimi ile hidroliz edilir. Kolesterol ve serbest yağ asitleri oluşur. Fosfolipidleri ise Fosfolipaz A2 hidroliz eder. Fosfolipidin ikinci karbonuna bağlı yağ asidini ayırır böylece lizofosfolipid oluşur. Birinci karbona bağlı yağ asidi ise lizofosfolipaz tarafından koparılır (2,7,10).

Serbest yağ asitleri, serbest kolesterol, 2-monoaçilgliserol jejunumdaki besinsel lipidlerin yıkım ürünleridir. Safra tuzları ince bağırsağın proksimal kısmındaki bu hidroliz ürünleri ve su ile etkileşime girerek miselleri oluştururlar.

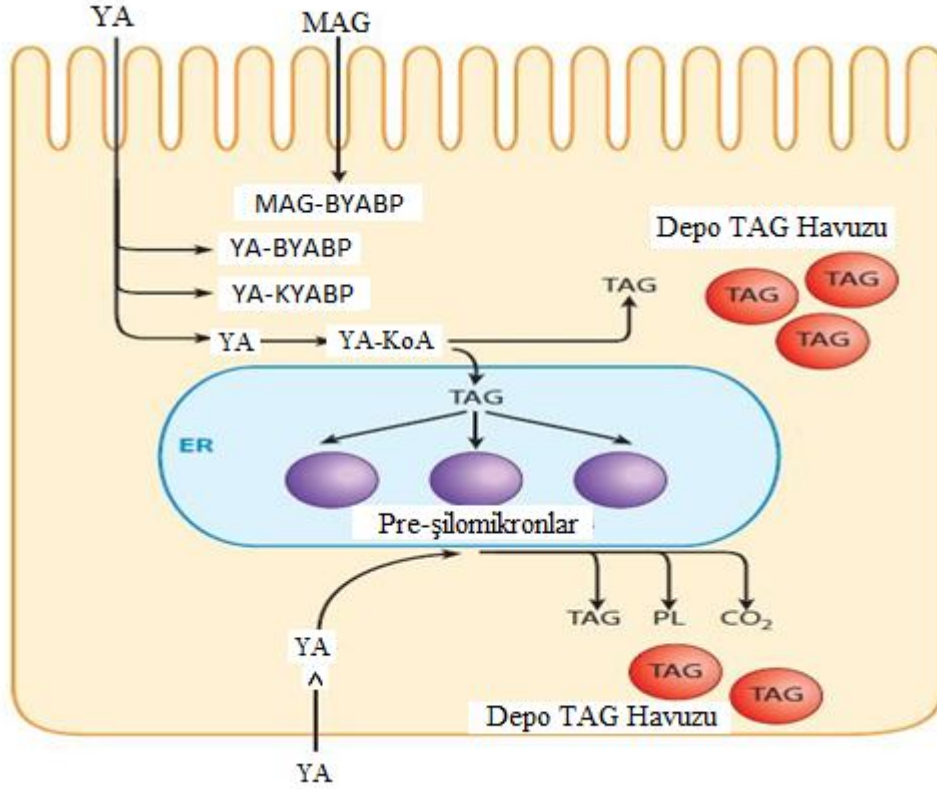
Misel yapılar ile lipidler çözünebilir hale gelirler. Misel yapıda lipidlerin hidrofobik grupları yapının iç kısmında hidrofilik grupları ise yapının dış kısmında yer alır. Ayrıca bu misel oluşumu ince bağırsaklarda suda çözünen lipazların lipid molekül fraksiyonlarıyla etkileşimini artırır. Misel yapıları bağırsak mukoza hücrelerinin fırçamsı kenar membranına yaklaşırlar. Bu membran neredeyse kımıldamayan ve lümendeki akuöz faz ile karışmayan ince bir su tabakası ile intestinal lümen içeriğinden ayrılmıştır. Misellerin hidrofilik yüzeyleri hidrofilik lipidlerin bu su tabakasından geçerek fırçamsı kenar membranından daha kolay emilmelerini sağlar. Böylece lipazların aktivasyonu ile oluşan hidroliz ürünleri, ince bağırsağın intestinal mukozasındaki epitel hücrelerin ER'na geçmiş olur (2).

2.3.1. Besinsel Yağ Asitlerinin Endoplazmik Retikuluma Hareketi

Yağ asitlerinin serbest sitozolik konsantrasyonlarının düşük kalması için hemen hemen tamamının yağ asidi bağlayıcı proteinlere bağlı olması gerekir. Aksi takdirde yağ asitleri, hücre membranına zarar vererek potansiyel hücre ölümüne sebep olurlar. Bunların zararlı etkilerini azaltma mekanizmalarından bir tanesi enterositlerde bulunan yağ asidi bağlayıcı proteinlere (YABP) bağlanmalarıdır. Hem karaciğer (KYABP) hem de bağırsakta büyük miktarda bulunan yağ asidi bağlayıcı proteinler (BYABP) bu durumu desteklemektedir. Rat bağırsağında KYABP ve BYABP'ler hemen hemen eşit miktarlarda bulunurken insan otopsi çalışmalarında KYABP'lerin daha baskın olduğu rapor edilmiştir. Ek olarak her iki YABP'lerin temel olarak hem insan hem de ratlarda besinsel lipidlerin emilim yeri olan proksimal bağırsakta bulunduğu ve yine her ikisinin de yüksek yağ diyeti ile beslenmiş ratlarda %50 arttığı gösterilmiştir. Farelerde sadece KYABP'ler yağlı beslenme ile artar. Özet olarak bu bilgiler KYABP ve BYABP'lerin diyet lipid absorpsiyonunda aktif rol oynadıkları anlaşılmaktadır (11,12).

Absorbe edilmiş besinsel yağ asitlerinin enterositlerin ER'larına iletilmesinde görevli diğer bir mekanizma, yağ asitlerinin Yağ Asidi Taşıyıcı Protein-4 (YATP-4) ile açılasyondur. Bu protein bağırsak lümeninden serbest yağ asitlerinin %60'undan fazlasının alınmasından sorumludur. Açıl KoA-sentetaz olarak görev yaparak aktive olmuş yağ asidinin açıl-KoA'ya dönüşümünde rol alır. Yağ asidi-CoA aynı zamanda misel oluşumuna neden olabilir ve kritik misel konsantrasyonunu aştıkları zaman

hücre membranına zarar verirler. Şekil 2.1’de de görüldüğü gibi yağ asitleri enterosit içine apikal membrandan girerlerse yeni oluşturulan TAG’lerin daha çok şilomikron oluşumuna katıldıkları eğer bazolateral membrandan girerlerse oluşan TAG’lerin sitozoldeki TAG depo havuzuna katıldıkları rapor edilmiştir (12).



Şekil 2.1. Besinsel lipidlerin absorpsiyonu ve TAG’lere dönüşümü (12).

Diyet TAG’lerin pankreatik lipaz ile hidroliz edilmeleri sonucu oluşan serbest yağ asitleri ve 2-MAG enterositler tarafından absorbe edilir. MAG, karaciğer yağ asidi bağlayıcı proteine (KYABP) bağlanırken, yağ asitleri ya bağırsak yağ asidi bağlayıcı proteine (BYABP) ya da karaciğer yağ asidi bağlayıcı proteine (KYABP) bağlanır. Yağ asitleri, aynı zamanda yağ asidi-taşıyıcı protein 4 (YATP-4) ile yağ asidi-asetil CoA’ya dönüştürülür. Yağ asidi ve MAG’ler, ER’un kompleks lipid sentezleyici enzimleriyle TAG’lere dönüştürülürler ve ER lümeninde şilomikron oluşturmak üzere bulunan TAG’lere katılırlar. Alternatif olarak enterositlere eğer büyük lipid damlacıkları girerse, bunlar sitozolde TAG damlacıkları olarak TAG depo havuzuna girerler. Yağ asitleri enterositlere bazolateral membrandan girerse, muhtemelen yağ asidi bağlayıcı proteinlerle ER’a taşınır ve TAG’e dönüştürülürler. Fakat bu TAG’ler daha ziyade TAG havuzuna girerler ve sonra şilomikron oluşturmak üzere bulunan TAG’lere katılırlar. Yağ asitleri aynı zamanda ya fosfolipidlere katılabilir ya da mitokondride CO₂’ye metabolize edilirler (12).

İntestinal mukozadaki epitel hücrelerin ER'una geçmiş olan hidroliz ürünlerinden burada tekrar TAG oluşturulur. Enterositlerdeki TAG sentezi 2 metabolik yolla oluşur. Monoaçil gliserol (MAG) metabolik yolu ve gliserol-3-fosfat metabolik yolu;

Monoaçilgliserol metabolik yolu

1. 2 MAG, monoaçilgliserol açil tranferaz (MGAT) enzimi ile diaçilgliserole dönüşür.
2. Diaçilgliserol (DAG), diaçilgliserol açil transferaz (DGAT) ile TAG'e dönüşür.

Gliserol 3-fosfat metabolik yolu

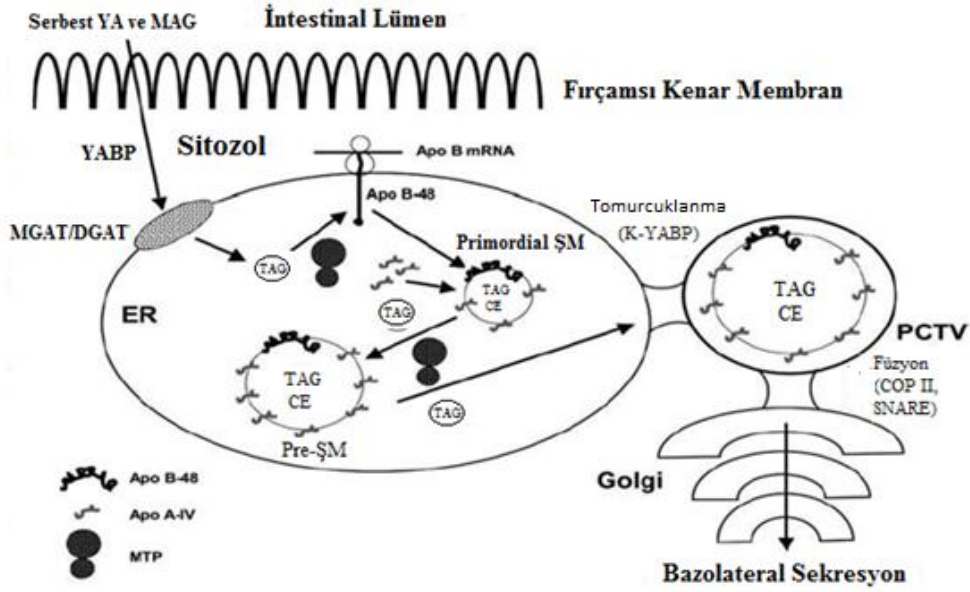
1. Gliserol-3-fosfat, gliserol fosfat açiltransferaz ile lizofosfatidik aside dönüşür.
2. Lizofosfatidik asit, fosfatid fosfohidrolaz ile fosfatidik aside dönüşür.
3. Fosfatidik asit, fosfohidrolaz ile DAG'e dönüşür.
4. DAG, diaçilgliserol açil transferaz (DGAT) ile TAG'e dönüşür (13).

2.3.2. Şilomikronların Endoplazmik Retikulum İçinde Oluşumu

Şilomikronlar ER lümeni içerisinde 2 aşamalı bir işlemle oluşurlar. İlk aşamada, apolipoprotein B-48, kolesterol, fosfolipid, apolipoprotein A-IV ve az bir miktar triaçilgliserol (TAG) içeren yüksek yoğunluklu bir partikül oluşturulur. İkinci aşamada bu primordial şilomikron, pre-şilomikron oluşturmak için büyük bir TAG-kolesterol ester külesiyle birleşir (ki bu kütle apoB-48'e sahip değildir) ve cis-Golgiye transport edilmeye hazır hale gelir (14).

Sentezin ilk aşaması ER lümenindeki proteinin aminoterminal kısmı ile apoB-48'in translasyonunu içerir, ancak apoB-48 diğer sekretuar proteinlerin aksine eğer ki primordial şilomikronla birleşirse normal metabolik yoluna devam edebilir ve salgılanabilirler. Aksi durumda apoB-48 Ubiquitin-proteosome sistem tarafından parçalanır. Mikrozomal transfer protein apoB-48 lipidasyonunu gerçekleştirir ve böylece apoB-48 parçalanmadan kurtulur. ApoB-48, apo-B100 ile aynı gen tarafından kodlanır ve apoB geninin N-terminal kısmının % 48'inin translasyonu

sonucunda Şu Şekilde oluşur; genomik DNA'da mevcut olmayan RNA yazıcı mekanizmalar tarafından oluşturulan bir stop kodon translasyonu durdurur. Bu stop kodon (UAA), apoB-mRNA'nın 6666'ncı nükleotidinde 2153. amino asid glutamini kodlayan CAA kodundaki sitozin bazının urasil bazı ile deĐiŐmesiyle oluşur. Yeni oluşan apoB-48'de apoB-100'de bulunan 2 β -tabakasının yalnız ilki ve 2 α -heliks kalır. Aynı zamanda yeni oluşan bu apoB-48, translokon yolağını yavaŐlatan veya durduran bir seri durdurma transfer zincir dizilimine sahiptir. Fakat translokasyon bu durdurma serisi ile değil β -sheet tarafından sınırlandırılır. ApoB-48, translokonu terk ederek mikrozomal transfer proteine (MTP) bağlanır. Oluşan apoB-48 MTP'ye ek olarak, aynı zamanda fosfolipidlere bağlanır ki bu olay onun nihayi sekresyonu için çok önemlidir. Ayrıca küçük bir miktar triaçilgliserol, olgunlaşmamış yüksek yoğunluklu bu lipoproteine eklenir. Tüm primordial Şilomikron HDL'ye benzer bir yoğunluğa sahiptir. Yeni oluşan bu primordail Şilomikron içeriğinde bulunan suda çözünmeyen apoB-48 sayesinde ER membranını geçerek ve ER lümenine gelir. Lmende bulunan TAG'den zengin partikül, TAG'leri ER membranının sentez bölgesinden alan MTP aracılığı ile alır ve onu yeni oluşan partiküle katar. TAG'den zengin partikül muhtemelen fosfolipid-kolesterol tabakası ve apoA-IV eklenmesiyle stabilize olur ve apoB-48 içeren primordial Şilomikron ile birleşerek preşilomikronun oluŐmasını sağlar. Şekil 2.2'de görüldüğü gibi TAG'den zengin partikül üzerinde apoB-48 olmadan bu partikül ER'den ayrılamaz, TAG'den zengin partikül üzerindeki apoB-48 pre-Şilomikronun ER'den ayrılmaya hazır olduğunun göstergesidir (14,15).



Şekil 2.2. Şilomikron oluşumu (16).

Yağ asidi bağlayıcı protein (YABP), Monoaçilgliserol açiltransferaz (MGAT), Diaçilgliserol (DAGT), şilomikron (ŞM), Triaçilgliserol (TAG), kolesterol esterleri (CE), karaciğer yağ asidi bağlayıcı protein (K-YABP), Coat protein kompleks II (COP II), Preşilomikron Transport Vezikül (PCVT)

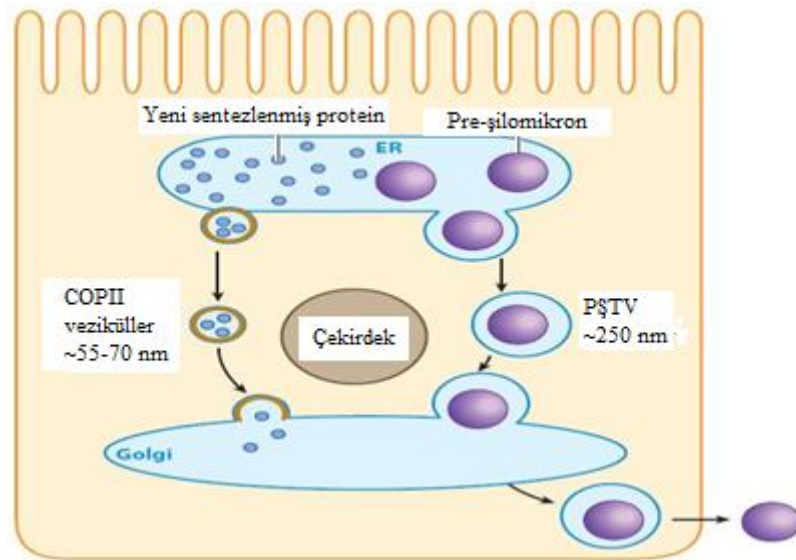
2.3.3. Pre-şilomikronların ER'den Ayrılması

Pre-şilomikronlar ER'den sentezlendikten sonra sekretuar yol boyunca cis-Golgi'ye tranfer olurlar (Şekil 2.3). Pre-şilomikronların ER'den golgiye hareketi kompleks olaylardan meydana gelen 2 ana aşamadan oluşur. Pre-şilomikronların ER'den ayrılmaları onların enterositlerden itibaren tüm sekresyon aşamalarında hız kısıtlayıcı basamak olarak tanımlanmıştır. Preşilomikronların boyutlarının çok büyük olması sebebiyle (ortalama 250 nm çapında) ER'den Golgi membranına transferi çok açık değildir. Bu bilgiler dahilinde yeni sentezlenen proteinler, ER'den Golgiye membran bağlayıcı veziküller içinde taşınırlar. Protein transport veziküllerinin biyogenizisini düzenlediğinden dolayı bu veziküller sıklıkla Coat protein kompleks II (COP II) vezikülleri olarak adlandırılırlar. COPII, 5 farklı sitozolik proteinden oluşur. Bu veziküllerin biyogenesi oldukça organize ve ER membranının ER çıkış bölümleri olarak bilinen farklı bölümlerinde oluşur. Çapları 55-70 nm arasında değişir. Son yapılan çalışmalarda cryoelektron mikroskopuyla bu proteinlerin yapısı

aydınlatılmış ve COPIIcoat'nin geometrik yapısının esnek olduğu ortaya konulmuştur. Ancak 100µm den daha fazla esneyemediği bu nedenle de preşilomikronların taşınması için uygun olmadığı rapor edilmiştir (12).

2.3.4. Pre-şilomikron Transport Vezikülünün Biyogenezisi

Pre-şilomikronun ER'dan çıkışı standart COP-II aracılı ER-tomurcuklanma prosesini izlemez. Olgunlaşmamış pre-şilomikronun ER membranından nasıl çıktığına dair bir çalışmada yapılan in vitro değerlendirmeler yeni bir vezikülün varlığını ortaya koydu, pre-şilomikron transport vezikül (PŞTV). PŞTV'ler TAG'den zengin içeriklerinden kaynaklanan hafif yoğunluklarıyla diğer veziküllerden izole edilebildi. Elektron mikroskobu ve jel kromatografisi sonuçları PŞTV'nin ortalama 250 nm çapında olduğunu ve bunun da pre-şilomikron partiküllerinin yerleşmesi için yeterli büyüklükte olduğunu gösterdi. Çalışmalar PŞTV'lerin, protein transport veziküllerden büyüklük, yoğunluk, içerik ve ER membranından biyogenezisi ile ayrıldığını göstermektedir. COPII proteinleri PŞTV oluşumunda gerekli olmamalarına rağmen PŞTV'nin Golgi ile birleşmesinde oldukça önemlidir. Golgi tarafından tanınmasında bir belirleyici olarak rol aldıkları bildirilmiştir. COP II proteinleri içermeyen PŞTV'lerinin Golgi ile birleşmedikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (12).



Şekil 2.3. Preşilomikronun hücreler arası taşınımı (12).

2.3.5. Preşilomikron Transport Vezikülünün Biyogenisisinin Düzenlenmesi

PŞTV tomurcuklanması, guanozin tri fosfat (GTP)'ye ihtiyaç duymazken protein transport vezikül biyogenisi GTP bağımlıdır. Oysa PŞTV oluşumu, ATP bağımlıdır. PŞTV biyogenisinde, ATP gereksinimi kinaz ve/veya fosforilasyon olaylarında olur. PŞTV oluşum regülasyonunda protein kinaz C'nin önemli bir rol aldığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bu proteinin sentezi için Sar I gereklidir. Ayrıca karaciğer yağ asidi bağlayıcı protein (KYABP) PŞTV'ün sentezinde anahtar rol oynarken, diğer proteinler PŞTV'ün Golgi ile birleşmesinde önemli rol oynarlar (12).

2.3.6. Preşilomikron Transport Vezikülün Cis-Golgi ile Birleşmesi

PŞTV'ler, sitozol içine serbestleştiklerinde bir sonraki basamak Golgi ile birleşme aşamasıdır. PŞTV'lerin taşınımı morfolojik ve biyokimyasal olarak transport vezikül proteinlerinden farklı görünmektedir. Genel olarak çözünebilir N-etilmalemid sensitive factor protein reseptör (SNARE) , vezikülün hedef membran ile birleşmesini hızlandırır ve kolaylaştırır. SNARE'ler vezikülerde bulunan membran proteinleridir. Bu proteinler, PŞTV'lerin Golgi ile birleşmesinde önemli görevler alırlar. SNARE hem vezikül membranında (v-SNARE) hem de hedef membranında (t-SNARE) bulunur. Vezikül membranında bulunanların merkezinde arjinin (R) kalıntısı bulunur R-SNARE, hedef membranında bulunanların merkezinde glutamin (Q) kalıntısı bulunur Q-SNARE. PŞTV-Golgi birleşmesini sağlayan koşullar altında 112-kDa ağırlığındaki SNARE kompleks molekülünü oluşturan proteinler bir araya gelir. Bu kompleks yapının üyelerinden her birinin fonksiyonel olarak bloke edilmesi sonrası PCTV-Golgi birleşmesinde önemli bir inhibisyon meydana gelir (12,13)

2.3.7. Şilomikronların Golgide Transformasyonu ve Post-Golgi Transportu

Golgi membranı ile birleşme olduğu zaman PŞTV, preşilomikron içeriğini Golgi lümenine aktarır. Golgi lümeninde iki transformasyon olayı olur. Birincisi normalde PŞTV içindeki preşilomikronda bulunmayan apoA-I'in Golgide

preşilomikron tarafından kazanılmasıdır. İkincisi, apoB-48'in glikolizasyonudur. Bu olaylar sonucunda şilomikron olgunlaşmış olur. Şilomikronların Golgiden ayrıldıktan sonraki akıbeti hakkında az bilgi bulunmakla birlikte morfolojik bilgiler bir vezikülün bunları taşıdığını işaret etmektedir. Burada vezikül, Golginin bazoleteral membranı ile birleşir ve şilomikronlar lamina propiye içine ters ekzositoz ile torasik kanal yoluyla dolaşıma katılmak üzere serbestleşirler (12).

2.4. İntestinal VLDL (Küçük Şilomikron)

Şilomikronlar (yunanca: şilus, chyle, mikron, çok küçük nesne) lipid absorpsiyonu sırasında bağırsaklar tarafından oluşturulur, diyet yağlarını ve yağda çözünebilen vitaminleri kan dolaşımına transport ederler (17).

1622 yılında Asellius, şilomikron sentezi ve transportu sonrasında mezenterik lenfte süt beyazlığında bir görünüm oluştuğunu ortaya koydu (17). Açıklık durumunda ratlarda endojen lipidlerin, mesenterik lenflerin lipoproteinlerine tranportu incelendiğinde lenfte şilomikrona ek olarak önemli miktarda daha yoğun triaçilgliserolden zengin başka bir fraksiyon (intestinal VLDL veya küçük şilomikron) olduğu Ockner ve arkadaşları (4) tarafından gösterilmiştir. Hepatik lipoprotein sekresyonu orotik asit tarafından bloke edildiği zaman açlık durumundaki hayvanlarda intestinal mukozal hücrelerde ve mezenterik lenflerde bu partiküllerin görülmesi durumu bu partiküllerin bağırsaktan sentezlendiğine işaret etmektedir (18).

Açlık durumunda intestinal lenfteki endojen lipidlerin çoğu % 47 triaçilgliserol (TAG) ve % 54 kolesterolden oluşan intestinal VLDL içinde taşınırlar (19). Ockner, Hughes ve Isselbacher, (20) elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalarda intestinal VLDL büyüklüğündeki partiküllerin aynı zamanda düşük yağ absorpsiyonu sırasında da bağırsak tarafından üretildiği gösterilmiştir. İnce bağırsaklar tarafından üretilen ve salgılanan intestinal VLDL partikülünün sayısı ve TAG içeriğinin açlık durumunda ve aktif lipid absorpsiyonu sırasında hemen hemen sabit kaldığı görülmüştür. Yine aynı çalışmalarında, doymuş yağ asitlerinin (palmitat) misel absorpsiyonunun VLDL büyüklüğündeki partiküllerin oluşumuyla sonuçlandığını, doymamış yağ asitlerinin ise daha büyük şilomikron partikülleriyle sonuçlandığını gösterdiler. Bu bulguları bağırsak içine doymamış yağların daha büyük konsantrasyonlarını infüze eden Redgrave (21) tarafından onaylanmadı. Bu

çelişkinin muhtemelen doymuş yağ asitlerinin daha yavaş absorbe edilmesinden ve Ockner ve arkadaşlarının (20) daha düşük misel konsantrasyonunu infüze etmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir.

İntestinal VLDL'in Sf (Svedberg flotasyon oranı-santrifugal alanda bir molekülün hareket hızının bir ölçüsüdür) 20-400 iken şilomikronların flotasyon oranı 400 Svedberg ünitesinden daha büyüktür. İntestinal VLDL, şilomikronlardan sadece flotasyonları bakımından değil aynı zamanda agaroz jeldeki elektroforetik hareketleri ve lipid kompozisyonu ve metabolizmaları bakımından da farklıdır. Her iki fraksiyon da orjinde kalmalarına rağmen agaroz jeldeki hareketleri bakımından önemli ölçüde farklılık gösterirler. Bu ortamda şilomikron orjinde kalır oysa intestinal VLDL, α_2 -globulin bölgesine hareket eder (4).

İntestinal epitel hücrelerdeki Golgi organeli, partiküllerin iki ayrı popülasyonunun üretimine katılır. İntestinal Golgi aparatından elde edilen negatif boyanan partiküllerin ölçümü iki ayrı popülasyonu büyüklük açısından ortaya koymuştur. Büyüklükleri 250-800 A^0 aralığında olan partiküller intestinal VLDL olarak yorumlanmıştır. 800 A^0 'dan büyük olan partiküller ikinci popülasyonu oluştururlar ve bunlar da şilomikron olarak yorumlanmıştır (22).

İntestinal VLDL'in lipid içeriği plazma VLDL'den çok şilomikronlarınkine benzer. İnsan intestinal VLDL'in apoproteinleri; apo B, apoA-IV, apo E, apoE-I, apoA-II ve C-peptidden oluşur. apoA-IV (%20-30) ve apo B içeriği VLDL'de şilomikronlardan daha fazladır ve apoC içeriği daha düşüktür. Fakat orta molekül ağırlıklı apolipoproteini farklıdır. Arjininden zengin protein (apo E) rat plazma VLDL'inde hemen hemen tüm orta moleküler ağırlıklı proteinleri kapsar fakat bunların sadece az bir kısmı intestinal VLDL içerir. Ayrıca hem şilomikronlar hem de intestinal VLDL'ler apoB-48 içerirler. İntestinal VLDL buna ek olarak apoB100 de içermektedir (23).

İntestinal VLDL, plazma ile inkübe edildiğinde apoE ve C protein kazanır, apoA-I ve A-IV'ü kaybeder bunun sonucunda agarozda α_1 'den α_2 'ye hareketinde bir değişim meydana gelir. Plazmayla inkübasyondan sonra intestinal VLDL plazma VLDL'in özelliklerini kazanır. İntestinal VLDL, plazma VLDL'den çok

şilomikronlara daha fazla benzediğinden dolayı, küçük şilomikronlar olarak da isimlendirilmektedir. İntestinal VLDL'in en azından bir kısmının farklı bir mekanizmayla üretildiğine dair kanıtlar vardır. Glickman ve Kirsch (24) şilus asidik sıvısındaki çalışmalarında şilomikron büyüklüğündeki azalmayla birlikte şilomikronun apo B içeriğinde bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Fakat intestinal VLDL, küçük şilomikronlardan daha fazla apoB içermektedir. Bu durum intestinal VLDL'in tam olarak küçük şilomikron olmadığını işaret etmektedir. Bu bulgu Mahley ve arkadaşları (22) tarafından da yaptıkları çalışmada desteklenmiştir. Bu yüzden bir miktar VLDL'in muhtemelen bağırsakta farklı bir yoldan üretiliyor olması veya şilomikron oluşumuna katılan farklı bir lokalizasyonun bulunması muhtemeldir (23).

Plazma VLDL'in lipid kompozisyonu %73,3 TAG, %15,5 fosfolipid, %2,3 serbest kolesterol ve %5,8 kolesterol esterden oluşur. Protein toplam kütleinin %4'ünü oluşturur. Daha küçük çaplı VLDL'lerde polar bileşen miktarı daha fazladır. VLDL'in kolesterol içeriği şilomikronlardan fazladır. Serbest kolesterol/kolesterol ester oranı VLDL'de 0,4 iken şilomikronda 1'dir. Benzer serbest kolesterol/kolesterol ester oranları Ockner (18) tarafından da gözlemlenmiştir. VLDL gibi hacimine göre daha büyük yüzey alanına sahip daha küçük partiküllerin bu nedenle nispeten daha fazla protein, fosfolipid, kolesterol ve daha az TAG içermesi beklenir. Eğer VLDL basit olarak küçük şilomikronlar olarak ifade ediliyorsa hacim oranına göre yüzey alanında eş zamanlı bir artış beklenilir ki bu artış VLDL'deki serbest kolesterol/kolesterol ester oranındaki artışı yansıtır. Fakat daha düşük bir oran gözlemlenmiştir. Bu da şilomikron oluşumundan farklı olarak VLDL fraksiyonunun bir kısmının bağırsakta bir lokalizasyonda veya farklı bir işlemle üretilmiş olabileceğinden kaynaklanmaktadır (25).

Safra diversiyonu veya kolestimamin uygulaması ratlarda VLDL'in intestinal mukozal hücrelerden ve mezenterik lenflerden azalmasına neden olur. Bu durum açlık durumundaki intestinal VLDL üretiminin, bağırsaktan safra lipidlerinin reabsorpsiyonu ve sekresyonu için farklı bir mekanizma geliştirdiğini göstermektedir (17).

2.4.1. İntestinal VLDL metabolizması

İntestinal VLDL veya küçük şilomikronlar muhtemelen şilomikronlara benzer şekilde metabolize edilirler. Rat veya insan intestinal VLDL'in plazma ile inkübe edilmesi plazma VLDL'e benzer olarak agarozda α_1 'dan α_2 'ye olan hareketlerini arttırır. Bu muhtemelen apoprotein içerğindeki değişmeyle ilgilidir. İnsan intestinal VLDL'i plazma ile inkübasyonunda apoE ve apoC kazanır (23).

Açlık durumunda plazma lipoprotein havuzuna intestinal VLDL'in katkısını araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar plazma triaçilgliserol seviyelerinin katkısı üzerine yoğunlaşmıştır. Ratlara plazma triaçilgliserol seviyesinin % 20'lere düşmesiyle sonuçlanan hepatektomi uygulandığında bağırsağın plazma TAG seviyesine % 20 oranında katkıda bulunduğu görülmüştür. Benzer % 20 oranları hayvanlara orotik asit uygulandığında da elde edilmiştir. Başka bir çalışmada total plazma VLDL döngüsüne bağırsağın katkısının % 40 civarlarında olduğu bildirilmiştir. Yakın zamanlarda yapılan diğer bir çalışmada Triton WR 1339 enjekte edildikten sonra intestinal lenf TAG salınımı ve hepatik ve total VLDL sekresyonu oranlarını plazma VLDL'in birikiminin ölçülmesiyle hesaplanmış ve açlık durumunda plazma VLDL'ne bağırsağın katkısının sadece % 11, lipidle beslenmeyen ratlarda ise bu oranın % 14-17 arasında olduğu tespit edilmiştir. Triton WR-1339'un, TAG lipoproteinlerinin uzaklaştırılmasını bloke ettiği bilinmektedir. Fakat yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada Triton verilmiş ratlarda plazma HDL yapısında şiddetli bir değişim olduğu gösterilmiştir (23).

Güldür T. tarafından küçük şilomikronlarda orta molekül ağırlıklı apolipoproteinlerin büyük şilomikronlara benzer oranlarda bulunduğu fakat büyük şilomikronlarda apo B'nin total apolipoprotein alanının % 8,5'ini, apo C'nin % 32'sini teşkil ederken küçük şilomikronlarda apo B total alanın %24,6'sını apo C'nin ise % 19,8'ini teşkil ettiğini ve benzer sonuçların rapor ettiler Green ve arkadaşları (26) tarafından da bulunduğu rapor edilmiştir. Hepatektomize ratlarda küçük şilomikronların (intestinal VLDL) lipolizi sonrasında, büyük şilomikronlarda olduğu gibi apo A-I, A-IV ve C'nin kaybolduğu fakat apo E, B-48 ve B 100 apoproteinlerinin muhafaza edildiği, büyük ve küçük şilomikron remnantlar

arasındaki apoprotein kompozisyonu açısından tek farkın küçük şilomikron remnantlarda apoB-100'ün varlığı olduğu Güldür T. tarafından bildirilmiştir (25).

Chajek-Shaul ve arkadaşları intestinal VLDL'in metabolik heterojenitelerini araştırmışlardır. [³H] kolesterol ve [¹⁴C] palmitat-işaretli TAG ile işaretlenmiş intestinal VLDL'ler, açlık süresince rat mezenterik lenflerinden toplanmış ve lipoprotein lipaz ile lipolize maruz bırakılmışlardır. Post-lipoliz şilomikronlar zonal ultrasentrifügasyonla ayrılmış ve intact ratlardaki biyolojik davranışları için test edilmişlerdir. Mesenteric lenf intestinal VLDL'ler üzerinde, lipoprotein lipazın aktivasyonu sonucunda LDL benzeri partiküller oluştuğu görülmüştür (27).

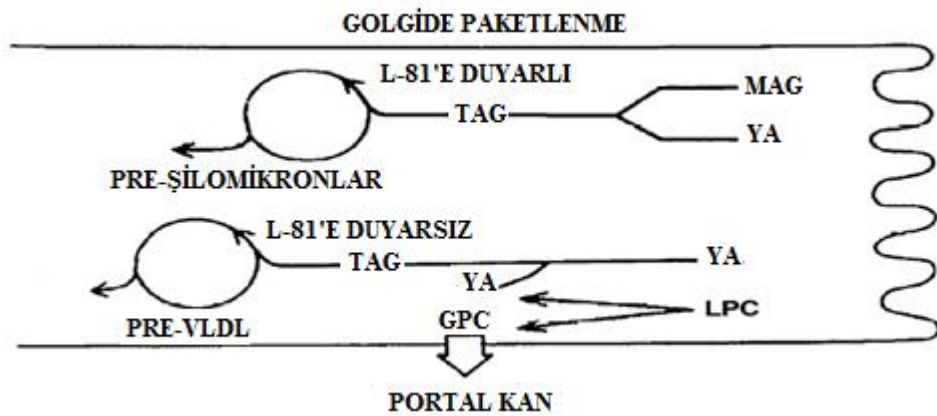
Windler ve arkadaşlarının çalışmalarında büyük şilomikron remnantlar ve intestinal VLDL remnantlarının karaciğer tarafından alım mekanizmaları ve uzaklaştırılmaları karşılaştırılmış ve her iki tür remnantın da reseptör aracılı endositoz yoluna alındığı bildirilmiştir. Ancak büyük şilomikron remnantlar karaciğer tarafından süratle uzaklaştırılıp metabolize edilmelerine karşın intestinal VLDL'ler daha yavaş bir şekilde uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir. Bu muhtemelen Apo B kompozisyonlarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır (28).

Patrick TSO ve ark.ları çalışmalarında yumurta-lesitin infüzyonunun ince bağırsaklarda bazı araştırmacılar tarafından küçük şilomikron olarak ifadelendirilen VLDL-büyüküklü lipoproteinlerin transportunu uyardığını gösterdiler. Aynı zamanda yumurta-lesitin infüzyonu sonrasında L-81'in lenfe lipid (intestinal VLDL) transportunu etkilemediğini yalnızca şilomikron partiküllerinin birikimini etkilediğini ortaya koymuşlardır. Bu sonuçların ışığında şilomikron ve VLDL'in enterositler tarafından ayrı bir şekilde paketlenmekte olduğunu ileri sürmüşlerdir (29).

Patrick TSO şilomikronların ve intestinal VLDL'lerin ince bağırsakta paketlenmesi ile ilgili 2 farklı yol olduğunu gösteren farklı çalışmalar bulunduğunu ifade etmişler ve bu çalışmaların kendi çalışmalarıyla uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Örneğin, Ockner Hüge ve Isselbacher (19) palmitat infüzyonunun VLDL transportunda artışa neden olduğu tespit etmişlerdir. Oysaki oleat ve linoleat infüzyonunda lenf VLDL salınımında bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Bundan başka yine çalışmalarında VLDL'in triaçilgliserolündeki yağ asidi kompozisyonu şilomikronunkinden farklı olduğunu ortaya koymuşlar. Bu nedenle VLDL ve şilomikron partiküllerinin farklı 2 yolu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Mahley ve ark.ları (22) rat enterositindeki golgi organellerinin şilomikron ve VLDL partikülerine katıldığı göstermişlerdir. Feldman ve ark.ları kolesterol ve TAG'ün intestinal lenf lipoproteinlerinin partikül büyüklüklerini farklı etkilediklerini göstermişlerdir. Kolesterol emilimindeki artışla birlikte daha fazla lipidin VLDL'de taşındığını, bunun tersine daha fazla TAG emildiğinde tercihen şilomikronların arttığını göstermişlerdir (29).

Ratlara ayrı ayrı TAG ve fosfatidil kolin (PC) infüze edildiğinde, TAG ve PC'den türeyen yağ asitleri enterositler tarafından ayrı ayrı alınmaktadır. Şekil 2.4'te de görüldüğü gibi TAG'den türeyen yağ asitleri şilomikron oluşumu için kullanılırken PC'den türeyen yağ asitleri baskın olarak VLDL oluşumunu uyarmaktadır. VLDL ve şilomikron oluşumundaki farklılık, şilomikronların L-81'in etkisine karşı duyarlı olmasından VLDL'in ise duyarlı olmamasından kaynaklanmaktadır. Pre-şilomikron ve pre-VLDL partikülleri golgi kompleksinde ya pre-şilomikron ya da pre-VLDL veziküllerini içeren veziküller içinde paketlenmektedirler (Şekil 2.5.) (29).

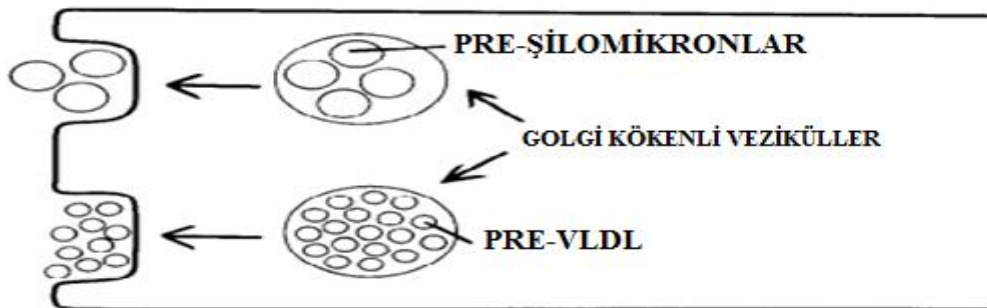


Şekil 2.4. Pre-ŞM ve pre-VLDL partiküllerinin ince bağırsağın enterositleri tarafından paketlenmesi (29).

TG'lerin temel sindirim ürünleri olan absorbe MG veYA'leri, hücrede MG metabolik yolu ile TG'lerden tekrar oluşturulur ve başlıca pre-ŞM partikülleri olarak paketlenirler. Bu metabolik yol L-

81 ile inhibe edilir. Absorbe edilen lizolesitinin hidrolizi sonucu oluşan YA ve YA türevleri α -gliserofosfat metabolik yolu ile TG oluşturmak için kullanılırlar. Bu metabolik yol pre- SM 'larınkinin tersine L-81'e duyarlı değildir (29).

Eğer şilomikron ve VLDL'in paketlenmesi için yaygın ortak metabolik son Golgi kompleksinde paketlenme ise L-81 neden özellikle şilomikron oluşumunu inhibe etmeyi tercih ettiği sorusu açıklanamamıştır. Morfolojik çalışmalar, açlık durumundaki ratlara yalnız L-81 infüze edildiğinde, jejunumun üst kısmından alınan hücrelerin golgi sisternasında VLDL büyüklüğündeki partiküllerin bulunduğunu, ancak ince bağırsağın benzer bölgelerindeki hücreler elektron mikroskopuyla incelendiğinde, L81'e ilaveten trioleinin infüzyonu sonrasında endoplazmik retikulumun sisternasında çok sayıda büyük lipid damlacıklarının gözlemlendiğini ortaya koymaktadır. Bazı ozmofilik lipid damlacıklarının $15,000 \text{ \AA}$ büyüklüğünde olduğu ve golgi sisternası şilomikron büyüklüğündeki partiküllerden yoksun olduğu bildirilmiştir. Bu morfolojik çalışma intestinal VLDL ve şilomikronun Golgi kompleksinde oluşmalarına rağmen, paketlenmelerinde farklılık olduğunu göstermektedir (29).



Şekil 2.5. İntestinal VLDL'in ve şilomikronun sekresyonu ve paketlenmesi (29).

Bu figür golgi türevli veziküllerin ya pre-şilomikron ya da pre-VLDL içerdiğini resmeder. Bu veziküller içerisinde pre-VLDL ve pre-şilomikron partiküllerinin çok az bir karışımını da içerir (29).

2.5. Ateroskleroz

Lipid metabolizması aterosklerozun teşhis ve tedavisinde son derece önemlidir. Aterosklerotik lezyon gelişiminin ilk basamağı, makrofajlarda büyük lipid damlacıklarının birikmesi sonrasında köpük hücrelerinin oluşmasıdır. Aterosklerozun oluşumunda serum lipoproteinlerinin metabolizmasının bozukluğunun önemi

büyüktür. Total serum kolesterol seviyesi ateroskleroz oluşumu riskinin değerlendirilmesinde önemli bilgi vermesine rağmen son yıllarda HDL-kolesterolün yükselmesinin ateroskleroz riski ile ters orantılı olduğu bilinmektedir. Bunu tersine şilomikron, IDL ve LDL'nin bozulmuş katabolizması ve ateroskleroz arasında pozitif bir korelasyon vardır (1).

Besinsel kaynaklı TAG, kolesterol ve fosfolipidler bağırsakta sindirilip, emildikten sonra şilomikron olarak sistemik dolaşıma verilirler. Bağırsak mukoza hücrelerinin düz ER'unda yeniden sentezlenen lipidler ile granüllü ER'unda sentezlenen B-48, A-I ve A-IV, birleştirilerek golgide paketlenildikten sonra şilomikron öncüsü halinde lenfatik sisteme oradanda dolaşıma aktarılmaktadır. Şilomikronlar daha sonra lipoprotein lipaz etkisiyle TAG'lerinin bir kısmını kaybederek şilomikron remnant haline gelirler. Remnantlar ilgili reseptörlerce tanınır ve karaciğer tarafından uzaklaştırılırlar. Ancak herhangi bir nedenden dolayı karaciğer tarafından alınamama durumunda arter duvarlarında birikir ve aterosklerozise neden olurlar (8).

Lipoprotein taneciğinin küresel yapısından, dış kısmında lipid ve proteinler arasındaki hidrofilik ilişkiler, çekirdeğe yakın bölgesinde ise hidrofobik ilişkiler sorumludur (30). Hidrofobisite lipid agregatlarının oluşumuna yol açan bir özelliktir (31). Agregasyon, aterosklerozisin altında yatan en önemli nedenlerden biridir.

Besinlerle alınan lipidlerin yağ asidi kompozisyonlarındaki farklılıklar onların hidrofobisitesini etkiler. Bu durum yağların ateroskleroz üzerindeki etkilerinin de farklı olmasına neden olmaktadır (5,6).

2.6. Misel Yapılar ve Hidrofobik Etki

Amfipatik moleküller hem polar hem de nonpolar gruplar taşıyan moleküllerdir. Bu karışık moleküller hem su fazı hem de nonpolar faz için çekiciliğe sahiptir. Bu moleküller düşük konsantrasyonda suda çözünürler. Bununla beraber herhangi bir kritik konsantrasyonda, çözünürlük sınırına ulaşırlar ve misel yapıları içinde agregat olmaya başlarlar Miselin yüzeyi polar baş gruplarından oluşur ve suda çözülür. İç kısımda ise hidrofobik kuyruk kısmı bulunur. Misel oluşumu sayesinde hidrofobik kısım su fazının dışına çıkar. Düşük amfipatik sürfaktan

konsantrasyonunda, moleküller rastgele dağılır. Kritik misel konsantrasyonunun (KMK) altında amfifilik moleküller, monomer misel oluşturmak için agregre olacaktır ki bu konsantrasyona KMK denmektedir (32).

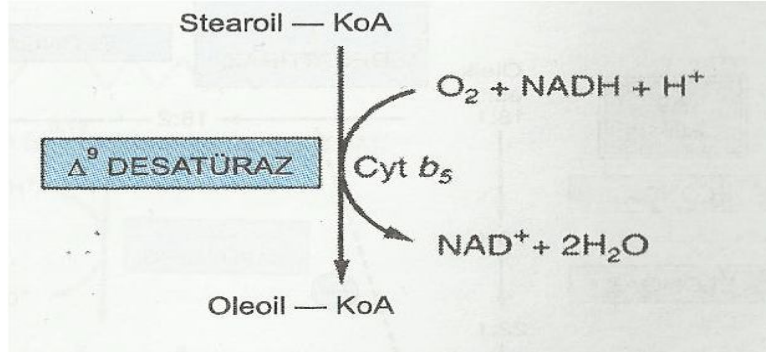
Kendiliğinden misel oluşumu iki faktör içerir. İlki, hidrofobik etki, molekülün nonpolar kısmının sudan ayrılmasına ve yapının içinde tek başına kalmasına sebep olur. İkincisi, baş gruplar arasındaki ilişki, moleküllerin ne kadar yakından paketlenbildiğini belirler (32).

Miseller ve bilayerlerdeki amfifilik molekülleri bir arada tutan güçler kovalent veya iyonik bağlar değildir, daha zayıf van der Waals kuvvetleri, hidrofobik hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimlerdir. Bu yüzden vezikül veya miseldeki aküöz süspansiyonu içindeki elektrolit konsantrasyonu ve pH gibi solüsyon şartları değişirse bu durum, sadece agregatlar arasındaki etkileşimi değil aynı zamanda her bir agregat içindeki intermoleküler güçleri etkileyecektir ve böylece kendi yapılarının şekil ve büyüklüklerini belirleyeceklerdir (32).

2.7. Şilomikronların Yağ Asidi Kompozisyonları ve Yağ Asitlerinin Birbilerine Dönüşümü

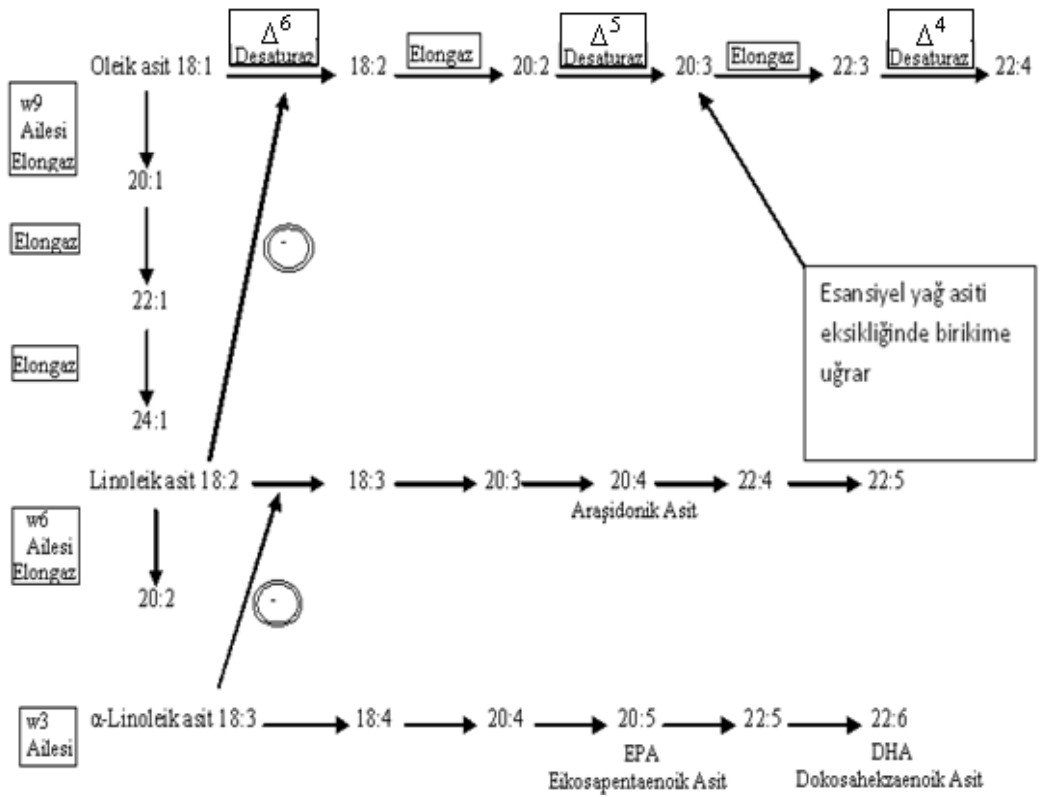
Besinlerle alınan yağ asitleri şilomikronların yağ asidi kompozisyonlarını belirleyen en önemli faktördür Bununla birlikte şilomikronların yağ asidi kompozisyonlarının bir kısmı endojen bir kısmı da eksojen kaynaklardan etkilenir. Bir kısım yağ asitlerinin entorsitlerde birbirlerine dönüşümü de mümkündür.

Esansiyel tekli doymamış yağ asitleri ele alındığında karaciğer dahil bir çok doku bu yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerinden sentes edilmesinden sorumludur. Doymuş bir yağ asidine eklenen ilk çift bağ hemen hemen diama Δ^9 konumundadır. Endoplazmik retikulumdaki bir enzim sistemi olan Δ^9 desaturaz (Şekil 2.6) palmitoil KoA veya stearoil KoA'nın sırasıyla palmitoleil veya oleil KoA'ya dönüşümünü katalizleyebilir (33).



Şekil 2.6. Stearik asidin oleik aside dönüşümü (33).

Tekli doymamış yağ asitlerine eklenen çift bağlar bakteriler dışında birbirlerinden daima bir metilen grubu ile ayrılırlar. Hayvanlarda ek çift bağların tümü, var olan çift bağ ile karboksil grubu arasına eklenirken, bitkiler bunları var olan çift bağ ile ω karbonu arasına da yerleştirebilir. Yani hayvanlar bir Δ^9 desaturaza sahip olduklarından zincir uzatma ve doymamış hale gelmeyi eşleyerek doymamış yağ asitlerinin $\omega 9$ ailesini tümüyle sentez edebilir (Şekil 2.7) (33).



Şekil 2.7. Yağ asitlerinin birbirine dönüşümü (33).

Tüm dünyada ve Türk toplumunda koroner kalp hastalığı önemli bir sağlık sorunu ve başlıca ölüm nedenlerinden biridir. Koroner kalp hastalığının en önemli sebebi de aterosklerozdur. Kandaki lipoprotein miktarı ve bu lipoproteinlerin kompozisyonu ateroskleroz oluşumuna neden olan en önemli etkenlerden biridir. Lipoprotein hidrofobisitesi ise lipoproteinin aterosklerotik özelliğini belirleyen unsurlardan biridir ve besinlerle alınan lipid kompozisyonu ile ilgisi net değildir. Lipoproteinlerin (LDL) lipid ve protein komponentlerindeki değişimlerin agregasyona neden olduğu ve bunun aterojenezin patojenezinde önemli bir mekanizma olduğu bilinmesine rağmen besinlerle alınan yağların lipoprotein partikülünün hidrofobik özelliğini nasıl değiştirdiği henüz aydınlatılmamıştır. Bu konuda yapılan çalışmalar daha çok LDL partikülü üzerine yoğunlaşmıştır. Besinlerle alınan lipidlerin, lipoprotein hidrofobisitesine etkisinin LDL üzerinde direk olarak tespit edilmesi mümkün değildir. Çünkü LDL, VLDL'in bir hidroliz ürünüdür ve oluşumu sırasında enzimatik ve/veya kimyasal değişime maruz kalmaktadır. Oysa torasik lenf intestinal VLDL partikülleri direk olarak besinsel yağlardan sentezlenmekte ve daha sirküleyasyona dahil olup değişime uğramadan orjinal yapısının araştırılabilmesi mümkün olmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada alınan besinsel lipidlerin lipoprotein partikülünün hidrofobik özelliği üzerindeki direk etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Lipoproteinlerin hidrofobik özellikleri ateroskleroz patogenezisinde önemli bir etken olduğundan alınan yağların postprandial lipemi ve neticesinde ateroskleroz yönünden değerlendirilmesi bu çalışma ile mümkün olmuştur. Her ne kadar besinsel yağların doymuşluk-doymamışlık oranlarıyla ateroskleroz arasındaki bağlantıya dair çeşitli çalışmalar mevcutsa da direk olarak alınan yağlarla lipoproteinlerin biyofiziksel (hidrofobisite) özellikleri arasındaki bağlantıya bu çalışma sonrasında ışık tutulacaktır. Bu çalışma aterosklerozun önlenmesinde yağ seçimiyle ilgili bilgiler sağlayacaktır. Ayrıca aterosklerozun önlenmesinde etkisi olabilecek çeşitli gıda katkı maddelerinin (nutraceuticals) intestinal VLDL'in hidrofobik özelliklerini değiştirip değiştirmediği konusunda yapılacak çalışmalara temel teşkil edecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Ratların Temini

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Deneysel Araştırmalar Birimi'nde, İnönü Üniversitesi Hayvan Etiği Komitesi tarafından öngörülen kurallara uygun olarak yapıldı (34). Çalışmada kullanılan 70 adet Sprague Dawley rat, İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edildi.

3.2. Ratların Muhafaza Koşulları

Ratlar, % 59,8 rh nem ve 20,4 °C sıcaklık koşulları altında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlıkta muhafaza edildi. Ratlara pellet yem ad libitum verildi. Ad libitum yem kompozisyonu aşağıdaki gibidir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Ratların yem kompozisyonu

Yem içeriği	En Çok veya En Az	Ağırlıkça yüzde (w/w)
Su	En çok	%12
Ham Protein	En az	%24
Ham Selüloz	En çok	%7
Ham Kül	En çok	%8
HCl'de Çözünmeyen Kül	En çok	%2.0
NaCl	En çok	%1.0
Kalsiyum	En az- En çok	%1.0-2.8
Fosfor	En az	%0,9
Sodyum	En az- En çok	%0,5-0,7
Metabolik Enerji (Kcal/Kg)	(En az)	2.650

Pellet yem hazırlanmasında kullanılan maddeler: Mısır, buğday, soya kütspesi, fındık kütspesi, melas mayası, ayçiçeği tohumu kütspesi, pamuk tohumu kütspesi, mısır proteini, rasmol, et-kemik unu, balık unu, kan unu, dikalsiyum fosfat (D.C.P.) tuz, mermer tozu, melas, tapiyoka, sorgum, kolza kütspesi, sentetik lisin, sentetik methionin, premiksler, kepek, süt tozu.

3.3. Yağların Hazırlanması ve Verilmesi

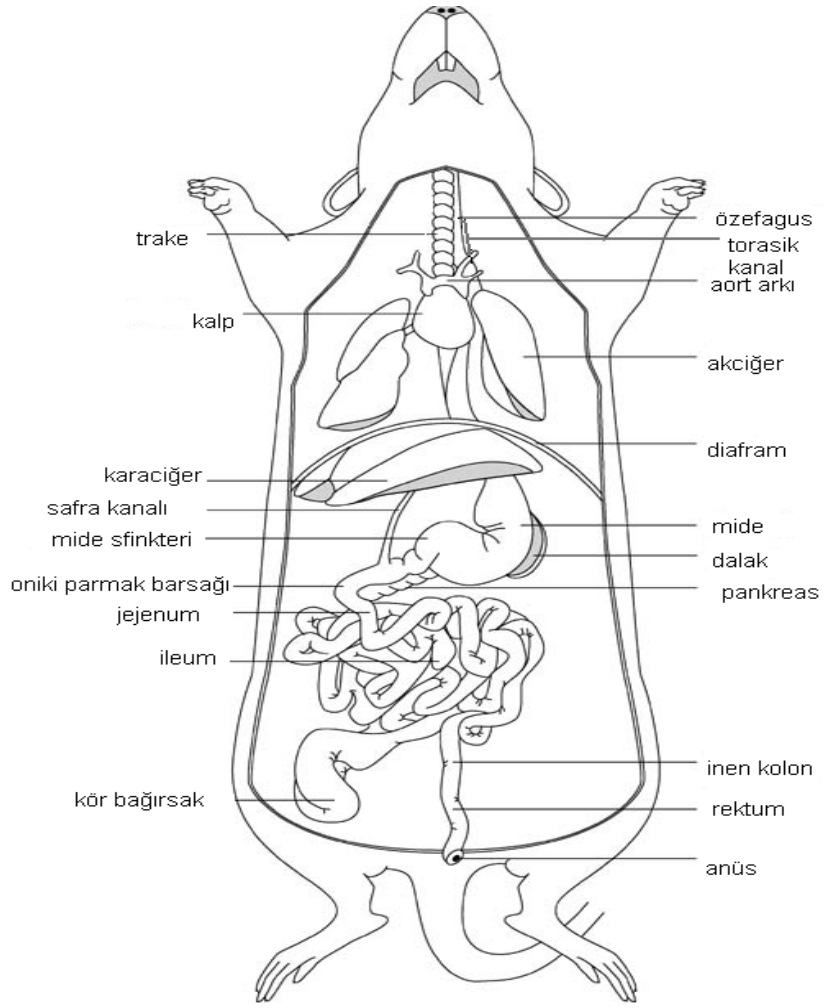
Yağlar ratlara verilmeden önce her yağa (10 UI α -tokoferol asetat/1mL yağ) E vitamini (Alfa Tokoferol Asetat-Aksu Farma Tıbbi Ürünler Mejar İlaç San. A.Ş.- İstanbul,Türkiye) eklendi. O gün çalışılacak olan E vitamini içeren 1,5 mL yağ ratlara gavaj yolu ile verildi (15).

3.4. Ratların Hazırlanması ve Anestezisi

Kanüle edilmek üzere 3 rat (250-300gr) diğer ratlardan ayrı kafese konuldu. Kanüle edilecek olan ratların sadece su içmelerine izin verilerek altı saat süreyle aç bırakıldı. Kanülyasyondan bir saat önce rata serum fizyolojik (%0,9 NaCl – izotonik) ile 1:10 dilüe edilmiş olan atropin (8-metil-8-azabisiklo[3.2.1]okt-3-il) 3-hidroksi-2-fenil-propanoat; 0,004 mg/ 100 gr) intraperitonel olarak enjekte edildi. 10 dakika sonra 90 mg/kg dozda ketamin (Ketalar, Pfizer İlaçları Limited Şirketi, İstanbul, Türkiye) ve 6 mg/kg dozda ksilazin (Rompun, Bayer Türk Kimya Sanayi Limited Şirketi, İstanbul, Türkiye) tek enjektöre çekildi intraperitonel olarak rata enjekte edildi (34).

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

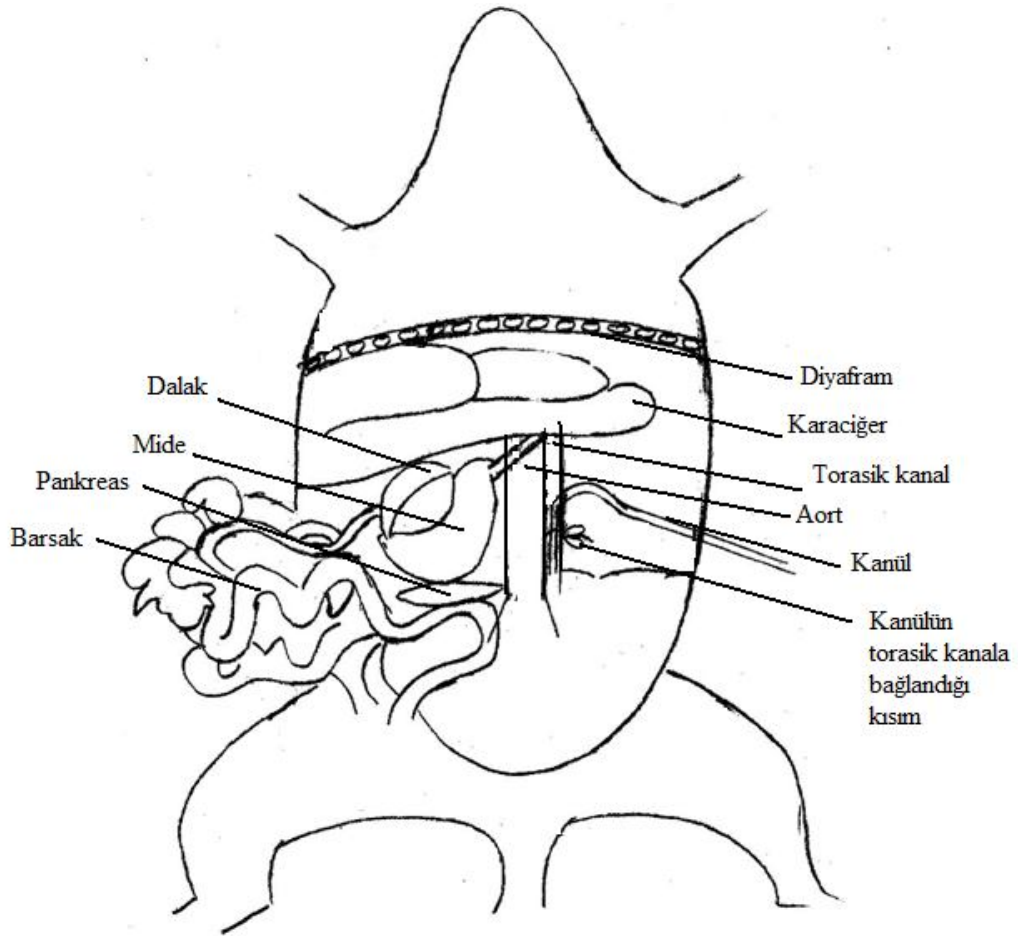
Her birinde 3-5 tane rat bulunan 6 deneysel grup oluşturuldu. Bunlar; AY = ayçiçeği yağı verilen grup, ZY = zeytin yağı verilen grup, PLM= palm yağı verilen grup, TRY= tereyağı verilen grup, MRG= margarin yağı verilen grup, BLK= balık yağı verilen grup. Çalışmada toplam olarak 23 tane rat kullanıldı. Yağ verilmeden torasik lenf sıvısı görünür olmadığı için kanülyasyon işlemi mümkün olmamaktadır. Bu nedenle kontrol grubu kullanılmadı. Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldı. Çalışmada kullanılan ratların bir kısmı torasik lenf kanülyasyonunu öğrenmek amacıyla yapılan pratik çalışmalarında, bir kısmı torasik lenf kanülyasyonu sırasında solunum durması sebebiyle, diğer bir kısmı operasyon sonrasında kaybedildi. Kanüle edilen ratlar, yaklaşık 18-20 saat sonra servikal dislokasyonla ötenazi edildi.



Şekil 3.1. Ratların genel karın boşluğu anatomisi (35).

3.6. Torasik Lenf Kanülasyonu ve Lenf Sıvısının Toplanması

Anesteziye giren hayvanın refleksleri kontrol edildikten ve dili dışarıya alındıktan sonra sternum alt ucundan son kostaya paralel olacak şekilde vertebraya doğru insüzyon ile deri, karın duvarı ve periton açılarak batın içine girildi. Karın organları dışarıya alındı. Diyaframa yaklaşık 1-1,5 cm mesafede torasik lenf kanalı abdominal aorttan mümkün olduğu kadar ayrıldı, çevresindeki dokulardan temizlendi. Torasik lenf kanalı etrafına bir iplik (usp-4/0 atravmatik) geçirildi, lenf kanalı üzerine iridektomi makası ile küçük bir kesit açıldı. Kanül (silikon tübing-iç çapı 0,3 mm, dış çapı 0,64 mm) kanal içerisine yerleştirildikten sonra geçirilen iple ligatüre edildi. Kanül, karın içinde başka bir noktaya ve karın boşluğundan çıktığı noktaya da dikiş ile tutturulup sabitlendi. Karın duvarı schmieden dikişle, deri ise basit ayrı dikişle dikilerek batın kapatıldı (4). (Şekil 3.1), (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Torasik lenf kanülasyonu şematik gösterim

Operasyon süresince karın organları vücut sıcaklığındaki serum fizyolojik ve % 5'lik dekstroz solüsyonu ile ıslatıldı. Kanüle edilen rat önceden hazırlanmış olan hareketlerini sınırlandıran özel bir kafese yerleştirildi. Ratın torasik kanalına yerleştirilen kanülün diğer ucu kafesteki boşluktan geçirilerek bir deney tüpüne parafilmle sabitlendi. Bu deney tüpüne 0,05 mg/ml ampicilin, 1mmol/l NaEDTA ve %0,05 Na-Azid eklendi. Rat bu şekilde 1 gece bekletildikten sonra servikal dislokasyon ötenazi uygulandı. Lenf sıvısı analizler için toplandı (27,36). Her yağ için en az üç torasik lenf kanülasyonu yapıldı.

3.7. İntestinal VLDL'in Lenf Sıvısından İzolasyonu

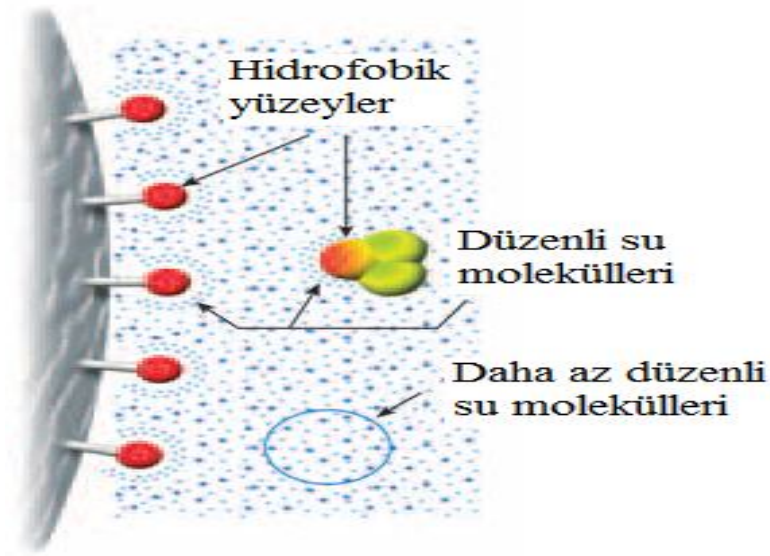
Ultrasantrifüj tüpleri [Beckman (25x86 mm, toplam hacmi 36,2 mL) Optiseal Polyallomer ultrasantrifüj tüpleri Cat No: 362183 (Beckman Instruments Inc. Spinco

Division, California, ABD.)] içinde dansite çözeltisi (%0,05 Na-EDTA ve %0,02 Na-Azid içeren % 0,85'lik NaCl çözeltisi) bulunan bir enjektörün uzun uçlu iğnesi ile hava kabarcığı kalmadan tüpün en alt kısmından itibaren en üstüne kadar yavaşça çıkılarak dolduruldu. Eküvyon çubuğuyla karıştırılarak toplanan lenf sıvısından fibrinler uzaklaştırıldı. Dansite çözeltisi ile ağzına kadar doldurulan ultrasantrifüj tüplerinin dibine, lenf sıvısından birer mL çekilip tüplerin en altına dağıtılmadan yavaşça tabaka yapıldı. Tüpler ultrasantrifüje (Beckman Coulter, Optimal L-90 K Ultrasantrifuge Class S, California, ABD) yerleştirildi. 5×10^5 gmin' de 17 dk 20 °C'de santrifüj edildi. Bu şekilde 300 nm ve 300 nm'den daha büyük şilomikronlar santrifüj sonrası tüpün üst 1,5 cm'lik kısımda toplandı. Şilomikronu tüplerden ayırdıktan sonra, geride kalan (lenf sıvısı ve dansite solüsyonu karışımı) sıvı, küçük bir deney tüpüne boşaltıldı. İçerisine yoğunluğu artırmak için bir spatül ucu ile tuz eklenip karıştırıldı. Yeni ultrasantrifüj tüpleri alınıp bunlar da dansite çözeltisi ile dolduruldu. Deney tüplerindeki tuz ile karıştırılan sıvı, dansite çözeltisi ile dolu ultrasantrifüj tüplerine tabaka oluşturulacak şekilde dolduruldu. Bu yeni hazırlanmış olan tüpler 1×10^7 gmin' de 20 °C'de 6 saat santrifüj edildi. Böylece santrifüj sonunda tüplerin üst kısmında biriken 75 nm ve daha küçük intestinal VLDL toplandı. Bu şekilde elde edilen intestinal VLDL'in bir kısmına agregasyon testleri, bir kısmına elektroforez ve diğer kısmına ise düşük basınçlı hidrofobik interaksiyon kromatografisi yapıldı. Geriye kalan intestinal VLDL numunesi ise protein, fosfolipid, trigliserid ve kolesterol miktar tayinleri için -70 °C'de dondurucuda (HERAfreeze/HERAEUS) saklandı (19,20,27).

3.8. İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi ile Analizleri

3.8.1.Prensibi: Hidrofobik interaksiyon kromatografisi (HİK), proteinleri hidrofobik yüzeylerindeki farklılıklara göre ayırır. Bunu kolondaki HİK sabit fazının (bütil sefaroze) hidrofobik yüzeyi ve proteinler arasındaki tersinir hidrofobik etkileşimden faydalanarak yapmaktadır. Hidrofobik maddeler su ile etkileşince su molekülleri bu hidrofobik maddelerin yüzeyini ıslatamaz, bu moleküllerin yüzeylerini bir kabuk oluşturacak şekilde kaplar. Hidrofobik maddeler, etraflarını saran bu su molekülü tabakasından ayrılarak toplam alanlarını azaltmak için bir araya

gelmeye zorlanırlar. Yani lipoproteinlerin hidrofobik kısımları ile kolondaki sabit fazının hidrofobik kısımları bir araya gelir ve aradan su molekülleri ayrılır. (Şekil 3.3). Böylece entropi artar. Proteinleri ve hidrofobik ligandları çevreleyen su moleküllerinin yer değiştirmesi, sistemin serbest enerjisinde meydana gelen negatif bir değişimin sonucu olarak entropiyi arttırır. Bu da hidrofobik ligand protein etkileşiminin, termodinamik olarak uygun olduğunun göstergesidir (37). HİK Şekil 3.4'te şematize edilmiştir.



Şekil 3.3. Hidrofobik interaksiyon kromatografisinde, hidrofobik yüzey (HİK sabit fazı) ile proteinler arasındaki hidrofobik etkileşim (37).

3.8.2. Kolonun Hazırlanması

Kolon önce distile su ile daha sonra da % 20'lik etil alkol birkaç defa yıkandı. Buzdolabında (+4 °C) bekletilmiş olan bütül serpharose (sabit faz) çözeltisinin oda ısısına gelmesi beklenildikten sonra içinde bulunduğu şişe yavaşça alt üst edilerek homojen hale gelmesi sağlandı. Bütül sefaroze bir baget yardımıyla kolona yavaşça boşaltıldı. Kolona akmasını kolaylaştırmak için bir kısım bütül sefaroze % 20'lik etil alkol ile sulandırılarak yavaşça kolona boşatıldı. Kolonun flow adaptörü takıldı ve mandalı yardımıyla kolon içerisine sabitlendi. Kolonun musluğu açıldı. Büyük bir enjektör (60 mL), flow adaptörün diğer üst ucuna takıldı ve enjektörün içindeki hava kolona birkaç defa tatbik edilerek bütül sepharosun tanecikleri arasında hiçbir boşluk

kalmaması sağlandı. Kolon içerisinde sabit faz bulunurken bu şekilde 2-2,5 saat bekletildi. Sabit fazın tanecikleri arasındaki tüm hava boşlukları bu şekilde dolduktan sonra kolon sisteme bağlandı. 20 cm uzunluğundaki kolon yaklaşık olarak 16-17 cm sabit faz ile dolduruldu. Önce 2 saat su ile yıkandı. Daha sonra 30 dk % 0,1 Triton X-100 ((*p*-(1,1,3,3-tetrametilbüti) fenil poli(etilen glikol)), ile 2 saat % 0,0125 Triton X-100 ile dengelendikten sonra akış hızı 0,8 mL/dk'ya ayarlandı. Numune tatbik edildi. Kromatografi işlemi sona erdiğinde kolon her defasında 20 dk distile su, 20 dk da %20 etil alkol ile yıkandı, flow adaptör çıkarıldı. Kolonun ağzı parafilmle kapatıldı, kolon buzdolabına (+4 °C) konuldu (Şekil 3.4). (37).

3.8.3. Numunenin Uygulanması

0,75 mL intestinal VLDL numunesi sisteme enjekte edildi. Pik geldiği dk'larda fraksiyonlar deney tüplerine toplandı. Diğer analizler için derin donduruda saklandı. Aynı işlemler her yağ için tekrarlandı.

3.8.4. Pik Alanlarının Hesaplanması

Pik Alanı: Kromatografide tutulan madde miktarının kantitatif ölçüsüdür. Pik alanı, pik yüksekliği ve bu yüksekliğin yarısından itibaren tabana paralel çizilen çizginin uzunluğunun çarpımı sonucunda hesaplandı (38).

3.8.5. Kapasite Faktörünün Hesaplanması:

Kapasite Faktörü (k) : Kolonda analitin göç hızlarının tanımlanmasında kullanılan en yaygın parametredir ve void volümün kaç katı hacimde pik geldiğinin de bir ifadesidir (38).

$$k^A = \frac{t}{t^M} \quad (3.1.)$$

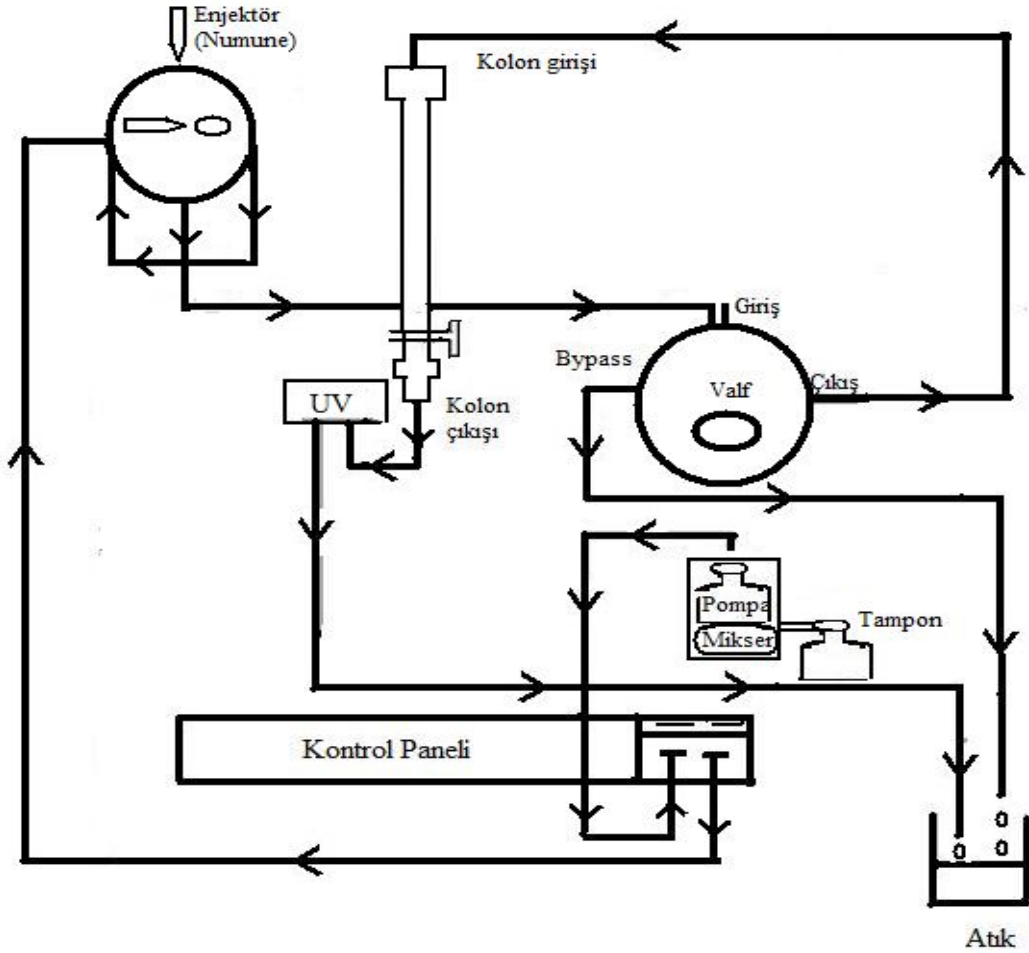
k^A = kapasite faktörü, t^R =Retensiyon zamanı,

t^M =Void volüm (kolon tarafından tutulmayan fraksiyonun) retensiyon zamanı (kaynak)

Alıkonma (retention) Zamanı: Mobil faz içerisinde gelen, analizi yapılacak maddeye ait bileşenlerin, sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda tutulması daha doğrusu yavaşlatılması ve böylece daha geç olarak sabit fazı terk etmesi olayıdır. Tutulma zamanı olarak da ifade edilir (39).

Ölü Hacim (Void Volum) : Kolon tarafından tutulmayan madde miktarının kantitatif ölçüsüdür (39).

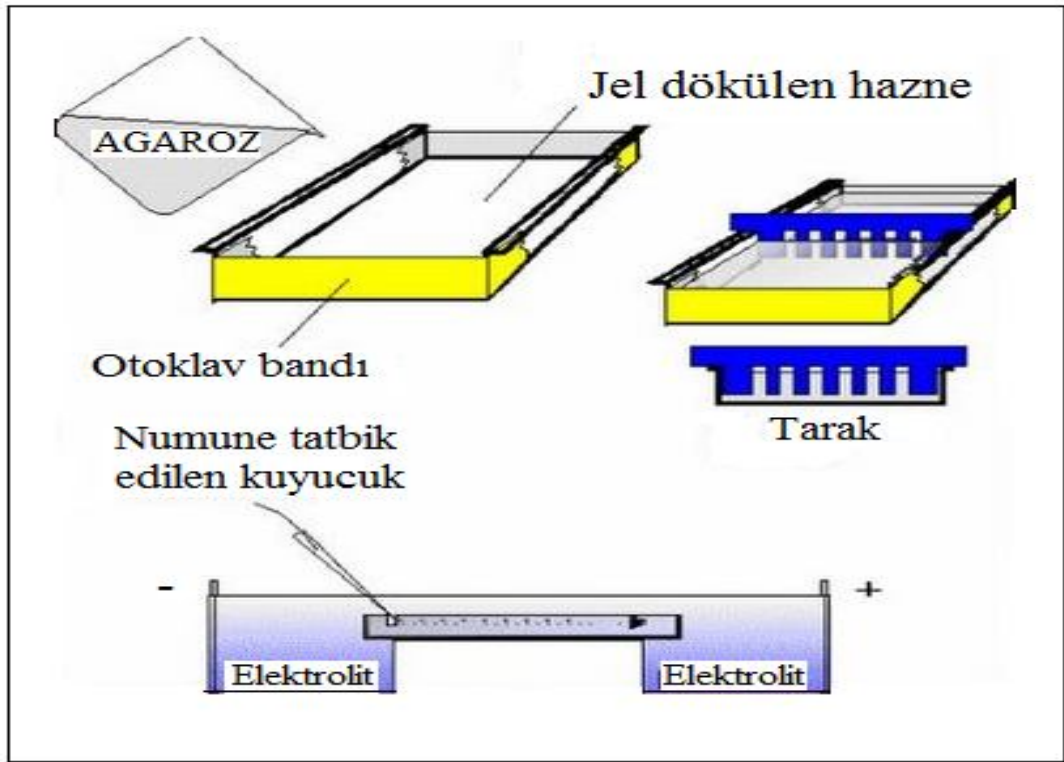
$$\text{Void Volume} = \frac{(\text{Kolonun Çapı})^2 \cdot \pi \cdot 0,7 \cdot \text{Hidrofobik Sabit Fazın Uzunluğu}}{4000} \quad (3.2)$$



Şekil 3.4. Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi şematik gösterimi

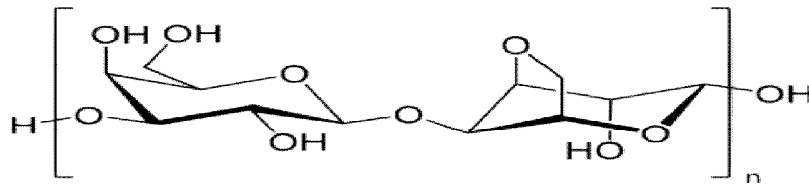
3.9. İntestinal VLDL'in Elektroforetik Analizleri

Elektroforez, elektriksel bir alanın etkisi altında likid bir ortamda yüklü solüt veya partiküllerin göçüdür. Belirli bir pH'da ve belirli bir elektrik alanında yüklü taneciklerin farklı hızlarda yürüyerek ayrılmaları tekniğine dayanır. Elektroforez yönteminde ortamın pH'sı; tampon çözelti ile, elektrik alanı ise doğru akım veren bir güç kaynağından sağlanır. Elektroforezde katedilen mesafe, net yük ile doğru, molekül büyüklüğü ve elektroforetik ortamın viskozitesi ile ters orantılıdır (40).



Şekil 3.5. Elektroforez işlemi aparatları ve şematik gösterimi (41).

3.9.1. Agaroz Jel Elektroforezi



Şekil 3.6. Agarozun kimyasal yapısı

Agar, kırmızı bir alg türü olan Agar agar'dan izole edilen bir polisakkarittir. Saf agaroz toz biçimindedir, oda sıcaklığında suda ya da tampon içerisinde çözünmez. Ancak sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Agaroz jellerde oluşan bantlar dağılmaya meyilli olduğu için çözünürlüğü sınırlıdır. Agaroz jel kuru toz halindeki agarozun sıvı bir tampon içine konması ve sonra karışımın agaroz berrak bir çözeltiliye dönüşüncüye kadar kaynatılmasıyla oluşur. Daha sonra bu çözeltili jel tepsisine dökülür ve katılaşıncaya kadar soğutulur. Katılaştıktan sonra yoğunluğu agaroz konsantrasyonuyla belirlenen bir matriks oluşur. Agaroz jel elektroforezi, molekülleri partikül büyüklüğüne ve yüklerine göre ayırmaktadır (42).

3.9.1.1. Kullanılan Ayıraçlar

%0,9'luk Agaroz jel : 1,62 gr agaroz (sigma) 100 mL distile suda çözülerek % 0,9'luk agaroz jel hazırlandı. Manyetik karıştırıcının ısıtıcı kısmında 3 defa kaynatıldı. Sonra 5-10 dk oda ısısında soğumaya bırakıldı. 17 cm – 25 cm boyutlarında 2,5 cm derinliğindeki jel dökme ünitesine döküldü (43).

180 mL TBEx1 (pH:8.0) : 121,10 mg tris base, 55,55 mg borik asit, 3,80 mg EDTA karıştırıldı, hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Bu TBEx10 çözeltilisinden 200 mL alınıp distile su ile 2000 mL'ye tamamlandı (43).

Tespit Çözeltisi : 70 mL etanol, distile su ile 100 mL'ye seyreltilerek %70'lik etanol v/v hazırlandı. 5 mL asetik asit hazırlanmış olan %70'lik etanol ile 100 mL'ye v/v seyreltildi (43).

Boyama Çözeltisi : 60 mL etanol, distile su ile 100 mL'ye seyreltilerek %60'lık v/v etanol hazırlandı. Daha sonra içinde 0,4 gr oil red O çözüldü (43).

Boyadan Arındırma Çözeltisi : 10 mL asetik asit, distile su ile 100 mL'ye seyreltilerek %10'luk asetik asit v/v çözeltili hazırlandı (43).

Koruma Çözeltisi : 5 mL asetik asit, distile su ile 100 mL'ye seyreltilerek %5'lik asetik asit v/v çözeltili hazırlandı. (43).

3.9.1.2. Jellerin Hazırlanması ve Numunenin Uygulanması:

Boya çözeltisi hazırlanıp diğer işlemler yapılincaya kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılarak ve ısıtılarak 4 saat süresince çözünmeye bırakıldı. %0.9'luk 180 mL agaroz jel hazırlandı. Elektroforez haznesine döküldü. Numune kuyucuklarının oluşturulması için jel dökme ünitesine 10 mm - 1 mm boyutlarındaki tarak yerleştirildi. Otoklav bandı ile jel dökme ünitesinin etrafı bantlandı. Daha sonra streç filmle sarılıp (jelin kurummasını önlemek için) buzdolabına (+4 °C) (polimerizasyonun tamamlanması için) konuldu. Ertesi gün dolaptan çıkarılıp kuyucuklara numune tatbiki yapıldı (43).

3.9.1.3. Elektroforezin Yapılışı:

Jel dökme ünitesinden tarak çıkartıldı. Elektroforez tankı 1600 mL TBE ile dolduruldu. Jelin etrafındaki otoklav bandı çıkartıldı. Jel tanka yerleştirildi. Pipetle 30-50 µL hacimdeki numune, kuyucuklar içerisine bir pipetle yerleştirildi. Ağzı kapatılıp çalıştırıldı. 130 V'ta 2 saat elektroforeze tabi tutulan jel, %70'lik etanolde hazırlanmış %5'lik asetik asit (tespit) çözeltisine konuldu. 90 °C'de 40 dk bu solüsyonda bekletilen jel daha sonra oil red O boya çözeltisine bırakıldı. 50 °C'de 24 saat bu çözeltide bekletildi. Jel ertesi gün 1 saat için boyadan arındırma çözeltisine konuldu. Sonra koruma çözeltisine bırakıldı (43).

3.10. İntestinal VLDL'in Türbidite Analizleri

İntestinal VLDL, agregasyon analizi için vortextlendiler. Her yağa ait intestinal VLDL (750 µL-distile su ile dilüe edilmiş) 1'er dk vortekslenerek 400 nm de absorbansları okundu.

Öncelikle toplam 14 dk boyunca okuma yapıldı. Her 1 dk vortekslenme sonrası absorbansları okundu.

3.10.1. Soğüğün İntestinal VLDL Agregasyonu Üzerine Etkisi

İntestinal VLDL, +4 °C'de ve buzlukta 1 gece bekletilip ertesi gün oda sıcaklığına geldikten sonra 1'er dk aralıklarla vortekslendi 400 nm de absorbansları okundu.

3.10.2. Farklı Yağlar Verilerek Elde Edilen İntestinal VLDL'in Misel Yapılarının, Misel Yapısına Etki Eden Faktörler Açısından Karşılaştırılması

Miselin yüzeyi polar baş gruplardan oluşur ve suda çözülür. İç kısımda ise hidrofobik kuyruk kısmı bulunur. Misel oluşumu sırasında hidrofobik kısım su fazının dışına çıkar. Düşük amphifilik surfaktan konsantrasyonunda, moleküller rastgele dağılır. Bu yapıya misel denir (44). Çalışmada değerlendirilen, misel yapısına etki eden faktörler: a) tuz eklenmesi b) sulandırma c) asit-baz eklenmesi

İntestinal VLDL, üzerine 58,5 mg/mL NaCl eklenildikten sonra 1'er dk aralıklarla vortekslenerek 400 nm de absorbansları okundu.

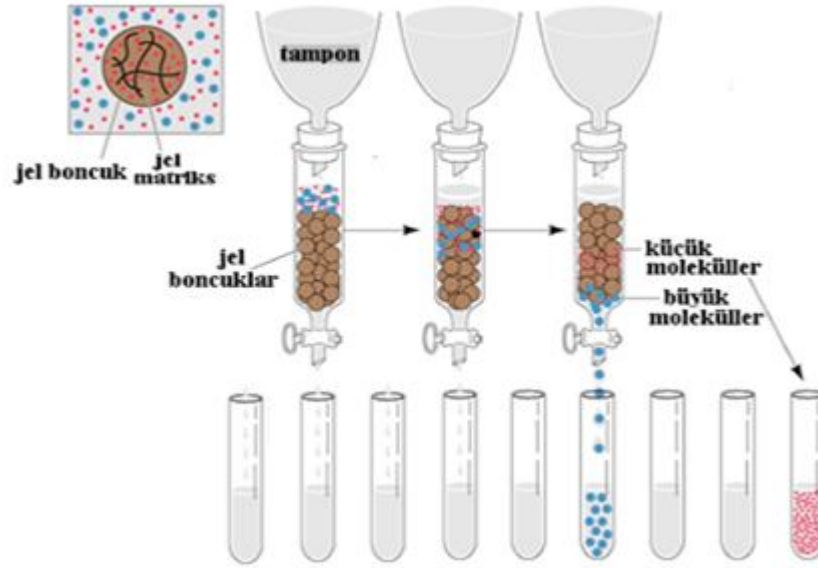
İntestinal VLDL, 1/3, 1/5 ve 1/7 sulandırıldıktan sonra vortekslenerek absorbansları okundu.

Ayrıca sulandırılmış 2mL intestinal VLDL numunesi üzerine 250 µL su eklenip vortekslenerek okundu. Su ile yapılan bu analiz aynı miktar asit ve baz ile de yapılarak absorbansları okundu.

3.10.3. İntestinal VLDL'in Jel Filtrasyon (Size Exclusion) Kromatografisi ile Analizleri

Prensip: Karışımdaki moleküllerin, molekül büyüklüklerine göre ayrılması esasına dayanır. Kolon, jel boncuklar (belli büyüklüğe sahip ve karışımdaki bileşenlerle etkileşmeyen bir madde) ile doldurulur. Biyomolekül karışımını içeren tampon, kolondan geçirilir. Küçük moleküller, jel boncuklar arasındaki boşluklara girer, bu nedenle kolondan geç çıkarlar. Büyük moleküller ise jel boncuklar arasındaki boşluklara giremez bu sebeple kolondan hızlı bir biçimde sürüklenerek önce çıkarlar.

Numunedeki moleküller boyutlarına göre ayrılmaktadır. Bu işlem için çok değişik por çapları içeren dolgu maddesiyle doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. Böylece değişik çaplardaki porlar birer elek gibi davranarak maddeleri boyut-çaplarına göre alıkoymaktadır (45).



Şekil 3.7. Jel Filtrasyon (Size Exclusion) Kromatografisinde moleküllerin ayrılması (46).

Sefaroz CL-4B: Sefaroz 4B, dayanıklı eter bağları (O-eter) aracılığıyla bütül ve oktil ligand çiftleriyle % 4 agaroz çapraz bağlıdır. Bu sabit fazın porları sefaroz CL-2B'nin porlarından küçük ancak sefaroz CL-6B'nin porlarından büyüktür (37).

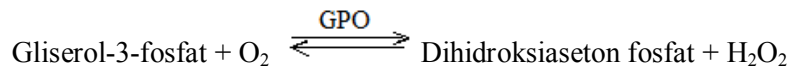
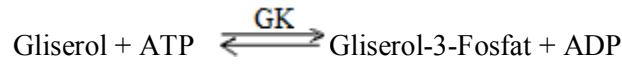
Sefaroz CL-6B: Sefaroz 6B, dayanıklı eter bağları (O-eter ya da S-eter) aracılığıyla bütül ve oktil ligand çiftleriyle % 6 agaroz çapraz bağlıdır. Bu sabit fazın porları sefaroz CL-2B ve sefaroz CL-4B'nin porlarından küçüktür (37).

Bu kromatografi için tek bir yağın yeterli miktarda intestinal VLDL'i olmadığı için ayçiçek yağı ve palm yağından elde edilen şilomikronlar karıştırılarak bir havuz oluşturuldu ve analiz edildi. Bu karışımından 0,75 mL lik üç hacim ayrılarak jel filtrasyon kromatografisi seferasyonu yapıldı. İlk seferasyonda kolona medium olarak sefaroz CL-4B dolduruldu, mobil faz olarak fosfat tamponu, ikinci seferasyonda medium olarak sefaroz CL-6B mobil faz olarak % 0,0125 Triton X-100, üçüncü seferasyonda ise medium olarak sefaroz CL-6B ve mobil faz olarak fosfat tamponu kullanıldı. Her üç analiz için akış hızı 0,5 mL/dk ayarlandı ve 0,75 mL intestinal VLDL (AYIV+PLMIV karışımı) sisteme enjekte edildi.

3.11. Lipid ve Protein Analizleri

3.11.1. Triaçilgliserol Miktar Tayini

Numune trigliserid düzeyinin ölçümü, bir seri reaksiyon içeren enzimatik kolorimetrik metod ile kit (Biolabo Reagents - Trigliserides GPO Method, Version: AT 80019 20 06 2007, 02160, Maizy, France) kullanılarak gerçekleştirildi. Numundeki trigliserid lipaz tarafından gliserol ve yağ asitlerine hidroliz edilir. Daha sonra gliserol, gliserol kinaz (GK) tarafından kataliz edilen bir reaksiyonla, adenzin-5-trifosfat (ATP) tarafından gliserol-3-fosfata ve adenzin-5-difosfata (ADP) fosforile edilir. Gliserol-3-fosfat daha sonra gliserol fosfat oksidaz (GPO) tarafından dihidroksiaseton fosfata ve hidrojen peroksite dönüştürülür. Daha sonra hidrojen peroksit, peroksidaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla kırmızı renkli kinon boyası elde etmek üzere 4-amino-antiprin (PAP) varlığında, 4-aminofenazon (4-AP) ve 4-klorofenol ile reaksiyona girer. Oluşan pembe rengin yoğunluğu 500 nm'de okunduğunda numune içerisindeki triaçilgliserol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (47).



3.11.1.1. Kullanılan Ayıraçlar:

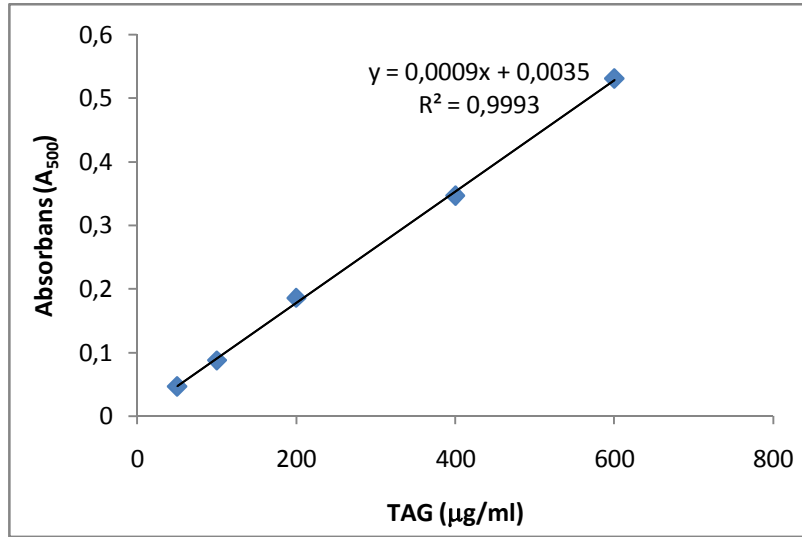
Tampon 1: PIPES, magnezyum klorid, kloro-4-fenol, prezervatif karışımı (47).

Tampon 2: Lipaz, peroksidaz (POD), gliserol-3-fosfat-oksidad (GPO), gliserol kinaz (GK), 4-amino-antiprin (PAP), Adenzin trifosfat Na (ATP) karışımı (47).

Standart Çözeltileri : 200 mg/dl konsantrasyondaki trigliserid stok-standart çözeltisinden 50, 100, 200, 400 , 600 , 800 µg/ml konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı. (47).

3.11.1.2 Deneyin Yapılışı:

Test tüplerine 10 µL süpernatant, kör tüpüne 10 µL distile su ve standart tüpüne de 10 µL standart solüsyonu konuldu. Tüm tüplere 1 mL reagent solüsyonu eklendi. 10 dk sonra 500 nm’de spektrofotometrede köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı. Elde edilen verilerden kalibrasyon grafiği hazırlandı (Şekil 3.11.1.) (47)



Şekil 3.8. Triaçilgliserol kalibrasyon grafiği

3.11.2. Fosfolipid Miktar Tayini

Bu yöntem malachite yeşili ve fosfomolibden arasındaki reaksiyon sonucu renkli bir kompleks oluşumuna dayanır. 50-200 µL HClO ve 0,01-1,5µg fosfolipid miktarı aralığında çalışan hassas bir yöntemdir. Kullanılan ayraçlar Zhou X.’nin literatürüne göre hazırlandı (48).

3.11.2.1. Kullanılan Ayraçlar

% 70’lik perklorik asit çözeltisi: %70’lik perklorik asit çözeltisinden direkt olarak kullanıldı.

% 1'lik HNO₃ çözeltisi: Yaklaşık 50 ml distile su üzerine 1 ml % 65 'lik HNO₃ yavaşça eklendi. 65 ml'ye distile su ile tamamlandı.

A Çözeltisi : % 0,4'lük Malaşit yeşili (0,4 gr malaşit yeşili boya tartılıp 100 ml distile su içinde çözüldü) 30 dk manyetik karıştırıcıda şiddetlice karıştırıldı.

B Çözeltisi : 5M HCl (%37'lik d=1,19 g/ml HCl'den 41,44 ml alınıp 100 ml'ye distile su ile seyreltilerek 5 M 100 ml HCl hazırlandı) içinde % 4,2'lik Amonyum molibdat (4,2 gr amonyum molibdat tartılıp 100 5M HCl içinde çözüldü) hazırlanılıp manyetik karıştırıcıda 30 dk şiddetlice karıştırıldı.

C Çözeltisi : 1,5 ml Tween 20, distile su ile 100 ml'ye seyreltilerek % 1,5'lik Tween 20 hazırlandı. 30 dk manyetik karıştırıcıda şiddetlice karıştırıldı.

D Çözeltisi: 1 hacim A çözeltisinden 3 hacim B çözeltisinden alınıp karıştırıldı. Bu karışım manyetik karıştırıcıda 30 dk şiddetlice karıştırıldı. Berrak bir sarı renk elde etmek için süzüldü.

Çalışma Çözeltisi: 1ml C çözeltisi ile 32 ml D çözeltisi karıştırıldı. Bu karışım manyetik karıştırıcıda 30 dk şiddetlice karıştırıldı.

KH₂PO₄ Standart Çözeltisi: 100 µgP/ml konsantrasyondaki stok KH₂PO₄ çözeltisinden 0,08, 0,10, 0,17, 0,33, 0,67, 1,33 µg/0,4 ml konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı (48).

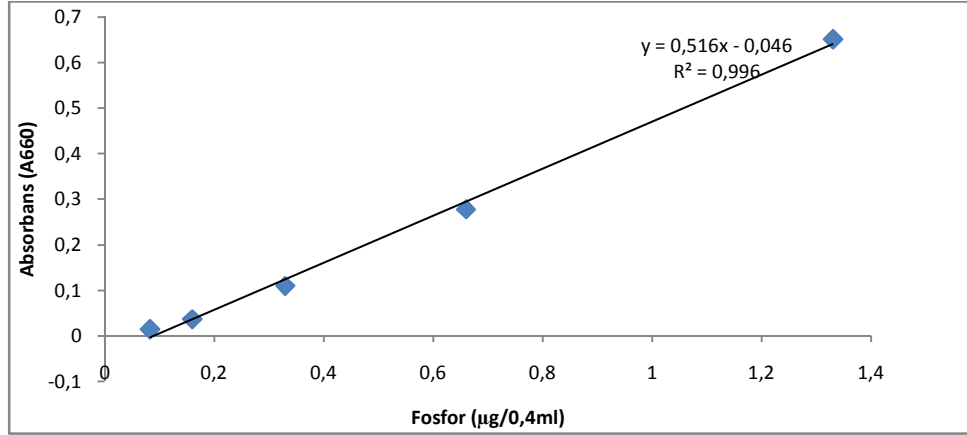
3.11.2.2. Deneyin Yapılışı:

Cam tüpler kullanılmadan önce %1'lik HNO₃ çözeltisi ile yıkayıp 100 °C de kurutuldu.

3.11.2.3. Numunenin Ekstraksiyonu:

2 hacim kloroform 1 hacim etanol karışımı hazırlandı. Test tüplerine 0,5 ml süpernatant, standart tüplerine 0,5 ml standart ve kör tüplerine 0,5 ml su dolduruldu. Her tüpe kloroform-metanol karışımından 10 ml eklenip 30 dk beklenildi. Tüplere, kloroform-metanol karışımının 2/5'i kadar 0,03 M HCl eklenip çalkalandı, 4 saat bekletildi. Üstteki faz atıldı. Alttaki fazdan 2 ml alındı. Bir gece bekletildi (48).

Ertesi gün tüplere 0,2 ml %70'lik HClO₄ eklenip, 180 °C etüvde 30 dk bekletildi. Sonra tüplere 0,2 ml distile su ve 2 ml çalışma solüsyonu eklenip vortekslendi. 20 dk sonra 660 nm'de spektrofotometrede köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı. Elde edilen verilerden kalibrasyon grafiği hazırlandı (Şekil 3.9) (48).



Şekil 3.9. Fosfor kalibrasyon grafiği

3.11.3. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayininde Lowry metodu, protein standartı olarak da Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı. Bu metoda kullanılan sodyum dodesil sülfat (SDS) lowry ayıracına ek olarak çözünmez lipoproteinlerin çözünmesini kolaylaştırmaktadır. Alkali kuprik tartarat ayıracı peptid bağları ile kompleks yapmakta ve fenol ayıracı eklenmesi ile de mavi bir renk meydana gelmektedir. Oluşan rengin koyuluğu numunede bulunan protein konsantrasyonu ile orantılıdır (49). Kullanılan ayıraçlar Markwell M. A'nın literatürüne (50) göre hazırlandı.

3.11.3.1. Kullanılan Ayıraçlar

1. Ayıraç A :

% 2'lik Na₂CO₃ çözeltisi: 2 gr Na₂CO₃ tartılıp 100 ml distile suda çözülerek % 2'lik Na₂CO₃ çözeltisi (w/v) hazırlandı.

% 0,4'lük NaOH çözeltisi: 0,4 gr NaOH tartılıp 100 ml distile suda çözülerek %0,4'lük NaOH çözeltisi (w/v) hazırlandı.

% 0,16'lık Sodyum tartarat çözeltisi: 0,16 gr sodyum tartarat tartılıp 100 ml distile suda çözülerek % 0,16'lık Sodyum tartarat çözeltisi (w/v) hazırlandı.

% 1'lik SDS çözeltisi: 1 gr SDS tartılıp 100 ml distile suda çözülerek %1'lik SDS çözeltisi (w/v) hazırlandı.

Bu dört çözelti 1:1:1:1 oranlarında karıştırıldı.

2. Ayıraç B:

% 4'lük $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 4 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 100 ml distile suda çözüldü.

3. Ayıraç C:

100 hacim ayıraç A ile 1 hacim ayıraç B karıştırıldı.

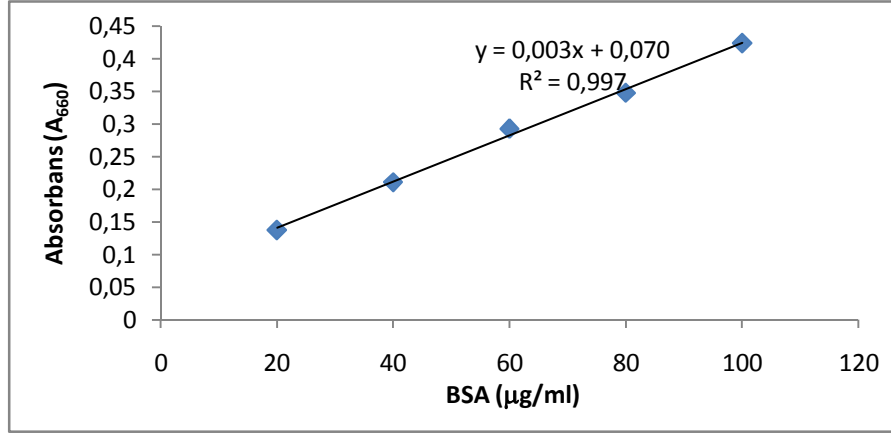
4. Folin Ciocalteu Phenol Ayıracı :

1 hacim Folin Ciocalteu Phenol ayıracı ile 1 hacim distile su karıştırıldı.

5. Bovin Serum Albumin (BSA) Standardı : 100 mg/ml konsantrasyondaki stok BSA çözeltisinden 20, 40, 60, 80 mg/l'lik çözeltiler hazırlandı.

3.11.3.2. Deneyin Yapılışı:

Test tüplerine 1 ml supernatant, standart ve kör tüplerine 1 ml su konuldu. Test, standart ve kör tüplerine 3'er ml ayıraç C eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyon yapıldı. Sonra dilüe Folin Ciocalteu Phenol ayıracı eklenip hızlıca vortekslendi. 45 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 4 ml kloroform eklenip vortekslendi. Daha sonra 3000 RPM'de 20 dk santrifüj yapıp, üstteki kısım atılıp, alttaki kısım 660 nm'de spektrofotometrede köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı. Elde edilen verilerden kalibrasyon grafiği hazırlandı (Şekil 3.10) ve konsantrasyonlar bu eğrilerden hesaplandı (50).



Şekil 3.10. BSA kalibrasyon grafiği

3.12. Verilen Yağlarda Yağ Asidi Analizleri

Yağ asidi analizleri Mersin İl Kontrol Laboratuvarında yaptırıldı. 0,1 gr yağ deney tüpüne alındı, 10 ml Hegzan ilave edildi ve vorteksle karıştırıldı. 0,5 ml 2 N KOH ilave edildi ve vorteksle karıştırılarak metillendirme yapıldı. Gaz kromatografisine (GC) enjekte edilerek analizi yapıldı.

Örnek iyice karıştırılarak homojen hale getirildi. Yaklaşık 60 mg deney numunesi deney tüpüne hassas terazide tartıldı. 10 ml n-Heptan ilave edildi. Üzerine 0.5 ml metanollü KOH çözeltisi ilave edildi. Tüpün kapağı kapatılarak 30 sn süresince kuvvetlice çalkalandı. Bir saat bekletildikten sonra üstteki berrak kısım alındı. 10 ml'lik viallere konularak enjeksiyona hazır hale getirildi. Gaz kromatografisi cihazına (Agilent 6890N) enjeksiyon yapıldı. Aynı numunede olduğu gibi mix standart da cihaza enjekte edilerek, numunedeki pikler tanımlandı.

3.13. İstatistiksel Değerlendirme

Araştırma verilerimizin İstatistiksel değerlendirilmesinde, SPSS for Windows Version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) programı kullanıldı. Araştırmamızda ölçülebilir değişkenlere ilişkin veriler ortalama (mean) ± standart sapma (SD) olarak verildi. Ölçülebilir değişkenlere ilişkin verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk testi ile saptandı (P<0.05). Veriler normal dağılım göstermediği için grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis Varyans analizi ve ikili Bonferroni Mann-Whitney U testi kullanıldı. P≤ 0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Yağların ve Şilomikronların Yağ Asidi Kompozisyonları

Tablo 4.1a ve Tablo 4.1b’de görüldüğü gibi, ayçiçek yağından elde edilen şilomikronlarda (AYŞ) bulunan palmitik ve stearik asit % oranları, ayçiçek yağında bulunan palmitik asit, stearik asit ve α -linoleik asit % oranlarına göre göreceli olarak bir yükselme göstermiştir. AYŞ’larda bulunan α -linoleik asit % oranları ise ayçiçek yağında bulunan α -linoleik asit % oranlarına göre göreceli bir azalma göstermiştir. AYŞ’larda ayçiçeği yağına göre doymuş yağ asidinden zenginleşme, çoklu doymamış yağ asidinden fakirleşme görülmektedir.

Zeytinyağı verilerek elde edilen şilomikronlarda (ZYŞ) bulunan oleik asit % oranı, zeytinyağında bulunan oleik asit % oranına göre göreceli olarak daha düşük ve α -linoleik asit % oranı ise ZYŞ’larda, zeytinyağında bulunan α -linoleik asit % oranına göre göreceli olarak daha yüksektir. ZYŞ’larda, zeytinyağında bulunan tekli doymamış yağ asidi (oleik asit) oranı % 25 göreceli bir azalma gösterirken, ikili doymamış yağ asidi (linoleik asit) yaklaşık %175 göreceli bir artış göstermiştir (Tablo 4.1a, Tablo 4.1b).

Palm yağında bulunan yağ asitleri % oranlarının, palm yağı verilerek elde edilen şilomikronlarda (PLMŞ) bulunan yağ asitlerinin % oranları ile yaklaşık olarak aynı olduğu görülmüştür. Palm yağına göre PLMŞ’larda bulunan doymamış yağ asitlerinde çok az bir miktar göreceli bir artma görülmüştür (Tablo 4.1a, Tablo 4.1b).

Tereyağından elde edilen şilomikronlarda (TRYŞ) bulunan α -linoleik asit ve stearik asit % oranları, tereyağında bulunan α -linoleik asit ve stearik asit % oranlarına göre, göreceli olarak daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.1a, Tablo 4.1b). Bu yağ asitlerinden daha kısa zincirli yağ asitleri ise Tablo 4.1b’de de görüldüğü üzere tereyağının kendisinde bulunurken TRYŞ’larda bulunmamaktadır. Çünkü kısa zincirli yağ asitleri, şilomikron yapısına dahil olmadan portal venaya geçerler. α -Linoleik asit esansiyel yağ asidi olup vücutta sentezi mümkün değildir ancak

TRYŞ'larda miktarının arttığı görülmektedir. Bu durum da muhtemelen hücrelerdeki mevcut depodan alındığını düşündürmektedir.

Margarin yağında bulunan yağ asitlerinin kompozisyonunun, margarin yağı verilerek elde edilen şilomikronlarda (MRGŞ) bulunan yağ asitlerinin kompozisyonu ile hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. MGRŞ'larda ağırlıklı olarak doymuş yağ asitleri bulunmuştur (Tablo 4.1, Tablo 4.1b).

Balık yağı verilerek elde edilen şilomikronlarda (BLKŞ) bulunan oleik asit % oranı, balık yağında bulunan oleik asit % oranından daha fazladır. Stearik asidin vücutta oleik aside dönüştüğü bilinmektedir. Oleik asitteki bu artış, stearik asidin oleik aside dönüşmesinden kaynaklanıyor olabilir (Şekil 2.1). Ayrıca BLKŞ'larda α -linoleik asit % oranı da yine balık yağında bulunan α -linoleik asit % oranından daha fazladır. Bu durum da oleik asidin vücutta linoleik aside dönüşüyor olmasından kaynaklanıyor olması muhtemeldir (Şekil 4.2). Balık yağında bulunan eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosahekzaenoik asit (DHA), yağ asitlerinin her ikisinin de BLKŞ'larda bulunmadığı görülmüştür (Tablo 4.1b). Ancak bu durum pek mümkün değildir ve besinsel yağlarla alınan yağların yağ asidi kompozisyonunun şilomikron yapısında hemen hemen benzer miktarlarda bulunduğunu gösteren mevcut literatür ile uyumlu değildir. Bu nedenle bu durumun analiz hatası nedeniyle gerçekleşmiş olması muhtemeldir.

Sonuçta, şilomikronların yağ asidi kompozisyonunun, besinlerle alınan yağların yağ asidi kompozisyonu ile büyük ölçüde paralellik gösterdiği teyit edilmiştir.

Yukarıda belirtilen altı farklı yağdan elde edilen torasik lenf şilomikronlarının yağ asitlerinin % kompozisyonları Tablo 4.1.a ve Tablo 4.1b'de verilmiştir.

Tablo 4.2'de yine bu farklı yağlardan elde edilen torasik lenf şilomikronlarının yağ asidi kompozisyonları karşılaştırılmıştır. Buna göre sıralama şu şekildedir:

Tekli Doymamış YA/Çoklu Doymamış YA Oranı Sıralaması BLKŞ> PLMŞ> TRYŞ >ZYŞ> MRGŞ> AYŞ.

Doymamış YA/Tekli Doymamış YA Oranı Sıralaması AYŞ> TRYŞ >MRGŞ >ZYŞ >BLKŞ >PLMŞ.

Tablo 4.1a. Altı Farklı Yağın Ve Bu Yağlardan Elde Edilen Torasik Lenf Şilomikronlarının Yağ Asitlerinin % Kompozisyonları

Yağ Asitleri	Ayçiçek Yağı	AYŞ	Zeytin Yağı	ZYŞ	Palm Yağı	PLMŞ	Tere yağı	TRVŞ	Balık Yağı	BLKŞ	Margarin Yağı	MRGŞ
Bütirik Asit	-	-	-	-	-	-	1,22	-	-	-	-	-
Kaproik Asit	-	-	-	-	-	-	1,31	-	-	-	-	-
Kaprilik Asit	-	-	-	-	-	-	1,05	-	-	-	0,61	-
Kaprik Asit	-	-	-	-	-	-	2,83	-	-	-	0,65	-
Undekanoik Asit	-	-	-	-	-	-	0,06	-	-	-	-	-
Laurik Asit	-	-	-	-	0,23	-	3,65	4,08	0,11	-	11,53	12,86
Tridekanoik Asit	-	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-
Miristik Asit	0,06	-	-	0,80	1,00	1,69	12,71	11,66	7,96	-	4,53	5,25
Miristoleik Asit	-	-	-	-	-	-	1,09	-	-	-	-	-
Pentadekanoik Asit	-	-	-	-	-	-	1,64	-	-	-	-	-
CIS-10 Pentadekanoik Asit	-	-	-	-	-	-	0,38	-	-	-	-	-
Palmitik Asit	6,31	21,57	12,14	14,41	39,24	32,93	37,82	35,81	18,04	31,84	34,92	31,02
Palmitoleik Asit	0,11	-	0,98	1,35	0,20	-	1,82	-	9,04	-	0,11	-
Heptadekanoik Asit	0,04	-	0,08	-	0,09	-	0,89	-	1,86	-	0,07	-
Cis-10 Heptadekanoik Asit	0,02	-	0,14	-	0,03	-	0,43	-	2,01	-	-	-
Stearik Asit	3,83	13,91	2,81	3,95	4,31	3,76	-	10,87	3,34	13,24	5,69	5,43
Oleik Asit	27,95	28,03	73,99	56,42	43,39	47,30	26,73	27,98	13,95	33,30	28,94	32
Elaidik Asit	-	-	-	-	-	-	0,19	-	-	-	-	-
Linoleidik Asit	-	-	-	-	-	-	0,51	-	0,20	-	-	-

Tablo 4.1b. Altı Farklı Yağın Ve Bu Yağlardan Elde Edilen Torasik Lenf Şilomikronlarının Yağ Asitlerinin % Kompozisyonları

Yağ Asitleri	Ayçiçek Yağı	AYŞ	Zeytin Yağı	ZYŞ	Palm Yağı	PLMŞ	Tere yağı	TRYŞ	Balık Yağı	BLKŞ	Margarin Yağı	MRGŞ
α -Linoleik Asit	60,13	36,48	8,18	22,45	10,59	14,33	3,023	9,60	1,19	21,82	11,80	13,44
Gamma-Linolenik Asit	-	-	-	-	-	-	0,60	-	-	-	-	-
Linolenik Asit	0,05	-	0,64	0,66	0,23	-	0,67	-	3,84	-	0,81	-
Arasidik Asit	0,28	-	0,48	-	0,39	-	0,23	-	0,30	-	0,24	-
11c-Eikosenoik Asit	0,17	-	0,36	-	0,16	-	0,30	-	1,50	-	0,10	-
11c,14c-Eikosadienoik Asit	-	-	-	-	-	-	0,07	-	1,07	-	Yok	-
8c,11c,14c-Eikosatrienoik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Yok	-
11c,14c,17c-Eikosatrienoik Asit	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	Yok	-
Arasidonik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	0,16	Yok	-
Eikosapentaen oik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Yok	-
EPA	0,77	-	0,14	-	0,06	-	0,13	-	20,65	-	Yok	-
Erusik Asit	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-	Yok	-
Dokosaheksaen oik Asit	-	-	-	-	-	-	Yok	-	-	-	Yok	-
Trikosanoik Asit	-	-	-	-	-	-	Yok	-	-	-	Yok	-
Lignoserik Asit	0,26	-	0,04	-	0,06	-	0,14	-	13,83	-	Yok	-
DHA	-	-	-	-	-	-	Yok	-	0,83	-	Yok	-

AYŞ=Ayçiçek yağından elde edilen şilomikron, ZYŞ= Zeytin yağından elde edilen şilomikron, PLMŞ=Palmyağından elde edilen şilomikron, TRYŞ=Tereyağından elde edilen şilomikron, MRGŞ=Margarinden elde edilen şilomikron, BLKŞ=Balık yağından elde edilen şilomikron

Tablo 4.2. Farklı Yağlardan Elde Edilen Torasik Lenf Şilomikronlarının Yağ Asidi Kompozisyonlarının Karşılaştırılması

Yağ Asidi (YA)	%AYŞ	%ZYŞ	%PLMYŞ	%TRYŞ	%MRGŞ	%BLKŞ
Doymuş YA	35,48	19,16	38,37	62,42	54,38	56,50
Tekli Doymamış YA	28,32	57,8	47,29	27,97	31,99	38,72
Çoklu Doymamış YA	36,48	23,11	14,32	9,60	13,44	4,87
Doymuş YA/Doymamış YA	0,50	0,20	0,60	1,60	1,10	1,20

4.2. Farklı Yağlardan Elde Edilen İntestinal VLDL'e Ait Türbidimetrik Analizler

Altı farklı yağdan elde edilen intestinal VLDL'in 14 dk vortekslendikten sonraki absorbanlarının (A_{400}) vortekslenmeden önceki absorbanlarına oranları hesaplanmış ve farklı yağların intestinal VLDL'i (IV) arasında ve aynı yağın intestinal VLDL'inin vortekslenme sonrası birbirini takip eden $A_{400}/0.dk.A_{400}$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak her bir yağ için 14.dk/0.dk oranı ile 0.dk/0.dk oranı ve 14.dk/0.dk oranı ile 5.dk/0.dk oranı arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildi ve zeytinyağı ve palm yağının 14.dk/0.dk oranları ile 0.dk/0.dk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken, sadece margarinin 0.dk/0.dk oranları ile 5.dk/0.dk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Doymuş yağ asitlerinden zengin yağlardan elde edilen (palm yağı ve tereyağı) intestinal VLDL'in absorbanları 14 dk vortekslensleme sonrasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yükselme gösterdi. Yine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da margarin yağı intestinal VLDL'nin absorbanları nispeten sabit kalırken, doymamış yağ asitlerinden elde edilen intestinal VLDL'in absorbanlarının ise azaldığı görüldü (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Farklı yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in vorteksleme sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ oranlarının ortalamaları

Numune	0dk/0dk	1dk/0dk	2dk/0dk	3dk/0dk	4dk/0dk	5dk/0dk	6dk/0dk	7dk/0dk	8dk/0dk	9dk/0dk	10dk/0dk	11dk/0dk	12dk/0dk	13dk/0dk	14dk/0dk
AYIV n=7	1,00±0,00	0,86±0,14	0,82±0,22	0,81±0,28	0,79±0,29	0,75±0,33	0,72±0,32	0,74±0,35	0,75±0,73	0,74±0,35	0,72±0,38	0,71±0,39	0,71±0,41	0,72±0,41	0,73±0,41
ZYIV n=4	1,00±0,00	0,92±0,14	0,86±0,20	0,84±0,28	0,82±0,24	0,81±0,23	0,80±0,29	0,82±0,28	0,80±0,27	0,82±0,28	0,75±0,26	0,73±0,27	0,69±0,29	0,75±0,26	0,71±0,26*
PLMIV n=3	1,00±0,00	1,37±0,38	1,25±0,52	1,00±0,62	1,05±0,66	1,06±0,69	1,20±0,63	1,33±0,56	1,36±0,62	1,33±0,56	1,47±0,51	0,80±0,58	1,58±0,60	1,56±0,59	1,49±0,41*
TRYIV n=4	1,00±0,00	1,04±0,18	0,91±0,11	0,90±0,07	1,04±0,27	0,99±0,19	1,03±0,29	1,15±0,39	1,22±0,46	1,15±0,39	1,20±0,40	1,04±0,17	1,23±0,51	1,36±0,56	1,37±0,58
MRGIV n=3	1,00±0,00	0,89±0,07	0,78±0,06	0,78±0,08	0,83±0,11	0,79±0,16*	0,87±0,16	0,89±0,11	0,92±0,14	0,89±0,11	0,97±0,16	0,96±0,13	0,97±0,17	0,96±0,16	0,98±0,16
BLKIV n=3	1,00±0,00	0,84±0,094	0,70±0,14	0,77±0,03	0,73±0,14	0,79±0,24	0,77±0,07	0,77±0,16	0,75±0,12	0,77±0,16	0,72±0,32	0,70±0,35	0,64±0,34	0,63±0,44	0,62±0,43

AYIV=Ayçiçek yağından elde edilen intestinal VLDL, ZYIV= Zeytin yağından elde edilen intestinal VLDL, PLMIV=Palmyağından elde edilen intestinal VLDL, TRYIV=Tereyağından elde edilen intestinal VLDL, MRGIV=Margarinden elde edilen intestinal VLDL, BLKIV=Balık yağından elde edilen intestinal VLDL *: 0.dk/0.dk ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$)

Rat torasik lenf intestinal VLDL oda ısısında 14 dk boyunca vortekslenmiştir. Her 1 dk sonrası okunan absorbansları 0. dk absorbansına bölünerek, oranları hesaplanmıştır.

4.3. Sıcaklığın Farklı Yağlardan Elde Edilen İntestinal VLDL'nin Vorteksle Agregasyonuna Etkilerinin Karşılaştırılması

4.3.1. İntestinal VLDL'nin Vorteksle Agregasyonuna +4 °C'nin Etkilerinin Karşılaştırılması

+4 °C'de 12 saat bekletilen rat torasik lenf intestinal VLDL'i 400 nm'de vortekslenmiştir. Tablo 4.4'te görüldüğü gibi intestinal VLDL'in vortekslenmekten sonraki absorbanslarının (A_{400}) vortekslenmeden önceki (0.dk) absorbanslarına oranları hesaplanmış, farklı yağların intestinal VLDL'i arasında ve aynı yağın intestinal VLDL'nin vortekslenme sonrası birbirini takip eden $A_{400}/0.dk.A_{400}$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak her bir yağ için 5.dk/0.dk oranı ile 0.dk/0.dk oranı arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildi ve ayçiçek yağı, palm yağı ve tereyağının 5.dk/0.dk oranları ile 0.dk/0.dk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu.

Tablo 4.4. + 4 °C'de Bekletilen İntestinal VLDL'in Vorteksleme Sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamaları

Numune	0.dk/0.dk	1.dk/0.dk	2.dk/0.dk	3.dk/0.dk	4.dk/0.dk	5.dk/0.dk
AYIV (n=6)	1,00±0,00	0,88±0,10	0,84±0,11	0,85±0,14	0,82±0,17	0,78±0,19*
ZYIV (n=4)	1,00±0,00	0,84±0,24	0,80±0,33	0,77±0,34	0,72±0,32	0,72±0,28
PLMIV (n=3)	1,00±0,00	0,92±0,19	0,82±0,21	0,82±0,24	0,81±0,24	0,85±0,23*
TRYIV (n=4)	1,00±0,00	0,71±0,16	0,57±0,18	0,52±0,23	0,54±0,25	0,54±0,25*
MKGIV (n=3)	1,00±0,00	0,90±0,06	0,91±0,17	1,01±0,19	0,99±0,22	1,01±0,26
BLKIV (n=3)	1,00±0,00	0,98±0,06	0,95±0,05	1,01±0,08	0,88±0,20	0,88±0,35

* : 0.dk/0.dk ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$)

4.3.2. İntestinal VLDL'in Vorteksle Agregasyonuna – 20 °C'nin Etkilerinin Karşılaştırılması

Rat torasik lenf intestinal VLDL'i on iki saat süreyle dondurulmasının ardından oda ısısına geldikten sonra vorteklenmişlerdir. İntestinal VLDL'in vortekslendikten sonraki absorbanlarının (A_{400}) vortekslenmeden önceki (0.dk) absorbanlarına oranları hesaplanmış ve ne farklı yağların intestinal VLDL'i arasında ve ne de aynı yağın intestinal VLDL'nin vortekslenme sonrası birbirini takip eden $A_{400}/0.dk.A_{400}$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Ancak her bir yağ için 5.dk/0.dk oranı ile 0.dk/0.dk oranı arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildi margarin ve tereyağının 5.dk/0.dk oranları ile 0.dk/0.dk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. Tereyağı ve margarin verilerek elde edilen intestinal VLDL'in 5 dk vortekslenme sonrası 0.dk'ya göre absorbanındaki azalma diğer yağlardan elde edilen intestinal VLDL'e göre daha belirgin görülmektedir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 -20 °C'de Dondurulan İntestinal VLDL'in Çözüldükten Sonra Vorteksleme sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamalar

* : 0.dk/0.dk ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$)

Numune	0.dk/0.dk	1.dk/0.dk	2.dk/0.dk	3.dk/0.dk	4.dk/0.dk	5.dk/0.dk
AYIV (n=4)	1,00±0,00	0,88±0,14	0,84±0,13	0,85±0,23	0,82±0,21	0,80±0,22
ZYIV (n=4)	1,00±0,00	0,84±0,16	0,72±0,24	0,68±0,23	0,64±0,23	0,72±0,24
PLMIV (n=3)	1,00±0,00	0,91±0,22	0,82±0,27	0,79±0,23	0,77±0,33	0,82±0,25
TRYIV (n=4)	1,00±0,00	0,62±0,24	0,50±0,27	0,42±0,28	0,42±0,30	0,44±0,35*
MRGIV (n=3)	1,00±0,00	0,72±0,05	0,63±0,03	0,61±0,06	0,67±0,06	0,74±0,04*
BLKIV (n=3)	1,00±0,00	0,91±0,15	0,79±0,25	0,76±0,27	0,85±0,30	0,94±0,47

4.4. Farklı Yağlardan Elde Edilen Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'nin Yüzey Hidrofobisitelerinin Bütil Sefaroz Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi İle Karşılaştırılmaları

4.4.1. İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi (HİK) ile Yüzey Hidrofobisitelerine Göre Fraksiyonları

Ayçiçek yağı, zeytin yağı, palm yağı, tereyağı, margarin yağı ve balık yağından elde edilen torasik lenf intestinal VLDL'nin Bütil Sefaroz HİK sonrası elde edilen kromatogramları Şekil 4.1'te verilmiştir. Ayçiçeği yağı ve margarinden elde edilen intestinal VLDL, yüzey hidrofobik dereceleri birbirinden farklı 2 fraksiyona ayrıldı. Diğer yağlardan elde edilen intestinal VLDL ise yüzey hidrofobik dereceleri birbirinden farklı 3 fraksiyona ayrıldı (Şekil 4.1).

4.4.2. İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatogramı Pik Alanlarının Birbirlerine Oranları

Her yağın hidrofobik dereceleri farklı fraksiyonlarına ait pik alanları birbirlerine oranlandı. 1. pik/3.pik, 1. pik/2.pik ve 2.pik/3.pik alan oranları Tablo 4.6'da verilmiştir.

Torasik lenf intestinal VLDL'in, Bütil Sefaroz Hidrofobik İnteraksiyon sonucu oluşan pik alanları ve alanların birbirlerine oranları hesaplandı. Pik alanları oranları büyükten küçüğe göre sıralandığında 1.pik/3.pik oranındaki sıralama, TRYIV>MRGIV>ZYIV>PLMIV>AYIV>BLKIV, 1.pik/2.pik oranındaki sıralama, MRGIV>ZYIV>BLKIV> PLMIV, 2.pik/3.pik oranındaki sıralama, PLMIV, >ZYIV>MRGIV>BLKIV şeklindedir (Tablo 4.6).

Pik alan oranlarına genel olarak bakıldığında, doymuş yağ asitlerinden zengin yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in HİK sabit fazı ile daha az miktarda etkileşime girdikleri oysa balık yağından elde edilen intestinal VLDL'in sabit fazla daha fazla miktarda etkileşime girdikleri görülmektedir (Tablo 4.6).

1.pik/3.pik alan oranları dikkate alındığında BLKIV, ayçiçek yağı ve palm yağı hariç diğer yağ intestinal VLDL'inden sabit fazla istatistiksel olarak daha fazla hidrofobik etkileşim gösterir. AYIV ise palm yağı ve balık yağı intestinal VLDL'i

hariç diğerlerine göre istatistiksel olarak sabit fazla daha fazla etkileşim gösterir (Tablo 4.6).

1.pik/2.pik alan oranları açısından ise MRGIV, balık ve palm yağı intestinal VLDL'ne göre sabit fazla istatistiksel olarak daha az hidrofobik etkileşim gösterir. ZYIV, margarin yağı intestinal VLDL'nden sabit fazla istatistiksel olarak daha fazla, palm yağı intestinal VLDL'nden ise sabit fazla istatistiksel olarak daha az etkileşim gösterir (Tablo 4.6).

2.pik/3.pik alan oranlarına bakıldığında ise yağlardan elde edilen intestinal VLDL arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Altı Farklı Yağdan Elde Edilen Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi Sonrasında Oluşan Piklerinin Alanlarının Birbirlerine Oranları.

	BLKIV	AYIV	PLMIV	ZYIV	MRGIV	TRYIV
1. pik/3.pik	0,17±0,07	0,26±0,18	1,04±1,2	1,65±1,40 ^{≠*}	1,66±0,59 ^{≠*}	1,93±1,52 ^{≠*}
1.pik/2.pik	1,19±1,10 ^b	-	0,75±0,18 ^{a,b}	1,96±1,14	7,57±6,70 ^a	-
2. pik/3.pik	0,36±0,40	-	1,35±1,5	1,13±1,27	0,54±0,45	-

≠ : AYIVM'dan istatistiksel olarak anlamlı bir fark olanlar, * : BLKIV 'dan istatistiksel olarak anlamlı bir fark olanlar, a: ZYIV' dan istatistiksel olarak anlamlı bir fark olanlar, b: MRGIV' dan istatistiksel olarak anlamlı bir fark olanlar (p≤0,05).

4.4.3. İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi Sonucunda Ayrılan Fraksiyonlarının Kapasite Faktörü (k) Değerleri

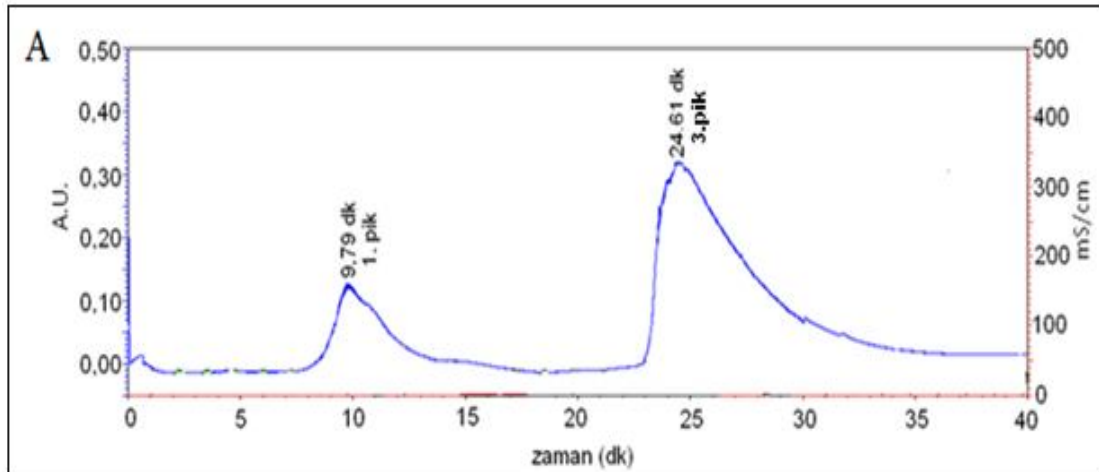
Farklı yağlardan elde edilen torasik lenf intestinal VLDL'nin 2. ve 3.pik kapasite faktörü değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

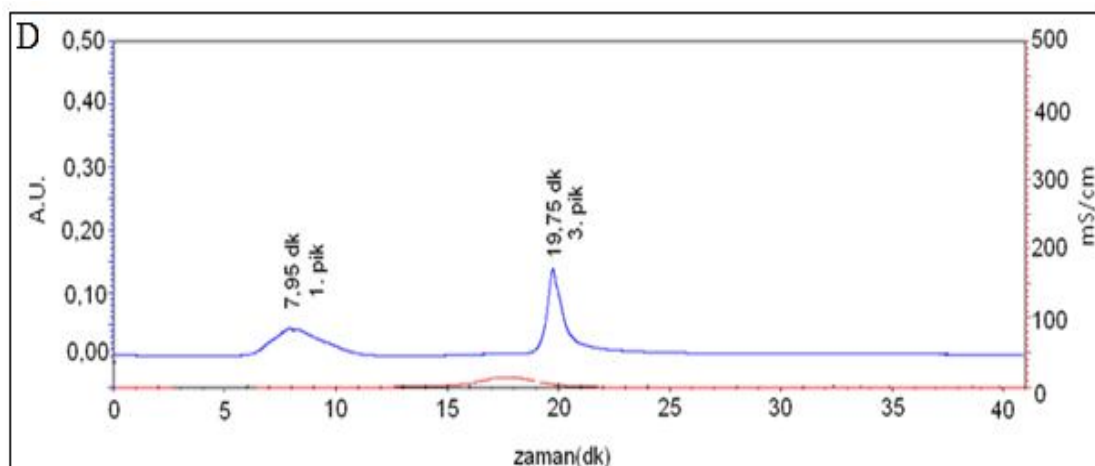
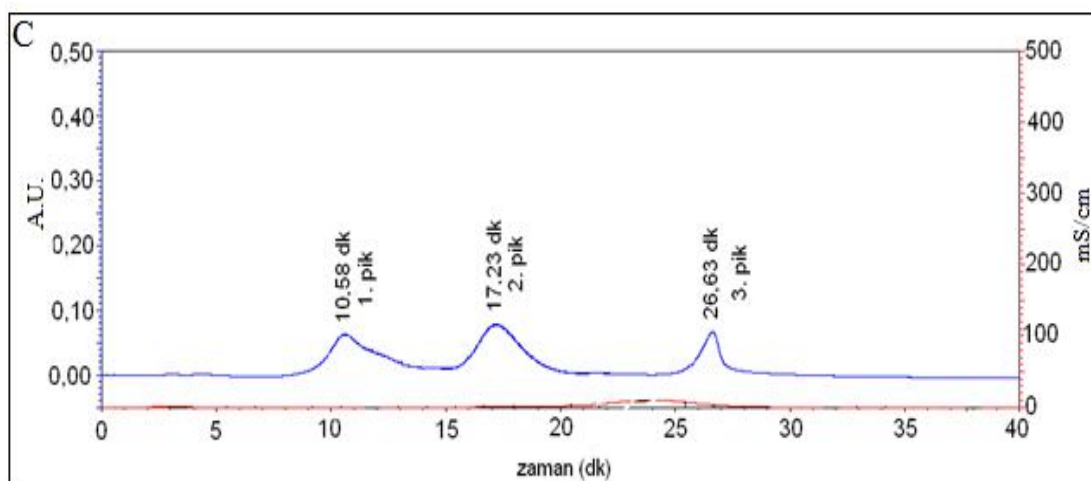
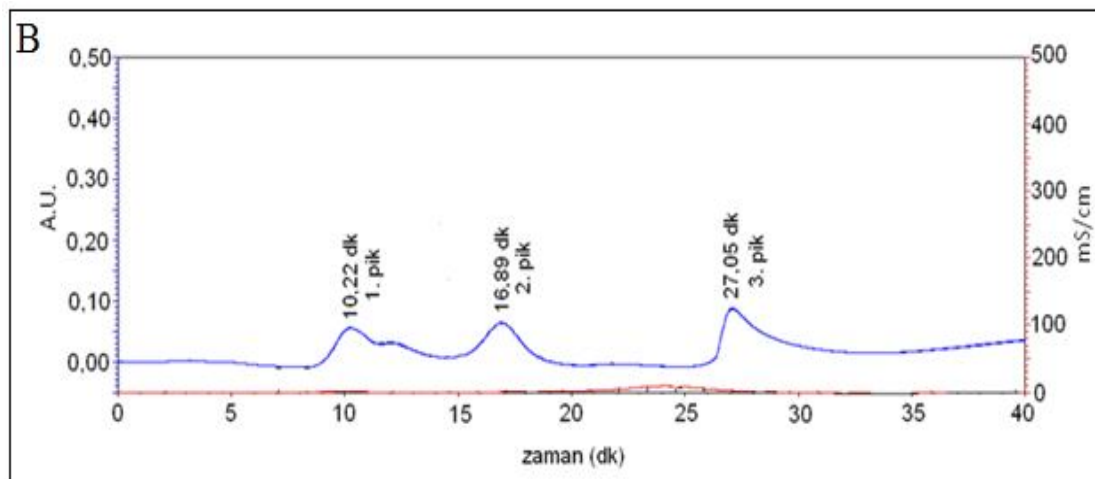
Torasik lenf intestinal VLDL'in Bütil Sefaroz Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi sonucunda oluşan piklerin kapasite faktörü değerleri ve birbirlerine oranları hesaplandı. Farklı yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in k değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kapasite faktörü değerleri arasındaki sıralama 2. pik k değerleri arasındaki sıralama, PLMIV>BLKIV>ZYIV>MRGIV, 3. pik k değerleri arasındaki sıralama, AYIV>PLMIV>TRYIV>BLKIV>ZYIV>MRGIV şeklindedir (Tablo 4.7.).

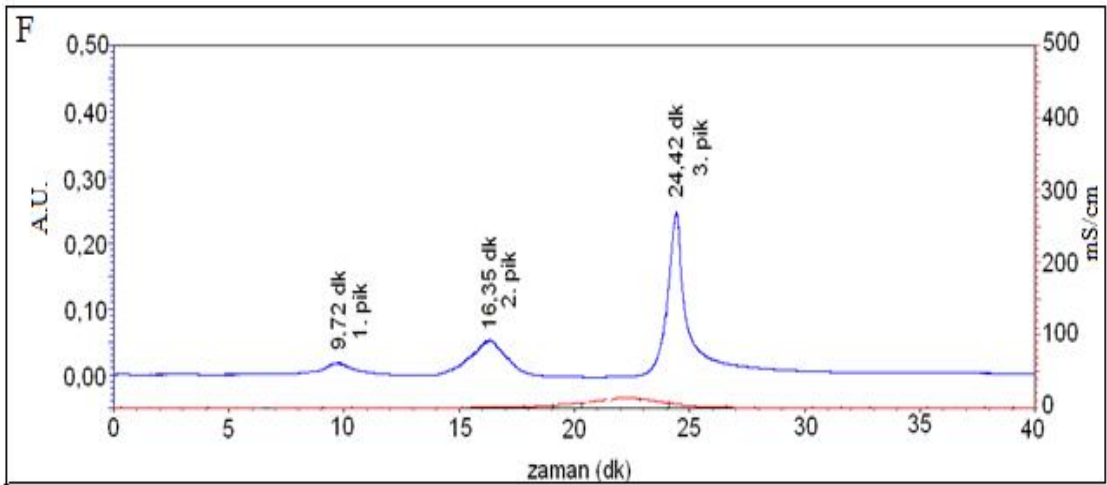
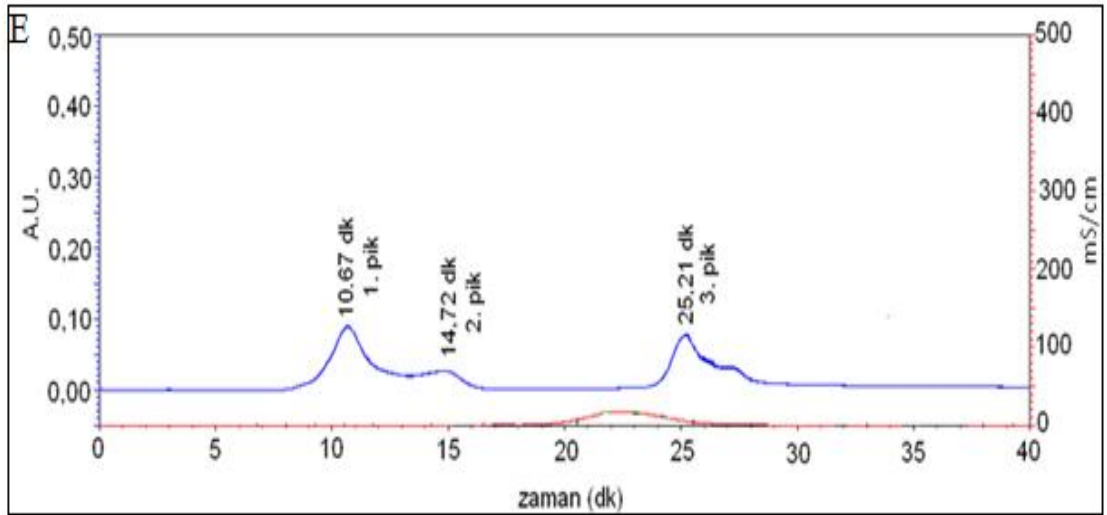
k değerleri, void volümün (hiç tutulmadan çıkan fraksiyon) kaç katı hacimde pik geldiğinin göstergesidir. 3. pik k değerleri arasındaki sıralama dikkate alındığında, torasik lenf kanülasyonu sonrası elde edilen intestinal VLDL'nin HİK'nde sabit faz ile etkileşimleri arasında önemli bir fark yoktur. Tüm yağların intestinal VLDL fraksiyonları, hidrofobik sabit faza yaklaşık olarak birbirlerine eşit kuvvetle tutunmaktadır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Altı Farklı Yağdan Elde Edilen Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'in Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi Sonrasında Oluşan Kapasite Faktörü (k) Değerlerinin Birbirlerine Oranları

k DEĞERLERİ						
	MRGIV	ZYIV	BLKIV	TRYIV	PLMIV	AYIV
2.pik k	0,30±0,08	0,48±0,21	0,61±0,08	-	0,75±0,22	-
3.pik k	1,34±0,02	1,39±0,50	1,53±0,12	1,54±0,14	1,59±0,08	1,66±0,19







Şekil 4.1 Ayçiçek yağı (A), zeytinyağı (B), palm yağı (C), tereyağı (D), margarin (E), balık yağı (F) verilerek elde edilen rat torasik lenf intestinal VLDL'nin hidrofobik interaksyon kromatografisi analizine ait kromatogramlar.

4.5. Misel Yapısına Etki Eden Faktörlerin Altı Farklı Yağdan Elde Edilen İntestinal VLDL Üzerine Etkisi

Yağlardan elde edilen intestinal VLDL'ler üzerine 1'er mmol NaCl eklenmiş elde edilen sonuçlar tablo 4.8.'de verilmiştir.

4.5.1. 1mmol NaCl'nin Etkisi

Altı farklı yağdan elde edilen rat torasik lenf intestinal VLDL'nin 1 mmol NaCl eklenip, vortekslenmekten sonraki absorbanlarının (A_{400}) vortekslenmeden önceki absorbanlarına oranları hesaplanmış ve ne farklı yağların intestinal VLDL'i arasında ve ne de aynı yağın intestinal VLDL'inin vortekslenme sonrası birbirini takip eden $A_{400}/0.dk.A_{400}$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak her bir yağ için 5.dk/0.dk oranı ile 0.dk/0.dk oranı arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildi ve margarin ve balık yağının 5.dk/0.dk oranları ile 0.dk/0.dk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. 1mmol NaCl Eklenilen İntestinal VLDL'in Vorteksleme Sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamaları

Numune	0.dk/0.dk	1.dk/0.dk	2.dk/0.dk	3.dk/0.dk	4.dk/0.dk
AYIV (n=5)	1,00±0,00	0,91±0,22	0,90±0,20	0,81±0,13	0,83±0,14*
ZYIV (n=4)	1,00±0,00	1,18±0,20	1,21±0,20	1,17±0,19	1,16±0,14
PLMIV (n=3)	1,00±0,00	1,54±0,48	1,51±0,52	1,43±0,66	1,29±0,69
TRYIV (n=4)	1,00±0,00	1,33±0,47	1,42±0,47	1,50±0,39	1,43±0,33
MRGIV (n=3)	1,00±0,00	1,15±0,35	1,08±0,31	1,08±0,31	1,06±0,32
BLKIV (n=3)	1,00±0,00	0,94±0,07	0,92±0,07	0,92±0,0,9	0,89±0,10*

* : 0.dk/0.dk ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$)

4.5.2. 0,1 N HCl'nin Etki

Yağlardan elde edilen intestinal VLDL'ler üzerine 0,1 N HCl eklenmiş elde edilen sonuçlar Tablo 4.9.'de verilmiştir.

Torasik lenf intestinal VLDL'ine 250 µl 0,1 N HCl/2 ml intestinal VLDL eklendi ve 1'er dk aralıklarla vortekslenerek 400 nm de absorbanları ölçüldü. Vortekslendikten sonraki absorbanlarının (A_{400}) vortekslenmeden önceki absorbanlarına oranları hesaplandı. Asit eklenmesinin absorban üzerindeki dilüsyon etkisi aynı deney distile su ile tekrarlanarak ortadan kaldırıldı. Ne farklı yağların intestinal VLDL'i arasında ve ne de aynı yağın intestinal VLDL'nin vortekslenme sonrası birbirini takip eden $A_{400}/0.dk.A_{400}$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Ancak her bir yağ için 4.dk/0.dk oranı ile 0.dk/0.dk oranı arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildi, ayçiçeği yağı ve balık yağının 4.dk/0.dk oranları ile 0.dk/0.dk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. 0,1 N HCl Eklenilen İntaestinal VLDL'in Vorteksleme Sonrası.

$A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamaları

Numune	0.dk/0.dk	1.dk/0.dk	2.dk/0.dk	3.dk/0.dk	4.dk/0.dk	5.dk/0.dk
AYIV (n=5)	1,00±0,00	0,91±0,12	0,92±0,17	0,88±0,20	0,91±0,19	0,95±0,23
ZYIV (n=4)	1,00±0,00	0,96±0,13	01,00±0,18	1,02±0,13	0,99±0,22	1,00±0,17
PLMIV (n=3)	1,00±0,00	0,87±0,31	0,74±0,24	0,79±0,32	0,78±0,33	0,78±0,28
TRYIV (n=4)	1,00±0,00	0,98±0,23	0,99±0,40	0,83±0,22	0,77±0,19	0,76±0,24
MRGIV (n=3)	1,00±0,00	0,79±0,05	0,77±0,12	0,77±0,13	0,74±0,07	0,82±0,06*
BLKIV (n=3)	1,00±0,00	0,86±0,10	0,75±0,21	0,81±0,13	0,76±0,16	0,73±0,24*

* : 0.dk/0.dk ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$) .

4.5.3. 0,1 N NaOH'nin Etkisi

Yağlardan elde edilen intestinal VLDL'ler üzerine 0,1 N NaOH eklenmiş edilen sonuçlar tablo 4.10.'de verilmiştir.

Torasik lenf intestinal VLDL'ine 250 µl 0,1 N NaOH /2 ml KŞM eklendi ve 1'er dk aralıklarla 400 nm de absorbansları ölçüldü. Her 1 dk sonrasındaki absorbans değerinin 0. dk absorbans değerine oranları hesaplandı. Baz eklenmesinin absorbans üzerindeki dilüsyon etkisi aynı deney distile su ile tekrarlanarak ortadan kaldırıldı. . Ne farklı intestinal VLDL arasında ve ne de aynı intestinal VLDL'in vortekslenme sonrası birbirini takip eden $A_{400}/0.dk.A_{400}$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Ancak her bir yağ için 4.dk/0.dk oranı ile 0.dk/0.dk oranı arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildi ve ayçiçek yağının, zeytin yağının, tereyağının, margarinin ve balık yağının 4.dk/0.dk oranları ile 0.dk/0.dk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. 0,1 N NaOH Eklenilen İntestinal VLDL'in Vorteksleme Sonrası $A_{400}/0. dk A_{400}$ Oranlarının Ortalamaları

Numune	0.dk/0.dk	1.dk/0.dk	2.dk/0.dk	3.dk/0.dk	4.dk/0.dk
AYIV (n=5)	1,00±0,00	0,78±0,08	0,74±0,12	0,68±0,16	0,68±0,17*
ZYIV (n=4)	1,00±0,00	0,65±0,10	0,55±0,10	0,51±0,11	0,49±0,12*
PLMIV (n=3)	1,00±0,00	0,86±0,24	0,79±0,34	0,76±0,39	0,71±0,40
TRYIV (n=4)	1,00±0,00	0,83±0,08	0,75±0,14	0,71±0,13	0,71±0,12*
MRGIV (n=3)	1,00±0,00	0,82±0,013	0,74±0,15	0,71±0,13	0,69±0,08*
BLKIV (n=3)	1,00±0,00	0,86±0,07	0,75±0,09	0,69±0,08	0,66±0,07*

* : 0.dk/0.dk ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$).

4.5.4. 1/3, 1/5 ve 1/7 Oranlarında Sulandırmanın Etkisi

İntestinal VLDL, 1/3 oranda dilüe edildikten sonra vorteklenerek 400 nm de 1'er dk aralıklarla absorbansları ölçülmüştür. Vortekslendikten sonraki absorbanslarının (A_{400}) vortekslenmeden önceki absorbanslarına oranları hesaplanmış ve farklı intestinal VLDL arasında ve aynı intestinal VLDL'in vortekslenme sonrası birbirini takip eden $A_{400}/0.dk.A_{400}$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak her bir yağ için 5.dk/0.dk oranı ile 0.dk/0.dk oranı arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildi ve bu oranlar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Distile Su İle 1/3 Oranında Sulandırılan Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'in Vortekslendikten Sonraki Absorbanslarının (A_{400}) Vortekslenmeden Önceki (0.dk) Absorbanslarına Oranları.

Numune	0.dk/0.dk	1.dk/0.dk	2.dk/0.dk	3.dk/0.dk	4.dk/0.dk	5.dk/0.dk
AYIV (n=4)	1,00±0,00	0,95±0,15	1,01±0,37	1,08±0,48	1,15±0,57	1,21±0,75
ZYIV (n=4)	1,00±0,00	0,09±0,03	0,08±0,11	0,85±0,03	0,77±0,10	0,81±0,15
PLMIV (n=3)	1,00±0,00	1,10±0,47	1,02±0,11	0,92±0,47	0,80±0,18	0,94±0,44
TRYIV (n=3)	1,00±0,00	0,98±0,19	0,89±0,12	0,87±0,06	0,88±0,12	0,93±0,23
MKGIV (n=3)	1,00±0,00	0,89±0,07	0,78±0,06	0,78±0,08	0,84±0,11	0,79±0,16
BLKIV (n=3)	1,00±0,00	0,84±0,09	0,70±0,14	0,78±0,04	0,73±0,14	0,80±0,24

* : 0.dk/0.dk ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$).

İntestinal VLDL, 1/5 oranda dilüe edildikten sonra vorteklenerek 400 nm de 1'er dk aralıklarla absorbansları ölçülmüştür. Her 1dk vorteks sonrası ölçülen absorbans değerlerinin (A_{400}) vortekslenmeden önceki (0.dk) absorbanslarına oranları hesaplanmış ve ne farklı intestinal VLDL (IV) arasında ve ne de aynı intestinal VLDL'in vortekslenme sonrası birbirini takip eden $A_{400}/0.dk.A_{400}$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Ancak her bir yağ için 5.dk/0.dk oranı ile 0.dk/0.dk oranı arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildi ve bu oranlar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. (Tablo 4.12).

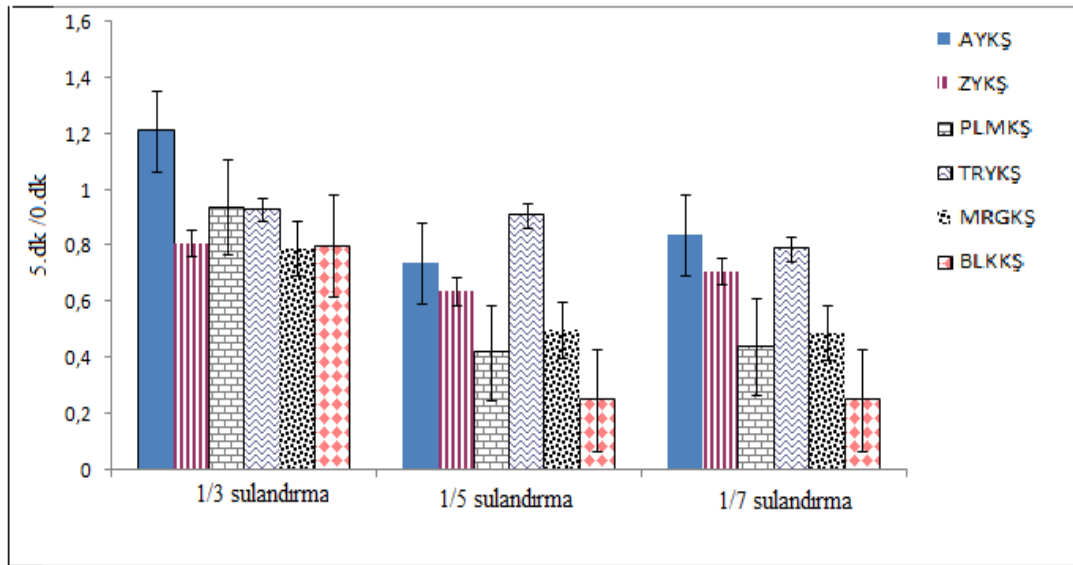
Tablo 4.12. Distile Su İle 1/5 Oranında Sulandırılan Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'inin Vortekslenmekten Sonraki Absorbanslarının (A_{400}) Vortekslenmeden Önceki (0.dk) Absorbanslarına Oranları

Numune	0.dk/0.dk	1.dk/0.dk	2.dk/0.dk	3.dk/0.dk	4.dk/0.dk	5.dk/0.dk
AYIV (n=4)	1,00±0,00	0,86±0,14	0,76±0,19	0,79±0,33	2,01±2,34	0,74±0,44
ZYIV (n=4)	1,00±0,00	0,80±0,06	0,74±0,10	0,71±0,11	0,66±0,13	0,64±0,14
PLMIV (n=3)	1,00±0,00	0,84±0,40	0,75±0,54	0,56±0,46	0,46±0,42	0,42±0,42
TRYIV (n=3)	1,00±0,00	1,07±0,15	0,92±0,10	0,93±0,07	0,90±0,13	0,91±0,17
MRGIV (n=3)	1,00±0,00	0,73±0,06	0,61±0,09	0,56±0,12	0,54±0,14	0,50±0,15
BLKIV (n=3)	1,00±0,00	0,60±0,09	0,48±0,11	0,38±0,25	0,30±0,15	0,25±0,18

İntestinal VLDL, 1/7 oranda dilüe edildikten sonra vorteklenerek 400 nm de 1'er dk aralıklarla absorbansları ölçülmüştür. Her 1dk vorteks sonrası ölçülen absorbans değerlerinin (A_{400}) vortekslenmeden önceki (0.dk) absorbanslarına oranları hesaplanmış ve ne farklı intestinal VLDL (IV) arasında ve ne de aynı intestinal VLDL'in vortekslenme sonrası birbirini takip eden $A_{400}/0.dk.A_{400}$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak her bir yağ için 5.dk/0.dk oranı ile 0.dk/0.dk oranı arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildi ve bu oranlar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Distile Su İle 1/7 Oranında Sulandırılan Rat Torasik Lenf İntestinal VLDL'in Vortekslenmekten Sonraki Absorbanslarının (A_{400}) Vortekslenmeden Önceki (0.dk) Absorbanslarına Oranları.

Numune	0.dk/0.dk	1.dk/0.dk	2.dk/0.dk	3.dk/0.dk	4.dk/0.dk	5.dk/0.dk
AYIV (n=4)	1,00±0,00	0,87±0,26	0,84±0,33	0,90±0,54	0,85±0,49	0,84±0,54
ZYIV (n=4)	1,00±0,00	0,87±0,15	0,79±0,19	0,76±0,23	0,73±0,24	0,71±0,22
PLMIV (n=3)	1,00±0,00	0,77±0,29	0,78±0,65	0,63±0,62	0,45±0,65	0,44±0,54
TRYIV (n=3)	1,00±0,00	1,08±0,24	1,03±0,19	0,89±0,02	0,87±0,08	0,79±0,15
MKGIV (n=3)	1,00±0,00	0,71±0,02	0,60±0,05	0,57±0,08	0,51±0,12	0,49±0,12
BLKIV (n=3)	1,00±0,00	0,65±0,09	0,48±0,23	0,31±0,26	0,22±0,25	0,25±0,16

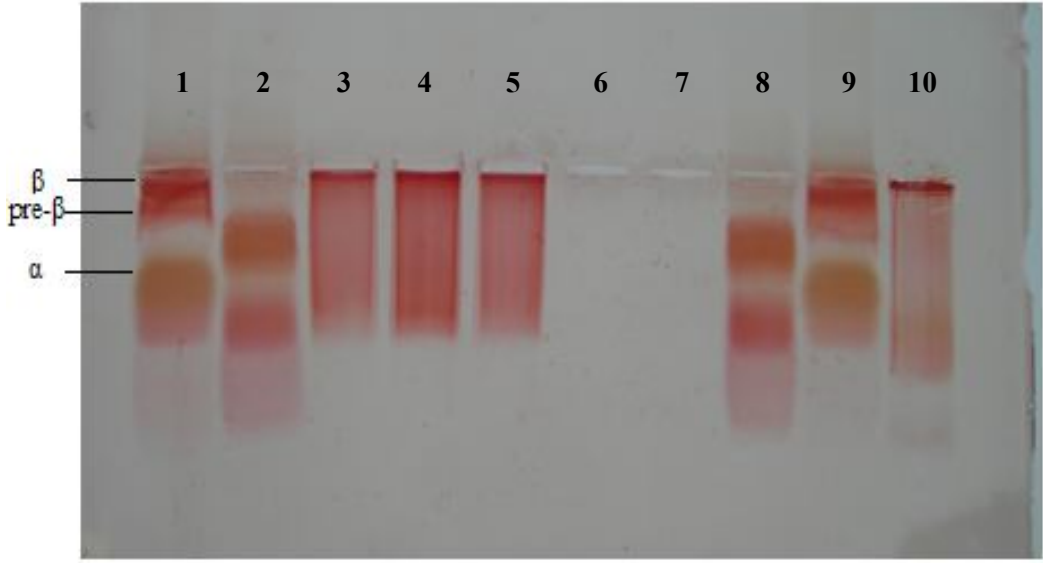


Şekil 4.2 Altı farklı yağ verilerek elde edilen rat torasik lenf intestinal VLDL'inin 1/3, 1/5 ve 1/7 oranlarında distile su ile sulandırılarak vortekslendikten sonraki absorbanslarının vortekslenmeden önceki absorbanslarına oranları.

Torasik lenf intestinal VLDL'i 1/3, 1/5 ve 1/7 oranlarında distile su ile sulandırıldı. Birer dk aralıklarla vortekslendi. 400 nm de absorbansları ölçüldü. 5.dk absorbans değerlerinin 0. dk absorbans değerlerine oranları hesaplandı, ortalamaları alındı. İntestinal VLDL'in 1/3, 1/5 ve 1/7 oranlarında distile su ile sulandırılmaları sonucunda yağlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır (Şekil 4.2).

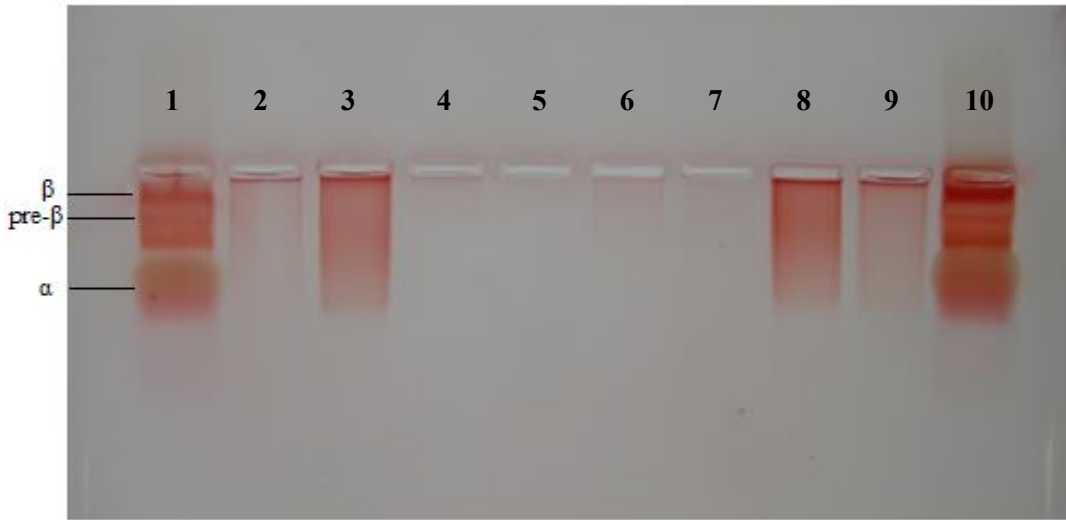
4.6. Torasik Lenf İntestinal VLDL'nin ve HİK Fraksiyonlarının Elektroforetogramları

Farklı yağlardan elde edilen rat torasik lenf intestinal VLDL'i agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. %0,9'luk agaroz jel torasik lenf kanülasyonu ile elde edilen torasik lenf sıvısı, kanülasyon sonrası ultrasentrifüj ile elde edilen intestinal VLDL, insan serumu, kanüle edilmiş ratın serumu, kanüle olmayan ratın serumu ve hidrofobik interaksiyon kromatografisi yapılan intestinal VLDL'den elde edilen fraksiyonlar tatbik edilerek gözlenen elektroforetik mobiliteleri Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'da görülmektedir. Elektroforetogramların tümünde de görüldüğü üzere çok dilüe oldukları için fraksiyonlara ait band gözlemlenmemiştir.



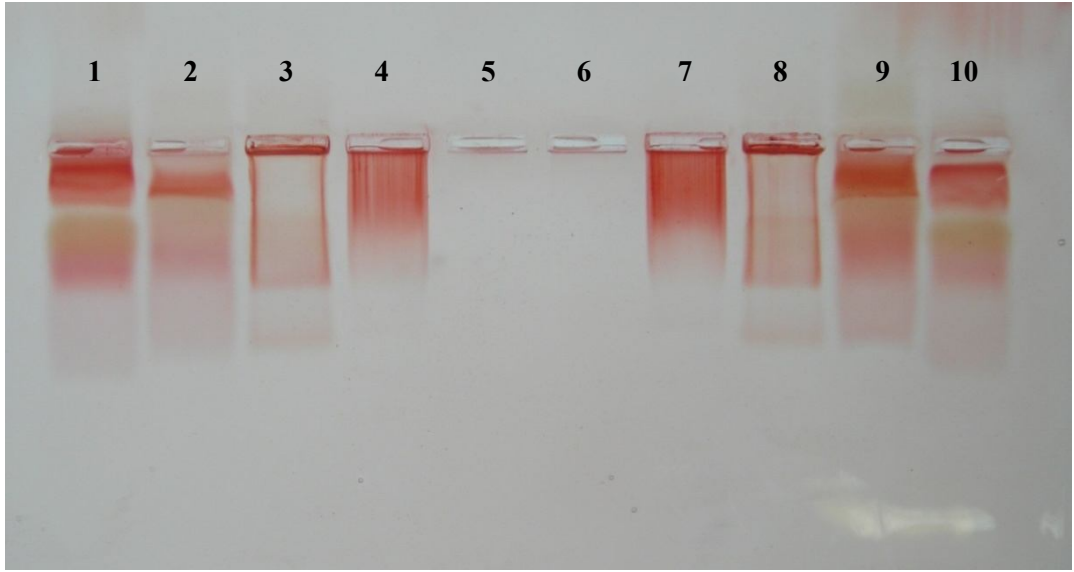
Şekil 4.3. Ayçiçek Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram

1.İnsan serum; 2. Rat serum; 3. AYIV; 4. AYIV; 5. AYIV; 6. Fraksiyon; 7. Fraksiyon; 8. Rat serum; 9. İnsan serum; 10. Torasik lenf sıvısı



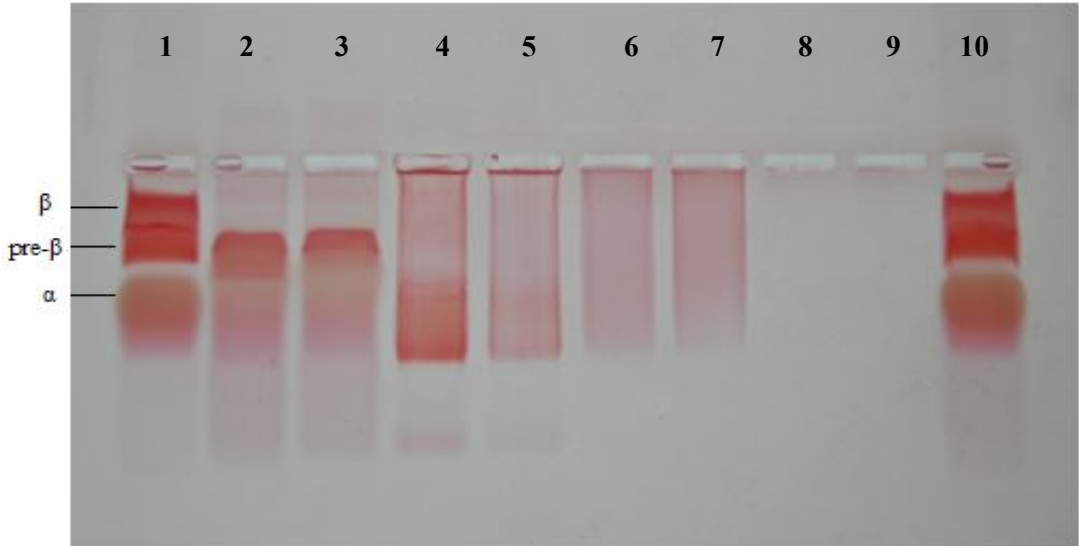
Şekil 4.4 Zeytinyağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram

1.İnsan serum; 2.ZYIV1; 3. ZYIV2; 4. Fraksiyon 5.Fraksiyon; 6.Fraksiyon; 7. Fraksiyon; 8. ZYIV2; 9. ZYIV1; 10. İnsan serum



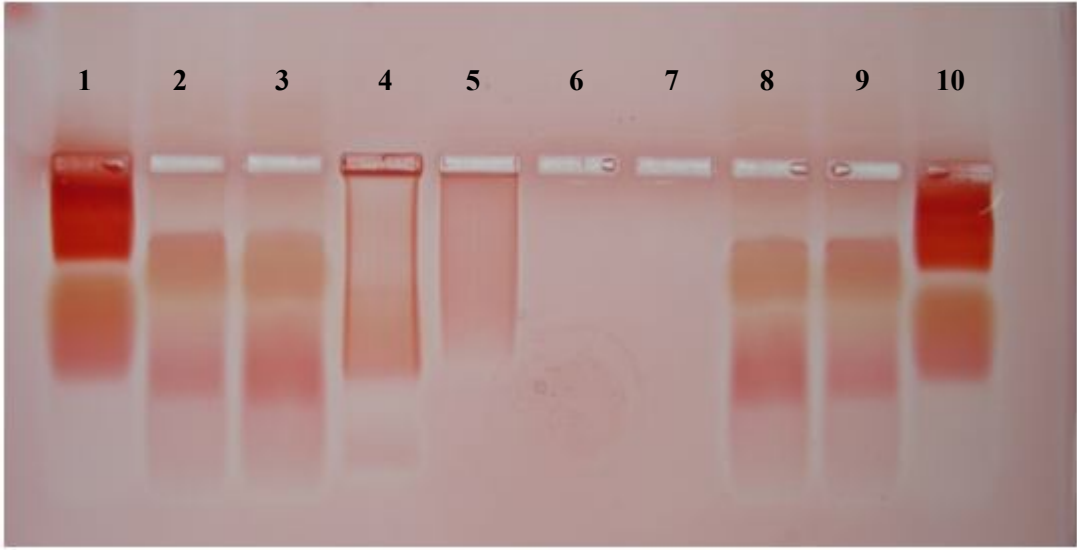
Şekil 4.5. Palm Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram

1. İnsan serum; 2. Rat serum; 3. Torasik lenf sıvısı; 4. PLMIV; 5. Fraksiyon; 6. Fraksiyon; 7. PLMIV; 8. Torasik lenf sıvısı; 9. Rat serum; 10. İnsan serum



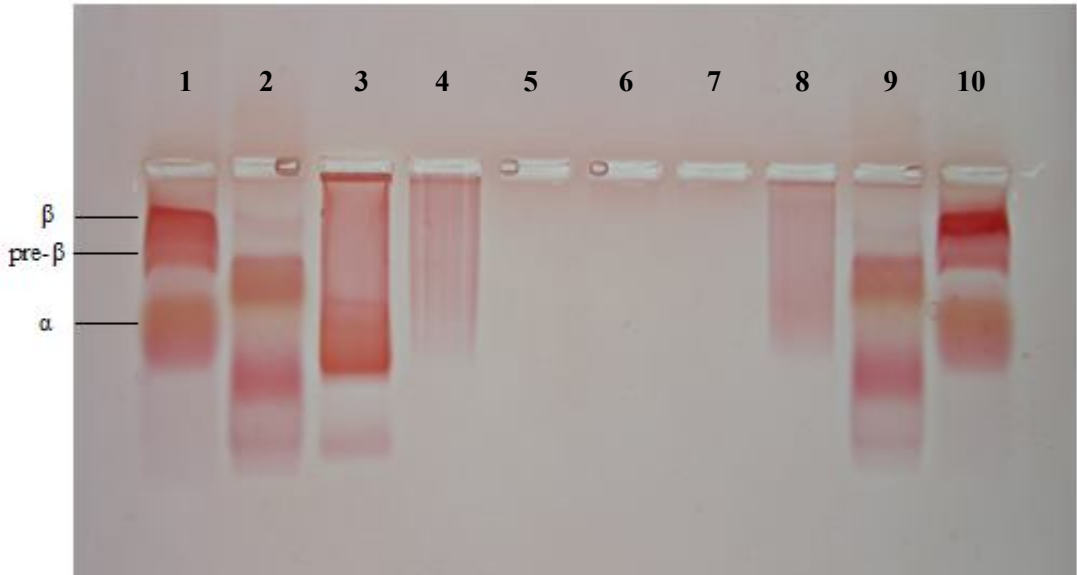
Şekil 4.6 Tereyağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram

1. İnsan serum; 2. Rat serum; 3. Rat serum; 4. Torasik lenf sıvısı; 5. Torasik lenf sıvısı; 6. TRYIV; 7. TRYIV; 8. Fraksiyon; 9. Fraksiyon 10. İnsan serum



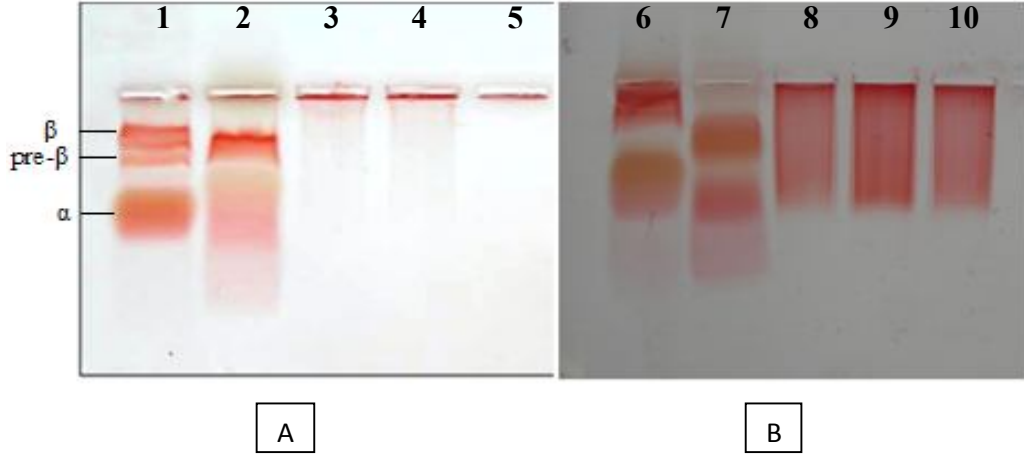
Şekil 4.7. Margarinden Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram

1.İnsan serum; 2.Rat serum (Kanüle olan); 3. Rat serum (Kanüle olmayan); 4. Torasik lenf sıvısı, 5.MRGIV; 6. Fraksiyon; 7. Fraksiyon; 8. Rat serum (Kanüle olmayan); 9. Rat serum (Kanüle olan) 10. İnsan serum



Şekil 4.8 Balık Yağından Elde Edilen İntestinal VLDL'lere Ait Elektroforetogram

1.İnsan serum; 2. Rat serum; 3.Torasik lenf sıvısı; 4. BLKIV, 5.Fraksiyon; 6. Fraksiyon; 7. Fraksiyon; 8. BLKIV; 9. Rat serum 10. İnsan serum



Şekil 4.9. Ayçiçek yağından elde edilen biri Şilomikron (A) diğeri İntestinal VLDL'e (B) ait birleştirilmiş iki elektroforetogram

1. İnsan serum; 2. Rat serum; 3. Şilomikron; 4. Şilomikron; 5. Şilomikron Fraksiyon; 6.İnsan serum; 7. Rat serum; 8. AYIV; 9. AYIV, 10. AYIV

4.7. İntestinal VLDL'in Lipid-Protein Oranları

Farklı yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in trigliserid miktarları enzimatik olarak, protein miktarları Lowry metoduyla, fosfolipid miktarları ise biyokimyasal meytodla hesaplanmıştır. Triaçilgliserol/Fosfolipid oranları Tablo 4.14'te, Fosfor/Triaçilgliserol oranları Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.14. İntestinal VLDL'in Triaçilgliserol/Protein oranları

TRİAÇİLGİSEROL (µg/ml)/PROTEİN (µg/ml)					
BLKIV	MRGIV	AYIV	TRYIV	PLMIV	ZYIV
3,20±0,11 ^{*a,b}	2,64±0,35 [*]	2,39±1,53 [*]	2,24±0,42 ^{*a}	1,32±0,88 ^a	0,69±0,5

*: ZYIV'den istatistiksel olarak farklı olanlar, a: MRGIV'den istatistiksel olarak farklı olanlar, b. TYKŞ'den istatistiksel olarak farklı olanlar (p≤0,05)

Bu oran büyükten küçüğe sıralandığında;

ZYIV> PLMIV> TRYIV> AYIV>MRGIV>BLKIV olduğu görülmektedir.

Tablo 4.15. İntestinal VLDL'in Fosfor/Triaçilgliserol Oranları

FOSFOR.(µg/ml)/TRİAÇİLGİSEROL (µg/ml)					
ZYIV	PLMIV	BLKIV	AYIV	MRGIV	TRYIV
0,02±0,015	0,008±0,005	0,008±0,017	0,007±0,006	0,005±0,001	0,004±0,0006

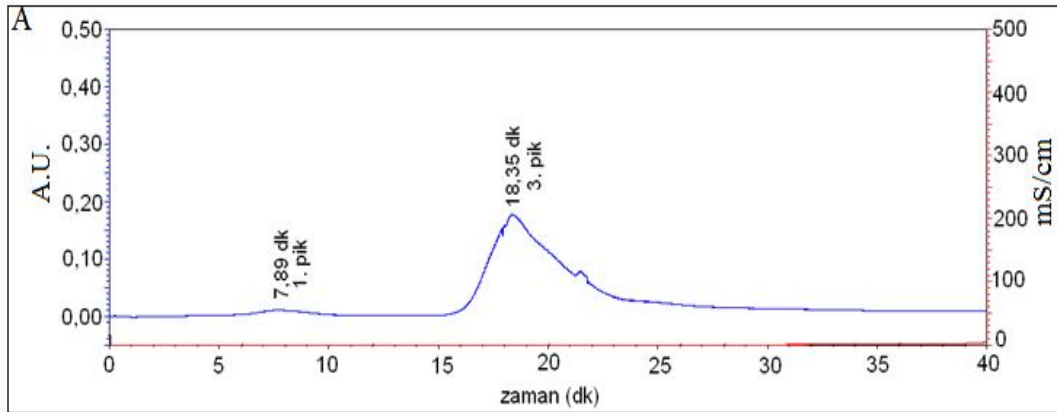
Yağlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

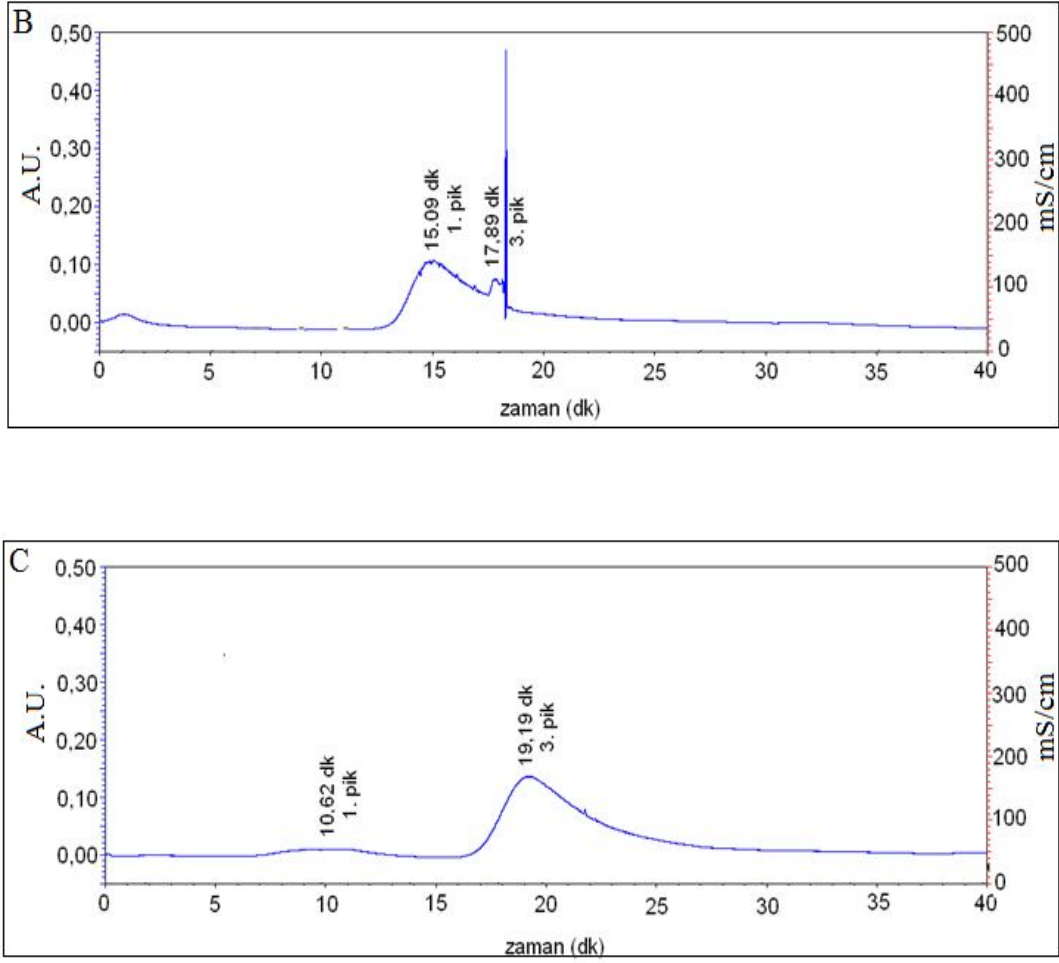
Buna göre büyüklük olarak sıralandığında

ZYIV>PLMIV>BLKIV>AYIV>MRGIV>TRYIV olduğu görülmektedir.

4.8. İntestinal VLDL'in Jel Filtrasyon Kromatografisine Ait Kromatogramlar

Ayçiçek yağı ve palm yağından elde edilen intestinal VLDL karıştırılarak numune havuzu oluşturuldu. Bu numunelerin sefaroz 4B ve sefaroz 6B kullanılarak yapılan jel kromatografisi sonucunda oluşan kromatogramlar Şekil 4.10 A, B ve C'de görülmektedir.





Şekil 4.10. İntestinal VLDL'in Jel (Size Exclusion) Kromatografisi Kromatogramları

Oluşturulan numune, sabit faz olarak sefaroz 6B, mobil faz olarak %0,0125 Triton X-100 kullanılarak (A); sabit faz olarak sefaroz 4B, mobil faz olarak fosfat tampon (pH 7,4) kullanılarak (B); sabit faz olarak sefaroz 6B, mobil faz olarak fosfat tampon kullanılarak (C) jel kromatografisi ile analiz edildi.

Bu durum gösteriyor ki Triton X-100 bir parçalama yapmıyor.

5.TARTIŞMA

Lipoproteinlerin hidrofobisitesi, onun aterojenitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Çalışmamızda yağ asidi kompozisyonu, doymuşluk-doymamışlık özellikleri ve mikronutrient içerikleri farklı yağlarla beslenen ratlardan elde edilen intestinal VLDL, hidrofobik özellikleri yönünden incelenerek besinlerle alınan lipidlerin, intestinal VLDL hidrofobisitesini nasıl etkilediğini ortaya koymaya ve aterogenezis ile bağlantıları değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu bağlamda, altı farklı yağ ile beslenmiş olan ratlardan torasik lenf kanülasyonu ile elde edilen intestinal VLDL, farklı koşullar altında vortekslenilerek agregasyonları, hidrofobik interaksiyon kromatografisi (HİK) sonrası pik alanları ve kapasite faktörleri değerlendirilerek yüzey hidrofobisitesi ve agaroz jel elektroforezi ile de elektroforetik özellikleri karşılaştırıldı.

Khoo ve ark.nın çalışmalarında, LDL'in vortekslenme sonrasında spesifik dalga boyundaki artış, agregasyonun derecesi olarak ifade edilmiş ve vortekslenmeye maruz kalan LDL'in kendi kendine agrege olduğu gösterilmiştir. Bu LDL agregatları makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir. Bu fagositik alım, LDL reseptörleri tarafından düzenlenmektedir (51).

Lipoproteinler çekirdekte hidrofob lipidler (triacilgliserol ve kolesteril esteri) ve yüzey tabakasında amfipatik lipidlerin (serbest kolesterol ve fosfolipidler) bulunduğu küresel bir partikül şeklindedir (6). Lipoproteinlerin hidrofilik doğası, suda çözünüp birbirlerinden uzaklaşmalarına sebep olurken hidrofobik doğası, onların bir araya gelmelerine sebep olur. Onların bu hidrofobik özellikleri lipid agregatlarının oluşumuna katkıda bulunur (30). Agregasyonun, aterosklerozisin altında yatan nedenlerden biri olduğu düşünülmektedir (31). Örne K. ve ark. aterosklerozun başlangıcının küçük lipid damlacıklarının ve arteriyel intimanın ekstraselüler matriksindeki, veziküllerin kümelenmesiyle karakterize edildiğini bildirdiler (52). LDL'in arterlerin intimal boşluğu içinde kümelenmesi ve okside olması (muhtemelen bu alanda bulunan makrofajlarla temas sonrası) ile ilgili

kuvvetli kanıtlar vardır. İntimada bulunan makrofajlar içindeki LDL'den kaynaklanan, hücre içi kolesterol esterlerin kümelenmesi insan aterosklerozisinin karakteristik bir özelliğidir. Diğer pek çok kanıt LDL'in biyokimyasal modifikasyonunun ve onun agregasyonunun, makrofajlar tarafından alımı için önemli olduğunu göstermektedir (53). Hücre içinde kümelenen lipidlerin kaynağının, dolaşımdaki LDL olduğu düşünülmektedir. Fakat hücre içi lipidlerin, LDL aracılı kümelenme mekanizması belirsizdir. Birçok yazar göstermiştir ki sağlıklı kişilerin kanlarından izole edilen doğal LDL, düz kas hücrelerindeki ve makrofajlardaki lipid seviyelerinin yükselmesini indüklemeye başarısız olmuştur. Birikme, sadece asetilasyonla, asetoasetilasyonla, karbamilasyonla, maleilasyonla, malonilaldehit veya glüteraldehit muamelesiyle oksidasyon ve deçialilasyon gibi işlemlerle, LDL'in kimyasal olarak modifiye edilmesi durumunda gözlenmiştir (31). LDL'in kümelenmesi sonucu oluşan agregatlar, çöpçü reseptörler tarafından alınmaz bunun yerine fagositozla alınırlar. Son çalışmalar lipoprotein agregasyonunun, hücre içi lipid akümüasyonu için temel koşul olduğunu göstermektedir. Vorteksleme ile üretilen agregat olmuş LDL, fagositozla alınmaktadır. Non-spesifik endositoz da makrofaj alımı için önemli olabilir. Vorteksleme ile agregat olmuş LDL'in ultrayapısal görünümü aterosklerozdaki hücre dışı lipid depozitlerinin görünümüyle kaydadeğer bir şekilde benzerlik göstermektedir (53). Ateroma içinde LDL kolesterolün birikimi için hem hücre dışı hem de hücre içi yollar olduğu varsayılmakta ve in vitro deneylerdeki bulgular, hücre içi çalışmalar ve aynı zamanda hastalıklı dokulardaki histolojik bulgularla desteklenmektedir. Aterom oluşumunun, LDL'in glikozaminoglikan, elastin ve proteoglikanlara bağlanmasıyla başladığı, LDL'in agregasyonu ve füzyonu sonrasında lipid damacıklarının oluşumu ve kolesterolün, kolesterol esterinin, serbest kolesterolden zengin lipozomların ve lipoproteinden zengin kolesterol esterlerinin depositlerinin intima içinde birikmesi ile sonuçlandığı ileri sürülmüştür. Lezyonların yukarıdaki sürecini aterom çekirdeği içinde kolesterolün birikimi izler ve sonuç olarak onların yırtılmasıyla sonuçlanır. Bu gibi yırtıklar koroner arterlerde oluşursa trombüs oluşumuna ve kalp krizine neden olur (54).

LDL'in agregasyonunun incelendiği pek çok çalışmada LDL'in vortekslenme sonrası absorbanlarında artış meydana geldiği, ki bu durumun bir ifadesi olarak da

LDL'in agrege olduğu ve LDL'in oksidasyon, glikolizasyon, deaçilasyon, malondialdehit ve hipoklorit ile muamele gibi prosesler sonucu oluşan kimyasal modifikasyonların da agregasyon oluşumunu indüklediği rapor edilmiştir (52). Bizim çalışmamızda ise vortekslenme sonrasında intestinal VLDL'in agrege olmadığı, vortekslemenin parçalanmaya sebep olduğu görüldü.

Çalışmamızda doymuş yağ asitlerinden zengin yağların (palm yağı ve tereyağı) intestinal VLDL'nin absorbanlarında, vorteksleme sonrası yükselme görüldürken balık yağı intestinal VLDL'nin absorbanı düştü ve margarinyağı intestinal VLDL'nin absorbanı ise nispeten sabit kaldı. Bu fark her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı değilse de doymuş yağların (palm yağı ve tereyağı) intestinal VLDL'nin absorbanlarındaki artış, diğer araştırmalarla paralel olarak bu yağların intestinal VLDL'nin agrege olduğunu, dolayısıyla doymuş yağlarda sıvı yağlara göre bir araya gelme eğiliminin daha fazla olduğunu göstermektedir.

İntestinal VLDL ile bu konuda yapılan çalışma olmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak LDL ile yapılan çalışmalar çok daha belirgindir. Talbot ve ark. nin çalışmalarında vorteksleme sonrası LDL'in agrege oduğu ifade edilmektedir (55).

Lipoprotein yüzeyinin hidrofobitesinin nereden kaynaklandığına cevap olarak şunlar söylenebilir; Lipoproteinler çekirdekte hidrofobik lipidler olan trigliserid ve kolesteril esterlerinin bulunduğu yüzeyde ise amfipatik lipidler olan fosfolipid ve serbest kolesterolün bulunduğu küresel partiküllerdir (6). Bir miselin yapısına baktığımızda ise hidrofobik kuyruklar onların su ile temasını en aza indirmek için iç kısımda toplanırken, hidrofilik baş kısım ise su ile teması maksimuma çıkarmak için dış yüzeyde kalır (44). Lipoproteinlerin ve misellerin yapılarının, hidrofobik kısımların iç bölgede, hidrofilik kısımların ise dış bölgede yerleşmeleri açısından bir benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bir deterjan olan oktil glikozitin bilgisayar simülasyonları, misellerin süratli bir şekilde fluktüasyona tabi olduklarını, hidrofobik oktil gruplarının düzensiz bir şekilde paketlenildiğini ve hidrofobik kuyruğun kısımlarının misel yüzeyinde herhangi bir anda açığa çıkabileceğini göstermiştir (56).

Küçük küresel misellerde baş grupları arasında, su ve hidrokarbon arasında teması sağlayan açık boşluklar olduğu bildirilmiştir (57). Ayrıca yine hidrokarbon zincirlerinin bir kısmının, misel yüzeyinde kaçınılmaz bir şekilde dışa doğru yöneldikleri bildirilmiştir (58). Akuöz fazın misel içerisine, hidrofobik baş gruplarının da ilerisinde, bir kaç metilen grup mesafesi boyunca nüfuz ettiği bilinmektedir (59). Tüm bunlar yapıları, misel yapısına benzeyen lipoproteinlerin, hidrofobik özelliklerinin nereden kaynakladığını göstermektedir.

HİK proteinleri, yüzeylerindeki hidrofobisite farklılıklarına göre ayırır. Bunu HİK sabit fazının hidrofobik yüzeyi ve bu proteinler arasındaki geri dönüşümlü bir etkileşimi kullanarak yapar. Hidrofobik proteinler ve hidrofobik sabit faz arasındaki etkileşim, uygulanan tampon içindeki belirli tuzların varlığından önemli ölçüde etkilenir. Düşük tuz konsantrasyonu etkileşimi zayıflatırken, yüksek tuz konsantrasyonu etkileşimi artırır. Protein veya hidrofobik ligand gibi bir hidrofobik madde, suya daldırıldığında yüzey gerilimi fenomenine benzer bir analog oluşur (37).

Su molekülleri, hidrofobik maddenin yüzeyini ıslatamaz, bunun yerine tüm yönlerde hidrojen bağlarını oluşturma yetenekleri olmadığı için, maddenin etrafında oldukça düzenli bir kabuk oluştururlar. Bu kabuğun genişliğinin azaltılması, düzenli su moleküllerinin sayısında azalamaya yol açar. Bu durum, termodinamik olarak daha tercih edilebilen bir durumdur ki bu durumda entropi artar. Entropiyi arttırmak için hidrofobik maddeler, bu kabukların total alanını minimize etmek üzere bir araya gelmeye zorlanırlar. Bu yüzden hidrofobik interaksiyon, hidrofobik moleküller arasındaki direk çekimden ziyade su moleküllerinin davranışına bağlıdır (37).

Proteinler yüzeylerinde hem hidrofilik hem de hidrofobik alanlar taşıdıklarından dolayı belirli tuzların yüksek konsantrasyonlarında çökebilirler. Bu duruma temelde zorunlu hidrofobik etkileşim sebep olur. İyonik güçteki değişimler, organik çözücülerin varlığı, sıcaklık ve pH, proteinin yapısını ve çözünürlüğünü etkileyebilir ve sonuçta HİK ortamındaki diğer hidrofobik yüzeylerle etkileşimi de etkileyebilir (37).

Çalışmamızda intestinal VLDL'in yapılan ilk kromatografisinde mobil faz olarak fosfat tampon (20 mM, pH: 7,4) kullanıldı. İntestinal VLDL'in kolona çok sıkı bir şekilde absorbe olduğu, su ile bile elüe olmadığı mobil faza % 20 etanol eklendiğinde ise ancak bir kısmının desorbe olduğu görüldü.

Bir HİK sabit fazının performansı birçok parametreden etkilenir: protein özellikleri, ligand tipi, ligand ikamenin derecesi, örnek uygulama sırasında kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu, deterjan varlığı ve sıcaklık, pH ve matriksin tipi. Katkı maddeleri ise seçiciliği ve çözünürlüğü geliştirmek için kullanılmaktadırlar (37).

Lipoproteinlerin yüzeylerinin hidrofobik derecelerini karşılaştırmak için gerek lipoprotein yüzeyinde gerekse sabit fazdaki (bütil sefaroze) hidrofobik alanları azaltmak için mobil fazı modifiye edici ajan olarak bir deterjan olan Triton X-100 kullanıldı. Aynı şekilde Wichman da insan HDL ve LDL lipoproteinleri ile sefaroze jel kromatografisinde, denatüre edici ajanlar kullanmadıkça bu lipoproteinlerin elüe olmadığını bildirmektedir. Yine Wichman da Triton X-100 ve SDS kullanarak kısmi desorpsiyon sağlamıştır (60).

Arı Helenius ve Kai Simons çalışmalarında, deoksikolat ve Triton X-100'ün misel solüsyonlarında lipofilik proteinlerin, bu deterjanların büyük miktarlarını bağladıklarını, bunun tersine hidrofilik proteinlerin ise deterjanlara çok az bağlandığını ya da hiç bağlanmadığını gösterdiler. Bu araştırmacılar triton X-100'ün iyonik bağlarla bağlı olamayacağını, hem deoksikolat hem de Triton X-100'ün, membranda ya da lipoproteinlerde, lipidler tarafından işgal edilen proteinler üzerindeki hidrofobik bölgelere bağlandıklarını ileri sürdüler. Deterjan muamelesi ile uzaklaştırılan lipid, deterjan bağlanması, lipid bağlanması ile yer değiştirerek protein yüzeyinde misel benzeri bölgeleri oluşturabilir. Bu ılımlı deterjanlar, görünebilir olarak kalan bu proteinlerin konformasyonunu değiştirmeksizin değişim yapabilirler. (61).

Deterjanlar amfifilik yapıya sahiptir. Hidrofobik kuyruk kısımlarıyla hidrofobik yapılara bağlanırlar (62).

Çalışmamızda Bütil Sefaroz HİK'ye, deterjan Triton X-100 mobil faza katılarak tatbik edildi. İlki void volüm olmak üzere retensiyon zamanları birbirinden

farklı olarak AYIV'nin ve MRGIV'nin iki, diğer yağların intestinal VLDL'nin ise üç fraksiyona ayrıldığı görüldü. AYIV'nin ve MRIV'nin neden iki fraksiyona ayrılırken diğerlerinin neden üç fraksiyona ayrıldığını, doymuşluk-doymamışlık özellikleri ile açıklamak mümkün değildir. Bu farklılık, bu yağların şilomikron sentezi sırasında izledikleri yolların farklılığından veya içerdikleri minör bileşenlerden kaynaklanıyor olabilir.

Fraksiyonlar çok seyreltik olduğu için elektroforetik analizde bu fraksiyonlara ait band görülmedi. TAG/protein yönteminin deteksiyon limitleri içerisinde tespit yapılamadı. Bu nedenle yağlardan elde edilen intestinal VLDL'nin, HİK sonucunda ayrılan fraksiyonları analiz edilememiştir.

Daha önce lipoproteinlerin hidrofobik ayrımı yapılmadığı için başka araştırmalarla karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Fakat mevcut sonuçlar, intestinal VLDL'nin hidrofobik dereceleri birbirinden farklı fraksiyonlar içerebileceğini ve bu açıdan homojen olmadığına işaret etmektedir.

Sıddiki yaptığı çalışmada, şilomikron sentezi sırasında, endoplazmik retikulumda üretilen triaçilgliserollerin, endoplazmik retikulumda daha önceden sentezlenmiş olan apoB-48 içeren pre-şilomikronlarla birleştiğini ve muhtemelen bir miktar triaçilgliserolün de golgide eklendiğini belirtmektedir (12). Bu bağlamda, sentez sırasında apoB-48'e eklenen bu lipid damlacıklarının, intestinal VLDL'nin hidrofobik yüzeyle karşılaştıkları zaman eklendikleri gibi aynı şekilde ayrıldıkları düşünülebilir. Ancak bunu söyleyebilmek için fraksiyonların daha fazla çalışmalarla detaylı analiz edilmesi gerekmektedir.

Yeterli miktarda surfaktan madde (örn. deterjan) suda çözüldüğünde, yüzey gerilimi azalır ve hidrokarbonlardaki çözünürlük gibi çözelti özelliklerinden bazıları önemli derecede değişir. Bu değişimler minimum bir surfaktan derişimine ulaşınca kadar gözlenmez. İşte bu değişimlerin gözlenmeye başladığı minimum konsantrasyona "kritik misel konsantrasyonu" denir (63). Bu konsantrasyondan sonra surfaktan konsantrasyonunun artırılması sonucu miseller teşkil eder.

KMK'yi etkileyen faktörlerden en önemlisi surfaktanın yapısıdır. KMK'yi etkileyen faktörler: 1) Hidrofobik gruplardır; hidrokarbon zincirini uzunluğu

belirleyicidir. KMK karbon sayısı ile logaritmik olarak azalır. 2) Hidrofilik grup (iyonik yapıdan non-iyonik yapılara kadar pek çok yapı) da KMK'yi etkiler. 3) Karşı yüklü iyonların etkisi ; tek değerlikli, iki ya da üç değerlikli iyonlara değişme, KMK'de keskin bir düşüşe neden olur. 4) Tuz eklenmesi: elektrolitler çoğu surfaktanın KMK'nin düşmesine neden olur. 5) Misel üzerinde sıcaklığın etkisi genel olarak azdır (64).

Kullandığımız Triton X-100'ün KMK yaklaşık 0,24 mM'dır (65). HİK'de modifiye edici ajan olarak kullandığımız Triton X-100, % 0,0125 konsantrasyonda ve KMK'nin altındadır. Dolayısıyla Triton X-100 misellerinin oluşması söz konusu olamaz. O nedenle ki çalışmamızda HİK sonrası görülen piklerin Triton X-100 misellerinin olması bu yüzden söz konusu değildir. Çeşitli deterjanlarla, lipoproteinlerin etkileşimine dair çalışmalar mevcuttur. Örneğin HDL'nin Triton X-100 ile muamelesi sonucunda KMK'nin üstünde, HDL'nin daha küçük parçalara bölündüğü verilmektedir (60). Her ne kadar çalışmamızda KMK'de kullanmamış olmamıza rağmen HİK sonrasında elde edilen fraksiyonların Triton X-100 miselleri olup olmadığını araştırmak için PMIV ve AYIV karıştırılıp bir havuz oluşturuldu ve intestinal VLDL hem Triton X-100 hem de fosfat tamponu kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisinde hem % 4 hem de % 6 agarozda her iki kromatografi sonucunda da tek pikin görülmesi, mevcut çalışma şartlarında deterjanın HDL'de olduğu gibi intestinal VLDL'i daha küçük parçalara ayırmadığı anlaşılmaktadır.

Deterjanların, insan plazma lipoprotein ile muameleleri üzerindeki etkileri, Pownall tarafından araştırılmıştır. Buna göre deterjanla LDL muamelesi, onun büyüklüğünde herhangi bir değişiklik yapmazken, HDL ile deterjanların (sodyum-kolat) muamelesi sonucunda HDL, iki farklı fraksiyona ayrılmıştır. Deterjan perturbasyonunda, anahtar basamağın karışık misellerin oluşumu olduğu ileri sürülmüştür (66).

Non-iyonik deterjanların genel olarak daha ılımlı olduğu ve denaturasyona sebep olmadığı bildirilmiştir. Bu tür deterjanların KMK, deterjanın alkil zincirinin uzunluğu ile azalmakta, çift bağların ve dallanma noktalarının ilavesi ile artmaktadır. Bu tür deterjanların, amfipatik yapıları gereği hidrofobik yüzeylerle olan etkileşimleri, onların hidrofobik kuyrukları ile olmaktadır (62).

Yine bir non-iyonik deterjan olan Triton WR-1339 ile normolipidemik Rhesus maymunlarından elde edilen plazma LDL ve HDL'nin, in vitro ve in vivo etkileşimleri incelenmiştir. Burada da Triton'un tercihen HDL ile etkileşim gösterdiği, bu lipoproteinin büyüklük ve dansitesini değiştirdiği ve apoE, apoA-I ve apoA-II gibi lipoproteinleri HDL'den uzaklaştırdığı oysa LDL ile en az etkileşime girdiği ve LDL'de oluşan yapısal değişimin minimum olduğu, apoB'yi yapıdan uzaklaştırmadığı gösterilmiştir. Fakat bu çalışmada kullanılan deterjan konsantrasyonu (1-2 mg Triton/mg HDL protein) bizim çalışmamızda kullanılan çok üzerinde bir konsantrasyondur (67).

Yamamoto, köpek plazma HDL ile Triton WR-1339 etkileşimini, in vitro olarak incelendiğinde, KMK'nin üstünde konsantrasyona bağımlı olarak HDL'de yapısal değişimler olduğunu göstermiştir. Bunun sonucunda apoA-I, HDL yüzeyinden progresif olarak ayrılmıştır. Ancak KMK'nin altında, HDL küresel şeklini muhafaza etmiştir. Böylece Triton WR-1339'un dozuna bağımlı olarak ya HDL'nin yüzeyini stabilize ettiği ya da HDL patikülüne nüfuz ederek parçalanmasına sebep olduğu ifade edilmiştir (68).

HDL'nin diskoidal yapısını bir arada tutan en önemli faktör elektrostatik etkileşimlerdir (69).

Plazma lipoproteinlerinin yüzey özelliklerini açıklamak için lipoprotein modelleri üzerinde çalışmalar yapılmış ve lipoproteinlerin yüzey tek katmanlarının fiziksel özellikleri, ara-yüzey polaritesi, yüzey lateral difüzyon ve yüzey lipid akışkanlıklarının, yüzeye lokalize probun floresans davranışlarıyla ilişkili olduğunu gösteren pek çok çalışmada rapor edilmiştir. Çalışmaların çoğunda doğal lipoprotein ve model lipoproteinlerdeki yüzey özellikleri ve enzimatik reaktivitenin tek katlı yüzey protein ve kolesterol içerikleri ile ilgili olduğu vurgulanmıştır.

Yağların sahip oldukları yağ asidi kompozisyonlarının onların akışkanlığını etkileyip etkilemediğini tespit edebilmek amacıyla da bazı çalışmalar yapılmıştır. Buna göre genel olarak akışkanlığın, besinsel yağların yağ asidi kompozisyonlarından daha çok triaçilgliserol ve kolesterol içeriklerine bağlı olduğu görülmektedir. Çalışmaların genelinde, kolesterol ile beslenmenin LDL ve VLDL'de

akışkanlığı azalttığı HDL’de ise minimum değişikliklere sebep olduğu vurgulanmıştır.

Motta ve ark. (70) bakır eksikliği bulunan farelerden ve kontrol grubu farelerinden, triaçilgliserolden zengin lipoproteinler (TGRLP), izole etmişlerdir. Floresans polarizasyonunu, 1,6-difenil-1-3-5-hekzatrien (DPH)’nin floresans anizotropisi ile belirlemişlerdir. Bakır eksikliği olan farelerden elde edilen TGRLP’nin kontrol grubu farelerinden elde edilen TGRLP’ye göre daha akışkan olduğunu bulmuşlar. Akışkanlıktaki bu yüksekliğin, düşük kolesterol ile ilişkili olduğunu: peroksidasyonun indüklediği hasarın özellikle bakır eksikliği bulunan farelerden elde edilen lipoproteinlerde, lipid fraksiyonunun daha düzenli bir durumda olmasıyla sonuçlandığını ileri sürmüşlerdir.

Sola ve ark. (71) insan HDL’sinin akışkanlığı üzerinde besinsel yağların etkisi çalışmalarında, HDL floresans anizotropisini, floresans polarizasyonla, DPH ile ölçerek, HDL’nin fosfolipidlerdeki oleik asit ve triaçilgliserol yüzdesinin, bu lipoproteinler üzerinde akışkanlığı arttırıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Taus ve ark. (72) karaciğer sirozu hastalarından elde edilen LDL akışkanlığı çalışmalarında; DPH floresans probu kullanılarak LDL’in kimyasal kompozisyonunu ve karaciğer sirozundaki akışkanlığı araştırmışlardır. Sonuçta sirozlu hastalarda LDL akışkanlığında yükselme gözlenmiştir. Bu yükselmenin artmış trigliserid içerikleri yüzünden olabileceği ileri sürülmüştür.

Berlin ve ark. (73) domuz lipoproteinlerinin akışkanlığı ve kompozisyonunu diyet yağları ve kolesterol ile indükledikleri çalışmalarında, kolesterol ile beslenmenin VLDL akışkanlığını azalttığını, LDL akışkanlığını minimum derecede azalttığını, HDL akışkanlığı üzerine etkisinin olmadığını ileri sürdüler.

Bizim çalışmamızda, TAG/protein yönteminin deteksiyon limiti içerisinde tespit yapılamadığı için kolesterol analiz edilememiştir. Ayrıca floresans polarizasyonu ile de analiz yapılmadığı için intestinal VLDL’in akışkanlığı üzerine bir değerlendirme yapmak mümkün olmamıştır.

Çalışmamızda tereyağı ve palm yağından elde edilen intestinal VLDL, balık yağı ve ayçiçek yağından elde edilen intestinal VLDL'ye göre HİK sabit fazı ile daha az etkileşim göstermiştir. Monounsature yağ asitlerinden zengin olan zeytinyağından elde edilen intestinal VLDL'nin sabit faz ile etkileşimi ise doymuş yağların sabit faz ile etkileşim derceleri arasındadır. Tereyağı intestinal VLDL'nin, doymuş yağ asidi/doymamış yağ asidi oranı 1,6, margarin yağı intestinal VLDL'nin doymuş yağ asidi/doymamış yağ asidi oranı 1,1, palm yağı intestinal VLDL'nin doymuş yağ asidi/doymamış yağ asidi oranı 0,6 iken balık yağı intestinal VLDL'nin 1,2 ve ayçiçek yağının intestinal VLDL'nin 0,5 dir. Buradan da görülebileceği gibi intestinal VLDL'in doymuş yağ asidi/doymamış yağ asidi oranları ile hidrofobik etkileşimleri arasında birebir örtüşme bulunmamaktadır. Burada etkili olabilecek diğer bir faktör ise lipoprotein partiküllerinin boyutudur. Genel olarak küçük küresel misellerin, termodinamik olarak daha dayanıksız oldukları ve yüzey/hacim oranları daha büyük olduğu için yüzey moleküllerinin baş grupları arasındaki boşluğun daha büyük olduğu, daha büyük misellere göre suyla daha çok temas ettikleri bildirilmiştir (54). Buna sebep olabilecek diğer bir faktör ise yağ asitlerinin alkil zincirlerinin uzunlukları ve cis-trans konfigürasyonlarıdır. Ayrıca yağların minör bileşenlerindeki (alfa tokoferoller, steroller, fenolik bileşenler, hidrokarbonlar, triterpenik alkoller, alifatik alkoller, renk vericiler, aroma bileşenleri gibi) farklılıkların da bu hidrofobik etkileşimlerin farklılıklarında etkili olabileceği belirtilmektedir. Ancak bunlardan hangisinin daha etkili olduğu ileride yapılacak çalışmalarla belirlenebilecektir.

Çalışmamızda yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in kapasite faktörleri (k) değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Miseller her bir surfaktan monomerlerinin non-kovalent agregasyonu ile oluşan değişken yapılardır. Bu nedenle onlar küresel, silindirik veya düz olabilirler. Misel şekli ve büyüklüğü, genel surfaktan konsantrasyonu, surfaktan kompozisyonu (karışık surfaktan sistemleri durumunda) iyonik güç, PH ve sıcaklık değişen solüsyon durumlarının yanı sıra değişen surfaktan kimyasal yapısıyla da kontrol edilebilir. Özellikle solüsyon koşullarına ya da surfaktan tipine bağlı olan küresel miseller, silindirik miseller içinde tek boyutlu olarak ya da çift katlı ya da diskoidal miseller

içinde iki boyutlu olarak gelişebilir. Misel gelişimi öncelikle surfaktan baş gruplar tarafından kontrol edilir çünkü hem çift boyutlu hem de tek boyutlu gelişme misel yüzeyindeki her surfaktan molekülü başına düşen mevcut alanı azaltmak için surfaktan baş grupların birbirlerine yakınlaşmasına ihtiyaç duyarlar ve misel yüzeyinin kavisliliği bu nedenledir (59).

Çalışmamızda, misel yapısına etki eden faktörlerden NaCl ve pH değişimleri en fazla BLKIV'ni etkilemektedir. Buna paralel olarak BLKIV'in 14 dk vortekslenme sonrası absorbanlarında meydana gelen azalma ki bu lipoprotein partikülünün daha küçük parçalara ayrıldığı bir ifadesidir, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da diğer yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in absorbanlarındaki azalmaya oranla en belirgin olanıdır. Buradan da BLKIV, misel yapısındaki monomerleri bir arada tutan kuvvetler dikkate alındığında elektrostatik etkileşimlerin diğer yağlardan elde edilen intestinal VLDL'e göre daha baskın olduğu söylenebilir.

PLMIV dışında tüm yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in pH'daki artışa karşı duyarlı oldukları görülmektedir.

Misel oluşumunu sağlayan en önemli itici güç, hidrofobik zincirler arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Ayrıca diğer bir güç olarak elektrostatik etkileşimlerin de etkili olduğu bilinmektedir (69).

Guha ve ark. LDL'deki fosfatidil kolin açıl zincirlerinin, zincir uzunluklarının azalmasının veya cis unsaturasyonunun artmasının, disk şeklindeki HDL'i destabilize ettiklerini ve HDL'nin ayrışmasına sebep olduklarını ifade etmişlerdir. Yine zincir uzunluğu arttıkça hidrofobik etki artmaktadır. Bu nedenle hidrofobik etkileşim disk stabilizesinde en önemli unsurdur. Ayrıca pH ve tuzun misel yapısına etkilerinden hareketle elektrostatik etkileşimlerin de HDL yapısının stabilizesine katkıda bulunduğunu ifade etmişlerdir (69).

Elektroforez analizi sonrasında ise farklı yağlardan elde edilen intestinal VLDL'in elektroforetik mobiliteleri arasında fark bulunamamıştır. Elektroforezde şilomikronlar orjinde kalırken, intestinal VLDL jel içerisine nüfuz etmiş ve yayılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, farklı yağlarla beslenen ratlardan elde edilen torasik lenf intestinal VLDL'nin hidrofobik özellikleri, türbidite analizleri, elektroforetik analizler, trigliserit/protein oranları ve hidrofobik interaksiyon kromatografisi ile değerlendirilmiştir. Doymuş yağ asitlerinden elde edilen intestinal VLDL, doymamış yağ asitlerinden elde edilen intestinal VLDL'e göre vortekslleme sonrasında daha fazla agregasyon gösterdiler. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Doymuş yağ asitlerinden elde edilen intestinal VLDL, hidrofobik sabit fazla (bütil sefaroze) daha az etkileşim gösterirken, BLKIV, daha fazla etkileşim gösterdi. Misel yapısına etki eden faktörler açısından altı farklı yağdan elde edilen intestinal VLDL karşılaştırıldığında, BLKIV'nin misel yapısının diğerlerine göre daha dayanıksız olduğu gözlemlendi ve intestinal VLDL'in yüzey hidrofobisitelerinde içerdikleri yağ asidi kompozisyonunun ve/veya lipoproteinlerin misel yapısında lipidlerin organizasyonlarının da rolü olabileceği sonucuna varıldı. Balık yağında bulunan başlıca eikosapentaenoik asit (EPA) ve dekosapentaenoik asit (DHA) gibi n-3 poliansature yağ asitlerinin, in vivo triaçilgliserol biyosentezini azalttığı ve VLDL yapısındaki triaçilgliserol miktarını düşürdüğü (74) EPA ve DHA'nın inflamasyonu baskılayarak (75) koroner kalp hastalığı riskini azalttığı (76), ateroskleroz gelişimini olumlu etkilediği bilinmektedir. BLKIV'nin bu olumlu özelliklerinin misel yapısının dayanıksız olmasından kaynaklanıyor olup olmadığının belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya gerek olduğu kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Adam, B., Göker, Z., Ardiçoğlu, Y. (2002). *Temel ve Klinik Biyokimya*. Ankara: Atlas Kitapçılık.
2. Champe P. C., Harvey R. A., Ferrier D. R. (2007). *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden : Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri
3. Delibaş, N., Tahan, V. (1995). Lipoprotein Metabolizması ve Ateroskleroz İlişkisi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2, 39-44.
4. Ockner, R., K., Hughes, F.,B., Isselbacher, K., J. (1970). Very Low Density Lipoproteins in Intestinal Lymph: Origin, Composition, and Role in Lipid Transport in The Fasting State. *J. Clin. Invest.*, 48, 2079-2088
5. M. Piha, L. Lindstedt and Kovanen P.T. (1995). Fusion of Proteolyzed Low-Density Lipoprotein in the Fluid Phase: a Novel Mechanism Generating Atherogenic Lipoprotein Particles. *Biochemistry* 34, 10120-10129.
6. Yiğitoğlu M., Göker Z. (2002). *Biyokimya ve Klinik Biyokimya*. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti.
7. Onat, T., Emerk K., Sözman, E.Y. (2002). *İnsan Biyokimyası*, Ankara: Palme Yayıncılık.
8. Gürdöl, F., Ademoğlu, E. (2005). *Biyokimya*. İstanbul:Nobel Tıp Kitabevleri
9. Üstdal, K.M., Karaca L., Türköz, Y., Testereci, H., Kuş H., Paşaoğlu, H. (2003). *Biyokimya*. Malatya :Medipres Yayıncılık.
10. DeNigris S.J, Hamos M., Kasbekar D.K. (1998). Lingual and Gastric Lipases: Species Differences in the Origin of Prepancreatic Digestive Lipases and in the Localization of Gastric Lipase. *Biochim Biophys Acta*, 959, 38-45.
11. Kindel, T., Lee, D., M., Tso, P. (2010). The Mechanism of The Formation and Secretion of Chylomicrons. *Atheroscler Suppl.*, 11, 11-16.
12. Mansbach C. M., Siddiqi S. A. (2010). The Biogenesis of Chylomicrons. *Annu. Rev. Physiol*,72, 315-333.
13. Nauli A. (2005). Intestinal Lipid Uptake and Secretion of VLDL and Chylomicron. Doctor of Philosophy Thesis. Univesty of Cincinati, Cincinati.
14. Mansbach, C., M., Gorelick, F. (2007). Development And Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorbtion. II. Dietary Lipid Absorption,

- Complex Lipid Synthesis, and Intracellular Packaging and Secretion of Chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, 645-650.
15. Greevenbroek, M., M., J., Bruin, T., W., A. (1998). Chylomicron Synthesis By Intestinal Cells in Vitro And in Vivo. *Atherosclerosis*, 141, 9-16.
 16. Black, D., D. (2007). Development and Physiological Regulation Of Intestinal Lipid Absorption. I. Development of Intestinal Lipid Absorption: Cellular Events in Chylomicron Assembly and Secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, 519-524.
 17. Hussain, M., M., Kancha, R., K., Zhou, Z. (1996). Chylomicron Assembly and Catabolism: Role of Apolipoproteins and Receptor. *Biochim. Biophys Acta*, 1300, 151-170.
 18. Windmueller H. G., Lindgren F.T., Lossow W. J., Levy R.I. (1970). On The Nature of Circulating Lipoproteins of Intestinal Origin in The Rat. *Biochim. Biophys Acta*, 202, 507-516.
 19. Ockner, R., K., Hughes, F.,B., Isselbacher, K., J. (1969). Very Low Density Lipoproteins in Intestinal Lymph: Role in Triglyceride and Cholesterol Transport During Fat Absorption. *J. Clin. Invest.*, 48, 2367-2373.
 20. Ockner, R., K., Jones, A.,L. (1970). An Electron Microscopic and Functional Study of Very Low Density Lipoproteins in Intestinal Lymph. *J. Clin. Invest*, 11, 284-292.
 21. Redgrave T.G. Dunne K. B. (1975). Chylomicron Formation and Composition in Unanesthetized Rabbits. *Atherosclerosis*, 22, 389-400.
 22. Mahley R. W., Bennet B. D., Morre D. J., Gray M. E., Thistlethwaite W., LeQuire vs. (1971). Lipoproteins Associated with the Golgi Apparatus Isolated from Epithelial Cells of Rat Small Intestine. *Lab Invest*, 5, 435-444.
 23. Green P, H.R, Glickman R.M. (1981). Intestinal Lipoprotein Metabolism. *J.Lipid Res.*, 22, 1153-1173.
 24. Glickman, R., M., Kirsch, K. (1974). The Apoprotein Of Various Size Classes Of Human Chylous Fluid Lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 371, 255-266.
 25. Güldür T. (1992). Metabolism of Chylomicrons and Chylomicrons Remnants. Doktora Tezi. The Royal Veterinary College University of London, London.

26. Green, P., H., Glickman, R., M., Saudek, C., D., Blum, C., B., Tall, A., R. (1979). Human Intestinal Lipoproteins: Studies in Chyluric Subjects. *J. Clin. Invest*, 64, 233-242.
27. Chajek-Shaul, T., Eisenberg, S., Oschry, Y., Olivecrona, T. (1983). Metabolic Heterogeneity Of Post-Lipolysis Rat Mesenteric Lymph Small Chylomicrons Produced in Vitro. *J.Lipid Res.*, 24, 831-840.
28. Windler E., Greeve J., Robenek H., Rinninger F., Greten H., Jackle S. (1996). Differences in the Mechanisms of Uptake and Endocytosis of Small and Large Remnants by Rat Liver. *Hepatology*, 24, 344-351.
29. Tso P., Drake D.,S., Black, D.,D, Sabesin, S., M. (1984). Evidence For Separate Pathways of Chylomicron And Very Low Density Lipoprotein Assembly and Transport By Rat Small Intestine. *Am. J. Physiol.* 247, 599-610.
30. Edwards L., Peng Y., Reggia J. A. (1998). Computational Model For The Formation of Protocell Stuctures. *Mit Press Journals*, 4, 61-77.
31. Tertov V., Sobenin I., Zufar G., Popv E., Orekhov. (1989). Lipoprotein Agregation as An Essential Condition of Intracelular Lipid Accumulation Caused By Modified Low Density Lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 489-494.
32. Njus D., (2000). Fundamental Principles of Membrane Biophysics. UK: Academic Press.
33. Murray K. R., Granner K.D., Mayes A. P., Rodwell W. V (2004). Harper Biyokimya Dikmen N., Özgünen (Ed). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
34. İde T. (2003). *Laboratuar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri*. Ankara; Medipres.
35. Erişim: Temmuz 2011
<http://media.wiley.com/CurrentProtocols/PH/ph0701/ph0701-fig-0001-1-full.jpg>
36. Güldür, T., Bay Karabulut, A., Bayraktar, N., Kaynar, Ö. (2004). Hydrophobic Nature of Rat Lymph Chylomicrons. *Clin. Chim. Acta*, 342, 161-169.
37. Hydrophobic Interaction Chromatography. (2001). Principles and Methods. Amersham Biosciences 18-1020-90, Edition AB.

38. Şenelt Ş., Yalçınkaya F. (1977). Yağların Tanınmasında Yağ Asitlerinin Gaz Kromatografisi ile Ayrılması Yöntemi. *Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi*, 37, 269.
39. Burtis C. A., Ashword E. R. (1999). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. America. W. B. Saunders Company.
40. Mehmetoğlu İ. (2002). Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı. Konya: Mikro Dizgi.
41. Electroföresis de ácidos nucleicos. Erişim: Temmuz 2011.
<http://html.rincondelvago.com/electroforesis-de-acidos-nucleicos.html>,
42. Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri Bölüm 5. Agaroz Jel Elektroforezi. Erişim: Temmuz 2011
<http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20TR/bolum5.pdf>
43. Chalvardjian A. (1971). Agarose-Strach Gel Electrophoresis of Rat Serum Lipoproteins. *J. Lipid Res*, 12, 265-269.
44. Domínguez A., Fernandez A. (1997). Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *J. Chem. Educ*, 74, 1227-1231
45. Rangel C.O., Pessoa A., Tavares L.C. (2005). Micellar Solubilization of Drugs. *J. Pharm. Pharmaceut Sci.* 8 (2), 148.
46. Kromatografi Metodu. Erişim: Temmuz 2011.
<http://bekircol.com/biyokimyalab/kromatografi.pdf>
47. Triglyserides GPO Methods. Biolabo Reagents. Version : AT 80019, 20 06 2007, 02160, Maizy, France
48. Zhou X., Arthur G. (1992). Improved Procedure For The Determination of Lipid Phosphorus By Malachite Green. *J. Lipid Res.*, 33, 1233-1234.
49. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr Al. Randal R.J., (1951). Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem*, 193, 265-275
50. Markwell M. A., Haas S. M., Bieber L.L., Tolbert N.E. (1978). A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples. *Anal. Biochem*, 87, 206-210.

51. Khoo J., Miller E., McLoughlin P., Steinberg D. (1990). Prevention of Low Density Lipoprotein Aggregation By High Density Lipoprotein or Apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.*, 31,645.
52. Öörni K., Pentikäinen M., Ala-Korpela M., Kovanen P. (2000). Aggregation, Fusion, And Vesicle Formation of Modified Low Density Lipoprotein Particles : Molecular Mechanism and Effect on Matrix Interactions. *J. Lipid Res.*, 41, 1703.
53. Meyer D., Mayans M., Groot P., Suckling K., Bruckdorfer. (1995). Time-course Studies By Neutron Solution Scattering and Biochemical Assays of The Aggregation Of Human Low-Density Lipoprotein During Cu^{2+} - Induced Oxidation. *Biochem. J.* 310, 417.
54. Lauraeus S., Holopainen J., Taskinen M., Kinnunen P. (1998). Aggregation of Dimyristoylphosphatidylglycerol Liposomes by Human Plasma Low Density Lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1373, 148.
55. Talbot R., Rio D.del Rio J., Weinberg P. (2003). Effect of Fluid Mechanical Stresses and Plasma Constituents on Aggregation of LDL. *J. Lipid Res.*, 44, 837.
56. Gravito M., Ferguson S. (2006). Michigan State University in Fundamentals of Biochemistry, Life at the Molecular Level , 2. Baskı, Donald Voet, Judith G Voet, Charlotte W. Pratt, John Wiley & Sons, Inc., USA, 29.
57. Tanford C. (1978). The Hydrophobic Effect and The Organization of Living Matter, *Science*, 200, 1012-1018.
58. Lindman B. (2001). Physico-Chemical Properties of Surfactants. Holmber K. (Ed.) Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry (421-443). John Wiley & Sons Ltd.
59. Rangel-Yagui C.O., Pessoa-Jr A., Tavares L.C. (2005). Micellar Solubilization of Drugs. *J Pharm Pharmaceut Sci.*, 8(2), 147-163.
60. Wichman A. (1979) Affinity Chromatography of Human Plasma Low- and High-Density Lipoproteins. Elution by Selective Cleavage of a Bond in The Spacer *Biochem. J.* 181, 691-698.
61. Helenius A., Simons K. (1972). The Binding of Detergents to Lipophilic and Hydrophilic Proteins. *J. Biol. Chem*, 24, 3656-3661.

62. Seddon A. M., Curnow P., Booth P. J. (2004). Membrane Proteins, Lipids and Detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 1666, 105-117.
63. Rochdi El Abdi Marcel P. (2011). Determination of Critical Micelle Concentration Using Optical Fiber Devices. Proceeding of International Conference on Innovations, Recent Trends and in Mechatronics, Mechanical Engineering and New High-Tech Products Development, MECAHITECH'11. Bildiriler (s.96).
64. Eastoe J. (2005). Surfactant Aggregation and Adsorption at Interfaces, Cosgrove T. (Ed.) Colloid Science, Principles, Methods and Applications (50-76) Blackwell Publishing: India.
65. Sigma Product Information Sheet, SIGMA PRODUCT NUMBER: X-100, CAS NUMBER: 9002-93-1
66. Pownall H.J. (2005). Remodeling of Human Plasma Lipoproteins by Detergent Perturbation. *Biochem.*, 44, 9714-9722.
67. Yamamoto K., Shen B., Zarins C., Scanu A. (1984). In Vitro and in Vivo Interactions of Triton 1339 with Plasma Lipoproteins of Normolipidemic Rhesus Monkeys Preferential Effects on High Density Lipoproteins. *Atherosclerosis*, 4, 418-434.
68. Yamamoto K., Byrne R., Edelstein C., Shen B., Scanu A. (1984). In Vitro Effect of Triton WR-1339 on Canine Plasma High Density Lipoproteins *J. Lipid Res.* 25, 770-779.
69. Guha M., Gantz D., Gursky O. (2008). Effects of Acyl Chain Length, Unsaturation, and pH on Thermal Stability of Model Discoidal HDLs *J. Lipid Res.* 49, 1752-176.
70. Motta C., Guex E., Mazur A., Rayssiguier Y. (1996). Lipid Fluidity of Triacylglycerol-rich Lipoproteins Isolated From Copper-Deficient Rats. *Br J. Nutr.* 75, 767-773.
71. Sola R., Baudet MF., Motta C., Maille M., Boisnier C., Jacotot B. (1990). Effect of Dietary Fats On The Fluidity of Human High-Density Lipoprotein: Influence of The Overall Composition and Phospholipid Fatty Acids. *Biochim Biophys Acta*, 1043, 43-51.

72. Taus M., Dousset N., Moreau J., Ferretti G., Galeazzi T., Solera ML. ve diğeri (1999). Study of Fluidity of Low Density Lipoproteins From Liver Cirrohotic Patients. *Nutr. Metab. Cardiovasc Dis.* 9, 289-293.
73. Berlin E., Khan MA., Henderson GR., Kliman PG. (1991). Dietary Fat and Cholesterol Induced Modification of Minipig Lipoprotein Fluidity and Composition. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.*, 98, 151-157.
74. Mozafarriyan D., Wu JH., (2011). Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease : Effect on Risk Factors, Molecular Pathways, and Clinical Events. *J Am Coll Cardiol*, 58, 2047-2067.
75. Pauwels EK., Kostkiewicz M. (2008). Fatty Acid Facts, Part III: Cardiovascular Disease, or, a Fish Diet is not Fishy. *Drug News Perspect.* 21, 552-561.
76. Colussi G., Catena C., Baroselli S., Nadalini E., Lapema R., Chiuch A., Sechi LA. (2007). Omega-3 Fatty Acid: From Biochemistry to Their Clinical use in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2, 13-2

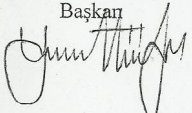

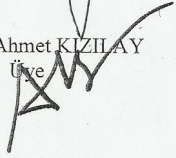
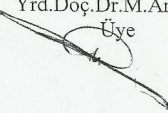
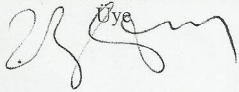


İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 26.01.2009
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol No.su :2008/18

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. Tayfun GÜLDÜR'ün yürütücüsü olduğu "Farklı yağlarla beslenen ratlardan elde edilen torasik lenf intestinal VLDL 'lerinin hidrofobik özelliklerinin karşılaştırılması" isimli 2008/18 Protokol no'lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ Başkan 	Doç.Dr.Nigar VARDI Başkan Yard. Katılmadı	Doç.Dr. Yunus KARAKOÇ Raporör 
Doç.Dr. Ahmet KIZILAY Üye 	Doç.Dr.Cüneyt KAYAALP Üye Katılmadı	Yrd.Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Üye 
Veteriner hk.M.Zafer BOZDAĞ Üye 	Bekir ÜNAL Sivil Üye Katılmadı	Zafer KIRÇUVAL Sivil Toplum Örgütü Üyesi Katılmadı

ÖZGEÇMİŞ

5 Mayıs 1978' de Samsun' da doğdum. İlkokul eğitimimi İzmir' de, ortaokul ve liseyi Malatya' da tamamladım. 1996 yılında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandım. 2000 yılında lisans eğitimimi tamamlayarak mezun oldum. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya AD' nda yüksek lisansa başladım, 2005 yılında tamamladım ve yine İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya AD'nda doktora programına başladım ve halen devam etmekteyim.