T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA TRANS–9 18:1 OKTADEKENOİK ASİT İZOMERİNİN SİSTEMİK İNFLAMASYON GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Elife DEVECİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

KONYA - 2009

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA TRANS–9 18:1 OKTADEKENOİK ASİT İZOMERİNİN SİSTEMİK İNFLAMASYON GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Elife DEVECİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 06202016 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA - 2009

ÖNSÖZ

Tezimi hazırlamamda emeği geçen, bilimsel yardımlarını esirgemeyen, ilgi ve desteğini gördüğüm S.Ü.Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, deney süresince yardım aldığım S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü yüksek lisans öğrencisi Yavuz ÇAKMAK'A ve Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Veteriner hekimi Mehmet ÖZ'e teşekkür ederim. Ayrıca tez hazırlama süresince desteğini eksik etmeyen eşime teşekkür ederim.

Tezimin çalışılması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR iii

1. GİRİŞ 1

1.1.Lipidler 2

1.1.1.Lipidlerin sınıflandırılması ve önemi 2

1.1.2. Yağ asitlerinin yapısı ve sınıflandırılması 3

1.1.2.1. Yağ asitlerinde cis ve trans izomerliği 4

1.1.2.2.Trans yağ asitleri 5

1.2 İnflamasyon 6

1.2.1. C- Reaktif Protein (CRP): 7

1.2.2.Tümör Nekrotizan Faktör (TNF) 8

1.2.3 IL-6 Interlökin 11

1.2.4.İnsülin 12

1.2.5 Homosistein 13

1.2.6 Troponin 14

1.3 Trans yağ asitlerinin Potansiyel Mekanizmalar 15

1.3.1 Kardiyovasküler hastalık riski üzerindeki potansiyel etki 15

1.3.2.Diyabet riski üzerindeki potansiyel etki 16

2.GEREÇ ve YÖNTEM 17

2.1.Gereç 17

2.1.1.Vakaların Oluşturulması ve Gruplandırma 17

2.1.2. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı 19

2.1.3. Kullanılan Cihazlar: 20

2.1.4. Kullanılan Reaktifler : 21

2.1.5 Kullanılan Çözeltiler; 21

2.2 Yöntem 22

2.2.1. CRP tayini 22

2.2.2. IL-6 Tayini 22

2.2.3. TNF-α Tayini 23

2.2.4. İnsulin Tayini 23

2.2.5.Homosistein Tayini 24

2.2.6. Troponin tayini 24

2.2.7. Serumda yağ asit kompozisyonun tayini 24

3. BULGULAR 26

4. TARTIŞMA 29

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 34

6. ÖZET 36

7. SUMMARY 37

8. KAYNAKLAR 38

9. ÖZGEÇMİŞ ……...43

SİMGELER ve KISALTMALAR

AFP: Akut faz proteini

AG-HPLC: Silver ion –high performence liquid kromotografi

AT-1-R: Anjiyotensin tip-1 reseptör

CRP: C-reaktif protein

ENOS Mrna: Endotelyal nitrik oksit sentaz Mrna

ET-1: Endotelin-1

FAO: Gıda ve Tarım örgütü

GC: Gaz kromotografi

ICAM: İnterselüler adezyon molekülü

IL-1: Interlökin -1

IL-6: Interlökin-6

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LPS: Lipopolisakkarit

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

NFkB: Nükleer faktör kbeta

NO: Nitrik oksit

PPAR-Y: Pereksizom proliferatör aktive edici reseptör

ROS: Reaktif oksijen türleri

SREBP-1: Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein

TNF: Tümör nekrozitan faktör

VCAM: Vasküler hücre adezyon molekülü

VSM: Vasküler düz kas

WHO: Dünya sağlık örgütü

1.GİRİŞ

Trans yağ asitleri çok eski çağlardan bu yana insan beslenmesinde yer almaktadır. Beslenmedeki trans yağ asidi oranı gelişen margarin endüstrisiyle artmıştır (Mozaffarian ve ark 2004).

Trans yağ asitleri, gıda üretimi için bitkisel yağ hidrojenasyonu esnasında oluşturulan trans konfigürasyonunda en az bir çift bağa sahip doymamış yağ asitleridir (Mozaffarian 2006). Bu asitlerde çift bağ sayısı cis izomerlere göre daha küçük, açil zinciri daha doğrusaldır. Dolayısıyla erime noktası ve termodinamik stabilitesi daha yüksek olan farklı fiziksel özellikte sert bir molekül ortaya çıkmaktadır (Larque ve ark 2001).

Trans yağ asidinin sanayileşmiş ülkelerdeki ortalama tüketiminin önemli kaynakları fast foodlar, hamur işi ürünleri, ambalajlı mezeler ve margarinlerden oluşmaktadır. Bunlar toplam diyetsel yağının %4-7'sidir (Allison ve ark 1999). Son zamanlarda trans yağ asidi tüketimi ile insan sağlığı ve beslenme üzerindeki etkileri tartışma konusu olmuştur. FAO ve WHO (1993) Trans yağ asidi tüketiminde, miktarın düşürülmesi için gıda endüstrisi ürünlerinde trans izomer oluşumunu engelleyici veya azaltıcı uygulamalara yönelik önerilerde bulunmaktadır (Taşan ve Dağlıoğlu 2005).

Günümüzde önemli sağlık sorunlarından koroner kalp hastalığı, diabet, insülin direnci, dislipidemi gibi hastalıkların beslenme şekliyle sıkı bir ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Bu hastalıkların patolojisinde inflamasyon temel bir rol oynamaktadır. Yükselmiş CRP, IL-6 konsantrasyonları ve yükselmiş çözülebilen TNF reseptörlerinin, insülin direnci, dislipidemi, koroner arter hastalığı riski ve kalp yetmezliği ölüm oranı ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bunların oluşum mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır (Fernandez-real ve ark 2000). Trans yağ asidinin sistemik inflamasyonun etkileyip etkilemediği merak edilen bir konudur.

Biz bu çalışmamızda diyet ile alınan trans-9 18:1 oktadekenoik asit izomerinin potansiyel proinflammatuar sonuçlarını araştırmayı amaçladık.

1.1.Lipidler

1.1.1.Lipidlerin Sınıflandırılması ve Önemi

Lipidler, genel olarak suda erimeyen (polar olamayan) eter ve kloroform gibi çözücülerde çözünen organik moleküllerdir. Bitkisel ve hayvansal dokularda bulunan lipidler, canlının hücre ve dokularında depolanmış haldeki enerji kaynağını oluştururlar. Yağların susuz olarak depo edilme özelliğinden dolayı iyi bir enerji deposu olan yağ molekülleri, aynı ağırlıktaki karbonhidratlardan daha fazla enerji verirler (Kalaycıoğlu ve ark 2000).

Lipidlerin Biyolojik Önemi

- Adipoz dokuda depolanarak gerektiğinde enerji için kullanılırlar.
- Subkutanöz dokuda ve bazı organların etrafında yer alan lipidler, ısı izolasyonunu sağlarlar.
- Nonpolar lipidler myelinli sinirlerde elektriksel izolasyon sağlarlar.
- Proteinlerle birlikte hücre membran yapısında yer alırlar.
- Plazmada proteinlerle birleşerek lipoproteinleri oluştururlar.
- Obezite, ateroskleroz gibi klinikopatolojik durumların anlaşılmasında lipid biyokimyası önem kazanır (Ünlü 2004).

Sınıflandırma

Lipidler için aşağıda sunulan sınıflandırma Bloor'dan değiştirilerek hazırlanmıştır (Murray ve ark 2004).

1-Basit lipidler: Yağ asitlerinin çeşitli alkoller ile yaptığı esterlerdir.

a-Yağlar: Yağ asitlerinin gliserol ile yaptığı esterlerdir.

b-Mumlar: Yağ asitlerinin yüksek molekül ağırlıklı monohidrik alkollerle yaptığı esterlerdir.

2-Karmaşık lipidler: Yağ asitlerinin bir alkol ve bir yağ asidine ek olarak diğer gruplarda içerdiği esterlerdir.

a-Fosfolipidler: Yağ asitleri ve bir alkole ek olarak bir fosforik asit kalıtı içeren lipidlerdir. Bunlar, sıklıkla azot içeren bazlar ve diğer yapı taşlarını içerir; örneğin gliserofosfolipidlerde alkol gliserol, sfingofosfolipidlerde alkol sfingozindir.

b-Glikolipidler (glikozfingolipidler): Bir yağ asidi, sfingozin ve karbonhidrat içeren lipidlerdir.

c-Diğer karmaşık lipidler: Sulfolipidler ve aminolipidler gibi lipidlerdir. Lipoproteinler de bu sınıfa alınabilir.

3-Öncül ve türev lipidler: Bunlar; yağ asitleri, gliserol, steroidler, gliserol ve steroidlere ek olarak alkoller, yağ aldehitleri ve keton cisimleri, hidrokarbonları, yağda çözünen vitaminler ve hormonları kapsar.

1.1.2. Yağ Asitlerinin Yapısı ve Sınıflandırılması

Yağ asitlerinin büyük bir kısmı organizmada hücresel yapı elemanı olarak yağ açil esterleri şeklinde, az bir kısmı ise serbest halde bulunmaktadır (Gürdöl ve Ademoğlu 2006).

Yağ asitleri bir ucunda karboksil grubu, diğer ucunda metil grubu içeren uzun hidrokarbon (H ve C karbon atomları) zincirinden oluşmaktadır. Yağ asidinin karboksil grubu pH 7 de iyonize haldedir ve suya affinitesi vardır. Yağ asidi karboksil grubunun pKa değeri 4.8 dir. Bu nedenle serbest yağ asitleri vücut sıvılarında iyonize halde bulunur. Uzun hidrokarbon zincirin bir ucunda bulunan hidrofilik karboksil grubu, sulu ortamda etkileşirken, hidrofobik uzun hidrokarbon zincir polar olmayan ortama yönelerek moleküle suda erimeme özelliği kazandırır. Bu hidrofilik ve hidrofobik bölgelerin bir arada olması nedeniyle yağ asitleri amfipatik özelliktedir. Bu moleküller plazmada proteinlere bağlı olarak taşınır (Gürdöl ve Ademoğlu 2006).

Yağ asitleri ve türevlerinin fizyolojik özellikleri, hidrokarbon zincirinin uzunluğu ve doymamışlık derecesi ile tayin edilmektedir. Yağ asitleri ve türevlerinin erime noktaları, sahip oldukları hidrokarbon zincirinin uzunluğuna ve doymamışlık derecesine bağlıdır. Polar olmayan hidrokarbon zinciri, yağ asitlerinin suda eriyebilirliğinin zayıflamasına neden olur. Uzun yağ açil zincir

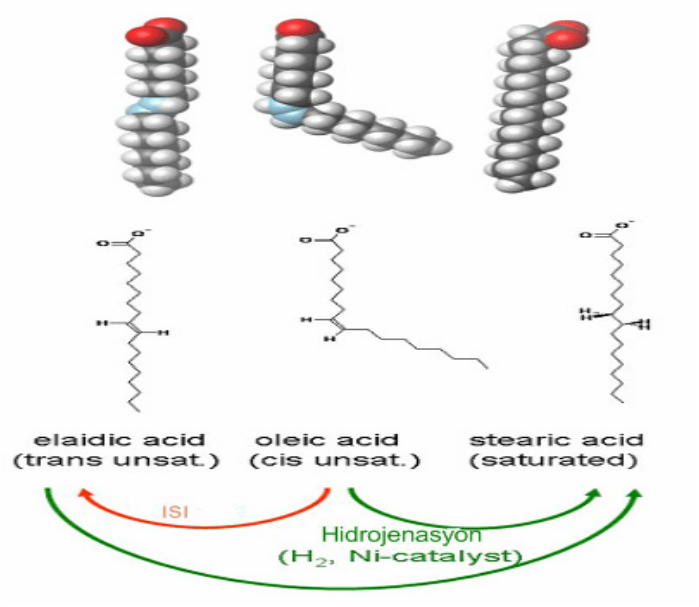
ve birden fazla çift bağ, suda eriyebilirliği azaltır. Zincir uzunluğu yağ asidinin erime ısısını arttırır. Buna karşılık çift bağlar bu erime ısısını azaltır (Gürdöl ve Ademoğlu 2006).

Yağ asitleri dört gruba ayrılır:

- Doymuş yağ asitleri
- Doymamış yağ asitleri
- Hidroksi yağ asitleri
- Eikozanoidler (Gürdöl ve Ademoğlu 2006).

1.1.2.1. Yağ Asitlerinde Cis ve Trans İzomerliği

Yağ asitlerindeki çift bağlar, alkil zincirin dönme yeteneğini kısıtlar. Bu durum, çift bağ etrafında cis veya trans biçimi olarak tanımlanan izomerizmin kaynağını oluşturur. Doymamış yağ asitleri katalizör eşliğinde ısıtılırsa, cis şeklinden trans şekline döner. Örneğin; oleik asit ısıtılırsa, trans şekli olan elaidik aside döner. Memelilerdeki doğal doymamış yağ asitlerinin tümü cis biçimine sahiptir (Spectochappel 2000).



Şekil 1.1. Yağ asitlerinde cis ve trans izomerleri (www.people.umass.edu/ktheis/fatty-acids2.gif).

Doymuş ve doymamış yağ asitleri arasında önemli konformasyonel fark vardır. Doymuş yağ asitlerinde hidrokarbon zinciri düşük sıcaklıklarda zig zag

şeklinde uzar. Yüksek sıcaklıklarda ise tekli bağın dönme serbestisi olduğu için sonsuz sayıda konformasyona uğrayabilir. Bağın dönmesi sonucu zincir daha kısa bir yapı kazanabilir (Mehmetoğlu 2004).

Molekülde çift bağ sayısı arttıkça, cis yapısından dolayı çeşitli bükülmeler meydana gelir. Tek çift bağlı bir molekül L şekli alırken (120° bükülür), 4 çift bağlı bir molekül kırık veya U şeklini alabilir (Mehmetoğlu 2004).

Bu şekiller, moleküllerin zarlarda paketlenmesinde ve yağ asitlerinin fosfolipid molekülleri içinde alacakları yerin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Mehmetoğlu 2004).

1.1.2.2.Trans Yağ Asitleri

Trans yağ asitleri trans konfigürasyonda en az bir çift bağa sahip doymamış yağ asitleridir (Mozaffarian 2006). Bu asitlerde çift bağ sayısı cis izomerlere göre daha küçük, açil zinciri daha doğrusaldır. Dolayısıyla, erime noktası ve termodinamik stabilitesi daha yüksek olan farklı fiziksel özellikte sert bir molekül ortaya çıkmaktadır (Larque ve ark 2001).

Trans yağ asitleri ruminal aktiviteden dolayı süt kaynaklı yağlarda, ayrıca hidrojenasyonla oluşmaktadır. Margarinler, şorteningler ve fırın ürünleri nispeten daha fazla trans yağ asidi içermektedir (Taşan ve Dağlıoğlu 2005).

Trans İzomerlerin Yapısı ve Özellikleri

Organik bileşiklere özgü olan izomeri, kısaca aynı kapalı formüllü bileşiklerin, düzlemde veya üçlü boyutta farklı molekül yapılarına sahip olmasıdır. Yağ asitlerinde, fiziksel ve kimyasal özellik farklılıklarına neden olan tüm izomer şekilleri söz konusudur. Doymamış yağ asitlerinde belirlenen önemli izomer çeşitleri yerel (pozisyon) ve uzay (geometrik) olarak iki grupta incelenebilir (Kayahan 2003).

Geometrik izomer, çift bağlar ucundaki karbon atomlarına bağlı hidrojen atomlarının konfigürasyonuna göre şekillenir; cis ve trans olarak iki

izomer oluşur. Hidrojen atomları karbon zincirinin aynı tarafında ise cis, aksi yönlerde ise trans izomerler ortaya çıkar. Pozisyon izomeri ise, molekül içinde çift bağların yer değiştirmesidir (Mensink ve Katan 1990).

Cis formu molekülde bükülmeye yol açarken, trans formu doymuş yağ asitlerinin düz zincirine benzerlik göstermektedir. Trans yağ asitlerinin çift bağ açısı daha küçük, açil zinciri daha doğrusaldır. Böylece aynı sayıda karbon, hidrojen ve oksijen atomlarına sahip olan iki izomer farklı üç boyutlu yapılara sahip olmaktadır (Taşan ve Dağlıoğlu 2005).

1.2 İnflamasyon

İnflamasyon organizmada enfeksiyöz, fiziksel, kimyasal ve diğer etkenlerin neden olduğu doku hasarına karşı, sellüler ve hümoral düzeyde oluşan güçlü bir fizyolojik cevaptır. Böyle bir reaktif cevabın amacı, hasarlayıcı etkeni (örneğin; bakteri) ve ortaya çıkan ürünleri ortadan kaldırmak ve zararlıyı olduğu yerde sınırlı tutmaktır. Kontrol sağlandıktan sonra, hasar görmüş dokuların tamir ve yenilenmesini mümkün kılmaktır (Kılıçturgay 1997).

Yerel olarak, inflamasyon bölgesinde, vasküler kalibre ve geçen kan miktarı artar (hiperemi). Kapiller damar duvarında permeabilite artışı sonucu bol miktarda sıvı kitlesi interstisiyel aralığa sızar (ödem). Oluşan kemotaktik uyaranların etkisi ile damar duvarındaki marginasyon yığınağından lökositler diapedez yolu ile dokulara geçerek inflamasyon alanına gelirler. Böylece inflamasyonun kolor (yerel ısı artışı), rubor (yerel kızarıklık), tümör (yerel şişlik) ve dolor (yerel ağrı) dan oluşan dört klasik kardinal belirtisi oluşur (Kılıçturgay 1997).

İnflamasyon esnasında, kompleman sistemi ile birlikte bazofil, makrofaj ve trombositlerden kaynaklanan histamin ve serotonin gibi aminler; lökositlerden kaynaklanan lökotrienler; makrofajlardan salınan IL-1, TNF ve IL-6 gibi monokinler; çeşitli hücrelerden kaynaklanan inflamatuar sitokinler, prostoglandinler, koagülasyon faktörleri; fagositlerden salınan lizozomal enzimler başlıca hümoral (endojen) mediatörleri oluştururlar. Bunlara çeşitli

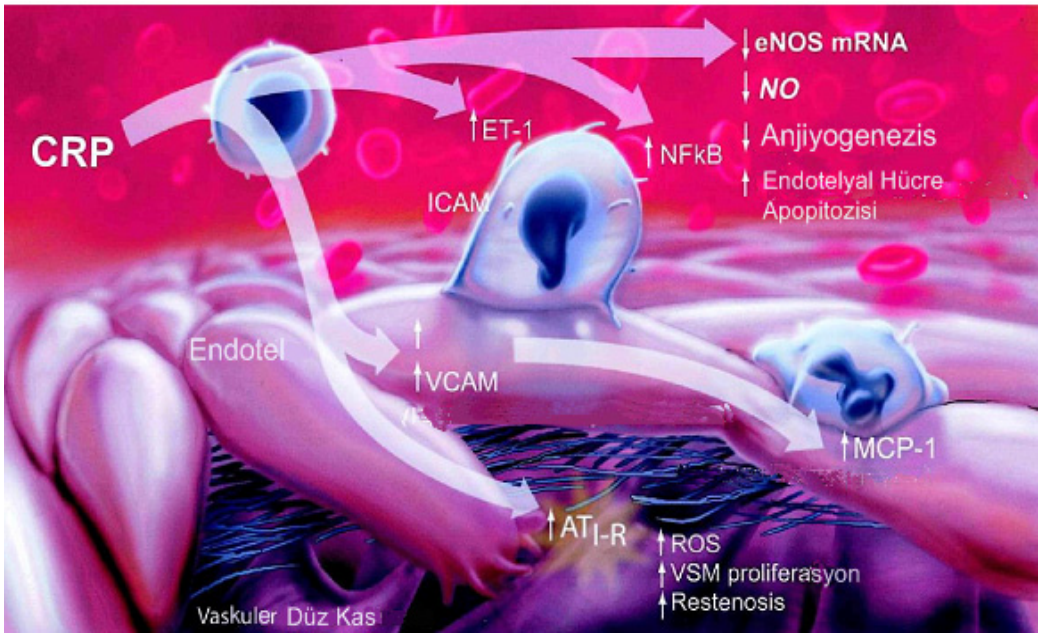
bakteri ürünlerini (eksojen mediatörleri) de eklemek gerekir (Kılıçturgay 1997).

1.2.1. C- reaktif Protein (CRP):

C-reaktif protein (CRP) insanlarda, enfeksiyon ve doku zedelenmesine yanıt olarak akut ve hızlı yükselen majör bir akut faz reaktanıdır. İnflamatuar yanıtın akut fazı, herhangi bir uyarıya karşı (enfeksiyon, travma vb) ani bir şekilde başlatılan fizyolojik değişikliklerle karakterizedir. C-reaktif protein nonspesifik bir laboratuvar bulgusudur ve enfeksiyon, doku zararlanması ve inflamasyonun çeşitli şekillerinde hepatik yapımı tetiklemektedir (Auer ve ark 2002).

İnsan CRP'si fosfokoline bağlanma spesifitesi olan, Ca2+ bağlayıcı bir akut faz proteinidir (Szalai ve ark 1999). Hastaların serumunda bulunan Streptococcus Pneumonia'nın hücre duvarındaki C-polisakkaridine bağlanma özelliği vardır. Protein elektroforezinde yavaş-y ile orta-p arasında bir bölgede göç etmektedir. Sentez yeri karaciğerdir. Proinflamatuar ve antiinflamatuar etkilere sahip olan bir AFP'dir (Lagrand ve ark 1999). CRP sadece çeşitli bakteri, mantar ve protozoal parazitlerde bulunan polisakkaride değil, kalsiyum iyonlarının varlığında fosforilkolin, lesitin gibi fosfatidilkolinler ve nükleik asidler gibi polianyonlara da bağlanabilmektedir. Bu şekilde bazı yabancı patojenleri ve hasar gören hücredeki fosfolipid bileşenlerini tanıyabilmektedir (Ralf ve Zweigner 1999). CRP fosfokolin içeren polisakkaridlere de bağlanabilmektedir (Szalai ve ark 1999). CRP polivalan bir ligand ile kompleksleştiği zaman, C1q ile başlayan klasik kompleman yolunu uyarmaktadır (Szalai ve ark 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalar, kompleman sisteminde yer alan faktör H 'ın CRP'ye bağlandığını ve bu bağlanmanın alternatif yolu ve C5 konvertazları güçlendirdiğini göstermektedir (Mold ve ark 1999). CRP, antikorlar gibi opsonizasyonu, fagositozu, inflamatuar tepkimenin bir yanıtı olarak invaze olan hücrelerin lizisini başlatabilmektedir (Szalai ve ark 1999). Monositlerde ise inflamatuar sitokinleri ve koagülasyon mekanizmasının başlamasında önemli bir role sahip olan doku faktörünü indüklemektedir. Son olarak CRP'nin yüksek afinite ile Fc reseptörüne

bağlandığı gösterilmiştir; bu bağlanmanın CRP bağımlı fagositozda rol aldığı sanılmaktadır. CRP'nin temel işlevi, muhtemelen hasarlı dokudan açığa çıkan, potansiyel olarak toksik, otojen substansları tanımak, onlara bağlanmak, zehirsizleştirmek ya da kandan uzaklaştırmaktır. CRP opsonizasyon işlemi sırasında metabolize olmaktadır (Szalai ve ark 1999). Son yıllarda CRP'nin proaterojenik özelliklere sahip olduğunu gösteren bir çok çalışma yayınlanmıştır (Pasceri ve ark 2000). Örneğin; CRP endotel hücrelerini aktive ederek interselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), selektinler, kemokin, monosit kemotaktik protein-1 salınımını artırır. CRP ayrıca, interlökin-6 (IL-6) ve endotelin-1 (ET-1) sekresyonunu indüklerken, endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS)'ın insan endotel hücrelerindeki expresyonunu ve biyoyararlılığını azaltır. Dolayısıyla hem bazal hem de stimüle edilmiş nitrik oksit (NO) salınımı azalır (Verma ve ark 2002). Ayrıca CRP'nin MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)'i stimüle ettiği ve makrofajlar tarafından LDL alınımını artırdığı gösterilmiştir (Venugopal ve ark 2002). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda da Szmitko (2003) CRP'nin endotelyal hücre apopitozisini hızlandırdığı ve anjiyogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir. Başlangıç aşamasında olan bazı çalışmalarda CRP'nin endotel hücrelerinde nükleer faktör κBeta (NFkB)'yı upregüle ettiği, bu şekilde de endotel progenitör hücre sağkalınımı diferansiyasyonunu azalttığı gösterilmiştir. CRP'nin vasküler düz kas hücrelerinde anjiyotensin tip-1 reseptör (AT-1-R)'lerini (hem invivo hem de invitro şartlarda) upregüle ettiği, vasküler düz kas proliferasyonu, migrasyonu, ROS (reaktif oksijen türleri) üretimi ve restenozisi artırdığı gösterilmiştir. Tüm bu sebeplerden dolayı C-Reaktif protein endotel disfonksiyonunun önemli bir markırı gibi fonksiyon görmektedir (Szalai ve ark 1999).



Şekil 1.2. şekilde C-Reaktif proteinin proaterojenik özellikleri şematize edilmiştir (Szmitko ve ark 2003).

(eNOS mRNA=endotelyal nitrik oksit sentaz mRNA; NO=nitrik oksit; ET-l=endotelin-l; NFkB=nükleer faktör KBeta; ICAM=interselüler adezyon molekülü; VCAM= vasküler hücre adezyon molekülü; AT-1-R=Anjiyotensin tip-1 reseptör; ROS=reaktif oksijen türleri; VSM=vasküler düz kas; MCP-l=monocyte chemoattractant protein-1)

1.2.2. Tümör Nekrotizan Faktör (TNF)

Konakçı hücrelerin gram (-) bakterilere karşı esas mediatörüdür (Üstüner 2002). Diğer enfeksiyöz organizmalara karşı yanıtta da rol oynar. Farelerde yapılan çalışmalarda varılan sonuca göre düşük konsantrasyonlarda LPS (lipopolisakkarit), mononükleer fagositlerin işlevini uyarır (Üstüner 2002).

Yüksek konsantrasyonlarda ise doku yaralanmasına bağlı yaygın intravasküler koagülasyona ve genellikle ölümle sonuçlanan şoka neden olur (Üstüner 2002).

TNF'nin hücresel kaynağı LPS ile aktive olan mononükleer fagositlerdir. Aktive naturel killer hücreleri ve aktive mast hücreleri de bu

proteini salgılar. İnsan TNF'si nonglikozile transmembran bır protein olup molekül ağırlığı 17 KD'dur. İki tip TNF vardır: (Vasili 1992).

TNFnin biyolojik etkinliği:

a) TNF-a (kaşektin)

b) TNF-p (lenfotoksin)

TNF düşük konsantrasyonlarda (yaklaşık 10^{-9} M'da) lökosit ve endotel hücreleri için lokal olarak parakrin ve otokrin düzenleyicidir (Üstüner 2002). Düşük yoğunluklarda biyolojik etkileri şunlardır:

1) TNF lökositlere karşı endotel hücre yüzeyini daha yapışkan hale getirerek damar endotel hücrelerinin yeni yüzey reseptörlerini exprese etmelerine neden olur. TNF aynı zamanda nötrofillere de etki ederek endotel hücrelerinin yapışkan özelliklerini artırır.

2) TNF inflamatuar lökositleri, mikroorganizmaları öldürecek şekilde aktive eder. Özellikle nötrofilleri aktive etmede güçlüdür.

3) TNF; IL-1, IL-6, kemokinler ve mononükleer fagositleri uyarır.

4) Virüslere karşı IFN benzeri koruyucu etki gösterir (Üstüner 2002).

TNF'nin enfeksiyonlara karşı temel sistemik etkileri aşağıdaki gibidir:

l) Endojen pirojen olarak etki ederek ateşi yükseltir. Bu etkiyi IL-1 ile yapar. Ateşin TNF ve IL-1'e yanıt olarak yükselmesi sitokinle uyarılmış hipotalamus hücreleri tarafından artırılan prostaglandin senteziyle olur.

2) Mononükleer fagositlere ve vasküler endotel hücrelere etki ederek IL-1 ve IL-6'nın dolaşıma salınmasını uyarır.

3) Hepatositlere etki ederek serum amiloid A ve P Protein, kompleman faktör 3, haptoglobulin, CRP, alasit glikoprotein, Faktör B gibi bazı akut faz proteinlerin sentezini artırır.

4) Damar endotelinin prokoagülan ve antikoagülan aktivitelerindeki dengeleri değiştirerek pıhtılaşma sistemini aktive eder.

5) Kemik iliğini baskılayarak ana hücre bölünmesini engeller. Sürekli TNF verilmesi lenfopeniye ve immün yetmezliğe neden olur.

6) TNF uzun süre deney hayvanlarına verildiğinde kaşektik metabolik değişmelere neden olur. Kaşeksi TNF ile uyarılan iştah azalmasıyla oluşur. IL-1 gibi sitokinler Tüberküloz ve kanser gibi kronik hastalıklarda kaşektik duruma katkıda bulunurlar.

7) Gram negatif bakteriyel sepsis durumlarında çok yüksek miktarda TNF üretilir ve serum TNF konsantrasyonu artar. Bunu takiben dolaşımda kollapsa neden olur. Yani TNF, septik ve endotoksik şokun önemli bir mediatörüdür (Üstüner 2002).

TNF'nin birçok özel etkileri aşırı yüksek konsantrasyonlarında letal (öldürücü) etkilerine katkıda bulunur (Üstün 2005).

1.2.3 IL-6 Interlökin

Önceleri INFp-2 olarak isimlendirilen IL-6 yaklaşık 26 KD'luk bir sitokin olup T lenfosit, B lenfosit, monosit damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreler, APCs, mast hücreleri tarafından sentez edilir. Diğer sinonimleri ise sitotoksik T hücresi farklılaşma faktörü, hibridoma/plazmasitoma büyüme faktörü, trombopoietin'dir. 4 α helikal uzun zincirli sitokin ailesine ait olduğu kabul edilmektedir (Male ve ark 1991). Sentez ve salgılanması:

Endotoksin, IL-1 ve TNF α, IL-6 sekresyonunu artırır. CD40 ligant TL-6 sekresyonunu tetikler. IL-4'ün IL-6 geni transkripsiyonunu inhibe ettiği, IL-10'un ise mRNA'nın postranskripsiyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Bellido ve ark 1996).

IL-6R: IL-6 reseptörü 60 KD a subunit ve 130 KD ß sinyal iletici subuniti içeren non-kovalent bağlı bir yapıdır. Sinyal iletiminde fosforilasyonda rol oynar (Bellido ve ark 1996).

Biyolojik aktivitesi:

IL-6'nın en iyi tanımlanan etkileri hepatositler ve B lenfositler üzerinedir:

l) IL-6 fibrinojen, hemopeksin, sistein proteinaz inhibitör, α1 antikimotripsin, α2-makroglobulin gibi akut faz cevaba katkıda bulunan birçok plazma proteininin hepatositler tarafından sentezine neden olur.

2) IL-6 B hücrelerinin immünglobulin salınımı için kofaktör olarak rol oynar. Malign plazma hücreleri için (plasmositoma ya da myelom) büyüme hücresi rolü oynar ve kendi kendine büyüyen plazmasitom hücreleri otokrin büyüme faktörü olarak IL-6'yı salgılar.

3) Bir endojen pirojendir. TNF, IL-1, trombosit gelişme faktörü, antijenler ve bakteriyel endotoksinleri etkilemektedir.

5) IL-6 hipofizden ACTH salgısını indükler ve direkt olarak glikokortikoid salgılamak üzere adrenalin uyarılmasını sağlar.

6) Böbreklerde mesengial proliferasyonu artırır.

7) Keratinositlerde proliferasyona, IL-1 ve TNFa sekresyonuna neden olur (Üstüner 2002).

1.2.4.İnsülin

Pankreastaki langerhans adacıklarının beta-hücreleri tarafından üretilen polipeptit yapıda 6000 dalton molekül ağırlığında bir hormondur. Molekülü 2 aminoasit zincirinden oluşmaktadır. Zincirler birbirlerine iki disülfür köprüsüyle bağlanmıştır. Bu hücreler pankreas kütlesinin yaklaşık %1'ini oluştururlar (Murat 2004).

İnsülin, dokular tarafından yakıtların kullanımını düzenleyen en önemli hormonlardan biridir. Metobolik etkileri anaboliktir. Örneğin; glikojen, triaçilgliserol, protein sentezini desteklemektedir (Murat 2004).

İnsülin sentezinin basamakları sırasıyla şöyledir:

1) Nükleusta insülin kodlayan genlerden mRNA transkripsiyonu olur.

2) mRNA stoplazmaya gelir ve kaba endoplazmik retikuluma bağlı polizom ile translasyona uğrar.

3) Polipeptit sentezi, N-Terminal sinyal polipeptidi oluşumuyla başlatılır ve kaba endoplazmik retikulum membranı içine penetre olur.

4) Polipeptit zinciri, kaba endoplazmik retikulum lümeni içine doğru uzar, sonuçta preproinsülin oluşur.

5) Sinyal peptidi ayrılır ve sisternada proinsülin oluşur.

6) Proinsülin kaba endoplazmik retikulumdan golgi komleksine taşınır. Orada proteazların etkisiyle c-peptit segmentini kaybederek insüline dönüşür. Dönüşüm; golgi aparatından kopma sonucu depo veziküllerinde devam eder.

7) İnsülin parsiyel ekzositozla salgılanırken, onunla birlikte ekimolar miktarda C- Peptiti de salgılanır.

Proinsülinin bir kısmı intakt olarak dolaşıma verilir. Dolaşımdaki insülin benzeri immüm reaktivitenin %20'sini teşkil eder. Proinsülinin biyolojik etkinliği insülininkinin % 10'u kadardır (Pederson ve ark 1990).

1.2.5 Homosistein

Homosistein serbest radikaller gibi etki gösteren ve son yıllarda oksidatif sisteme dahil olduğu kabul edilen, protein yapısına girmeyen bir amino asittir (Çıkım ve ark 2004). Homosistein, metiyonin metabolizması sırasında oluşan, proteinlerin yapısına girmeyen, vücutta metiyoninden sentez edilen esansiyel bir aminoasit olup; remetilasyon ve transsülfürasyon olmak üzere başlıca iki yol ile metabolize olmaktadır. Remetilasyon döngüsünde kofaktör olarak vitamin B_{12} kullanan metiyonin sentaz enzimi görev almaktadır. Bu enzimin varlığında homosistein folik asitten metil grubu alarak metiyonine dönüşmektedir. Diğer yol olan transsülfürasyon döngüsünde ise kofaktör olarak vitamin B_6 kullanan sistation-P sentaz enzimi görev almaktadır. Bu enzimin varlığında homosistein, sistationa daha sonra da yine vitamin B_6 varlığında sisteine ve a-ketobütirata dönüşerek metabolize olmaktadır (Hajjar 2001). Enzimlerdeki konjenital eksiklik veya metabolizma sırasında reaksiyonlarda görev alan folik asit, vitamin B_{12} ve B_6'nın yetersizliğine bağlı olarak plazma homosistein düzeyleri yükselmektedir. Hiperhomosisteinemi vücutta bir çok zararlı etkilere yol açmaktadır. Bunlardan bazıları arasında serbest radikaller gibi davranıp endotel hasarı oluşturması ve bu olayın sonucunda da trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu, trombüs formasyonu gibi koagulasyonu artırıcı etkiler meydana getirmesi, biyolojik membranlarda oksidasyon yapması, LDL oksidasyonu yaparak aterosklerozu artırıcı etkiler ortaya çıkarması sayılabilmektedir. Homosistein düzeylerinin artmasının bir sonucu da endotelde bulunan ve lipid

peroksidasyonunu engelleyen glutatyon peroksidaz aktivitesinin baskılanmasıdır (Çıkım ve ark 2004).

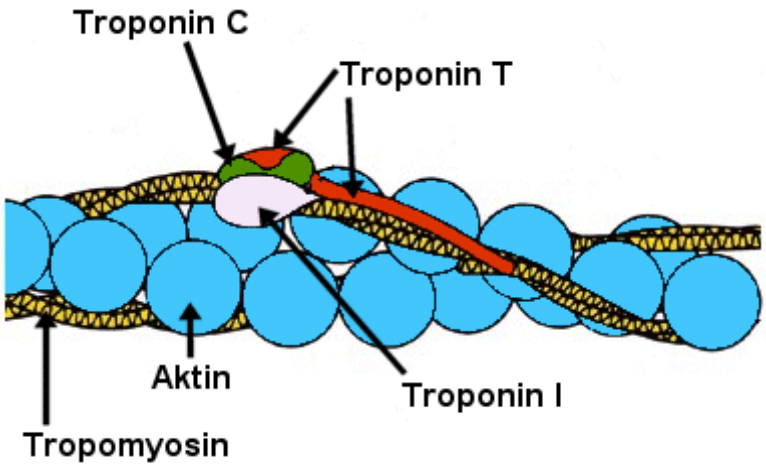
Homosistein konsantrasyonu yaşla birlikte devamlı olarak yükseldiğinden; kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olabilir. Yüksek plazma homosistein düzeyleri genel populasyonda derin ven trombozu içindeki bir risk faktörüdür. Hiperhomosisteineminin tromboz üzerindeki etkisi Protein C, Protein S ve antitrombin III eksiklikleri ve aktif protein C direnci gibi diğer risk faktörlerinden bağımsızdır (Kocabalkan ve ark 2000).

1.2.6 Troponin

Troponin T ve Troponin I

Troponinler, kas kontraksiyonunda aktin ve miyozin arası etkileşimi düzenlerler. 3 subüniteden oluşur; TnT, TnI ve TnC. Troponin I ve T akut miyokard infaktüsünden sonra ortalama 3-12 saatte yükselmeye başlar. 24 saatte pik yapar ve 5-14 günde normale döner (Üstün 2005).

Troponin (Ta) çizgili kasın ince filamanlarının düzenleyici proteinidir ve TnC (18 kDa), Tnl (24 kDa) ve TnT (37 kDa) olmak üzere üç alt gruptan meydana gelir. Troponinler kana T, I, C kompleksleri (cTnT-I-C üçlü kompleksi ve cTnI-C ikili kompleksi) şeklinde ve serbest alt gruplar olarak salınırlar. Troponin T ve I çizgili kasta kasılma işleminin önemli bileşenleri olarak beraber görev alırlar. Çizgili kaslarda troponin kompleksi benzer şekilde yer alsa da troponin T ve I nın izoformları kardiyak kasta farklıdır. Çünkü proteinler bu dokuda farklı genler tarafından kodlandırılır. Kardiyak izoformları karşı spesifik antikorlar, hassas cTnT ve cTnI testleri için esas oluşturur (Christenson ve ark 1998).



Şekil 1.2.6. Troponinin yapısı (www.med4you.at/.../lbef2/aktin_troponin.gif).

1.3 Trans Yağ Asitlerinin Potansiyel Mekanizmaları

Trans yağ asitlerinin sistemik inflamasyon veya endotelyal fonksiyon üzerindeki etkilerinin temelini oluşturan mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Yinede diğer yağ asitlerinin subselüler yolları etkilediği ve hücre zarı fosfolipidleriyle birleşerek spesifik zar reseptörlerinin işlevini değiştirdiği bilinmektedir (Mozaffarian ve ark 2004). Bu yolla gen transkripsiyonunu düzenleyen çekirdek reseptörlerine doğrudan bağlanarak yanıt oluşturulduğu düşünülmektedir (Han ve ark 2002).

Trans yağ asidi alımı mononükleer hücrelerin inflamatuar cevaplarını değiştirir. Hayvan çalışmalarında; trans yağ asidi alımı, peroksizom proliferator aktivite edici reseptör (PPAR)-y'nin, resistini ve lipoprotein lipazın adiposit gen ekspresyonunu değiştirir (Mozaffarian ve ark 2004).

Ayrıca insanlardaki adiposit yağ asidi metabolizmasını etkiler. Diğer yağ asitlerine benzer olarak trans yağ asidi, hem lipid hem de non-lipid kardiyovasküler risk faktörlerini etkileyen SREBP-1 (genleri düzenleyen sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1), PPAR ve LXR (karaciğer x-reseptörü) dahil olmak üzere adipositler ve diğer dokularda çekirdek reseptörler için ligandlar olarak işlev görebilirler (Mozaffarian 2006).

1.3.1 Kardiyovasküler Hastalık Riski Üzerindeki Potansiyel Etki

Trans yağ asitlerinin sistemik inflamasyon ve endotelyal fonksiyon üzerindeki etkilerinin kardiyovasküler sonuçlarla ne ölçüde ilişkili olduğu bilinmemektedir. Trans yağ asitlerinin endotelyal fonksiyon üzerindeki zararlı etkilerini gösteren biyolojik mekanizmalar açık değildir. Trans yağlar endotelyal hücre zarları içinde birleştirilirler ve böylece kan damarı duvarının ara yüzünde hareket eden selüler ve makromoleküler bileşenleri değiştirebilirler (Mozaffarian 2006).

1.3.2.Diyabet Riski Üzerindeki Potansiyel Etki

Glikoz alımının %70 ile %80'ini oluşturan iskelet kası insülin hareketi için önemli bir hedef dokudur. Adipoz dokunun glikoz alımının yalnızca yaklaşık %10'unu oluşturduğu gerçeğine rağmen, insülin direncinde önemli bir rol oynamaktadır (İbrahim ve ark 2004).

Son çalışmalar insülin direncinin adipositlerde başlatıldığını ve iskelet kası ile karaciğerin insülin duyarlılığını etkilediğini ileri sürmektedir. Diyetsel yağ asitleri muhtemelen iskelet kası ve adipoz dokudaki yapı lipidlerinin yağ asidi bileşimleri nedeniyle, insülin indüksiyonunda önemli bir rol oynarlar (İbrahim ve ark 2004).

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Gereç

2.1.1.Vakaların Oluşturulması ve Gruplandırma

Çalışmamıza Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen 45 adet erkek (6 aylık, yaklaşık 280-300 gr ağırlığında) Sprague Dawley albino soyunda sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar tüm çalışma boyunca iklim kontrollü odalarda, 20 +-1 C^o sıcaklıkta, %45 rölatif nem ve 12/12 ışık periyodundaydı.

Çalışmaya başlamadan önce 2006/08 Sayılı proje 10/02/2006 tarihide yapılan SUDAM Deney Hayvanları Etik Kurul Toplantısı'nda kabul edilerek izin alındı.

Sıçanlar polikarbonat malzemeden yapılmış, Tip 4 standardında (tecniplast) kafeslerde, her kafeste 5 sıçan olacak şekilde tutuldu. Yem, su ad-libitum verildi. Çeşme suyu hergün taze olarak verildi. Rasyonları, Kuzucu yem firması tarafından hazırlandı. Rasyonda herhangi bir hayvansal ve bitkisel yağ kullanılmadı. Rasyondaki diğer parametreler standart sıçan yeminde olan değerlerdi. Elaidik asit (trans–9 18:1 oktadekenoik asit) izomeri her gün düzenli olarak aynı saatte, bir bakıcı tarafından gevşek ense derisi ve kuyruğundan dik pozisyonda getirilen sıçanlara gavaj için özel olarak üretilmiş aparatlar yardımıyla verildi. Gavaj aparatlarının ucundaki bombe uç sayesinde kateterin özafagusa gitmesi mümkün değildi. 10 gün sonra tüm sıçanlardan eter anestezi altında intrakardiyak punksiyon ile kan alındı. Alınan kanın bir kısmı EDTA'lı tüplere, bir kısmı rutin biyokimya tüplerine aktarıldı.

Çizelge 2.1. Kullanılan rat yeminin bileşimi.

Kuru Madde	En az	%88.0	
Ham Protein	En az	23.0	
Ham Selüloz	En çok	5.0	
Ham Kül	En çok	8.0	
HCL'de Çöz. Kül	En çok	1.0	
Kalsiyum	En az-En çok	1-1,3	
Fosfor	En az	0,9	
Sodyum	En az-En çok	0,5-0,6	
NaCl	En çok	1.0	
Lizin	En az	1,35	
Metiyonin	En az	0,45	
Sistin	En az	0,35	
Vit. A	En az	15.000	IU/kg
Vit. D	En az	3.300	IU/kg
Vit. E	En az	40	mg/kg
Vit.B2	En az	5	IU/kg
Vit. B12	En az	20	mcg/kg
Vit. K3	En az	5	mg/kg
Metabolik Enerji	En az	3100	kcal/kg

Kullanılan yemin özellikleri:

* Yüksek kaliteli protein kaynakları kullanılmıştır.

* Esansiyel aminoasitlerden zengindir.

* Sindirilebilirliği yüksektir.

* Yağ haricinde ratların tüm besin madde ihtiyaçları karşılanmıştır.

Çizelge 2.2. Rat yemi bileşiminde kullanılan hammaddeler.

Kullanılan Hammaddeler
Tahıllar ve tahıl yan
Yağlı tohum küspeleri
Yağlar
Nişasta sanayi yan ürünleri
Mermer Tozu
DCP
Sodyum Bikarbonat
Tuz
Melas
Sentetik aminoasitler
Vitamin ve mineral
Küf önleyici ve

Ratların beslenmesi, Destailillats ve arkadaşlarının çalışmasındaki metoda göre yapıldı (Destailillats ve ark 2005). İki haftalık yağsız rat pellet yemi ile beslenmeden sonra ratlar rastgele iki gruba ayrıldı. Aynı ortamda devam edildi.

1.Grup (kontrol grubu): 20 sağlıklı rata yağsız diyete 10 gün daha devam edildi.

2.Grup (çalışma grubu): 25 sağlıklı rata rasyona ilaveten sabahları gavaj yoluyla 50mg/gün elaidik asit izomeri (trans–9 18:1 oktadekenoik asit izomeri) 10 gün süreyle verildi.

2.1.2. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı

Tüm ratların 24. gün sonunda Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde eter inhalasyonu yapılarak, intrakardiyak punksiyon ile kanları alındı ve hipovolemik şok neticesinde yaşamları sonlandırıldı.



Alınan kan numuneleri rutin biyokimya tüpüne ve EDTA'lı tüpe alındı. Kan numuneleri 3000 devir/dakika toplam 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma örnekleri elde edildi. Serum numuneleri; GS (gaz kromotografi) ile yağ asit kompozisyonu tayini, plazma numuneleri CRP, IL-6, TNF, insülin, troponin homosistein tayinleri çalışılmak üzere -80 °C derecede saklandı.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar:

1. ELX800 Okuyucu Bio-Tek Marka Eliza Cihazı
2. ELX50 Yıkayıcı Bio-Tek marka Eliza Cihazı
3. Santrifüj: Nüve NF 100012
4. Hassas Terazi: Nüve-NM 110
5. Vorteks: Nüve 400
6. Gaz kromografi: Hewlett-Packard Agilent model 6890N
7. Benmari: Nüve 400

2.1.4. Kullanılan Reaktifler:

1. CRP tayini için

CRP rat kiti, cat no: EIA-4695 DRG Marka

2. IL-6 tayini için

IL-6 rat kiti, cat no: KRC0062 Biosource Marka

3. TNF-α tayini için

TNF rat kiti, cat no: KRC3012 Biosource Marka

4. Homosistein tayini için

Homosistein kiti, Dade behring marka

5. Troponin tayini için

Troponin kiti, cat no: RF421C Dade behring marka

6. İnsulin tayini için

İnsulin rat kiti, cat no: EZRMI-13K Linco Marka

7. Gaz Kromotografisi ile yağ asit kompozisyonunun tayini için:

KOH, cat no: merk B 415

n-hekzan, cat no: merk K606

Kloroform, cat no: merk K630

Bortriflorür-metanol kompleksi, cat no: merk S624

NaCl, cat no: sigma 9625

2.1.5 Kullanılan Çözeltiler;

2.1.5.1. Yağ Asit Kompozisyonun Tayini İçin:

%2'lik metanolik NaOH çözeltisi: 20 g. NaOH üzerine litreye tamamlanıncaya kadar methanol ilave edildi.

%6'lık KOHçözeltisi: 6g. KOH üzerine 100 ml. ye tamamlanıncaya kadar distile su ilave edildi.

Kloroform hekzan (1/4) karışımı: 250ml. kloroform ile 750ml. hekzan karışımı hazırlandı.

2.2.Yöntem

2.2.1. CRP Tayini

Test için rat plazması 1/4 oranında dilue edildi. Özel işlem görmüş kuyucuklardaki antikorlarla reakiyona girerek kompleks oluşturur. Uygun inkübasyondan sonra kuyucuklar reaksiyona girmemiş olan serum proteinlerini uzaklaştırmak için kuyucuklar yıkanır ve rabbit anti rat CRP isimli bir enzim antijeni eklenir. İkinci inkübasyon periyodunu takiben kuyucuklar reaksiyona girmeyen konjugatların uzaklaştırılması için tekrar yıkanır. Kromojen olan TMB ile bir üre peroksid substrata renk gelişimini başlatmak için eklenir. Mavi rengin oluşumu pozitif reaksiyonu gösterirken renksizlik veya belli belirsiz mavi rengin gözükmesi negatif reaksiyonu gösterir. Reaksiyon mavi rengi sarıya dönüştüren stop solüsyonu ile durudurulur. Negatif reaksiyonlar renksizlikle veya belli belirsiz sarı renkle sürer. Renk yoğunluğu eliza okuyucu tarafından 450 nm dalga boyunda okunur.

2.2.2. IL-6 Tayini

Aranan antijen içeren numune IL-6 antikoru ile kaplı kuyucuklara konur. Rt IL-6 miktarı bilinen standartları içeren örnekler, kontrol örnekleri ve numune örnekleri antikorla kaplı kuyucukların içine pipetlenir.

İlk inkübasyon sırasında Rt IL-6 antijenleri bir bölgedeki immobilize antikorları bağlar. Yıkama sonrası Rt IL-6 için özel biyotinle konjuge bir antikor eklenir. İkinci inkübasyon esnasında bu antikor ilk inkübasyon esnasında yakalanmış immobilize Rt IL-6 yı bağlar. İkinci antikorun fazlasının yıkamasından sonra Streptavidin Peroksidaz enzimi eklenir. Üçüncü inkübasyon ve bağlanmamış enzimlerin tümünün uzaklaştırılması için yıkama işleminden sonra bağlanmış enzimlerde renk üreten bir substrat solusyonu eklenir. Oluşan rengin yoğunluğu orijinal örneklerdeki mevcut Rt IL-6 konsantrasyonu ile orantılıdır.

2.2.3. TNF-α Tayini

Kuyucuklarının üzeri Rt TNF-α için özel bir antikorla kaplıdır. Rt TNF-α miktarı bilinen standartları içeren örnekler, kontrol örnekleri ve numune örnekleri antikorla kaplı kuyucukların içine pipetlenir. Bunu takiben biotinle konjuge ikinci antikor kuyucuklara eklenir.

İlk inkübasyon esnasında Rt TNF-α antijeni bir bölgedeki immobilize antikorları ve diğer ikinci bölgedeki solüsyon fazındaki biotinle konjuge olan antikorları eşzamanlı olarak bağlar.

İkinci antikorun fazlası uzaklaştırıldıktan sonra Streptavidin Peroksidaz enzimi eklenir. Bağlanmamış enzimlerin tümünü temizlemek için yıkama ve ikinci bir inkübasyondan sonra bağlanmamış enzimlerde renk değişikliğine neden olan substrat solusyonu eklenir. Oluşan rengin yoğunluğu orijinal örneklerdeki mevcut Rt TNF-α konsantrasyonu ile orantılıdır.

2.2.4. İnsulin Tayini

Sandwich ELİSA metodu sırasıyla; biyotinle konjuge poliklonal antikorların kompleksi tarafından kaplı kuyucuklardaki örneklerden insülin molekülü yakalanır. Örneklerden bağlanmamış materyallerin uzaklaştırılması için yıkanır. İmmobilize biyotinle konjuge antikorlar horseradish-peroksidaz enzimi ile bağlanır. Serbest enzim konjugatları temizlenir. 3,3',5,5'-tetrametilbenzidizn substratının varlığında horseradish-peroksidaz enzim aktivitesinin ölçülmesi ile immobilize antikor enzim konjugatları ölçülür. Enzim aktivitesi biçimlenmiş ürünlerin asitleştirilmesinden sonra 590 nm absorbansta doğrulanarak spektrofotometrik yöntemle ölçülür. Absorbanstaki artış doğrudan doğruya bilinmeyen örneklerdeki yakalanmış insülin miktarları ile orantılıdır.

2.2.5.Homosistein Tayini

Nefelometrik yöntem ile Dade Behring marka ticari kit kullanılarak yapıldı.

2.2.6. Troponin Tayini

Mikropartiküler enzim immunassay yöntemiyle Dade Behring marka ticari kit kullanılarak yapıldı.

2.2.7. Serumda Yağ Asit Kompozisyonun Tayini

Serum yağ asit kompozisyonlarının analizleri, Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümünde, Hewlett Packard Agilent marka 6890N model FID (Flame Ionization Detector, alev iyonlastırıcı dedektör) dedektörlü otomatik enjekterlü gaz kromotografi cihazı ile gerçekleştirildi.

Yağ asitlerinin gaz kromotografik analizleri için metilleştirme; Moss ve ark (1974)'nın metodundan yararlanılarak gerçekleştirildi. Yağ asitlerinin metilleştirilmesinde (bortriflorür-methanol) kompleksi kullanıldı.

Sabunlaştırma

Şişedeki serum örneklerine 10 ml. Metanolde %6' lık KOH çözeltisi konuldu, karıştırılarak 95 ºC' de 1 saat sabunlaştırıldı. Şişe çalkalanarak köpürtüldü. N2 altında uçuruldu. Kalan kısım ayırma hunisine konuldu. Şişe saf su ile çalkalanarak ayırma hunisine boşaltıldı (3 kez). Üzerine 10 ml. Kl / hek (1/4) karışımı ilave edilerek karışım sıkıca kapatıldı ve 100 kez çalkalandı (3 kez). Faz oluştuktan sonra huninin kapağı çıkarıldı. Alttaki faz, ikinci bir ayırma hunisine alındı. Alttaki sulu fazın pH' ı ölçüldü. pH = 2 oluncaya kadar H2SO4 (8 N) damla damla ilave edildi. 10 ml. Kl/hek. ilave edilip 100 kez çalkalandı. Alttaki sulu faz atıldı (3 kez). Üstteki yağ asidi ve çözücü tabakası rotary evoperatör balonuna alındı. Çözücü 72 ºC' de uçuruldu. Kalan kısım

desikatöre alındı. Sabit tartım olunca yağ asit miktarı bulunmuş oldu (Moss ve ark 1974).

Metilleştirme

Desikatörden alınan cam kaptaki yağ asitleri Kloroform / hekzan ilavesi ile çözülerek şişeye alındı (3 kere). Şişedeki çözücü N2 altında uçuruldu. 3 ml. BF3-Metanol ilave edildi ve karıştırıldı. 95 ºC' da 15 dakika bekletildi. Su banyosundan alınan şişe soğutuldu ve içindeki, ayırma hunisine konuldu. Şişeye 5 ml. Doymuş NaCl ilave edildi. Şişeye 5 ml kloroform/hekzan konulup karıştırıldı. Huni 100 kez çalkalandı ve dinlendirildi. Alttaki NaCl bir ayırma hunisine alındı. Üstte kalan çözücü metilleşmiş yağ asitleri huninin üst kısmından temiz bir deney tüpüne alındı. Tüpteki çözücü (2-3 ml. kalacak şekilde) N2 altında uçuruldu. Numune şişeye aktarılarak derindondurucu da saklanıldı (Moss ve ark 1974).

Numunelerin Gaz Kromatografi Cihazına Enjekte Edilmesi

Gaz kromatografik analizler HP (hewlet packard) agilent marka 6890 N model FID (flame lonization detector, alev iyonlaştırıcı dedektör) dedektörlü otomatik enjektörlü gaz kromatografi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde HP 88 100m x 0.25 mm 0,2 µm kapiler yağ asidi kolonu kullanılmıştır.

Gaz kromatografi cihazının enjektör bloğu sıcaklığı 240 °C, dedektör bloğu sıcaklığı 250 °C, fırın sıcaklığı ise 160 °C olarak ayarlanmıştır. Kolona sıcaklık programı uygunlanmıştır. Kolon fırın sıcaklığı 160 °C' de başlayıp 2 dakika devam etmiş, dakikada 4 °C artarak 185 °C ulaşmıştır ve dakikada 1 °C artarak 200 °C ulaşıp bu sıcaklıkta 46,75 dakika daha bekletilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Akış hızı dakikada 30 ml ve hava akış hızı dakikada 300 ml olarak ayarlanmıştır. Split oranı ise 10:1 olarak ayarlanmıştır.

Analiz için metilleştirilmiş yağ asidi numunelerinden bir mikrolitre gaz kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Gaz kromatografi cihazında numuneler 3 defa tekrarlanarak analizleri yapılmıştır. Kromatogramlardaki piklerin hangi yağ aside ait olduğu standartların bağıl alıkonma zamanları (relative retantion time) ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

3. BULGULAR

Diyet ile alınan, trans-9 18:1 oktadekenoik asit izomeri verilen çalışma grubu ile kontrol grubunun serumlarındaki yağ asit komposizyonlarının gaz kromotoğrafi ölçümü ile hesaplanan değerleri çizelge 4.1'de verildi.

Çizelge 3.1.Çalışma ve kontrol grubunun serumdaki yağ asit kompozisyonun karşılaştırılması.

Yağ Asidi %	Kontrol x ± SD	Çalışma x ± SD	P
C 12:0	0,31 ± 0,23	1,66 ± 2,63	0,034
C 13:0	0,06 ± 0,11	0,27 ± 0,35	0,010
C 14:0	1,06 ± 0,37	1,96 ± 1,47	0,121
C 14:1	0,12 ± 0,04	0,35 ± 0,16	0,007
C 15:0	0,48 ± 0,03	0,24 ± 0,19	0,050
C 15:1	0,09 ± 0,22	0,10 ± 0,15	0,049
C 16:0	22,24 ± 2,24	23,10 ± 3,29	0,624
C 16:1t	0,16 ± 0,03	0,31 ± 0,20	0,191
C 16:1	2,71 ± 1,06	2,42 ± 1,89	0,253
C 17:0	0,55 ± 0,04	0,27 ± 0,25	0,060
C 17:1	0,24 ± 0,14	0,19 ± 0,11	0,540
C 18:0	11,65 ± 1,34	14,32 ± 3,00	0,034
C 18:1t	0,34 ± 0,27	0,75 ± 0,18	0,006
C 18:1	19,06 ± 2,19	14,81 ± 1,89	0,001
C 18:2t	0,14 ± 0,07	0,15 ± 0,06	0,806
C 19:0	0,18 ± 0,06	0,15 ± 0,05	0,462
C 18:2	22,15 ± 1,69	20,16 ± 1,73	0,220
C 18:3 3n	0,36 ± 0,20	0,38 ± 0,22	0,935
C 18:3 n6	0,56 ± 0,19	0,31 ± 0,15	0,007
C 20:0	0,07 ± 0,09	0,41 ± 0,34	0,022
C 20:1	0,40 ± 0,26	0,61 ± 0,33	0,221
C 21:0	0,10 ± 0,08	0,20 ± 0,13	0,102
C 20:2	0,22 ± 0,08	0,14 ± 0,10	0,022
C 20:4	11,20 ± 6,04	10,40 ± 3,17	0,462
C 22:1	0,06 ± 0,10	0,15 ± 0,12	0,007
C 20:5	0,51 ± 0,52	0,81 ± 1,42	0,935
C 22:2	0,07 ± 0,14	0,06 ± 0,10	0,931
C 22:4	0,42 ± 0,14	0,13 ± 0,19	0,004
C 24:0	0,007 ± 0,018	0,23 ± 0,07	0,000
C 24:1	0,16 ± 0,10	0,04 ± 0,07	0,015
C 22:5	0,33 ± 0,14	0,33 ± 0,23	0,713
C 22:6	0,81 ± 0,28	0,93 ± 0,58	0,624
Diğer yağ asitleri	3,03 ± 0,91	3,51 ± 1,28	0,414

Serumda kontrol grubu ve çalışma grubunun yağ asit komposizyonları incelendi. Serumdaki trans–9 18:1t yağ asidinin çalışma grubunda, kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğu belirlendi ($p < 0,01$).

Aynı ratlardan alınan serum numunelerinde ölçülen CRP, IL-6, TNF-α değerleri çizelge 3.2'de verildi.

Çizelge 3.2. Kontrol ve Çalışma grubunda trans–9 18:1t yağ asidi, CRP, IL-6, TNF-α troponin değerlerinin karşılaştırılması (Mann-Whitney Test).

Testler	Kontrol $x \pm SD$	Çalışma $x \pm SD$	P
Trans – 9 18:1t Yağ asidi %	$0,34 \pm 0,27$	$0,75 \pm 0,18$	0,006
CRP pg/mL	$389,43 \pm 45,45$	$450 \pm 66,74$	0,05
IL-6 pg/mL	$31,42 \pm 5,99$	$27,54 \pm 9,64$	0,19
TNF-α pg/mL	$31,49 \pm 13,78$	$59,70 \pm 45,20$	0,03
Troponin ng/mL	$26,35 \pm 18,35$	$16,59 \pm 11,21$	0,119

CRP ve TNF-α değerlerinin çalışma grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu belirlendi ($p < 0,05$).

IL-6 değerlerinde, çalışma grubunda istatiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Troponin değerlerinde çalışma grubu ile kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$).

Çizelge 3.3 Kontrol ve çalışma grubunda Homosistein ve insülin değerlerinin karşılaştırılması.

	Kontrol $x \pm SD$	Çalışma $x \pm SD$	t	p
İnsülin µU/mL	0,48 ± 0,22	0,18 ± 0,11	4,30	0,00
Homosistein mmol/L	4,25 ± 1,02	3,44 ± 1,04	2,54	0,015

İnsülinin çalışma grubunda, kontrol grubu değerlerine göre anlamlı şekilde azalmış olduğu belirlendi ($p < 0,001$).

Homosistein değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre çalışma grubunda anlamlı şekilde azalmış olduğu belirlendi ($p < 0,05$).

4. TARTIŞMA

Trans yağ asitleri çok eski çağlardan bu yana insan beslenmesinde yer almaktadır. Birçok ülkeye ait beslenme ile ilgili istatistiklerde gıda maddelerinin trans yağ asidi içeriklerinin bulunduğu bilinmektedir. Ülkemizde de trans yağ asidi tüketimi oranı yüksektir (Taşan ve Dağlıoğlu 2005).

Trans yağ asidi içeriği yüksek yağların büyük çaplı ticari üretimleri, gelişen margarin endüstrisiyle başlamıştır. Trans yağ asidi alımı kaynağı sadece margarinler değildir. Kısmi hidrojenize yağlar; kek, bisküvi, kurabiye, mayonez, cips, milföy hamuru, pizza, gofret gibi birçok ürünün üretiminde ve yağda kızartılmış fast food tipi gıdaların hazırlanmasında kullanılmaktadır (Taşan ve Dağlıoğlu 2005).

Günümüzde değişen yemek alışkanlıklarıyla birlikte birçok sağlık sorununun ortaya çıktığı görülmektedir. Başta kalp hastalıkları, diabet ve obezite olmak üzere insan sağlığını tehdit eden bu rahatsızlıklar yağ ve şeker ağırlıklı, enerji miktarı yüksek yiyeceklerle daha ciddi bir boyuta taşınmaktadır (Şahin ve ark 2005).

Diyetle alınan trans yağ asidinin sistemik inflamasyonu etkilediği belirtilmiştir. Trans yağ asidi alımından etkilenen inflamatuar sisteminin aktivasyonuyla koroner arter hastalığı, insülin direnci, diabet, dislipidemi ve kalp yetmezliği gelişebilmektedir (Mozaffarian ve ark 2004).

Trans yağ asitleri doymuş yağ asitleri gibi LDL kolesterol, trigliserid ve lipoprotein-a konsantrasyonlarını artırırken, HDL kolesterol konsantrasyonunu düşürür ve kalp hastalıkları riskini yükseltir (Taşan ve Dağlıoğlu 2005).

Aterosklerozda inflamasyon temel rol oynamakla birlikte CRP, IL-6, TNF, homosistein, troponin gibi belirteçler bağımsız risk faktörlerini oluşturmaktadır.

Mozaffarian ve ark (2004), sağlıklı 823 kadında yaptıkları çalışmada diyetle alınan trans yağ asitleri ile sTNF-R1, sTNF-R2, CRP, IL-6 konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışma grubunun kontrol grubuna göre sTNF-R1 ve sTNF-R2 kosantrasyonlarının anlamlı olarak arttığını gözlemlemişlerdir. IL-6 ve CRP değerlerinde ise yüksek vücut kitle

indeksine sahip kadınlarda anlamlı bir artış gözlemlemelerine rağmen, yüksek vücut kitle indeksine sahip olmayanlarda anlamlı bir fark olmadığını tespit etmişlerdir.

Lopez-Garcia ve ark (2005), yaşları 43 ile 69 arasında olan kardiyovasküler hastalığı, kanser ve diabeti olmayan 730 kadında inflamasyon ve endotel disfonksiyon belirteçlerinin plazma konsantrasyonları ile trans yağ asidi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Trans yağ asidi alımının en fazla olduğu grup, en düşük olan grupla karşılaştırıldığında sTNF-R2 değerini %5, CRP değerini %73, IL-6 değerini ise %17 olmak üzere daha yüksek bulmuşlardır.

Terry ve ark (2005), kalp yetmezliği olan 42 hastada diyetsel yağ alımının TNF-α, sTNF-R1, sTNF-R2 ve IL-6 düzeyleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Hastalar poliansatüre yağ asidi, doymuş yağ, günlük tavsiye edilen miktarı aşan trans yağ asidi ve tavsiye edilen miktarın %70'inden az omega-3 yağ asitlerini içeren diyetle beslenmişlerdir. TNF-α değerlerini trans yağ asidi ile beslenen hastalarda doymuş yağ asidi ile beslenen hastalara göre daha yüksek bulmuşlardır. Daha yüksek oranda poliansatüre yağ asitleri ve omega-3 yağ asitlerini içeren yiyecekleri tüketen hastalarda daha düşük sTNF-R1, sTNF-R2 değerleri tespit etmişlerdir. IL-6 düzeyinin ise trans yağ asidi alımıyla ilgisi olmadığını belirtmişlerdir.

Han ve ark (2002), 11 kadın ve 8 erkeğe 32 gün boyunca %30'u yağ olmak üzere üç çeşit diyet uygulamışlardır. Diyetler soya yağı, margarin ve tereyağından oluşturulmuştur. Yapılan çalışmada margarine dayalı diyetle beslenenlerin TNF-α ve IL-6 düzeylerinin önemli şekilde yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Baer ve ark (2004), rastgele seçilmiş 50 sağlıklı erkeğe beş hafta boyunca oleik asit ve trans yağ asidi içeren kontrollü bir diyet uygulamışlardır. Trans yağ asidi tüketiminin IL-6 ve CRP plazma seviyelerini arttırdığını bildirmişlerdir.

Lichtenstein ve ark (2003), yaptıkları çalışmada diyetle alınan trans yağ asidi ile kardiyovasküler hastalık gelişme riski arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Çalışmalarında 52 ile 73 yaş arası erkek ve kadınlardan oluşan

toplam 36 kişiye diyetle soya yağı, yarı likit margarin, yumuşak margarin, shortening, margarin ve tereyağı vermişlerdir. 35 günlük takibin sonunda deneklerden alınan kan numunelerinde CRP düzeylerinin bu değişik yağ diyetlerinden etkilenmediğini gözlemlemişlerdir.

Diyetle alınan trans yağ asidi sistemik inflamasyonu arttırabilmektedir. Bu sebepten dolayı sistemik inflamasyonun belirteçlerinden olan TNF-α, CRP ve IL-6 değerlerinin artması beklenmektedir.

Biz çalışmamızda ratlara trans-9 18:1 oktadekenoik asit izomeri vererek, çalışma grubunda kontrol grubuna göre TNF-α ve CRP düzeylerinin daha yüksek olduğunu fakat IL-6 düzeyinde anlamlı bir fark olmadığını tespit ettik (Çizelge 3.2).

Literatür bilgilerimize bakacak olursak yapılan bütün çalışmalarda (Mozaffarian ve ark 2004, Lopez-Garcia ve ark 2005, Terry ve ark 2005, Han ve ark 2002) TNF değerlerinin trans yağ asidi alımıyla artmış olduğu görülmektedir. CRP ve IL-6 düzeylerinin ise sadece birer çalışmada (Terry ve ark 2005, Lichtenstein ve ark 2003) trans yağ asidi alımıyla ilgisi olmadığı fakat diğer çalışmalarda (Mozaffarian ve ark 2004, Lopez-Garcia ve ark 2005, Han ve ark 2002, Baer ve ark 2004) artış gösterdiği anlaşılmaktadır.

Trans yağ asidi alımı adipoz dokudaki makrofaj üretimini arttırmaktadır. Bu artan makrofajların zarlarında bulunan fosfolipidlerdeki ve bu fosfolipidlerin sinyal yollarındaki değişiklerden dolayı inflamasyon gelişmektedir (Mozaffarian ve ark 2004). Bizim çalışmamızdaki inflamasyon belirteçlerinden olan TNF-α ve CRP değerleri bu bilgiler doğrultusunda beklendiği üzere artmıştır.

IL-6 adipoz doku tarafından üretilmektedir. Proinflamatuar sitokinlerden olan IL-6'nın artışı genişlemiş adipoz doku kütlesindeki aşırı üretimi yansıtmaktadır. Adipoz dokudaki spesifik yağ asitlerinin yarı ömrü birkaç aydır. Bu nedenle kısa süreli çalışmalarda trans yağ asidi alımının gerçek etkisi gözlemlenemeyebilir (Mozaffarian ve ark 2004). Bizim çalışmamızın da kısa süreli bir çalışma olmasından dolayı, IL-6 değerimizin herhangi bir değişiklik göstermediğini düşünmekteyiz.

İbrahim ve ark (2004), ratlarla yaptıkları çalışmada trans yağ asidi alımının adiposit plazma membranı yağ asidi kompozisyonu değişiklikleri ve insülin düzeyi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada trans yağ asidi ile beslenmiş ratların kontrol grubuna göre daha yüksek açlık plazma insülin düzeyine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Saravanan ve ark (2005), çalışmalarında sütten kesilmiş erkek ratlara üç ay boyunca trans yağ asidi ve serbest yağ asidi diyeti uygulamışlardır. Trans yağ asidi ile beslenen ratlarda yağ dokusu insülin rezistansının, serbest yağ asidi ile beslenenlere göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bunun, insülin rezistansının gen ifadesindeki değişikliğe aracılık etmesinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Bray ve ark (2002), yaptıkları klinik çalışmada trans yağ asitlerinin insülin rezistansını arttırabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca insülin rezistansına oluşan cevapların farklı yağ asitlerinde farklılıklar gösterdiğini, cevabın bütün yağ asitlerinde aynı olmadığını belirtmişlerdir.

Salmeron ve ark (2001), 14 yıl boyunca takip edilen yaşları 34 ile 59 arasında olan tip 2 diabetli 2507 kadınla yaptıkları çalışmada tip 2 diabet riski ile diyetle alınan yağlar arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Total yağ, doymuş ve doymamış yağ asitleri alımının kadınlarda tip 2 diabeti ile ilgili olmadığını fakat trans yağ asitleri ve çoklu doymamış yağ asitleri alımının tip 2 diabet riskini arttırdığını bildirmişlerdir.

Louheranta ve ark (1999), 14 sağlıklı kadında kısa süreli cis yağ asidi ve kısa süreli trans yağ asidi tüketiminin insülin duyarlılığını değiştirmediğini, plazma lipid profilini ise etkilediğini belirtmişlerdir.

Diyetsel yağ asitleri, iskelet kası ve adipoz dokudaki yapı lipidlerinin yağ asidi bileşimleri nedeniyle, insülin indüksiyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Storlien ve ark 2000). İnsülin direnci adipositlerde başlamaktadır ve insüline normalde cevap veren yağ, karaciğer, iskelet kası, kalp kası gibi hedef organlarda insülinin sinyal yolundaki yetersizliğinden kaynaklanmaktadır (İbrahim ve ark 2004). Bundan yola çıkarak, trans yağ asidi tüketimi ile insülin konsantrasyonunun artması beklenmektedir.

Biz bu çalışmamızda trans-9 18:1 oktadekenoik asit izomer alımının ratlardaki insülin düzeyini inceleyerek, çalışma grubunun kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdiğini bulduk (Çizelge 3.3).

Literatür bilgilerimize (İbrahim ve ark 2004, Saravanan ve ark 2005, Bray ve ark 2002) göre trans yağ asidi alımının insülin rezistansını arttırabileceği, sadece bir çalışmada (Louheranta ve ark 1999) trans yağ asidi alımıyla insülin rezistansının değişmediği anlaşılmaktadır.

Bizim çalışmamızda insülin düzeyinin artacağı yerde azalmış olması elde ettiğimiz bilgilerle uyuşmamaktadr. Bunun, çalışmamızın kısa süreli olmasından kaynaklandığını ayrıca insülinle ilgili daha uzun süreli, daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

Berstad ve ark (2007), belli bir bölgedeki popülasyonu esas alarak iki yaş grubuna ayrılmış (41-49 yaş ve 71-74 yaş) 5917 katılımcıyla yaptıkları çalışmada katılımcılara serbest yağ asidi ve omega-3 yağ asidi içeren diyet uygulamışlardır. Yüksek miktarda serbest yağ asidi alımıyla homosistein plazma konsantrasyonlarının arttığını bulmuşlardır. Omega-3 yağ asidi ile beslenen grupta ise plazma homosistein konsantrasyonlarının düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Trans yağ asidi alımı ve plazma homosistein konsantrasyonundaki değişikliği açıklayıcı hiçbir literatür bilgisine ulaşamamış olmakla beraber Berstad ve ark (2007)'ının yaptıkları serbest yağ asidi ve omega-3 yağ asidi ile homosistein arasındaki ilişkiyi açıklayıcı çalışmadan yola çıkarak bir çalışma yaptık. Bizde trans yağ asidi alımının homosistein seviyesi üzerine etkisini araştırdık. Çalışmamızda plazma homosistein konsantrasyonun çalışma grubunda kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını gördük (Çizelge 3.3).

Trans yağ asidi alımının plazma troponin konsantrasyonuna etkisini açıklayıcı herhangi bir literatür çalışmasına rastlayamadık. Kardiyak troponin I ve troponin T miyokard zedelenmesini gösteren biyokimyasal belirteçlerdir (Elmalı ve ark 2005). Bundan dolayı çalışmaya değer olduğunu düşündük. Çalışmamızda kontrol ve çalışma gruplarına ait troponin değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık (Çizelge 3.2).

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

Tükettiğimiz birçok gıdada trans yağ asidi bulunduğu bilinmektedir. Trans yağ asitlerinin insan sağlığını olumsuz etkilediği belirtilmiştir. Bilim adamları trans yağ asidinin bu olumsuz etkilerini ortaya çıkarabilmek için birçok çalışma yapmaktadırlar.

Trans yağ asidi alımından etkilenen sistemik inflamasyonun aktivasyonu sonucunda koroner arter hastalığı, insülin direnci, diabet, dislıpidemi ve kalp yetmezliği gelişebilmektedir. Biz çalışmamızda diyet ile alınan trans-9 18:1 oktadekenoik asit izomerinin potansiyel proinflamatuar sonuçlarını araştırmak üzere inflamatuar belirteçlerinden olan TNF-α, CRP, IL-6 parametrelerini inceledik. Ayrıca insülin, homosistein ve troponin düzeylerinin trans yağ asidi alımıyla arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Trans yağ asidi alımının inflamasyonu artırdığını bundan dolayıda TNF-α, CRP, IL-6 seviyelerinin artması beklenmektedir. Fakat çalışmamızda TNF-α, CRP düzeyleri artarken, IL-6 düzeyinde herhangibir değişiklik olmamıştır.

Trans yağ asidi alımıyla insülin, homosistein ve troponin düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere yaptığımız çalışmada ise insülin değerinin artmasını beklerken azalma görülmüştür. Homosistein ve troponin değerlerinin artıp azalması konusunda literatür bilgisine rastlayamadığımız için herhangibir beklentimiz olmamakla beraber çalışmamızda trans-9 18:1 oktadekenoik asit izomerinin alımıyla homosistein değeri azalıp, troponin değeri değişmemiştir.

Vardığımız sonuçlar doğrultusunda trans yağ asitleri tüketiminin insan sağlığı üzerine etkisini araştırmak için TNF-α, CRP, IL-6, insülin, homosistein ve troponin ile ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Trans yağ asitlerini beslenme şeklinden tümüyle çıkarmak, yiyeceklerin trans yağ asidi içerikleri göz önünde bulundurulduğunda mümkün olarak

görülmemektedir. Yapılan araştırmalar doğrultusunda tüketilen trans yağ asitlerinin miktarı sağlık açısından büyük önem oluşturduğundan diyetteki miktarları mümkün olduğu kadar sınırlandırılmalıdır. Trans yağ asitlerinin insan sağlığı üzerinde yol açabilecekleri olumsuz etkilerin gözden geçirilmesi ve trans yağların kullanımı ile ilgili düzenlemelerin getirilmesinin toplum sağlığı açısından önemli olduğu kanaatindeyiz. Araştırmacılar ve üreticilere gıdalarda trans yağ asidini azaltacak veya oluşumunu önleyecek üretim yöntemleri geliştirmeleri konusunda önemli görevler düşmektedir.

6. ÖZET

T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ratlarda Trans–9 18:1 Oktadekenoik Asit İzomerinin Sistemik İnflamasyon Gelişimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Elife Deveci

Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2009

Bu çalışmada diyet ile alınan trans-9 18:1 oktadekenoik asit izomerinin, ratlarda sistemik inflamatuar belirteçleri, insülin, troponin ve homosistein üzerine olan etkilerini araştırdık.

Bu amaçla 45 adet rat kullanıldı. Ratlar kontrol (20 adet) ve çalışma grubu (25 adet) olmak üzere ikiye ayrıldı. Çalışma grubundaki ratlara 10 gün süre ile 50mg/gün elaidik asit verildi. Bu süre sonunda ratlardan eter aneztezi altında intrakardiyak punksiyonla kanları alındı ve serumlarında yağ asitleri, CRP, TNF-α, IL-6, insülin, troponin ve homosistein düzeyleri ölçüldü.

CRP ve TNF-α değerlerinin kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğu, insülin ve homosistein değerlerinin ise azaldığı belirlendi. Her iki gruba ait IL-6 ve troponin değerleri arasında önemli bir fark bulunmadı.

Sonuçta, trans yağ asidi alımının sistemik inflamasyonun aktivasyonuyla koroner kalp yetmezliği, insülin resistansı ve diabet riski oluşabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Trans Yağ Asidi;İnflamasyon;C-reaktiv protein;interlökin.

7. SUMMARY

Investigation of the Effects of Trans-9 18:1 Oktadecenoic Acid Isomer on Systemic Inflammation in Rats.

In this study, we have investigated the effects of trans-9 18:1 octadecenoic acid isomer on systemic inflammatuary markers, insulin, troponin and homocystein in rats.

For this purpose, totally 45 male rats were used. The rats were divided into two groups as control (20 rats) and study group (25 rats). To the study group 50 mg / day of elaidic acid was given for a period of 10 days. At the end of that period blood samples of the rats were collected by intracardiac puncture under ether anesthesia. Serum fatty acids, CRP, troponin, TNF-α, IL-6, ınsulin and homocystein levels we measured.

CRP and TNF-α levels of the study group were significantly increased whereas insulin and homocystein levels were decreased than the same parameters of the control group. There was no significant difference between IL-6 and troponin levels of the groups.

It was concluded that dietary consumption of unsaturated trans fatty acids may result in coronary heart defficiency, ınsulin resistance and diabes by activating systemic inflammation.

Key Words : Trans Fatty Acids;Inflammation;C-reactive protein;Interleukin.

8.KAYNAKLAR

1. Allison D, Egon K, Baraj L, Laughman C,Infante M and Heimbach J. Estimated intakes of trans fatty acids and other fatty acids in the US population. J A M Diet Assoc.1999;99: 166-174.
2. Auer J, Berent R, Lassing E and Eber B. C-reactive protein and coranary artery disease. Jpn Heart.2002; 43: 607-619.
3. Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA and Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. Am J Clin. Nutr. 2004;79 (6) 969-973.
4. Bellido T, Stahl N, Ferruggella T, Borba V, Yoncopoulos G and Manolagas S . Detection of receptorsfor ınterleukin-6, ınterleukin-11, leukemia ınhıbitory factor, oncostation m, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteo blastic cells. The Journel of Clinical Investigaation. 1996;657-683.
5. Berstad P, Konstantinova S, Refsum H, Nurk E, Vollset S, Tell G, Ueland P, Drevon C and Ursin G. Dietary fat and plasma total homocysteine concentrations in 2 adult age groups: the Horland homocysteine study. Am J Clin Nutr. 2007;85:1598-605.
6. Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, Ryan DH, York DA . The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. J Nutr. 2002; 132(9):2488-91
7. Christenson RH, Apple FS, Morgan DL, Alonsozana GL, Mascotti K, Olson M, McCormack RT, Wians FH Jr, Keffer JH and Duh SH . Cardiac troponin I measurement with the Access immunoassay system: analytical and clinical performance chorac teristics. Clin Chem. 1998;44(1), 52-60 .
8. Çıkım G, Ozan G, Gülcü F, Baykan D, Gürsü MF. Toksik multi nodüler guatırlı olgularda homosistein düzeyi ve lipid peroksidasyonu. Fırat Tıp Dergisi. 2004;9(4):116-119.
9. Destailillats F, Berdeaux O, Sebedio JL, Juaneda P, Gregoire S, Charding JM,Bretıllıon L and Anders P. Metabolites of conjugated ısomers a-linolenicacid (CLnA) in the rat. J Agric Food Chem. 2005;53, 1422-1427.
10. Elmalı E, Kraeren Z, Özdöl Ç ve Akan ÖA. Akut koroner sendrom şüpheli hastalarda kardiyak troponin t ve troponin ı'nın karşılaştırılması. Türk Biyokimya Dergisi. 2005;30(3):212-215.
11. Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Rıchet C and Rıcart W. Interleukin-6gene polymorphism and lipid abnormolities in healthy subjects. The Journal of Clinical Endocrinolgy Metabolism. 2000;Vol.85, No:3.
12. Gürdöl F ve Ademoğlu E. Biyokimya kitabı. Nobel Tıp Kitabevleri.2006.

13. Hajjar K. Homocysteine: a sulph'rous fire. The Journal of Clinical Investigation. 2001; 675-683

14. Han SN, Leka L, Lichtenstein A, Ausman L, Schaefer E and Meydani SN. Effect of hydrogenated and satured, relative to polyunsatured, fat on immune and inflammotory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. Journal of Lipid Research. 2002;43.

15. İbrahim A, Natorejen S and Ghafoorunissa. Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plazm membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. Metabolism Clinical and Experimental. 2004;54: 240-246.

16. Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Tiftik AM. Biyokimya kitabı. NobelYayın Dağıtım. 2000.

17. Kayahan M. Yağ kimyası. ODTÜ Yayıncılık, Ankara. 2003.

18. Kılıçturgay K. İmmünoloji kitabı. Güneş Nobel Tıp Kitabevleri. 1997.

19. Kocabalkan F, Baykal Y, Bozoğlu E. Yaşlılarda kardiyovasküler risk faktörüolarak homosistein. Turkish Journal of Geriatrics. 2000; 3(2): 69-73.

20. Lagrand W, Visser CA, Hermens WT, Niessen HWM, Verheugt FWA, Wolbink GJ and Hack CE. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor; more than an epiphenomen, Circulation. 1999;100; 96-102.

21. Larque E, Zamora S and Gil A. Dietary trans fatty acids in early life: a review. Early Human Development. 2001;65: 31-41.

22. Lichtenstein A, Erkkila A, Lamarche B, Schwab U, Jalbert S and Ausman L. Influence of hydrogenated fat and butter on CVD risk factors: remnant-like particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. Atherosclerosis. 2003;171:97-107.

23. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ, Willett WC and Hu FB. Consumption of trans fatty acids ıs related to plasma biomarkers of ınflammation and endothelial dysfunction. J Nutr. 2005;135: 562-566.

24. Louheranta AM, Turpeinen AK, Vidgren HM, Schwab US and Uusitupa MI. A high-trans fatty acid diet and insulin sensitivity in young healthy women. Metabolism. 1999; 48: 870-5.

25. Male D, Champion B, Cooke A and Owen M. Advanced immunology. 1991; s: 11.8-11.9

26. Mehmetoğlu İ.Biyokimya ders notları. 2004.

27. Mensink RP ve Katan MB. Efect of dietary trans fatty acids on high-density and low-densitiy lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. N. Eng. J. Med. 1990;323: 439-445.

28. Mold C, Gewurz H and Du clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. Immunopharmacology. 1999;42 (1-3) 23.

29. Moss CW, Lambert MA, Merwin WH. Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. Appl. Microbiol.1974;28, 80-85

30. Mozaffarian D. Trans fatty acids effects on systemic inflammation and endothelial function. Atherosclerosis Supplemen. 2006;29-32.

31. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC and Rimm EB. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. A merican Journal of Clinical Nutrition. 2004;Vol: 79, No.4, 606-612.

32. Murat B. Pre diyaliz, hemodiyaliz ve sürekli ayaktan periton diyalizi hastalarında insülin direncinin karşılaştırılması. Dahiliye Uzmanlık Tezi. 2004.

33. Murray RK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW.Harper biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri. 2004.

34. Pasceri V, Willerson JT and Yeh ET . Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. Circulation. 2000; 102: 2165-2168.

35. Pedersen O, Bak JF and Andersen Ph. Evidence againist altered expression of GLUT 1 or GLUT 4 skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. Diabetes.1990;39: 865- 70.

36. Ralf S and Zweigner J .A novel Acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP). Clin chem Lab Med.1999; 37 (3): 271-274.

37. Sahin N, Akoh CC, Karaali A. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes. J Agric Food Chem. 2005;13;53(14):5779-83.

38. Salmeron J, Hu F, Manson J, Stampfer M, Colditz G, Rimm E and Willet W. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. Am J Clin Nutr. 2001;73:1019-26.

39. Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham N and Ghafoorunissa. Differential effects of dietary satured and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. European Journal of Endocrinology. 2005;153.

40. Spectochappel MC. Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım. Palme Yayıncılık. 2000.

41. Storlien LH, Higgins JA and Thomas TC, Brown MA, Wang HQ, Huang XF, Else PL. Diet composition and insulin action in animal models. Br J Nutr. 2000;83:85-90.

42. Szalai A, Agrawal A, Greenhough T and Volanakis J. C-reactive protein: Structural Biology and host defense function. Clin Chem Lab Med. 1999;37(3):265-270.

43. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, De Almeida JR, Anderson TJ and Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation. Part 1. Circulation. 2003;108: 1917.

44. Taşan M ve Dağlıoğlu O. Trans yağ asitlerinin yapısı, oluşumu ve gıdalarla alınması. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi. 2005; 2 (1).

45. Terry A, Lennıe, Mısook L, Chung, Dıane L, Habash and Debra K, Moser. Dietary Fat Intake And Proinflammatory Cytokine Levels İn Patients With Heart Failure. Journal of Cardiac Failure. 2005;Vol. 11 No. 8

46. Ünlü A. Biyokimya ders notları. 2004.

47. Üstün G.. 40 Yaş altı akut koroner sendromlu hastalarda interlökin-1 reseptörantagonist gen polimorfizmi. Kardiyoloji Uzmanlık Tezi. 2005.

48. Üstüner F. Diabetes mellituslu hastalarda diabet yılının eritrosit membranı Na+K+ ATP az (EC:3.6.1.37) Aktivitesi ile kemokin ve sitokinler arasındaki ilişkinin araştırılması. Biyokimya Uzmanlık Tezi. 2002.

49. Vasili P. The pathophysiology of TNF: Ann review of ımmunology. 1992;10: 411-452

50. Venugopal SK, Devaraj S and Yuhanna I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and biactivity in human aortic endothelial cells. Circulation. 2002;106: 1439-1441.

51. Verma S, Li SH and Badiwala MV. Endothelin antagonizm and ınterleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. Circulation. 2002;105:1890-1896.

52. www.med4you.at/.../lbef2/aktin_troponin.gif

53. www.people.umass.edu/ktheis/fatty-acids2.gif

9.ÖZGEÇMİŞ

Konya'da 1980 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladı. ÖnLisans eğitimini Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi laboratuvar Bölümünün'de 2000 yılında tamamladı. Lisans eğitimini Selçuk Üniversitesi Fen -Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 2003 yılında tamamladı. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde tezsiz yüksek lisans yaparak pedagojik formasyon eğitimini 2004 yılında tamamlamıştır. 2004 yılında S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp Fakültesi) anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılında Doğanhisar devlet hastanesinde laborant olarak göreve başladı ve halen devam etmektedir.