

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLESTEROL STEREOİZOMERLERİNİN
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER İLE AYIRIM
METODLARI VE FARKLI KAYNAKLARDAN
ELDE EDİLEN KOLESTEROLÜN
STEREOKİMYASAL YAPILARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Basri SATILMIŞ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR

MALATYA-2009

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLESTEROL STEREOİZOMERLERİNİN
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER İLE AYIRIM
METODLARI VE FARKLI KAYNAKLARDAN
ELDE EDİLEN KOLESTEROLÜN
STEREOKİMYASAL YAPILARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

Basri SATILMIŞ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR

**Bu araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2007/61 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

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

Jüri Başkanı

Doç.Dr.İsmail TEMEL

İmza

Danışman

Prof.Dr.Tayfun GÜLDÜR

Üye

Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2009 tarih ve 2009/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ali OTLU
Enstitü Müdürü

**KOLESTEROL STEREOİZOMERLERİNİN KROMATOĞRAFİK
YÖNTEMLER İLE AYIRIM METODLARI VE FARKLI KAYNAKLARDAN
ELDE EDİLEN KOLESTEROLÜN STEREOKİMYASAL YAPILARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

ÖZET

Hücre membranlarının yapısal bileşeni, safra asitleri ve steroid hormonlar için substrat olan kolesterol önemli bir lipiddir. Siklopentanoperhidrofenantren yapısına sahip olan kolesterol molekülünde 8 tane asimetric karbon atomu bulunması sebebiyle 256 tane muhtemel stereoizomere sahiptir. Biyolojik moleküllerin farklı stereoizomerleri vücut içerisinde farklı biyolojik cevaplara yol açmaktadır. Kolesterol stereoizomerlerinin metabolizmalarına dair bazı araştırmalar mevcuttur.

İnsan vücuduna besinlerle farklı kaynaklardan kolesterol alınmaktadır. Kolesterol stereoizomerlerinin tespiti, alınan kolesterolün besinsel kaynağı hakkında fikir verebilir. Bu amaçla koyun yün yağından ve domuz karaciğerinden elde edilen kolesterolün ters faz HPLC, mobil faza siklodekstrin eklenmiş ters faz HPLC ve kiral kolonlar kullanılarak yapılan kiral HPLC ile stereoizomerik analizleri yapıldı.

Mobil faza kiral ajan olarak çeşitli siklodekstrinlerin, gama siklodekstrin hariç, eklenmesi ile yapılan ters faz HPLC analizlerinin neticesinde, mobil faza kiral ajan eklemeyen yapılan ters faz HPLC ile belirlenemeyen piklerin ortaya çıktığı görüldü. Tespit edilen bu pikler siklodekstrin tarafından ayrılan bir stereoizomer, başka bir sterol veya kolesterolün değişime uğramış şekli olabilir.

Mobil faza siklodekstrin eklenmesi ile yapılan stereoizomer analizinde domuz karaciğerinden elde edilen kolesterol örneğinde kolesterol pikinden daha önce gelen pik 2 koyun yün yağından elde edilen kolesterol örneğindeki pik 2 den daha belirgin olarak ölçülmektedir. Bu sonuç da farklı kaynaklardan elde edilen kolesterolün stereoizomer içeriğinin birbirinden farklı olabileceğini işaret edebilir.

Sonuçlar, farklı kaynaklardan elde edilmiş olan kolesterollerin izomerik yapılarının heterojen ve birbirinden farklı olabileceğini göstermektedir. Bu yapıların tanımlanması için moleküler düzeydeki ileri analiz teknikleri gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Kolesterol, Stereoizomer, Kromatografi, Seperasyon

**INVESTIGATION ON SEPARATIONS OF CHOLESTEROL
STEREISOMERS BY CHROMATOGRAPHIC METHODS AND
COMPARISON OF STEREOCHEMICAL STRUCTURES OF
CHOLESTEROL FROM DIFFERENT SOURCES**

ABSTRACT

As a constituent of cell membrane and a substrate for bile acids and steroid hormone synthesis, cholesterol, which is a lipid, is of great importance. Cholesterol possesses cyclopentanoperhydrophenanthrene structure and has a 256 possible stereoisomer due to the occurrence of 8 asymmetric carbon atoms. Different stereoisomers bring about different responses in the body. There are a few researches present with respect to metabolism of various cholesterol stereoisomer.

Human body takes up cholesterol from various dietary sources. Identification of cholesterol stereoisomers can point out the dietary sources of cholesterol. To this end, stereoisomer analysis of cholesterol from sheep wool and pork liver were conducted by reverse phase HPLC, reverse phase HPLC with modified mobile phase by cyclodextrins as a chiral agents, and HPLC with chiral columns.

Stereoisomer analysis of cholesterol from both sources by HPLC with modified mobile phase by cyclodextrins (except for gamma cyclodextrin) resulted in two extra peaks other than cholesterol peak, whereas with the other analysis no extra fractions were seen. It is possible therefore that these extra fractions might be stereoisomer of cholesterol or different sterol or chemically modified cholesterol (e.g. oxidized cholesterol).

With HPLC analysis by modified mobile phase in pork liver cholesterol samples, extra peak eluted before cholesterol peak was much higher than that in sheep wool cholesterol samples. This result might indicate that stereoisomer composition of cholesterol from different sources might be different.

The present results show that stereoisomer composition of cholesterol from various sources could be heterogenous. Identification of these structures requires further advanced molecular analysis.

Key words: Cholesterol, Stereoisomer, Chromatography, Separation

TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yapmış olduğum tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Tayfun Güldür' e, fikir ve tecrübelerinden yararlandığım Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı' ndan Yrd. Doç. Dr. S. Ebru Büyüktuncel' e, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı' ndan Yrd. Doç. Dr. Arzu Karakurt' a, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı' ndan Prof. Dr. Mevlüt Ertan' a ve değerli arkadaşım Arş. Gör. A. Burçin Uyumlu' ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, en sıkıntılı zamanlarda bile desteklerini her zaman hissettiğim sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kolesterol Biyosentezi	5
2.2. Besinsel Kolesterol ve Emilimi.....	6
2.3. Kolesterol Homeostazı.....	8
2.4. Kolesterolün Biyomedikal Önemi	9
2.4.1. Safra Asitleri	9
2.4.2. Steroid Hormonlar.....	10
2.4.3. Zar Özellikleri	10
2.4.4. Hastalıklarla İlişkisi	11
2.4.4.1. Hiperlipoproteinemi	11
2.4.4.2. Wolman Hastalığı ve Kolesterol Ester Depo Hastalığı.....	12
2.4.4.3. Niemann-Pick tip C Hastalığı	12
2.4.4.4. Tangier Hastalığı ve Ailesel HDL Eksikliği	12
2.4.4.5. Sitosterolemi	12
2.4.4.6. Smith-Lemli-Opitz Sendromu.....	13
2.4.4.7. Serebrotendon Ksantomatoz	13
2.4.4.8. Konjenital Lipoid Adrenal Hiperplazya.....	13
2.4.4.9. Alzheimer	14
2.4.4.10. Ateroskleroz	14
2.5. İzomeri ve Kolesterol Molekülü	17
2.5.1. İzomeri	17
2.5.1.1. Stereoizomeri	17
2.5.1.1.1. Enantiomerler	18
2.5.1.1.2. Diastereomerler	18
2.5.2. Kolesterolün Moleküler Yapısı	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. Kolesterol Örnekleri.....	21

3.1.2. HPLC Cihazı ve Kolonları	21
3.1.3. Diğer Gereçler	21
3.2. YÖNTEM	22
3.2.1. Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması	22
3.2.2. Mobil Fazın Hazırlanması	22
3.2.3. Kolonların Şartlandırılması	22
3.3. HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Stereoizomer Analizleri	24
3.3.1. Ters Faz HPLC ile Analizleri	24
3.3.1.1. Kromatografik Parametreler	24
3.3.1.2. Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması	24
3.3.2. Mobil Faza Siklodekstrin Eklenerek Yapılan Ters Faz HPLC Analizleri	25
3.3.3. Permetillenmiş γ -siklodekstrin Kolon ile HPLC Analizleri	25
3.3.3.1. Kromatografik Parametreler	26
3.3.3.2. Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması	26
3.3.4. Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbammat) Kolon ile HPLC Analizleri	26
3.3.4.1. Kromatografik Parametreler	26
3.3.4.2. Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması	26
4. BULGULAR	28
4.1. Ters Faz HPLC Metod Validasyonu	28
4.2. Kolesterol Örneklerinin Kromatografik Stereoizomer Analizleri	33
4.2.1. Ters Faz HPLC Analizleri	33
4.2.1.1. Yeni Hazırlanan Kolesterol Örneklerinin Stereoizomer Analizleri	33
4.2.1.2. UV Işınlarnın Kolesterol Örneklerine Etkisi	35
4.2.1.3. Oda Sıcaklığında Bekletmenin Kolesterol Örneklerine Etkisi	37
4.2.1.4. +4 °C' de Bekletmenin Kolesterol Örneklerine Etkisi	39
4.3. Mobil Faza Kiral Ajan Eklenerek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Stereoizomerlerinin Analizi	41
4.3.1. Mobil Faza α -siklodekstrin Eklenerek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri	41
4.3.2. Mobil Faza β -siklodekstrin Eklenerek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri	43
4.3.3. Mobil Faza β -metilsiklodekstrin Eklenerek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri	44
4.3.4. Mobil Faza β -hidroksipropilsiklodekstrin Eklenerek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri	46
4.3.5. Mobil Faza γ -siklodekstrin Eklenerek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri	47
4.3.6. Mobil Faza γ -hidroksipropilsiklodekstrin Eklenerek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri	48
4.4. Kiral HPLC ile Kolesterolün Stereoizomer Analizleri	51
4.4.1. Permetillenmiş γ -siklodekstrin Kiral Kolon ile HPLC Analizleri	51
4.4.1.1. Yeni Hazırlanmış Kolesterol Örneklerinin Analizleri	51
4.4.1.2. UV Işınlarnın Kolesterol Örneklerine Etkisi	52
4.4.1.3. Oda Sıcaklığında Bekletmenin Kolesterol Örneklerine Etkisi	55
4.4.1.4. +4 °C' de Bekletmenin Kolesterol Örneklerine Etkisi	57

4.4.2. Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) Kiral Kolon ile HPLC Analizleri	58
4.4.2.1. Yeni Hazırlanmış Kolesterol Örneklerinin Analizleri	58
4.4.2.2. UV Işınlarnın Kolesterol Örneklerine Etkisi	60
5.TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1 Kolesterol molekülü ve atomların numaralandırması	19
Şekil 2. 2 Kolesterol ile enantiomerinin ve diastereomerinin yapıları	20
Şekil 2. 3 Kolesterol molekülünde halkaların pozisyonları	20
Şekil 3. 1 Genel Deney Organizasyonu	23
Şekil 3. 2 Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması	24
Şekil 4. 1 500 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram	28
Şekil 4. 2 400 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram	29
Şekil 4. 3 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram	29
Şekil 4. 4 100 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram	30
Şekil 4. 5 50 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram	30
Şekil 4. 6 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile I. analizine ait kromatogram	31
Şekil 4. 7 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile II. analizine ait kromatogram	31
Şekil 4. 8 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile III. analizine ait kromatogram	32
Şekil 4. 9 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile IV. analizine ait kromatogram	32
Şekil 4. 10 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile V. analizine ait kromatogram	33
Şekil 4. 11 Yeni hazırlanmış K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram...	34
Şekil 4. 12 Yeni hazırlanmış K2' nin Ters Faz HPLC ile analizine ait kromatogram	34
Şekil 4. 13 Yeni hazırlanan K3' ün Ters Faz HPLC ile analizine ait kromatogram..	34

Şekil 4. 14 UV' de 1 saat bekletilmiş K1' in Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	35
Şekil 4. 15 UV' de 1+2 saat bekletilmiş K1' in Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	35
Şekil 4. 16 UV' de 1 saat bekletilmiş K2' nin Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	36
Şekil 4. 17 UV' de 1+2 saat bekletilmiş K2' nin Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	36
Şekil 4. 18 UV' de 1 saat bekletilmiş K3' ün Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	37
Şekil 4. 19 UV' de 1+2 saat bekletilmiş K3' ün Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	37
Şekil 4. 20 Oda Sıcaklığında 1 Ay bekletilmiş K1' in Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	38
Şekil 4. 21 Oda Sıcaklığında 1 Ay bekletilmiş K2' nin Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	38
Şekil 4. 22 Oda Sıcaklığında 1 Ay Bekletilmiş K3' ün Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	39
Şekil 4. 23 +4 °C' de 1 Ay Bekletilmiş K1' in Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	39
Şekil 4. 24 +4 °C' de 1 Ay Bekletilmiş K2' nin Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	40
Şekil 4. 25 +4 °C' de 1 Ay Bekletilmiş K3' ün Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	40
Şekil 4. 26 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza α -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	41
Şekil 4. 27 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza α -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	42
Şekil 4. 28 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza α -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	42
Şekil 4. 29 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza β -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	43

Şekil 4. 30 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza β -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	43
Şekil 4. 31 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza β -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	44
Şekil 4. 32 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza β -metilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram.....	44
Şekil 4. 33 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza β -metilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram.....	45
Şekil 4. 34 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza β -metilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram.....	45
Şekil 4. 35 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza β -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram.....	46
Şekil 4. 36 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza β -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram.....	46
Şekil 4. 37 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza β -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram.....	47
Şekil 4. 38 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza γ -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	47
Şekil 4. 39 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza γ -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	48
Şekil 4. 40 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza γ -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram	48
Şekil 4. 41 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza γ -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram.....	49
Şekil 4. 42 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza γ -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram.....	49
Şekil 4. 43 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza γ -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram.....	50
Şekil 4. 44 Yeni hazırlanmış K1' in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	51
Şekil 4. 45 Yeni hazırlanmış K2' nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	51

Şekil 4. 46 Yeni hazırlanmış K3' ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	52
Şekil 4. 47 UV' de 1 Saat bekletilmiş K1' in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	52
Şekil 4. 48 UV' de 1+2 Saat bekletilmiş K1' in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	53
Şekil 4. 49 UV' de 1 Saat bekletilmiş K2' nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	53
Şekil 4. 50 UV' de 1+2 Saat bekletilmiş K2' nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	54
Şekil 4. 51 UV' de 1 Saat bekletilmiş K3' ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	54
Şekil 4. 52 UV' de 1+2 Saat bekletilmiş K3' ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	55
Şekil 4. 53 Oda Sıcaklığında 1 Ay Bekletilmiş K1' in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram	55
Şekil 4. 54 Oda Sıcaklığında 1 Ay Bekletilmiş K2' nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram	56
Şekil 4. 55 Oda Sıcaklığında 1 Ay Bekletilmiş K3' ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram	56
Şekil 4. 56 +4 °C' de 1 Ay Bekletilmiş K1' in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	57
Şekil 4. 57 +4 °C' de 1 Ay Bekletilmiş K2' nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	57
Şekil 4. 58 +4 °C' de 1 Ay Bekletilmiş K3' ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	58
Şekil 4. 59 Yeni Hazırlanmış K1' in Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	59
Şekil 4. 60 Yeni Hazırlanmış K2' nin Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	59
Şekil 4. 61 Yeni Hazırlanmış K3' ün Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	60

Şekil 4. 62 UV' de 1 Saat Bekletilmiş K1' in Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram	60
Şekil 4. 63 UV' de 1+2 Saat Bekletilmiş K1' in Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	61
Şekil 4. 64 UV' de 1 Saat Bekletilen K2' nin Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram	61
Şekil 4. 65 UV' de 1+2 Saat Bekletilmiş K2' nin Amiloz tris(3, 5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	62
Şekil 4. 66 UV' de 1 Saat Bekletilen K3' ün Amiloz tris(3, 5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram	62
Şekil 4. 67 UV' de 1+2 Saat Bekletilmiş K3' ün Amiloz tris(3, 5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram.....	63

TABLULAR

Tablo 2. 1 Besinsel kolesterolün kaynağı ve miktarı	7
Tablo 4. 1 Örnekler arası ölçümlerde belirlenen sapmalar	30
Tablo 4. 2 Örnek içi ölçümlerde gözlenen sapmalar.....	33
Tablo 4. 3 Kiral ajan eklemeyen yapılan ters faz HPLC ile analizlerde görülen pikler	41
Tablo 4. 4 Kiral ajan eklemeyen tüm deney koşullarında yapılan ters faz HPLC' de görülen piklerin retansiyon süreleri	41
Tablo 4. 5 Siklodekstrin ekleyerek yapılan ters faz HPLC ile analizlerde görülen pikler	50
Tablo 4. 6 Siklodekstrin ekleyerek yapılan ters faz HPLC' de görülen piklerin retansiyon süreleri	50
Tablo 4. 7 Permetillenmiş γ -siklodekstrin kirali kolon ile yapılan HPLC analizlerinde görülen pikler	58
Tablo 4. 8 Amiloz tris(3, 5-dimetilfenilkarbamit) kirali kolon ile yapılan HPLC analizlerinde görülen pikler.....	63

SİMGE VE KISALTMALAR

α	: Alfa
ABCA1	: ATP bağlayıcı kaset protein A1
ABCA2	: ATP bağlayıcı kaset protein A2
ABCG5	: ATP bağlayıcı kaset protein G5
ABCG8	: ATP bağlayıcı kaset protein G8
ACAT	: Açıl KoA kolesterol açıl transferaz
AMP	: Adenozin monofosfat
Apo A-I	: Apolipoprotein A-I
Apo B	: Apolipoprotein B
Apo C-II	: Apolipoprotein C-II
Apo E	: Apolipoprotein E
ATP	: Adenozin trifosfat
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
c-AMP	: Siklik adenozin monofosfat
dL	: Desilitre
DMAPP	: Dimetilallilpirofosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dk	: Dakika
ER	: Endoplazmik retikulum
γ	: Gama
g	: Gram
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HMG-CoAR	: 3-Hidroksi-3-MetilGlutaril-CoA redüktaz
HMG-CoAS	: 3-Hidroksi-3-MetilGlutaril-CoA sentaz
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IFN-γ	: İnterferon-gama
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IPPP	: İzopentenilpirofosfat
LC-MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LDL-R	: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
Lp(a)	: Lipoprotein(a)
LPL	: Lipoprotein lipaz
LXR	: Karaciğer X reseptör
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre

mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
m-RNA	: Mesajcı ribonükleik asit
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NPC1L1	: Niemann-Pick C1 benzeri 1 protein
P450scc	: Sitokrom P450 yan zincir kırıcı
ppm	: Milyonda bir parçacık
R	: Rektus
RNA	: Ribonükleik asit
S	: Sinister
SCAP	: Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinin yarılmasını aktive edici protein
SREBP	: Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein
SSD	: Sterole hassas bölge
StAR	: Steroidojenik akut düzenleyici protein
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
UV	: Ultraviyole ışınlar
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

1. GİRİŞ

20. yüzyılın ikinci yarısında proteinler ve nükleik asitler (DNA, RNA ve genler) bilim adamları tarafından büyük ilgi görmüştür. Genomiks ve protein temelli biyolojik işlevler üzerindeki odaklanmadan dolayı lipidler, yaşam bilimlerinin birçoğunda yoğun çalışma alanının dışında kalmıştır. Ancak, lipidlerin bu durumu değişim sürecindedir ve artık biyolojik işlevlere verilen cevapların hepsinin genomdan kaynaklanmadığı daha açık hale gelmektedir [1].

Kimyasal yapılarında görülen çeşitliliğe rağmen lipidlerin tanımlanmış olan ortak özellikleri suda çözünmeyişleridir. Buna karşın, biyolojik işlevleri ise kimyasal yapıları gibi çeşitlilik göstermektedir.

Lipidlerin alt sınıfı olan yağlar organizmada enerjinin depo şekli iken fosfolipidler ve kolesterol biyolojik zarların temel yapısal elemanıdır. Diğer lipidler ise miktar olarak az bulunmasına rağmen enzim kofaktörü, elektron taşıyıcı, ışık absorblayıcı pigment, proteinler için hidrofobik çapa, sindirim sisteminde emülsüfiye edici ajan, hormon, hücreiçi mesajcı olarak önemli görevler üstlenirler [2].

20. yüzyıl biyolojinin moleküler düzeyde anlaşılması konusunda büyük gelişmelere sahne olmuştur. Çok sayıdaki başarı içerisinde belki de en ilginçlerinden biri kolesterol araştırmalarıdır. Yüzyıl başladığında, kolesterol izole edilmiş olmasına rağmen bilim adamları yapısı hakkında çok fazla bir bilgiye sahip değildi. Ancak yüz yıllık süre boyunca yapısı, biyosentez yolağı ve kolesterol metabolizmasını düzenleyen mekanizmalar aydınlatılmıştır [3].

Kolesterol, hücrede çok çeşitli olaylarda kritik roller üstlenmektedir. Hücrenin uygun yer ve miktardaki kolesterole sahip olması zar yapısı, sinyal iletimi ve insan sağlığı için gereklidir [4].

Ökaryotlarda önemli bir zar bileşeni olan kolesterol, hücresel bölmeler arasında yarı geçirgen bariyer oluşumuna yardım eder, zar akıcılığını ve membran proteinlerinin işlevini düzenler, zar yoluyla gerçekleşen uyarı iletisine katkıda

bulunur. Öte yandan kolesterol metabolitleri olan steroidler ve safra asitleri, uyarı iletici ve diğer lipidlerin çözümler hale getirilmesi gibi önemli biyolojik işlevlere sahiptir [5].

Bunun yanında dengesiz kolesterol dağılımının çok sayıda hastalıkla ilişkisi olduğu bilinmektedir. Yüksek kan kolesterol seviyeleri, ateroskleroz, koroner arter hastalıkları ve hipertansiyon ile ilişkilidir [4]. Kalp damar hastalıkları patogenezinin yanı sıra kolesterol, Alzheimer, diabet, kanser ile de ilişkilidir. Nadiren de kolesterol metabolizması ve biyosentezindeki bazı enzimlerin kusurlu olmasından kaynaklı bazı hastalıklar görülmektedir [4,5]. Hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunma ihtimali yüksek olan ve otooksidasyon yoluyla oluşan kolesterol oksidasyon ürünlerinin de sitotoksik ve mutajenik özellikleri gösterilmiştir [6].

Patolojik ve fizyolojik birçok mekanizmada yer alması, çok büyük ve karmaşık bir moleküler yapıya sahip olması nedeniyle kolesterolün moleküler yapısı üzerinde farklı çalışmalar yapılmıştır [4,7-11].

Tetrasiklik siklopentanofenantren yapısı ve yapıya bağlı alifatik yan zincir içeren kolesterol, -OH grubu taşımaktadır. Amfipatik yapıya sahip olan kolesterol, polar bir baş ve apolar hidrokarbon gövdeden oluşmaktadır [12].

Kaynaşmış dörtlü siklik yapı ve birden fazla kiral merkez içermesi, kolesterol molekülü için çok sayıda muhtemel konformasyonel ve konfigürasyonel izomeri düşündürmektedir [13,14].

Sterollerin çoğunun özdeş yapılara sahip olması ve çoğunlukla yan zincirlerde gözlenen küçük farklılıkların biyolojik işlevlerde neden olduğu büyük değişiklikler [6], kolesterol molekülünün muhtemel izomerlerinin de farklı biyolojik yanıtlar oluşturabileceği sorusunu düşündürmektedir.

Bu nedenle kolesterolün bazı konfigürasyonel izomerleri üzerinde yapılan çalışmalar ile bu soruya cevap aranmaktadır. Kolesterol ve 3- α hidroksi izomeri olan

epikolesterolün ratlardaki emilimi incelendiğinde, kolesterolün stereoizomerinden iki kattan daha fazla emildiği gözlenmektedir. Emilen kolesterolün % 50' sinin lenfte esterleşmiş olarak geri alınmasına rağmen epikolesterol için böyle bir durumun olmadığı ve bu iki izomerin emilim oranlarındaki farklılığın sterol emilimindeki stereokonfigürasyon nedeniyle olabileceğine işaret edilmektedir [7].

Kolesterolün fonksiyonunun enantiospesifik olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, canlılığının devamı için ekzojen sterollere ihtiyaç duyan *Caenorhabditis elegans* ile yapılan çalışmanın sonuçları, kolesterolün mutlak konfigürasyonunun sadece fiziksel özellikler için değil aynı zamanda *in vivo* kolesterol işlevi için de gerekli olduğunu göstermektedir [9].

Kolesterol ve enantiomerik formu olan ent-kolesterolün deney hayvanlarına verilerek kolesterol emiliminin özgülüğünün ve mekanizmasının araştırıldığı çalışmada, izomerlerin emiliminde farklılık gözlenmektedir. Deney hayvanlarına izomerlerin verilmesinden sonra kolesterolün yaklaşık olarak % 53' ü emilmiş iken, serumda ent-kolesterol' e rastlanılmamıştır. Bu sonuçlar, kolesterol absorpsiyon sürecinin fitosterollerde olduğu gibi enantiomerler bakımından farklılık gösterdiğini işaret etmektedir. Bu farklılıklar da kolesterol absorpsiyonunun, yapısal olarak spesifik özellik taşıdığı ve muhtemelen enantiospesifik hücrel proteinler aracılığı ile gerçekleşebileceğini akla getirmektedir [10].

Gelişmiş toplumlardaki ölüm nedenlerinin büyük kısmını oluşturan koroner kalp hastalıkları, aterosklerozun en önemli klinik bulgusudur. Hiperkolesterolemi ise intestinal emilim, endojen sentez ve metabolizma, lipoproteinlerle taşınma ve safra salgısı gibi kolesterol homeostazındaki düzensizliklerin neden olduğu ateroskleroz gelişiminde en önemli risk faktörü olarak ortaya çıkmaktadır [15,16].

Besinlerle alınan kolesterol miktarındaki artış serum toplam ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-C) seviyelerinde neden olduğu yükselme ile ilişkili olarak koroner kalp hastalıklarının sebeplerinden biri olarak değerlendirilmektedir [17]. Besinlerle kolesterolün günlük alımında gerçekleşen her

100 mg'lık azalma toplam serum kolesterol düzeylerini ortalama olarak 7 mg/dL kadar düşürmektedir [18]. Klinik denemelerin sonuçları, diyetle ve/veya farmakolojik ajanlarla kolesterol düzeylerinin düşürülmesinin, kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklı ölümlerin görülme sıklığını azalttığını ortaya koymaktadır [19,20].

Kolesterolün farklı stereoizomerleri ile yapılan, intestinal absorpsiyon ve in vivo kolesterol fonksiyonunu değerlendiren çalışmaların sonuçları [7,9,10] ateroskleroz oluşum mekanizmasının da bu farklılıklardan etkilenebileceğini düşündürmektedir.

Bu nedenle farklı besin kaynakları ile alınan kolesterolün içerebileceği muhtemel stereoizomerlerin farklı aterojenik etki gösterebilme ihtimali bu izomerik formların önemini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, farklı kaynaklardan elde edilmiş olan kolesterolün stereoizomerik formlarının ayrılması ile farklı kaynaklardaki kolesterolün stereoizomerik formlarındaki muhtemel farklılıklar ortaya konulabilmesini amaçlandı. Sonuçlardan çıkarılabilecek olan farklı stereoizomerik yapıların, plazma kolesterolünün kaynakları hakkında bilgi sahibi olunmasına ve farklı kaynaklardan gelen kolesterolün aterojenik özelliklerinin değerlendirilebilmesine olanak sağlaması mümkündür. Aynı zamanda muhtemel sonuçların hayvan deneylerinde kullanılması ile stereoizomerik yapıdan kaynaklanabilecek ateroskleroz oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasına ışık tutabileceği düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolesterol Biyosentezi

Kolesterol biyosentezinin hızı besinlerle alınan kolesterol miktarına göre ayarlanır. Normal bir yetişkinde besinle alınan kolesterol miktarı 200 – 3000 mg, sentezlenen miktar ise 1 g kadardır. Kolesterolün de novo sentezinin gerçekleştiği en önemli doku karaciğer olmakla beraber bağırsak, adrenal korteks, testis, deri gibi dokularda da sentezlenmektedir [12].

Yaklaşık 30 enzimatik reaksiyon sonucunda sentezlenen 27 karbonlu tetrasiklik bir molekül olan kolesteroldeki bütün karbon atomları asetat birimlerinden sağlanmaktadır [21,22]. Üç molekül asetil CoA' dan ikisinin tiyolaz katalizi ile asetoasetil CoA oluşur. Asetoasetil CoA' nın üçüncü asetil CoA birimiyle 3-Hidroksi-3-MetilGlutaril-CoA sentaz (HMG-CoAS) katalizörlüğünde HMG-CoA oluşur. Oluşan HMG-CoA' nın mitokondriyal ve sitozolik olmak üzere iki ayrı havuzu vardır. Bu havuzlar sırasıyla keton cisimlerin ve kolesterol gibi izoprenoidlerin sentezinde kullanılmaktadır [12]. HMG-CoA geri dönüşümsüz bir reaksiyon basamağında düz endoplazmik retikulumun integral proteini olan 3-Hidroksi-3-MetilGlutaril-CoA redüktaz (HMG-CoAR) katalizi ile mevalonata dönüşmektedir. HMG-CoA redüktaz, kolesterol biyosentezinin hız sınırlandırıcı basamağında rol alır [23].

Mevalonata ATP' den sağlanan fosfatların sırayla bağlanmasını takiben gerçekleşen dekarboksilasyon sonucunda izopentenil pirofosfat (IPPP) oluşmaktadır. IPPP, izomeri olan dimetilallil pirofosfat (DMAPP) ile denge halindedir ve bu iki molekülün kondensasyonu sonucu geranilpirofosfat oluşmakta, geranilpirofosfatın bir diğer IPPP ile birleşmesi sonucu farnezilpirofosfat oluşmaktadır. İki molekül farnezilpirofosfat, skualen sentaz katalizi ile skualene dönüşmektedir. Skualen, iki basamaklı reaksiyon sonucunda halkalaşarak lanosterole dönüşmektedir [12,24].

6 tane izopren birimi içeren 30 karbonlu lanosterolün 27 karbonlu kolesterole dönüşümü, 4. C daki iki metil grubunun ve 14. C daki bir metil grubunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Daha sonra 8-9. C lar arasındaki çift bağın 7-8. C

lar arasına kayması, 24-25. C lar ile 14-15 ve 7-8. C lar arasındaki çift bağın doyurulması ve 5-6. C lar arasında çift bağın meydana gelmesi ile kolesterol molekülü oluşmaktadır [25].

Mevalonat metabolik yolu, izoprenlerin iç ve dış kaynaklarının dengelenmesini kontrol altında tutmaktadır. Mevalonat metabolik yolunun ürünlerinden olan kolesterol, hücre içerisinde sentezlendiği gibi reseptör aracılı olarak plazma düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)' den sağlanmaktadır. Mevalonattan türemiş bir ürün olan kolesterolün biyosentezi, hız kısıtlayıcı basamağı katalizleyen HMG-CoAR enziminin aktivitesi ile düzenlenmektedir [5,26].

HMG-CoAR, kolesterol miktarı ile sıkı bir şekilde regüle edilmektedir. Bu nedenle enzim hiperkolesterolemi tedavisinde terapötik hedef olarak yoğun dikkat çekmiştir [27]. Bu enzim, statin olarak adlandırılan bir grup farmakolojik ajan tarafından inhibe edilir. Bu inhibisyon sonucunda, kolesterol biyosentezindeki azalma ve karaciğerdeki LDL reseptörlerinin üst düzenlenmesi yoluyla dolaşımdaki kolesterol miktarı azalmakta, böylelikle koroner kalp hastalığı riski azalmaktadır [28].

Hüresel enerji durumunu belirleyen ATP/AMP oranı, HMG-CoAR enziminin aktivitesinin düzenlenmesinde etkilidir. Defosforile şekli aktif olan HMG-CoAR, c-AMP bağımlı kinazların etkisiyle fosforillenmekte ve inaktif hale geçmektedir [29].

2.2. Besinsel Kolesterol ve Emilimi

Steroller, insan besininde yer alan lipid karakterdeki gıdaların küçük bileşenidir [6]. Kolesterol süt ürünleri, yumurta, sığır, domuz, kuzu ve kümes hayvanları eti gibi hayvansal kökenli ürünlerde bulunmaktadır. Besinsel kolesterolün en yoğun olarak bulunduğu kaynaklar, karaciğer ve diğer organ etleri, yumurta sarısı, kırmızı et, tam yağlı süt ürünleri ve kabuklu deniz hayvanlarıdır [30].

Tablo 2.1 Besinsel kolesterolün kaynağı ve miktarı [30]

Besin Kolesterolünün Kaynağı	Kolesterol (mg/100g)
Tam yağlı süt	13,6
Tereyağı	183-248
Yumurta sarısı	1260
Karaciğer	300-360
Sığır eti	65-82
Domuz eti	72-100
Istakoz	95
Karides	152

Besinlerle alınan kolesterol miktarı genellikle yağ tüketimiyle ilişkilidir ve gıdalarda bulunan kolesterolün çoğunluğunu serbest formu oluştururken yalnızca %8-15' lik bir kısmını kolesterol esterleri oluşturmaktadır [16]. Besinsel kolesterol ince bağırsağın proksimal kısmında yağ asitleri ve lizofosfolipidlerle birlikte safra tuzu misellerinden emilir. Bağırsak lumeninden enterositler tarafından gerçekleştirilen emilim işleminin, kolesterol homeostazında görev alan HMG-CoAR ve sterol düzenleyici eleman bağlayan protein (SREBP) bölünmesini etkileyen protein (SCAP) gibi sterole hassas bölge (SSD) içeren bir anahtar protein olan Niemann-Pick C1-benzeri 1 proteini (NPC1L1) tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir [21,31]. Enterositlerin brush-border zarına yerleşmiş olan NPC1L1, kolesterol ve fitosterollerin intestinal emiliminde görev yapmaktadır [32].

Son çalışmalar farmakolojik bir ajan olan ezetimibin, NPC1L1 proteinini hedef alarak kolesterolün intestinal emilimini inhibe ettiğini göstermektedir [33,34]. Ayrıca NPC1L1 geninin inaktive edildiği farelerle ezetimib uygulanan farelerin lipid emilim karakterleri arasında benzerlik olması da NPC1L1 proteininin önemini ortaya koymaktadır [31].

2.3. Kolesterol Homeostazi

Kolesterol biyosentezinin hız kısıtlayıcı basamağını katalizleyen HMG-CoAR enzim aktivitesi çeşitli düzenleyici sistemler tarafından kontrol edilmektedir. Bu düzenleyici sistemler gen transkripsiyon seviyesini, mRNA translasyon etkinliğini, protein yıkım hızını ve enzimatik aktivite ayarlanmasını içermektedir [25,35].

HMG CoAR geninin transkripsiyonel düzenlenmesi sterol seviyelerine cevap olarak feedback düzenleme ile SREBP aracılığı ile gerçekleşmektedir. Transkripsiyon faktörü olan SREBP, sıkı ilişki içinde bulunduğu SCAP ile birlikte endoplazmik retikulum (ER) üzerinde yerleşmiş durumdadır. Yüksek kolesterol konsantrasyonlarında SREBP-SCAP kompleksi ER içinde tutulurken düşük sterol seviyelerinde SREBP-SCAP arasındaki etkileşim zayıflar, SREBP-SCAP kompleks yapısının golgi aygıtına transferi sağlanır. Golgide proteazlarının etkisi ile SREBP' in N-terminal DNA bağlayıcı/transkripsiyon aktivasyon bölgesi C-terminal' dan ayrılır. Daha sonra çekirdeğe geçen N-terminal bölgesi, kolesterol homeostazında rol oynayan HMG CoAR ve LDL reseptör genlerini transkripsiyonel olarak aktive eder [36,37].

Bir diğer transkripsiyonel düzenleyici ise nükleer hormon reseptörü olan karaciğer X reseptörleridir (LXR). SREBP aktivasyonu hücrel kolesterol artışına neden olan geni transkripsiyonunu artırırken LXR aktivasyonu, kolesterolün periferel hücrelerden uzaklaştırılması ve safra sterol salgılanmasının artmasına neden olan ters kolesterol taşınmasını kolaylaştırmaktadır [38].

Endoplazmik retikulum enzimi olan açıl CoA kolesterol açıl transferaz (ACAT) katalizi sonucunda aşırı kolesterolün esterleştirilmesi ile artan kolesterol seviyelerine karşı hızlı şekilde cevap verilmektedir [39].

2.4. Kolesterolün Biyomedikal Önemi

2.4.1. Safra Asitleri

Besinlerle alınan yağ, kolesterol ve yağda çözünen vitaminlerin ince bağırsakta emilimini kolaylaştıran, kolesterol ve diğer maddelerin feçes ile atılmasını sağlayan fizyolojik deterjan özelliğindeki safra asitleri, kolesterolün karaciğerde dönüşümü ile sentezlenmektedir ve vücuttan atılan kolesterolün en önemli metabolik yolunu oluşturmaktadır [40].

İleumda tekrar emilen safra asitleri portal venöz sirkülasyon yoluyla yeniden karaciğere taşınır [41]. Safra asitlerinin bu şekildeki enterohepatik dolaşımı oldukça etkilidir. Bu şekilde safra asitlerinin yalnızca %5' lik bir kısmı feçesle atılır ki bu kayıpta kolesterolün dönüşümü ile gerçekleşen biyosentez yoluyla telafi edilir. Bu feedback mekanizması sadece safra asidi sentezini regüle etmez, aynı zamanda kolesterol biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamak enzimi olan HMG-CoAR ile LDL-C' ün LDL reseptörlerince hepatik alınmasını inhibe ederek kolesterol sentezinde de önemli rol oynamaktadır [40].

Safra asitlerine dönüştürülen kolesterol, vücuttaki kolesterolün yaklaşık %50' sini oluşturmaktadır. Ekstrahepatik dokulardan karaciğere taşınan aşırı kolesterol, hepatositlerde safra asitlerine dönüşür. Bu nedenle, safra asitleri biyosentez yolağı memelilerde kolesterol homeostazının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır [40,42].

Hepatik kolesterolün fazlası iki yolla safra asitlerine dönüştürülür. İlki kolesterol 7α -hidroksilazın hız kısıtlayıcı basamağı katalizlediği nötral ya da klasik yolak, ikincisi ise sterol 27-hidroksilazın regülatör enzim olarak görev yaptığı asidik ya da alternatif yolaktır [43].

İnsan safra içeriğinde en çok bulunan safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asit primer safra asitleri olarak adlandırılmaktadır. Primer safra asitlerinin dekonjugasyonu ve 7α -OH grubunun da uzaklaştırılması ile sekonder safra asitleri olan deoksikolik asit ve litokolik asit oluşmaktadır [12].

2.4.2. Steroid Hormonlar

Kolesterolün sadece küçük bir kısmının değişime uğraması sonucu oluşmasına rağmen steroid hormonlar önemli fizyolojik görevler üstlenmektedir. Steroid hormonlar steroidojenik hücreler olan adrenal, over, testis, plasenta ve beyinde normal üreme fonksiyonu ve vücut homeostazisinde kullanılmak üzere sentezlenirler. Kolesterolün hormon öncüsü olduğu steroid hormonlar, glikokortikoidler (21C), mineralokortikoidler (21C), androjenler (19C), östrojenler (18C) ve progesteron (21C) olmak üzere beş gruptur.

Steroidogenezde, substrat olan kolesterol, sitokrom P450 yan zincir kırıcı enzim (P450_{sc}) tarafından pregnenolona metabolize edilir. Pregnenolon üzerinden gerçekleşen seri reaksiyonlar sonucunda steroid hormonlar sentezlenmektedir [44].

2.4.3. Zar Özellikleri

Memeli hücre zarının temel bileşeni olan kolesterol, hücre yoğunluğuna bağlı olarak zarda farklı kolesterol/protein oranları görülmektedir. Hücre zarları arasında heterojen dağılım gösteren kolesterol, plazma zarındaki çeşitli fosfolipid, sfingomyelin ve glikolipidlerin oluşturduğu lipid moleküllerinin yaklaşık olarak %20-25' lik kısmını oluşturmaktadır [5].

Hücre zarında yer alan fosfolipidlerin çeşitliliğine karşın memeli hücre zarları, hücre proliferasyonunu ve canlılığını devam ettirebilmek için gerekli olan kolesterolü tek önemli sterol olarak içermektedir [45].

Kolesterolün moleküler yapısı diğer zar lipidlerinden oldukça farklı olmasına rağmen hidrofobik ve hidrofilik grupları birlikte taşıma özelliği benzerdir. Fosfolipid çift tabakalı yapı içerisindeki kolesterol polar hidroksil grubu ile sulu faza doğru yönelmekteyken hidrofobik steroid halka fosfolipidlerin hidrokarbon zincirleri arasında paralel olarak yer almaktadır [45,46].

Hücre zarındaki lateral organizasyon, zar özelleşmesinin düzenlenmesi bakımından önemlidir. Kolesterol tarafından gerçekleştirilen lipidlerin artmış lateral

düzenlenmesi ile akıcılığın azalması ve polar moleküllerin geçirgenliğinin kısıtlanmasından zarın biyofizik özellikleri etkilenmektedir [47].

Lipid raft hipotezi, spesifik proteinlere karşı affinitesi olan dinamik platform oluşturmak için kolesterolün sfingolipidlerle etkileşimler gerçekleştirdiğini varsaymaktadır [47,48]. Sfingolipidlerin hidrokarbon zincirleri arasında yer alan kolesterolün raft yapısının bütünlüğünü korumak için dinamik bir yapıstırıcı gibi fonksiyon yaptığı düşünülmektedir. Raft ve raft olmayan kısımlarda dağılım gösteren kolesterol doymamış fosfolipidlerden daha çok raft sfingolipidlerine ilgi göstermektedir. Raft kolesterolünün platformdan çekilmesi, raftlardaki çoğu proteinin ayrılmasına ve bu proteinleri fonksiyon göremez hale gelmesine yol açmaktadır [49].

2.4.4. Hastalıklarla İlişkisi

Lipid organizasyonunda meydana gelen değişiklikler sinyal ileti ve zar trafiği gibi hücrel fonksiyonlar üzerinde derin etkilere sahiptir. Bu etkilerin insanda neden olduğu hastalıklar, genetik değişiklikler veya beslenme gibi çevresel faktörlerin ya da her ikisinin de etkisi sonucunda ortaya çıkmaktadır [46].

2.4.4.1. Hiperlipoproteinemi

Hiperlipoproteinemiler 5 farklı tipte sınıflandırılmaktadır. Tip I hiperlipoproteinemi, lipoprotein lipaz (LPL) veya apoC-II eksikliğinde ortaya çıkan ailesel şilomikronemidir. Tip II hiperlipoproteinemi, çoğunlukla LDL-R genindeki mutasyonla ortaya çıkmasına rağmen nadiren de LDL-R için ligand olan apoB' deki mutasyonla da görülmekte olan primer hiperkolesterolemidir. Tip III hiperlipoproteinemi, apoE' deki kusur sonucu ortaya çıkmaktadır. Tip IV hiperlipoproteinemi, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) oluşumunda artışla beraber katabolizmasındaki azalma ile ortaya çıkan ailesel hipertriglisidemi. Tip V, şilomikron ve VLDL' de artışın gözlemlendiği muhtemelen apoC-II' nin kusurlu olduğu hiperlipoproteinemidir. Tip VI, ender rastlanan bir durum olup HDL miktarındaki artışın görüldüğü ailesel hiperalfalipoproteinemidir [21,44].

2.4.4.2. Wolman Hastalığı ve Kolesterol Ester Depo Hastalığı

Wolman hastalığı ve kolesterol ester depo hastalığı, asit lipaz eksikliğinde ortaya çıkan hastalıklardır. Lizozomal asit lipaz, lizozomlardaki trigliserid ve kolesterol esterlerinin hidrolizi için gereklidir. [50].

Wolman hastalığı, büyümedeki durgunluk ile karakterize olup genellikle 1 yaşından önce ölümlü sonuçlanmaktadır. Wolman hastalığına göre daha ılımlı seyreden kolesterol ester depo hastalığında ise hiperkolesterolemi ile birlikte nötral yağların ve kolesterol esterlerinin arterlerde birikmesi sonucu oluşan ateroskleroz görülmektedir [21].

2.4.4.3. Niemann-Pick tip C Hastalığı

Niemann-Pick tip C hastalığı, geç endositik organellerde esterleşmemiş kolesterol ve diğer lipidlerin, özellikle sfingolipid, birikmesi ile karakterizedir. Bu hastalık, ER' de bozulmuş kolesterol esterifikasyonu, kolesterol sentezi ve LDLR aktivitesindeki kusurlu baskılanma ile birlikte oluşmaktadır [51].

2.4.4.4. Tangier Hastalığı -Ailesel HDL Eksikliği

HDL, köpük hücresi olarak adlandırılan aterosklerotik lezyon makrofajlarından birincil olarak kolesterolün uzaklaştırılmasını stimüle ederek ateroskleroz gelişiminden korumaktadır. Makrofaj plazma membran proteini olan ABCA1, apoA-1 ile bağlanarak kolesterolün uzaklaştırılmasında ve HDL' nin olgun formlarının oluşmasında anahtar bir rol üstlenmektedir [52,53,54]. Bu süreçte görev alan ABCA1' in önemi, Tangier hastalığının temelinde yatan mutasyonların belirlenmesi ile anlaşılmıştır [55,56]. Bu hastalık, HDL eksikliği, doku makrofajlarında sterol birikmesi ve aterosklerozun hızlı şekilde gelişmesi gibi karakteristik özelliklere sahiptir [21].

2.4.4.5. Sitosterolemi

Batı tipinde olmayan bir beslenmeyle alınan kolesterol ve bitkisel sterol miktarları yaklaşık olarak aynıdır. Ortalama olarak kolesterolün yaklaşık % 50' lik

bir kısmına karşılık bitkisel sterollerin %5' den daha az bir kısmı emilmektedir. ABCG5 ve ABCG8' deki mutasyon sonucu görülen sitosterolemi hastalığı, kolesterol ve bitkisel sterol emilimindeki farklılığın sonucunda ortaya çıkmaktadır [57,58]. Sitosterolemi hastalarında beslenmeyle alınan bitkisel sterollerin %15-20' lik bir kısmı emilirken, normal durumlara göre yüksek besin kolesterol emilimi ve safraya daha az kolesterol atılımı görülmektedir. Bunların sonucunda, çocuklukta görülen ciddi hiperkolesterolemi, ksantomatoz, hızlı gelişen ateroskleroz ve premature koroner arter hastalıkları gözlenmektedir [59].

2.4.4.6. Smith-Lemli-Opitz Sendromu

Smith-Lemli-Opitz sendromu ve kolesterol sentezi ile ilgili olan diğer doğuştan gelen bozukluklarda, membrandaki kolesterolün eksikliği ve/veya kolesterol sentezinde oluşan sterol prekürsörlerin birikmesi gözlenmektedir. Smith-Lemli-Opitz sendromu kolesterol sentezinin son basamağı olan 7-dehidrokolesterol' ün kolesterole dönüşümünü katalizleyen 7-dehidrokolesterol redüktaz' ın eksikliği ile ortaya çıkmaktadır. Hastalığın klinik belirtileri multipl malformasyonlar, ciddi mental gerilikler, prenatal ve neonatal ölümler olarak gözlenmektedir [21].

2.4.4.7. Serebrotendon Ksantomatoz

Serebrotendon ksantomatoz, safra asidi sentezi asidik yolunun hız kısıtlayıcı enzimi olan sterol 27-hidroksilaz mutasyonu ile ortaya çıkmaktadır [60]. Kolesterol türevi kolestanol metabolit olarak birikmekte, nörolojik bulgular, katarakt, ishal ve ksantoma gibi çeşitli anormallikler ile aterosklerotik damar hastalıkları gözlenmektedir [61].

2.4.4.8. Konjenital Lipoid Adrenal Hiperplazi

Mitokondriyal kolesterol transport proteini olan StAR' da meydana gelen mutasyon lipoid adrenal hiperplazyaya neden olmaktadır [62]. Nadiren görülen resesif kalıtsal durum, steroid sentezini hemen hemen durdurma noktasına getirebildiğinden ölümcül durumlar ortaya çıkabilmektedir [63].

2.4.4.9. Alzheimer

Alzheimer hastalığının patogeneğinde kolesterolün önemli rol oynadığını gösteren işaretler giderek artmaktadır. Kolesterol ile Alzheimer arasındaki ilk bağlantı, kolesterolün beyindeki ana taşıyıcısı olan ApoE E4 allelinin bulunmasıyla kurulmuştur [64-66]. Bu nedenle kolesterol dağılımı ve seviyelerindeki değişikliklerin amiloid plak oluşumunda etkisi olduğu düşünülmektedir [46]. Kolesterol taşınmasında önemli rol oynayan ABCA1, ABCA2 ve ACAT' ın genetik olarak değişik biçimlerinin Alzheimer riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [67-69]. Epidemiyolojik çalışmaların sonuçları, hiperkolesterolemik bireylerin statinler ile tedavisinin Alzheimer hastalığı görülme sıklığını azalttığını göstermektedir [70,71].

2.4.4.10. Ateroskleroz

Ateroskleroz, kolesterol ve lipid metabolizması ile ilişkili bir hastalıktır. Aterogenezin erken aşamalarında intima içerisinde plazma lipoproteinleri birikmeye başlar. Lipoproteinler, proteoglikan bağlanması ve lipoproteinlerin agregasyonunun birlikte gelişmesi nedeniyle intimada tutulurlar. Bu tutulan lipoproteinlerden özellikle oksidasyon, agregasyon ve diğer şekillerde değişmiş olanlar seri biyolojik cevapların ortaya çıkması ile aterogeneze neden olurlar [72]. Bu biyolojik cevaplar içerisinde en önemlisi, değişime uğramış olan lipoproteinlerdeki okside olmuş fosfolipidlerin etkisi ile kemokinlerin salgılanması ve monositler ve T hücreleri için damar endoteli yüzeyinde adhezyon moleküllerinin oluşumudur [73]. Bu lökositler bozulmamış endotel tabaka yoluyla göç ederler ve monositler intima içerisinde sonuç olarak makrofajlara farklılaşırlar [74].

Lipid oksidasyonunun aterogeneze önemli rol oynadığı bilinmektedir. Aterogenezin oksidasyon hipotezi, araşidonik asit içeren LDL fosfolipidlerinin okside olması ile oluşan spesifik proinflamatuvar okside fosfolipidler üzerine odaklanmıştır. Bu fosfolipidler insanlar ve hayvanlarda immün sistem tarafından tanınmaktadır. Plazma ve lipoproteinlerdeki okside lipidlerin miktarı ve bu lipidlerin etkisi ile immün sistem tarafından oluşturulan antikorların miktarı aterogeneze yatkınlığın belirlenmesinde uygun biyoişaretler olarak düşünülmektedir [75].

Aterosklerozun lipid kaynaklı rahatsızlık olarak düşünülmesine rağmen, son çalışmalarındaki gelişmeler inflamasyon ile ilgili kısmın hastalığın bütün aşamalarını etkileyen önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Çoğunlukla dolaşımdaki monositlerden köken alan makrofajların yer aldığı lökositler arter duvarlarında yer almaktadır. Damar duvarlarında yer alan değişime uğramış LDL, lökositleri doğrudan ya da doğrudan olmayan yoldan etkileyen bir ajan olarak yorumlanmaktadır [76].

Lipoproteinlerin okside fosfolipid kısımları plak oluşumunda yer alan bir çok hücre ile etkileşimdedir. Bu etkileşim, aktive olmuş endotel üzerinde lenfosit ve monositlerin yer almasını kolaylaştıran adezyon moleküllerinin ifadenmesini artırmaktadır. Köpük hücreleri ve aktive olmuş endotel, interlökin-1 (IL-1), IL-6, interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi inflamatuvar cevabın gelişimini kolaylaştıran proinflamatuvar sitokinleri oluşturabilir [77].

İntima içerisinde, reseptör aracılı endositoz ve fagositoz ile makrofajlara alınan lipoproteinlerdeki kolesterolün çoğunluğunu oluşturan kolesterol esterleri, kolesterol ve yağ asitlerine hidroliz edildikten sonra makrofaj içerisinde diğer bölgelere taşınmaktadır [78-80]. Serbest kolesterol atılım için plazma membranına taşınırken, intraselüler kolesterol homeostazı ve intimal makrofajlardaki lipoprotein kökenli kolesterolün en önemli akıbeti olan ACAT ile tekrar esterleştirilmesi için ER' ye taşınmaktadır [46]. Oluşan kolesterol esterlerinin bir araya gelerek sitoplazma içerisinde oluşturdukları membrana bağlı nötral lipid damlacıkları köpük hücreleri olarak adlandırılmaktadır [81].

Agrege olmuş LDL, aterosklerotik lezyonlarda yer alan LDL' in baskın olan formudur ve köpük hücre oluşumuna neden olan makrofajlara bol miktarda kolesterol taşımaktadır [82]. LDL bileşeni olan ApoB ile matriks proteoglikanları arasındaki etkileşim, damar duvarlarında LDL' in tutulumunu açıklamaktadır [83]. LDL' e ek olarak Lp(a) ve remnantlar gibi ApoB içeren diğer lipoproteinler de intima içerisinde birikerek aterosklerozu geliştirebilirler [84]. Köpük hücre oluşumuna katkısı olan aterojenik lipoproteinlerden remnant lipoproteinlerin katkısı

genellikle pek önemsenmemektedir. Ancak kısmi katabolizma ve sonrasında kolesterol miktarı oransal olarak artan ve trigliserid bakımından zengin olan bu lipoproteinler makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde alınmakta ve ACAT aktivitesini indükleyerek köpük hücre oluşumuna katılmaktadırlar. Ayrıca, intimaadaki aterosklerotik lezyonlarda çoklukla yer alması ve plazma seviyelerinin yüksek olması, aterosklerotik damar hastalıkları ve köpük hücre varlığı ile olan ilişkisini insanlarda ve hayvan modellerinde göstermektedir [85].

HDL, ateroskleroza karşı oldukça güçlü bir koruyucu etkiye sahiptir. HDL' in bu etkiyi göstermesinin altında yatan mekanizma, aşırı kolesterolü periferden uzaklaştırmasıdır. Buna ek olarak, lipoprotein oksidasyonunu inhibe ederek koruma sağlar. Biyolojik olarak aktif haldeki okside olmuş fosfolipidleri parçalayan bir esterase olan paraoksonazdan dolayı HDL' in antioksidan özelliği ortaya konulmuştur [86,87].

Erken safhalardaki aterosklerotik lezyon kan akışını engelleyecek kadar arteriyel lumen tıkanmasına sebep olmadığı için belirtileri görülemeyebilir. Yıllar içerisinde lezyon oluşumunun yavaş biçimde ilerlemesi, köpük hücreleri, düz kas hücreleri, ekstraselüler matris materyalleri ve düz kas hücrelerinden köken alan dokular lumen oklüzyonunun gelişimine neden olmaktadır. Ancak, hipoksiden dolayı oluşan neovaskülarizasyon gibi telafi edici organizasyonlar sayesinde organlara kan akımının sağlanmaktadır ve bu nedenle belirtiler görülmemektedir [46].

Lezyonların az bir kısmı, ani ölüm, akut miyokard enfarktüs, anstabil anjina ve iskemik felç gibi akut vasküler olaylara sebep olurlar [88]. Bu olaylar, oklüzif lumen pıhtısı ile aniden gelişen lumen tıkanması meydana gelmekte ve organların hasar görmesine neden olmaktadır. Bu süreçler çok kısa bir zaman aralığında gerçekleştiğinden telafi edici organizasyonların gelişeceği yeterli zaman olmamaktadır. Akut olaylardan etkilenen hastaların arterlerindeki patolojik gözlemler, akut aterosklerotik plak dağılım teorisinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [89,90]. Bu teoriye göre, plakların çok az bir kısmı nekrotik ve oldukça

inflamatuvar olmaktadır ve sonuç olarak endotel hücre tabakasının erozyonuna ya da koruyucu özellikteki fibröz kapağın yıkılmasına neden olmaktadır [46].

Plak yapısının bozulması ile ilgili teorilerden ilki, lezyonal makrofajların salgıladığı matriks metalloproteinazların fibröz kapağı yıkıma uğratmasıdır [91]. In vitro çalışmalar, inflamatuvar mediatörlerin makrofajların proteaz salgılamasını etkilediğini gösterse de in vivo veriler eksiklik olduğunu göstermektedir. Bir diğer teori düz kas hücrelerinin ölümünün plak instabilitesini etkilediğini göstermektedir [92]. Üçüncü ve önemli olan teori ise, makrofaj hücrelerinin ölümü ile nekrotik çekirdeğin meydana gelmesidir [93].

Aterosklerotik lezyonlarda meydana gelen biyolojik olaylar, plak instabilitesine ve sonrasında akut tromboza ve vasküler tıkanmaya neden olmaktadır. Nekrotik çekirdeklerin oluşumunda makrofaj ölümünün etkili olduğu, lezyonal makrofaj aracılı inflamasyonun ve makrofaj ölümünün nedeninin intraselüler ortamda aşırı miktarda birikmiş olan serbest kolesterol olduğu doğrulanmaktadır [46].

2.5. İzomeri ve Kolesterol Molekülü

2.5.1. İzomeri

Aynı molekül formülü ile gösterilebilen iki ya da daha fazla sayıda farklı bileşiğe izomerler adı verilmektedir. İzomerler genel olarak iki gruba ayrılmaktadır. Aynı molekül formülü ile gösterildiği halde, atomların bağlanma düzeninin farklı olduğu bileşiklere yapısal izomerler denir. Stereoizomerler ise aynı bağlanma düzenine sahip bileşiklerdeki atomların uzayda farklı yönelimlerinden kaynaklanan izomeri şeklidir [94].

2.5.1.1. Stereoizomeri

Dört bağ yapan karbon atomunu içeren molekül, karbona dört farklı süstitüentin bağlanması ile bir kiral (asimetrik) merkeze sahip olur ve bunun sonucunda stereoizomerler oluşmaktadır. Bir molekül n tane farklı kiral merkez içeriyorsa 2^n tane stereoizomere sahiptir [95].

2.5.1.1.1. Enantiomerler

Enantiomerler, birbirinin ayna görüntüsü olan, üst üste çakıştırılmayan, polarize ışığın titreşim düzlemine zıt yönde ve ideal olarak eşit miktarlarda çeviren stereoizomerlerdir. Eğer bir molekülde bir asimetrik merkez varsa, stereoizomer sayısı ($2^n=2^1=2$) ikidir ve bunlar enantiomerdir [96]. Enantiomerler yalnızca kiral özellikleri bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedir. Düzlem polarize ışığı eşit miktarlarda fakat zıt yönlerde çevirmektedir. Erime noktası, kaynama noktası ve normal çözücülerdeki çözünürlükleri gibi kiral olmayan özellikleri aynıdır. Bu nedenle enantiomerler, kristallendirme ve damıtma gibi kiral olmayan özelliklere dayanan yöntemlerle birbirinden ayrılamazlar. Enantiomerlerin birbirinden ayrılması, kiral reaktifler ile tepkimeye sokularak oluşan diastereomer çiftlerinin geleneksel yöntemler ile birbirinden ayrılmasını içermektedir [95].

2.5.1.1.2. Diastereomerler

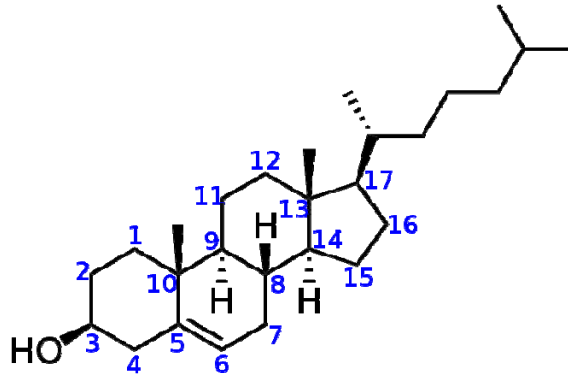
Birden fazla asimetrik merkez taşıyan moleküllerde, birbirinin ayna görüntüsü olmayan yani enantiomer olmayan stereoizomerlere diastereomer adı verilir. Sahip oldukları kiral merkezlerin hepsinde değil ancak en az birinde farklı konfigürasyona sahip olan stereoizomerlerdir. Diastereomerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirinden farklıdır. Diastereomerlerin kiral ve kiral olmayan özellikleri birbirlerinden farklılık gösterebilmektedir. Yani, erime noktaları, kaynama noktaları, çözünürlükleri, düzlem polarize ışığı çevirme yönleri ve çevirme açıları farklı olabilir. Kısacası, diastereomerler iki farklı kimyasal bileşik gibi davranmaktadır. Bu nedenle bu farklılıklardan yararlanılarak diastereomerlerin birbirlerinden ayrılması mümkün olabilmektedir [95].

2.5.2. Kolesterolün Moleküler Yapısı

Steroller, geniş kapsamlı biyolojik aktiviteleri ve fiziksel özellikleri olan geniş bir grup bileşiklerden oluşmakta, ökaryotik hücrelerde genellikle bulunurken prokaryotlarda daha nadiren yer almaktadır [23]. Kaynaklarına göre bitkisel ya da hayvansal steroller olmak üzere sınıflandırılabilir. Kolesterol, bitkilerde az

düzeyde bulunan temel hayvansal sterol iken sitosterol, kampesterol ve stigmasterol öne çıkan bitkisel steroller yani fitosterollerdir [6,23].

Yapısında bulunan izopren birimlerinin ileri derecede halkalaşmasıyla oluşan kolesterol, üç adet 6 karbonlu fenantren halkasının 5 karbonlu siklopentan halkasıyla birleşmesinden meydana gelen tetrasiklik siklopentanofenantren sistemini içeren yapıdır. 17 karbondan oluşan tetrasiklik sistemde halkalar A, B, C ve D olarak isimlendirilir, halkalarda yer alan karbon atomları A halkasından başlanarak numaralandırılır.

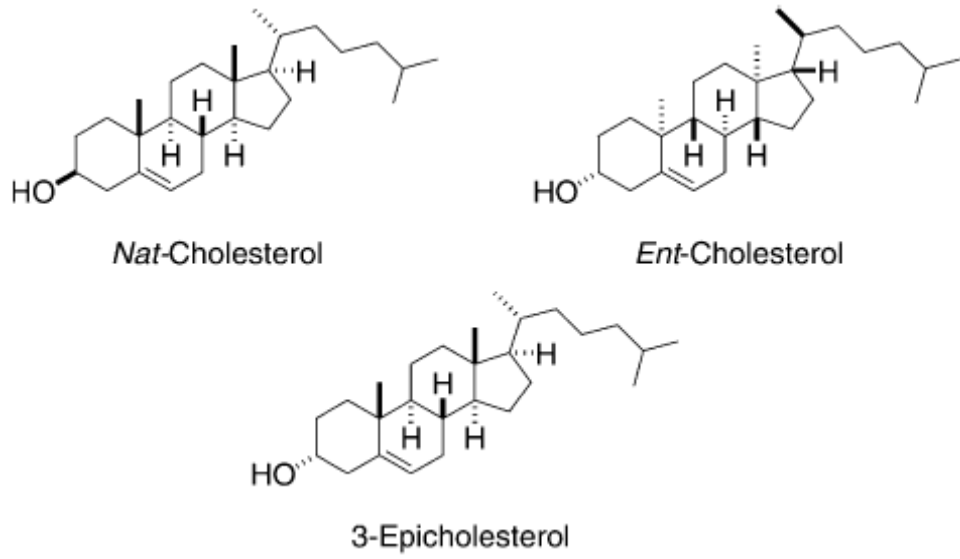


Şekil 2.1 Kolesterol molekülü ve atomların numaralandırması [97]

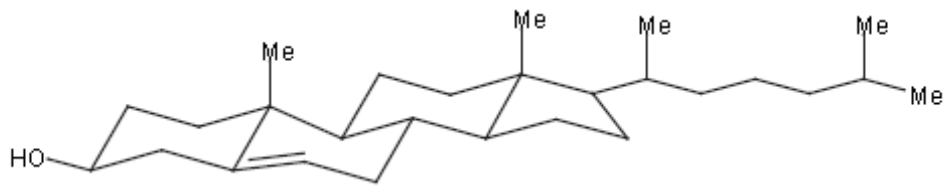
Amfipatik yapıya sahip olan kolesterol, polar bir baş ve apolar karakterde hidrokarbon gövdeden oluşmaktadır. Kolesterol, 3 numaralı karbon atomu üzerinde hidroksil grubu, 5 ve 6 numaralı karbon atomları arasında çift bağ, 10 ve 13 numaralı karbon atomları üzerinde metil grubu ve yan zincir olarak 17 numaralı karbon atomu üzerinde izooktil grubunu taşımaktadır. Polar baş kısmında yer alan 3 numaralı karbondaki hidroksil grubu ile 5 ve 6 numaralı karbon atomları arasında yer alan çift bağ molekülün reaktif kısımlarını oluşturmaktadır [12,98].

Halka çekirdeğine bağlanan ek gruplar halka düzleminin üstünde veya altında yer alabilirler. Bunun sonucunda aynı bileşik için iki farklı konfigürasyon ortaya çıkabilmektedir. Ek grupların halka düzlemini üzerinde yer alması β konfigürasyonudur ve düz çizgi ile gösterilir. Halka düzleminin altında yer alması ise α konfigürasyonu olarak adlandırılır ve kesikli çizgi ile gösterilir [12]. Kolesterol

molekülünde 3, 8, 9, 10, 13, 14, 17 ve 20 numaralı karbon atomları üzerinde toplam 8 tane α ve β konfigürasyon farklılığı bulunmaktadır. Kolesterolde 3 numaralı karbondaki -OH β , 8 numaralı karbondaki -H β , 9 numaralı karbondaki H α , 10 numaralı karbondaki -CH₃ β , 13 numaralı karbondaki -CH₃ β , 14 numaralı karbondaki -H α , 17 numaralı karbondaki -H α ve 20 numaralı karbondaki -CH₃ α pozisyonundadır. Moleküller sahip oldukları stereojenik merkez sayısına (n) göre 2^n tane konfigürasyonel stereoizomere sahip olduğundan kolesterol için 256 tane stereoizomer muhtemeldir [14].



Şekil 2.2 Kolesterol ile enantiomerinin ve diastereomerinin yapıları [4]



Şekil 2.3 Kolesterol molekülünde halkaların pozisyonları [99]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kolesterol Örnekleri

Üç farklı kolesterol örneği ile deneyler yürütüldü. Örnek 1 (K1), \geq %99 saflığa sahip olan kolesterol kromatografi standartıdır (Sigma, C8667, Saint Louis, Missouri, USA). Örnek 2 (K2), \sim %99 saflıkta olan domuz karaciğerinden elde edilmiş olan kolesterol, (Sigma, C3137, Saint Louis, Missouri, USA), Örnek 3 (K3), %95 saflıktaki koyun yün yağından elde edilmiş olan kolesteroldür (Acros Organics, 110190050, NewJersey, USA).

3.1.2. HPLC Cihazı ve Kolonları

HPLC analizleri manuel enjeksiyonlu Agilent 1100 (Agilent Technologies, Inc. Headquarters, Santa Clara, United States) cihazı ile yapıldı. Çalışmalar, C18 kolon (250x4.6 mm, 5 μ m) (ACE, ACE-121-2546, Aberdeen, Scotland), permetillenmiş gama-siklodekstrin kiral kolon (200x4.6 mm, 5 μ m) (Macherey Nagel, Nucleodex γ -PM, 720752.40, Düren, Germany) ve amiloz tris-(3,5-dimetilfenilkarbammat) kiral kolon (250x4.6 mm, 5 μ m) (Macherey Nagel, Nucleocel Alpha S, 720645.46, Düren, Germany) olmak üzere toplam üç kolon ile yürütüldü.

3.1.3. Diğer Gereçler

Mobil fazların hazırlanmasında HPLC derecesinde saflığa sahip olan izopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), hekzan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ve asetonitril (JT Baker, Deventer, Holland) kullanıldı. Mobil fazlara eklenen siklodekstrinler, α -siklodekstrin (Wacker-Chemie AG, Alpha W6, Burghausen, Germany), β -siklodekstrin (Wacker-Chemie AG, Cavamax W7, Burghausen, Germany), β -metilsiklodekstrin (Wacker-Chemie AG, Cavalosol W7 M, Burghausen, Germany), β -hidroksipropilsiklodekstrin (Wacker-Chemie AG, Cavalosol W7 HP Pharma, Burghausen, Germany), γ -siklodekstrin (Wacker-Chemie AG, Gamma W8 Pharma, Burghausen, Germany) ve γ -hidroksipropilsiklodekstrin (Wacker-Chemie AG, Cavalosol W8 HP Pharma, Burghausen, Germany)' den sağlandı. Mobil faz bileşiminde kullanılan su, saf su cihazından (New Human Power

I, Human Corporation, Seoul, Korea) alındı. Mobil fazlar 0.45µm' lik naylon membranlardan (Alltech Associates Inc., Illionis, USA) süzüldü, ultrasonik banyoda (Bandelin Electronic, Heinrichstraße 3-4, Berlin, Germany) degaze edildi. UV' de bekletilen örnekler için kabinli UV lamba (Model UVGL-58, UVP Upland, USA) kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan üç farklı HPLC kolonu için ve değişik deney koşulları için ayrı kolesterol örnekleri hazırlandı. Kullanılacak olan HPLC kolonu ile uyumlu mobil faz seçenekleri, literatür taramaları ve bununla uygunluk gösteren denemeler sonucunda belirlendi. Her kolon için uygun mobil faz belirlendikten sonra, K1, K2 ve K3 mobil fazda çözülerek hazırlandı. Hazırlanan K1, K2 ve K3 dört farklı deney koşulu için ayrı ayrı hazırlandı. Her bir kolesterol örneğinden dört farklı analiz için dört farklı çözelti hazırlandı. Bunlar, yeni hazırlanmış kolesterol çözeltileri, UV uygulamasında kullanılacak kolesterol çözeltileri, oda sıcaklığında bekletilecek kolesterol çözeltileri ve +4 °C' de bekletilecek olan kolesterol çözeltileridir (Şekil 3.1 ve 3.2).

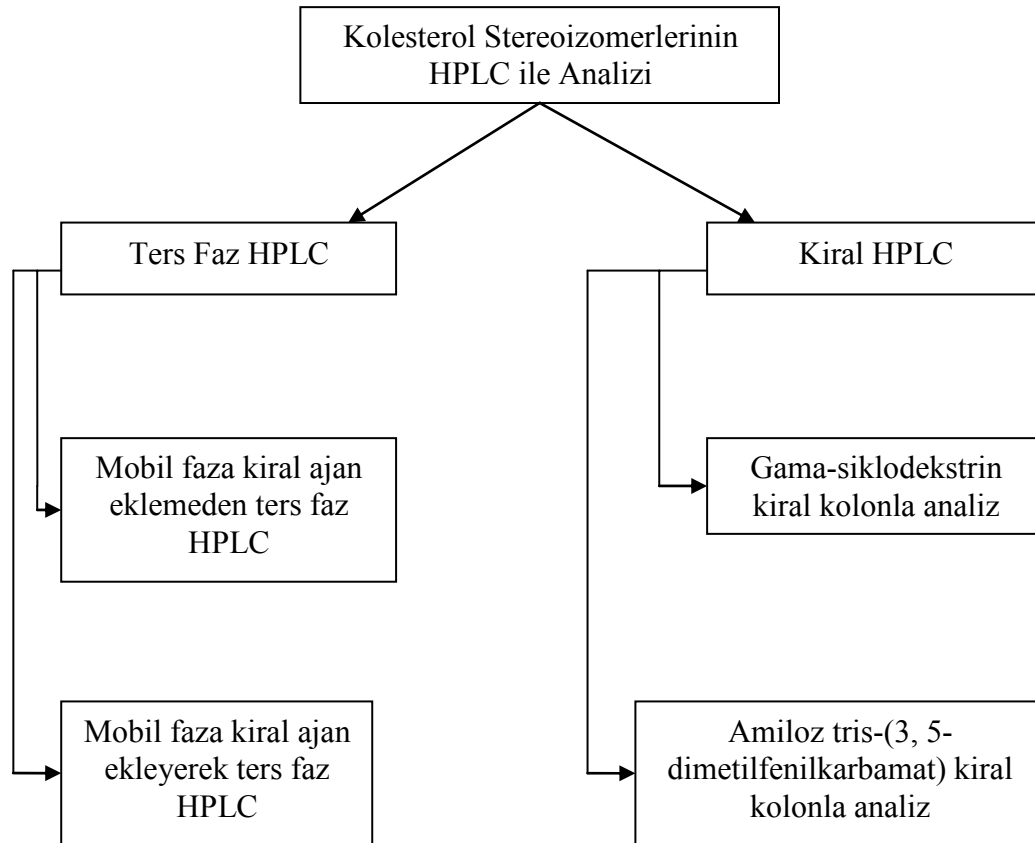
3.2.2. Mobil Fazın Hazırlanması

Literatür taramaları sonucunda belirlenen ve tarafımızdan denenen tüm mobil fazların hazırlanmasında HPLC derecesinde saflığa sahip olan solventler kullanıldı. Mobil faz bileşiminde kullanılan deiyonize su ultra saf su cihazından alındı. Bileşimlerine uygun olarak hazırlanan tüm mobil fazlar vakum altında 0.45µm' lik naylon membranlardan süzüldükten sonra 20 dakika süre ile ultrasonik banyoda degaze edildi.

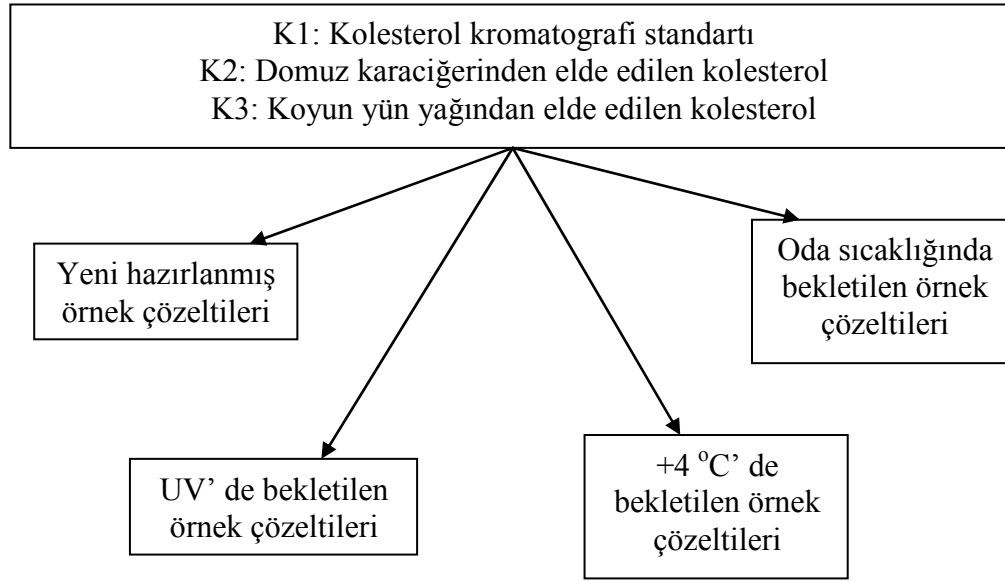
3.2.3. Kolonların Şartlandırılması

Kullanılan HPLC kolonlarının öncelikle mobil faz ile dengeye gelmesi gerekmektedir. Mobil faz sisteme bağlandıktan sonra mobil faz rezervuarından kolon girişine kadar olan boru sisteminde kalmış olabilecek hava kabarcıkları kolona ve

sonrasında dedektöre ulaşmadan uzaklaştırıldı. Purge adı verilen bu işleminden sonra uygun kromatografik koşullar altında kolon mobil faz ile şartlandırıldı, dedektör sinyalleri temel çizgide dengeye gelene kadar kolondan yaklaşık 1 saat mobil faz geçirilmeye devam edildi.



Şekil 3.1 Genel Deney Organizasyonu



Şekil 3.2 Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması

3.3. HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Stereoizomer Analizleri

3.3.1. Ters Faz HPLC ile Analizleri

3.3.1.1. Kromatografik Parametreler

C18 kolon ile yapılan bütün analizlerde mobil fazın İzopropanol:Asetonitril:Su (60:30:10, v:v:v), akış hızının 1 mL/dk ve UV dalga boyunun 210 nm olduğu kromatografik parametreler kullanıldı [100]. Kolesterol çözeltilerinden alınan 100 µL' lik örnekler cihaza yüklendi.

3.3.1.2. Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması

Üç kolesterol örneği mobil fazda çözülerek 200 ppm konsantrasyondaki yeni hazırlanmış kolesterol çözeltilerinden alınan örnekler cihaza yüklendikten sonra analiz başlatıldı.

Mobil fazda çözümlenerek ile hazırlanan üç örneğe ait 200 ppm konsantrasyondaki kolesterol çözeltilerinin 25 mL' lik kısmı ağzı açık şekilde petri kutusuna konularak 1 saat UV ışığı altında bekletildi. 1 saat sonunda buharlaşma nedeniyle eksilen hacim izopropanol : asetonitril : su (60:30:10, v:v:v) ilavesi ile başlangıç hacmine getirilerek örneklerin HPLC analizi yapıldı. Hacmi tamamlanan örnekler bu defa UV ışığı altında 2 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda yine hacim izopropanol: asetonitril: su (60:30:10, v:v:v) ilavesi ile başlangıç hacmine getirilerek HPLC analizi yapıldı.

Üç örneğin mobil fazda çözülmesi ile hazırlanan 200 ppm konsantrasyondaki kolesterol çözeltileri iki kısma ayrıldı. Bunlardan biri balon joje içerisinde ağzı hava almayacak şekilde 1 ay süreyle oda sıcaklığında bekletildikten, diğeri de +4 °C' de bekletildikten sonra analizleri yapıldı.

3.3.2. Mobil Faza Siklodekstrin Eklenecek Yapılan Ters Faz HPLC Analizleri

Kolesterolün stereoizomerik ayrımları için mobil faza kiral ajan olan çeşitli siklodekstrinler eklenerek ters faz HPLC ile analizleri gerçekleştirildi. Bu çalışmada C18 kolon için uygulanan kromatografik parametreler kullanıldı [100]. Farklı olarak mobil faza % 0.01 oranında çeşitli siklodekstrinler eklendi.

Mobil fazda çözümlenerek hazırlanan üç farklı örneğe ait yeni hazırlanmış kolesterol çözeltilerinden alınan 100 µL' lik örnekler cihaza yüklendi.

3.3.3. Permetillenmiş γ-siklodekstrin Kolon ile HPLC Analizleri

Enantiomerlerin kiral kromatografi sistemleri ile ayırımı, kiral mobil faz kullanılarak kiral olmayan sabit faz üzerinde veya daha yaygın olarak, kiral sabit faz üzerinde kiral olmayan mobil faz kullanılarak yapılır. Kimyasal ve fiziksel özellikleri aynı olan enantiomerlere mobil fazla veya sabit fazla bir kiral merkezin daha eklenmesi ile diastereomer oluşumu metodun temelini oluşturmaktadır. Fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı olan diastereomerler kromatografik sistemde birbirlerinden ayrılabilir [96].

3.3.3.1. Kromatografik Parametreler

Gamma-CD kolon ile yapılan bütün analizlerde mobil fazın İzopropanol:Asetonitril:Su (60:30:10, v:v:v), akış hızının 1 mL/dk ve UV dalga boyunun 210 nm olduğu kromatografik parametreler kullanıldı. Kolesterol çözeltilerinden 100 µL' lik enjektör ile alınan örnekler cihaza yüklendi.

3.3.3.2. Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması

Üç kolesterol örneği mobil fazda 500 ppm konsantrasyonda hazırlandı.

Mobil fazda hazırlanan üç örneğin 500 ppm' lik çözeltilerinin 25 mL' lik kısmı ağız açık şekilde petri kutusuna konularak 1 saat UV ışığı altında bekletildi. 1 saat sonunda izopropanol : asetonitril : su (60:30:10, v:v:v) ilavesi ile başlangıç hacmine getirilerek HPLC analizi yapıldı. Hacmi tamamlanan örnekler bu defa UV ışığı altında 2 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda yine hacim izopropanol: asetonitril: su (60:30:10, v:v:v) ilavesi ile başlangıç hacmine getirilerek HPLC analizi yapıldı.

Üç örneğin mobil fazda çözülmesi ile hazırlanan 500 ppm kolesterol çözeltileri, balon joje içerisinde ağızları hava almayacak şekilde kapatılarak 1 ay süreyle oda sıcaklığında ve +4 °C' de bekletildikten sonra analizleri gerçekleştirildi.

3.3.4. Amiloz tris-(3,5-dimetilfenilkarbamat) Kolon ile HPLC Analizleri

3.3.4.1. Kromatografik Parametreler

Amiloz tris-(3,5-dimetilfenilkarbamat) kolon ile yapılan bütün analizlerde mobil fazın Hekzan: İzopropanol (90:10, v:v), akış hızının 1 mL/dk ve UV dalga boyunun 210 nm olduğu kromatografik parametreler kullanıldı [101]. Kolesterol çözeltilerinden alınan 100 µL' lik örnekler cihaza yüklendi.

3.3.4.2. Kolesterol Örneklerinin Hazırlanması

Üç kolesterol örneği mobil fazda 500 ppm konsantrasyonda hazırlandı.

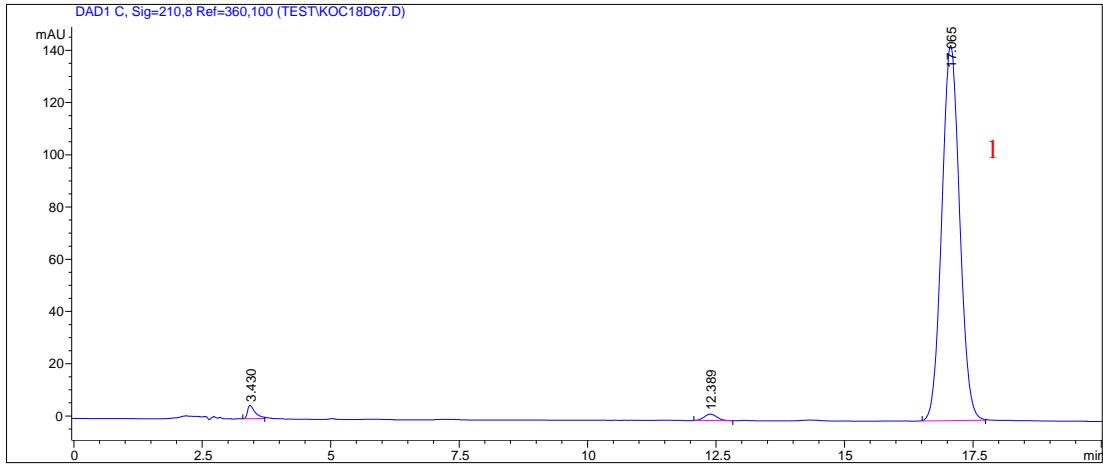
Mobil fazda çözümlenerek hazırlanan üç örneğe ait 500 ppm kolesterol çözeltilerinin 25 mL' lik kısmı ağız açık şekilde petri kutusuna konularak 1 saat UV ışığı altında bekletilmiştir. 1 saat sonunda hekzan: izopropanol (90:10, v:v) ilavesi ile başlangıç hacmine getirilerek HPLC analizi yapıldı. Hacmi tamamlanan örnekler bu defa UV ışığı altında 2 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda yine hacim hekzan : izopropanol (90:10, v:v) ilavesi ile başlangıç hacmine getirilerek HPLC analizi gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

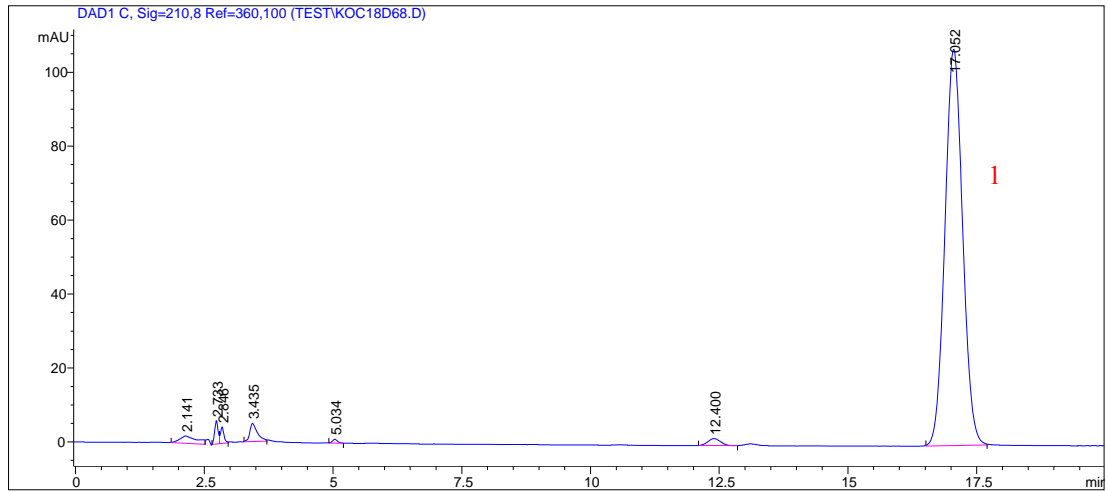
4.1. Ters Faz HPLC Metod Validasyonu

Ters faz HPLC analizlerinde kullanılacak olan metodun validasyonu için örnekler arası ve örnek içi ölçümler yapıldı. Bu amaçla K1 örneğinin mobil fazda çözülerek hazırlanan 50, 100, 200, 400 ve 500 ppm konsantrasyondaki çözeltileri kullanıldı.

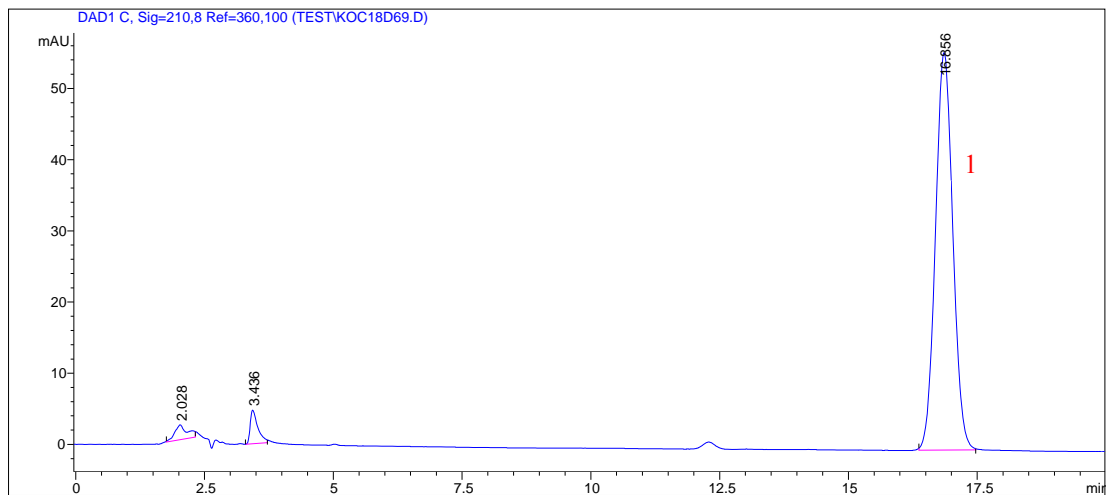
Örnekler arası ölçümler yapılırken 50, 100, 200, 400 ve 500 ppm konsantrasyondaki çözeltilerin 1 numaralı kolesterol piklerinin alanları karşılaştırıldı (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5).



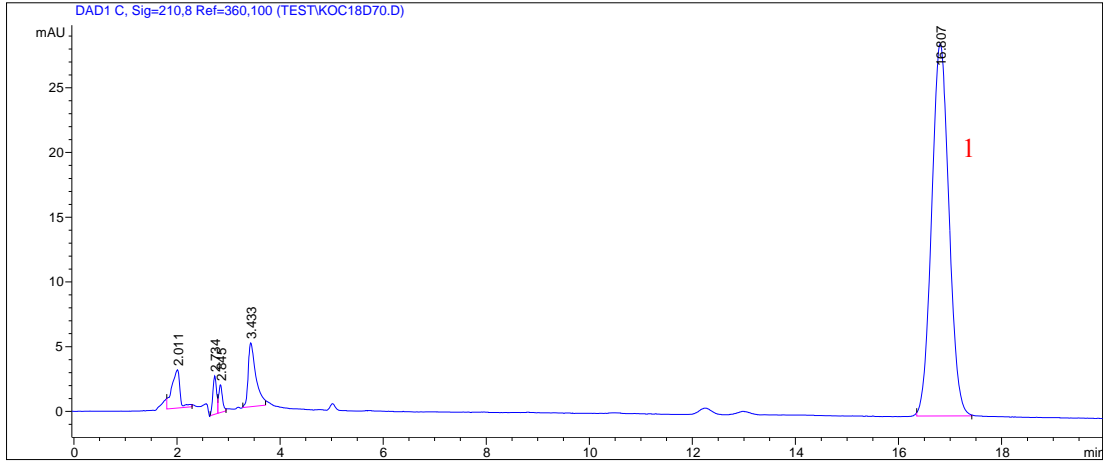
Şekil 4.1 500 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram. Mobil Faz: İzopropanol : asetonitril : su (60:30:10, v:v:v), Akış Hızı: 1 mL/dk, UV: 210 nm



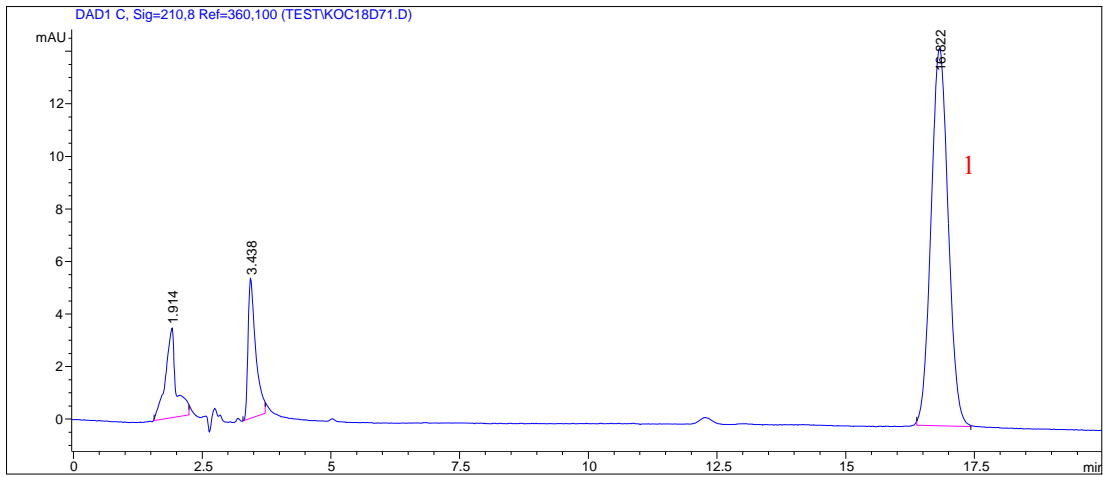
Şekil 4.2 400 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram



Şekil 4.3 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram



Şekil 4.4 100 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram.

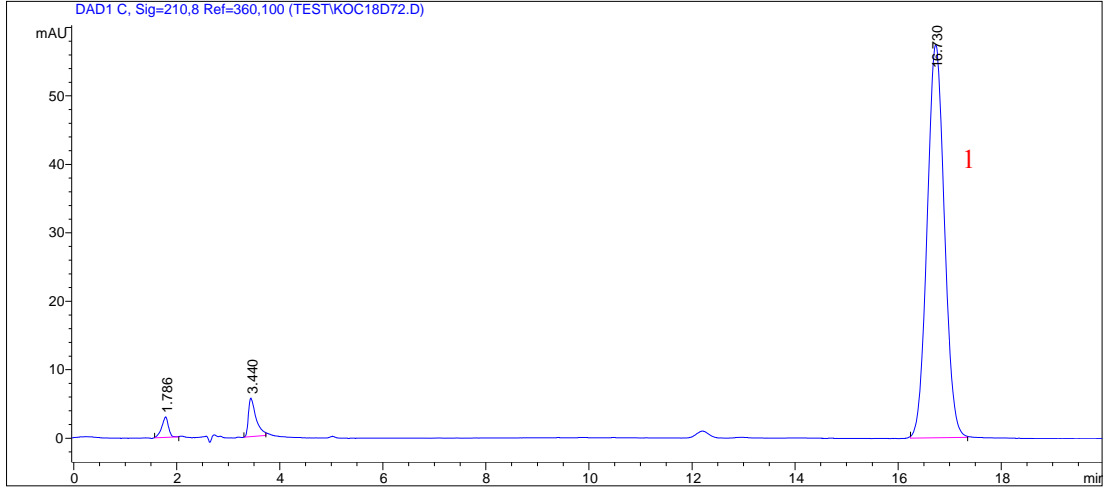


Şekil 4.5 50 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram

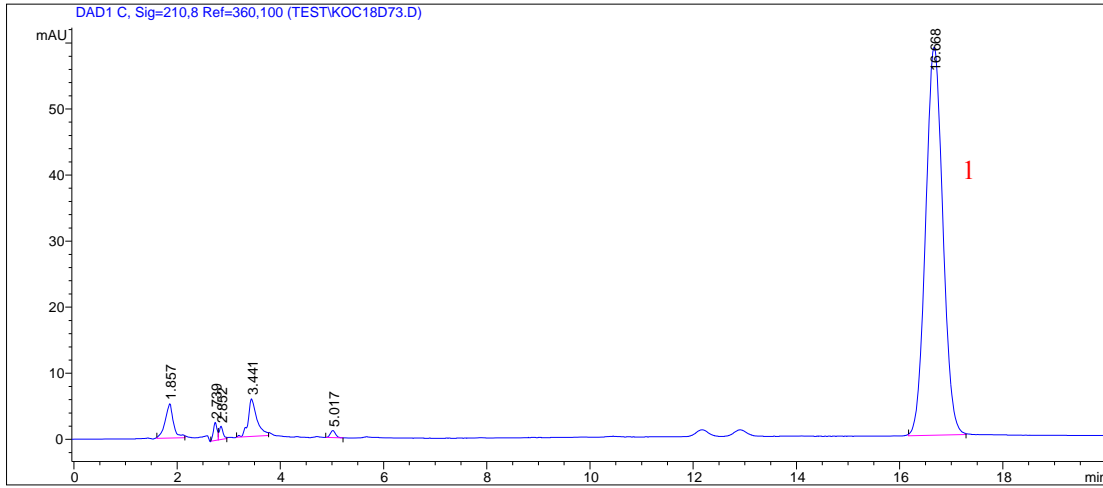
Tablo 4. 1 Örnekler arası ölçümlerde belirlenen sapmalar

Kolesterol örnek konsantrasyonları	Gözlenen pik alanı	Beklenen pik alanı	% Sapma
50 ppm	332.067	332.067	0
100 ppm	669.917	664.134	+ 0.87
200 ppm	1304.299	1328.268	- 1.80
400 ppm	2553.377	2656.536	- 3.88
500 ppm	3463.469	3320.670	+ 4.30

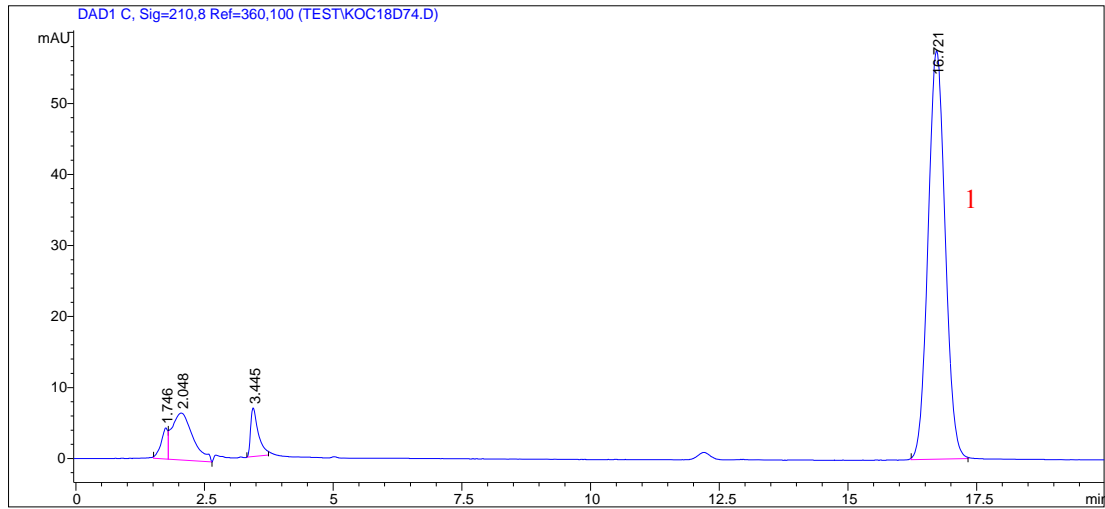
Örnek içi ölçümler, K1 örneğinin 200 ppm konsantrasyondaki çözeltisinin 5 kez analiz edilerek 1 numaralı kolesterol piklerinin alanlarının karşılaştırılması ile belirlendi (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10).



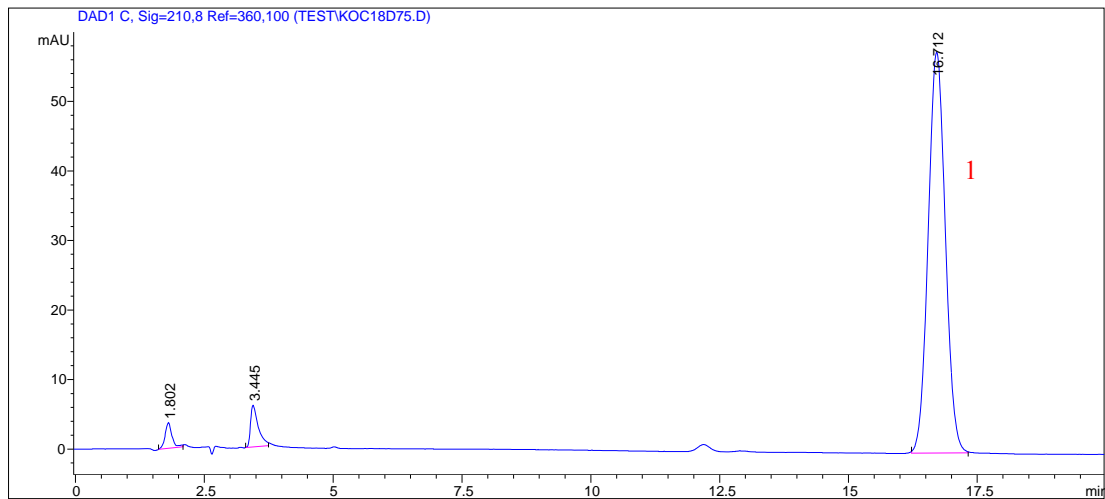
Şekil 4.6 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile I. analizine ait kromatogram Mobil Faz: İzopropanol : asetonitril : su (60:30:10, v:v:v), Akış Hızı: 1 mL/dk, UV: 210 nm



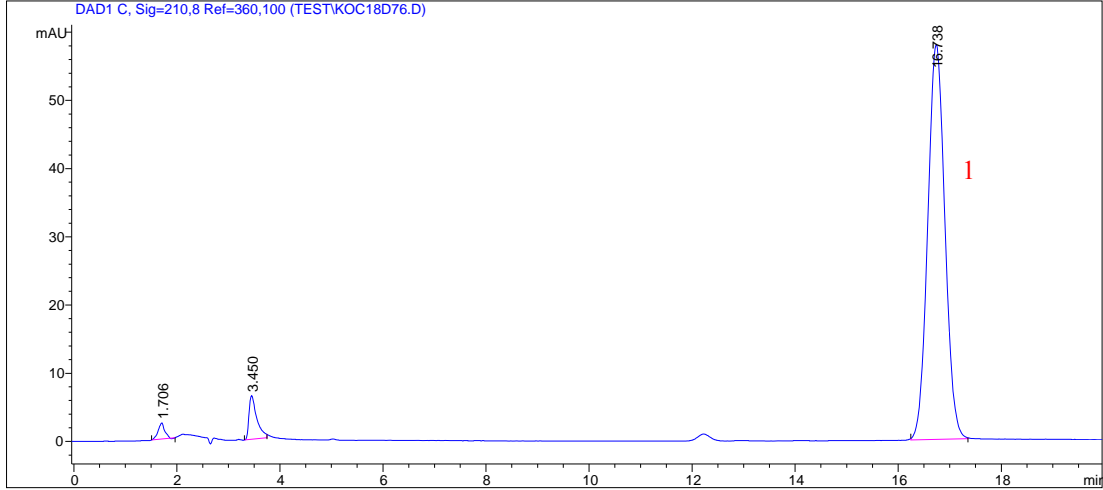
Şekil 4.7 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile II. analizine ait kromatogram



Şekil 4.8 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile III. analizine ait kromatogram



Şekil 4.9 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile IV. analizine ait kromatogram



Şekil 4.10 200 ppm konsantrasyondaki K1' in ters faz HPLC ile V. analizine ait kromatogram

Tablo 4.2 Örnek içi ölçümlerde gözlenen sapmalar

Yapılan Analiz	Gözlenen Pik Alanı	Ortalamadan Sapma	% Sapma
Analiz I	1331.158	-6.089	0.45
Analiz II	1357.498	+20.251	1.51
Analiz III	1328.879	-8.368	0.63
Analiz IV	1333.110	-4.137	0.31
Analiz V	1335.588	-1.659	0.12

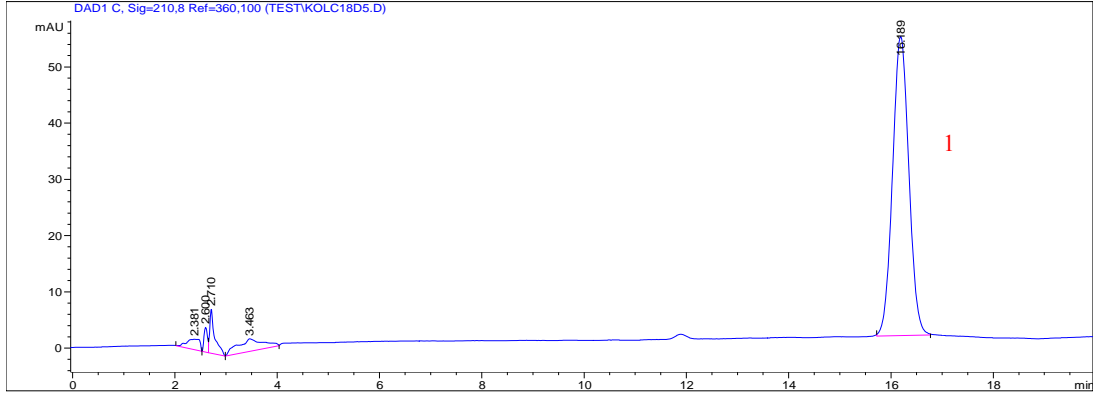
Örnek içi ölçümlerin sonucunda 1 numaralı kolesterol pikine ait pik alanı 1337.247 ± 11.58 , ölçümlerin varyasyon katsayısı ise % 0.87 olarak bulundu.

4.2. Kolesterol Örneklerinin Kromatografik Stereoizomer Analizleri

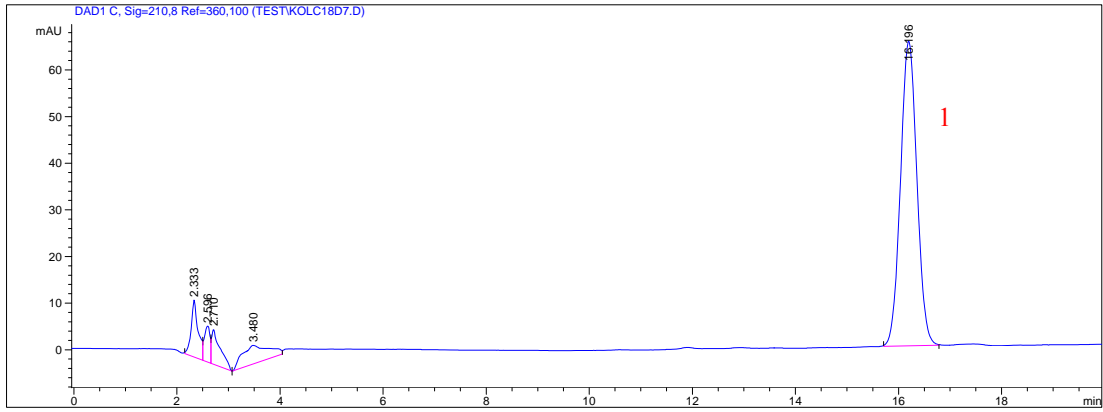
4.2.1. Ters Faz HPLC Analizleri

4.2.1.1. Yeni Hazırlanan Kolesterol Örneklerinin Stereoizomer Analizleri

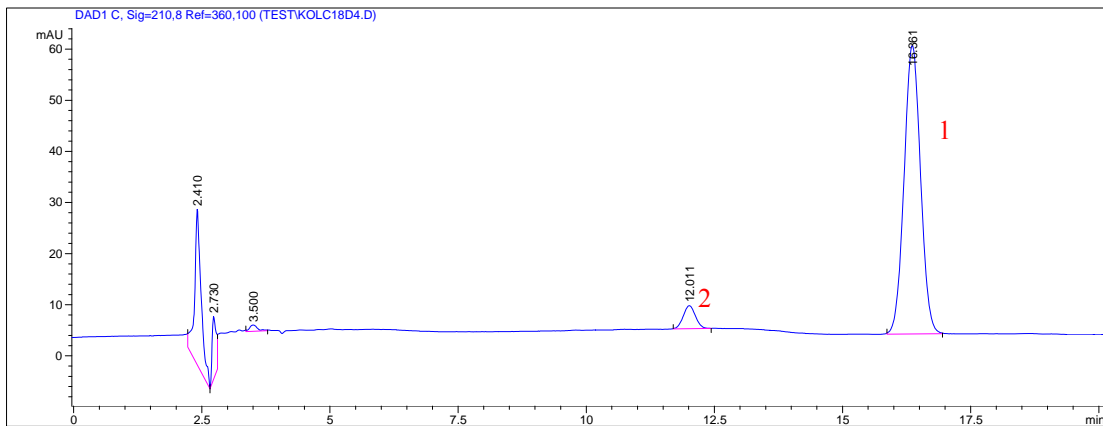
Her üç örnek için kromatogramda 1 numaralı kolesterol piki gözlemlendi (Şekil 4.11, 4.12, 4.13). Ancak K3 için diğer örneklerden farklı olarak kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik görüldü (Şekil 4.13).



Şekil 4.11 Yeni hazırlanmış K1' in ters faz HPLC ile analizine ait kromatogram
Mobil Faz: İzopropanol : asetonitril : su (60:30:10, v:v:v), Akış Hızı: 1 mL/dk,
UV: 210 nm



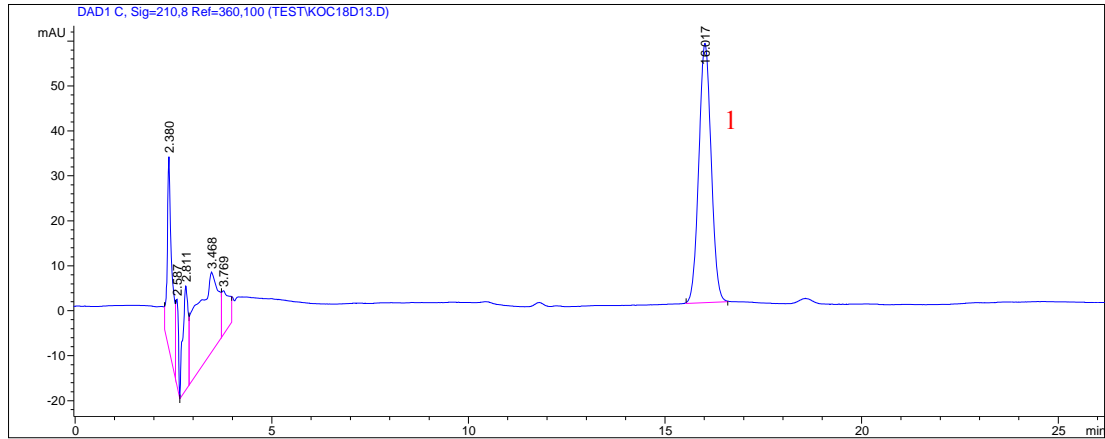
Şekil 4.12 Yeni hazırlanmış K2' nin Ters Faz HPLC ile analizine ait kromatogram
Kromatografi şartları ve pik tanımlamaları şekil 4.11' deki gibidir.



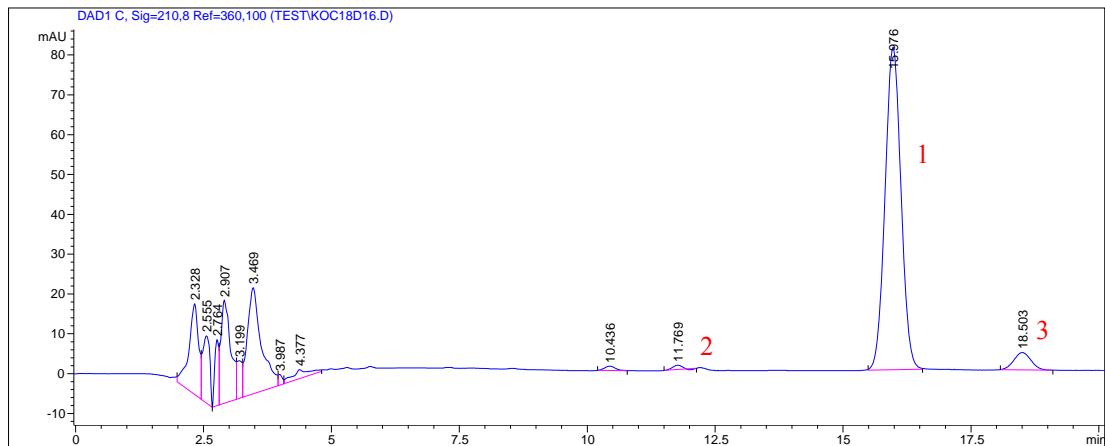
Şekil 4.13 Yeni hazırlanan K3' ün Ters Faz HPLC ile analizine ait kromatogram

4.2.1.2. UV Işınlarmın Kolesterol Örneklerine Etkisi

K1 için UV uygulamasının birinci saati sonunda 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik, sonrasında 3 numaralı pik oluşmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.14). Bunu takip eden iki saatlik UV uygulaması sonunda ise bu piklerin daha belirgin hale geldiği gözlemlendi (Şekil 4.15).



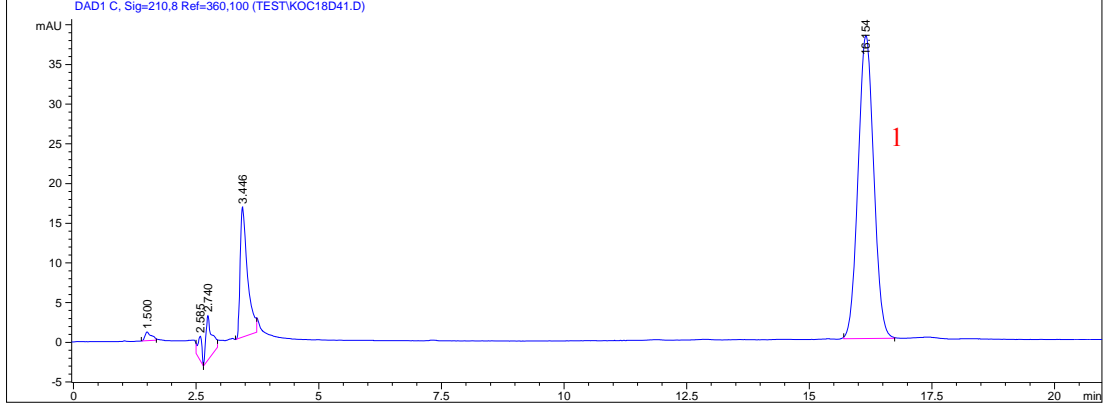
Şekil 4.14 UV' de 1 saat bekletilmiş K1' in Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram



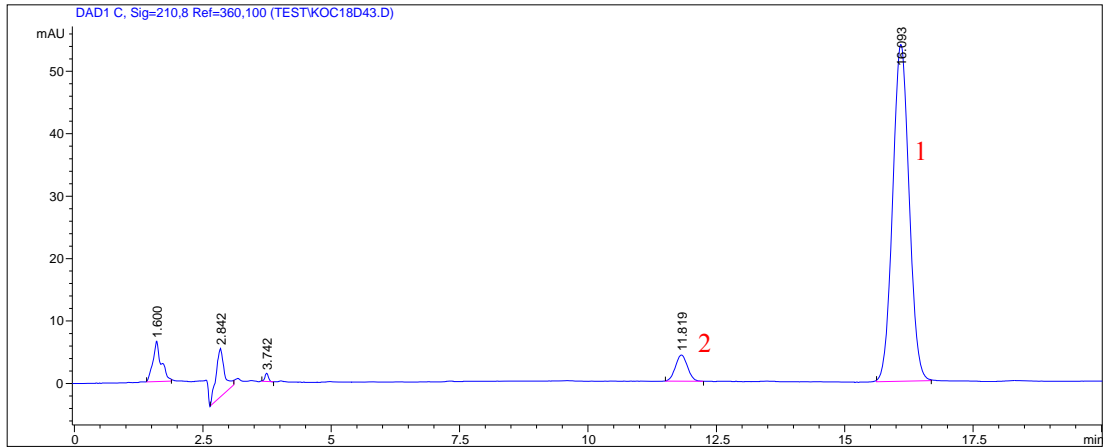
Şekil 4. 15 UV' de 1+2 saat bekletilmiş K1' in Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K2 için UV uygulamasının sonunda 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.17). K3 için UV uygulamasının belirgin bir etkisi gözlenmedi. Ancak kromatogramın ilk kısımlarında yer alan safsızlıkların miktarında değişim gözlemlendi (Şekil 4.19).

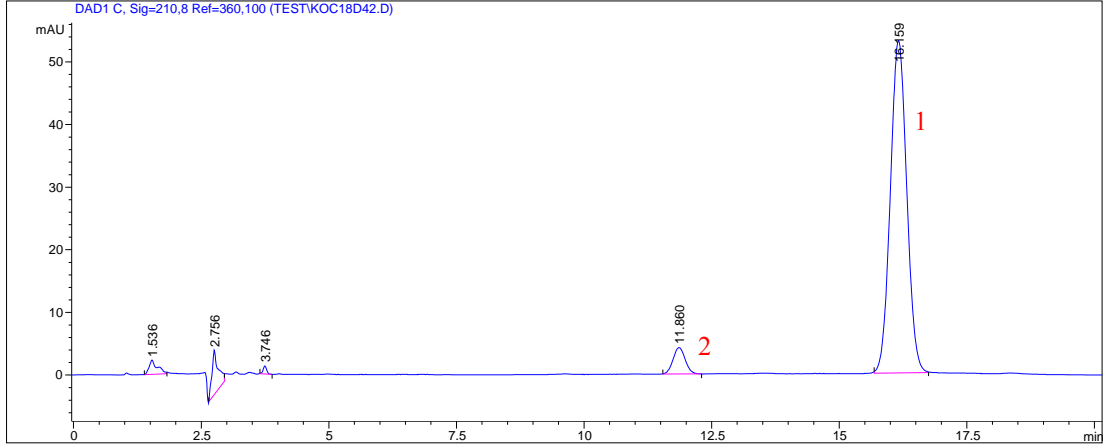
Üç örneğin UV uygulamasının her aşamasından sonra retansiyon sürelerinin kısaldığı ve piklerin daha polar karakter kazandığı gözlemlendi.



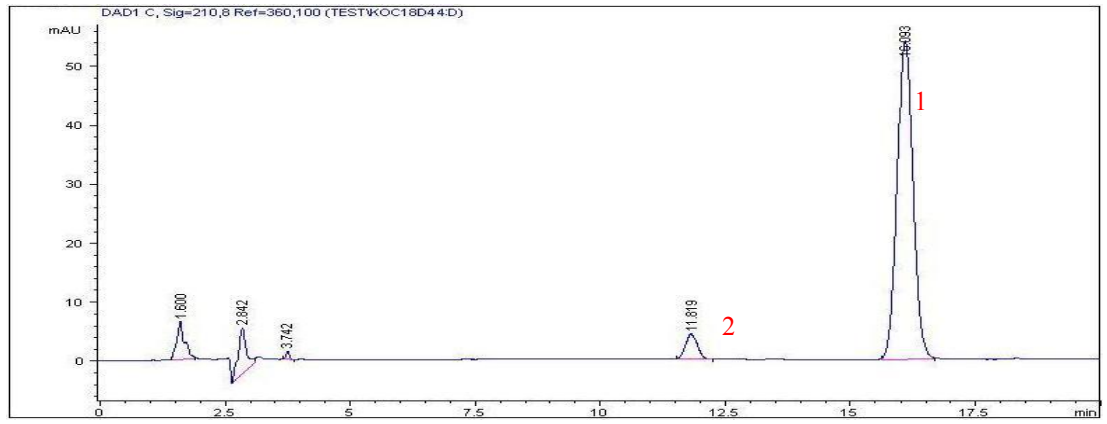
Şekil 4.16 UV' de 1 saat bekletilmiş K2' nin Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram



Şekil 4. 17 UV' de 1+2 saat bekletilmiş K2' nin Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram



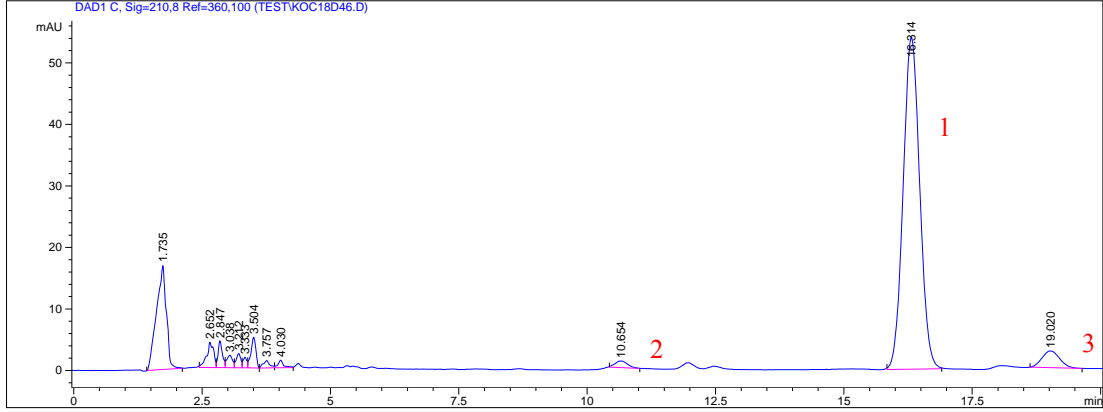
Şekil 4.18 UV’ de 1 saat bekletilmiş K3’ ün Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram



Şekil 4. 19 UV’ de 1+2 saat bekletilmiş K3’ ün Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

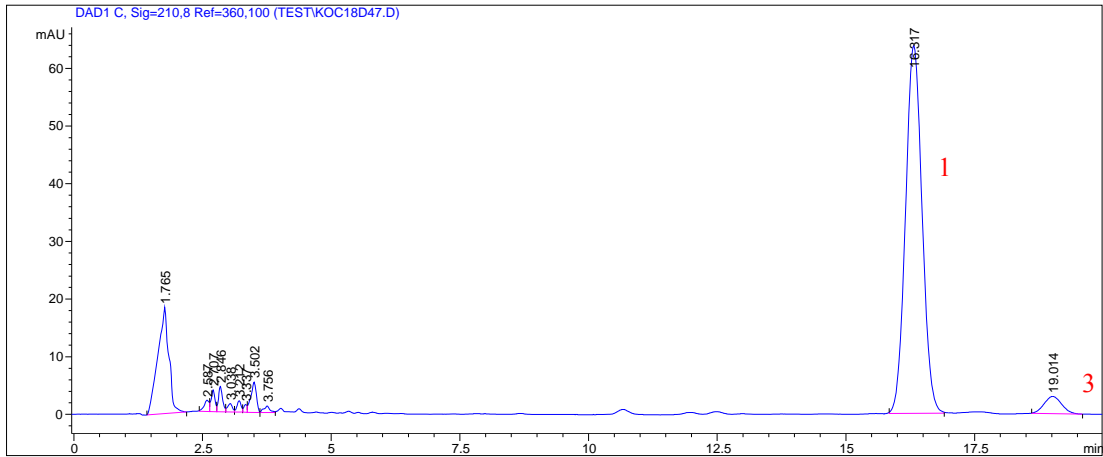
4.2.1.3. Oda Sıcaklığında Bekletmenin Kolesterol Örneklerine Etkisi

K1 için, 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik, sonrasında ise 3 numaralı pikin oluştuğu görüldü. Oda sıcaklığında bekleme sonucunda piklerin retansiyon sürelerinin uzadığı ve dolayısıyla daha apolar karakter kazandığı görüldü (Şekil 4.20).



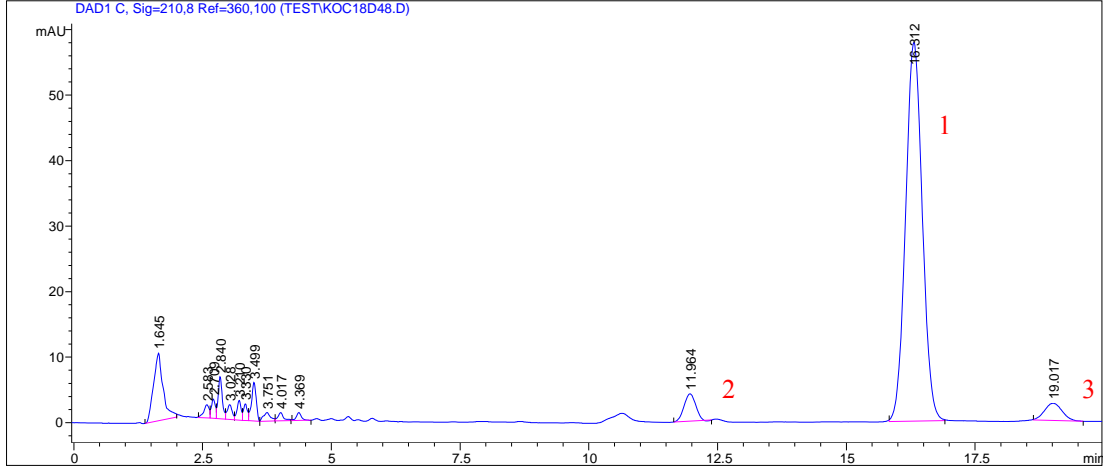
Şekil 4.20 Oda Sıcaklığında 1 Ay bekletilmiş K1' in Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K2 için, 1 numaralı kolesterol piki sonrasında ortaya çıkan 3 numaralı pik belirgin şekilde ölçülürken öncesindeki pikler ölçülememesine rağmen değişiklik göze çarpmaktadır (Şekil 4.21).



Şekil 4. 21 Oda Sıcaklığında 1 Ay bekletilmiş K2' nin Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

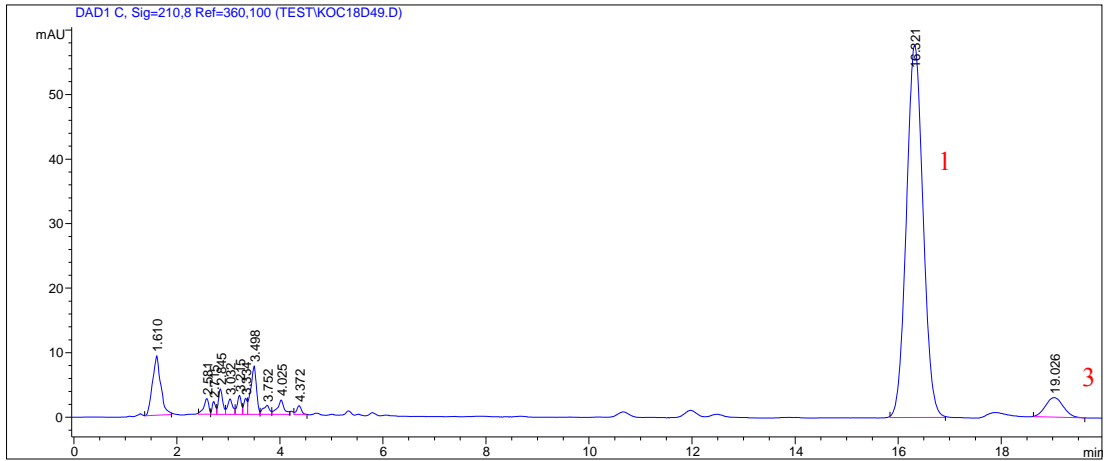
K3 için, 1 numaralı kolesterol piki sonrasında daha önceden gözlemlenmeyen 3 numaralı pik ortaya çıktı (Şekil 4.22).



Şekil 4. 22 Oda Sıcaklığında 1 Ay Bekletilmiş K3' ün Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

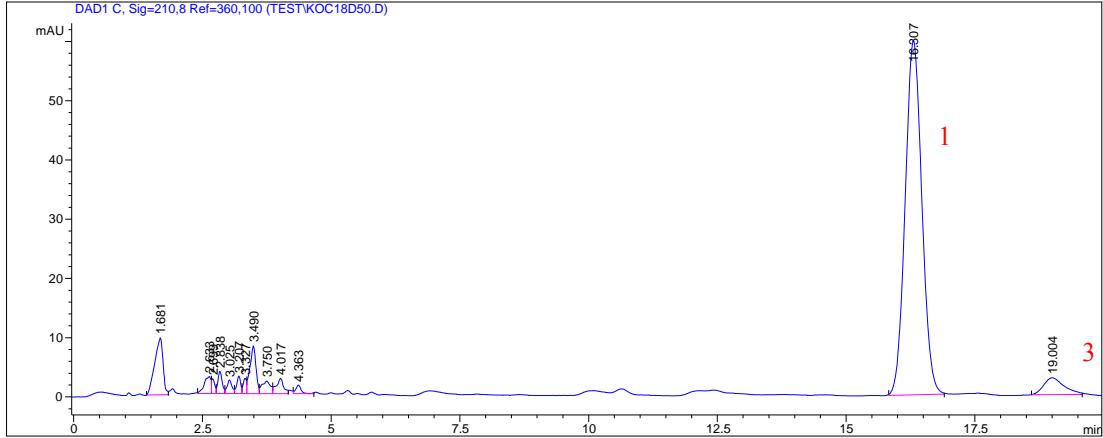
4.2.1.4. +4 °C' de Bekletmenin Kolesterol Örneklerine Etkisi

K1 için, 1 numaralı kolesterol pikinin sonrasında daha önce gözlenmeyen 3 numaralı pik oluşumu gözlenirken, öncesinde ise ölçülemeyen piklerin oluşmaya başladığı görüldü. +4 °C' de bekleme ile piklerin retansiyon sürelerinin uzaması ile daha apolar karakter kazandığı görüldü (Şekil 4.23).



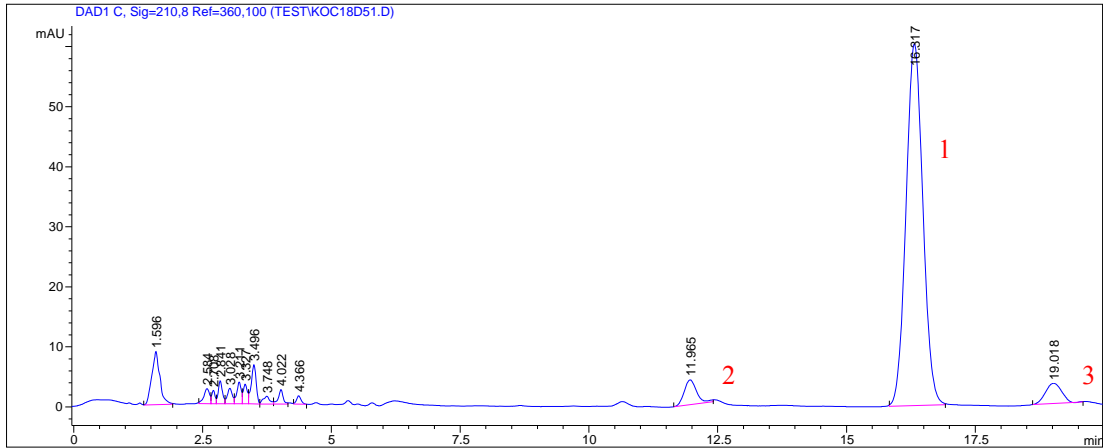
Şekil 4. 23 +4 °C' de 1 Ay Bekletilmiş K1' in Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K2 için, 1 numaralı kolesterol piki sonrasında 3 numaralı pik ortaya çıkarken öncesindeki pikler ölçülememesine rağmen değişiklik göze çarpmaktadır. +4 °C' de bekleme ile piklerin retansiyon sürelerinin uzamasıyla daha apolar karakter kazandığı gözlemlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4. 24 +4 °C’ de 1 Ay Bekletilmiş K2’ nin Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K3 için, 1 numaralı kolesterol piki sonrasında daha önceden gözlemlenmeyen 3 numaralı pik ortaya çıktı (Şekil 4.25).



Şekil 4. 25 +4 °C’ de 1 Ay Bekletilmiş K3’ ün Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

Tablo 4. 3 Kiral ajan eklemeyen yapılan ters faz HPLC ile analizlerde görülen pikler

Kolesterol Örnekleri	Yeni hazırlanan örnekler	UV' de bekletilen örnekler		Oda sıcaklığında bekletilen örnekler	+4 °C' de bekletilen örnekler
		1 saat	1+2 saat		
Örnek 1	1	1	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 3
Örnek 2	1	1	1, 2	1, 3	1,3
Örnek 3	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2, 3	1, 2, 3

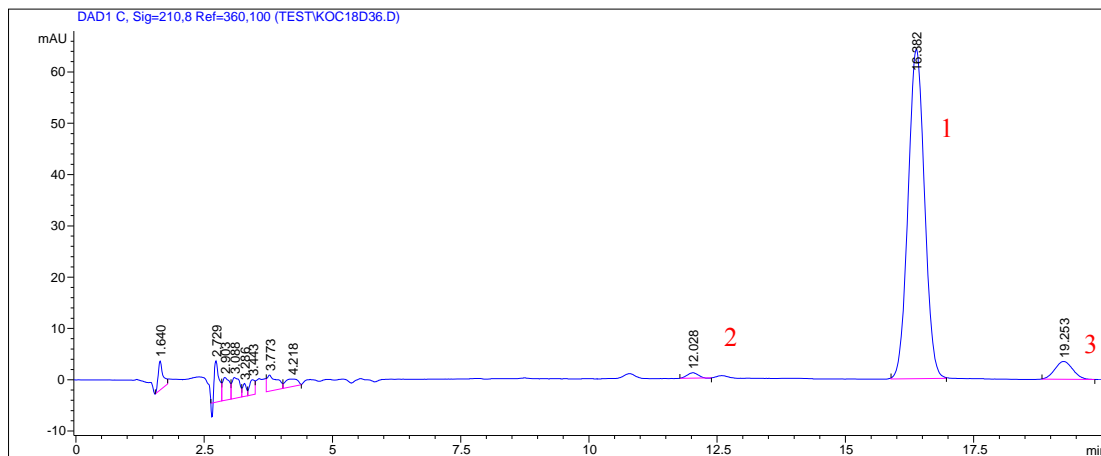
Tablo 4. 4 Kiral ajan eklemeyen tüm deney koşullarında yapılan ters faz HPLC' de görülen piklerin retansiyon süreleri

Görülen pikler	Retansiyon süreleri
2 numaralı pik	11.896 ± 0.09 (n=6)
1 numaralı pik	16.233 ± 0.12 (n=12)
3 numaralı pik	18.943 ± 0.19 (n=7)

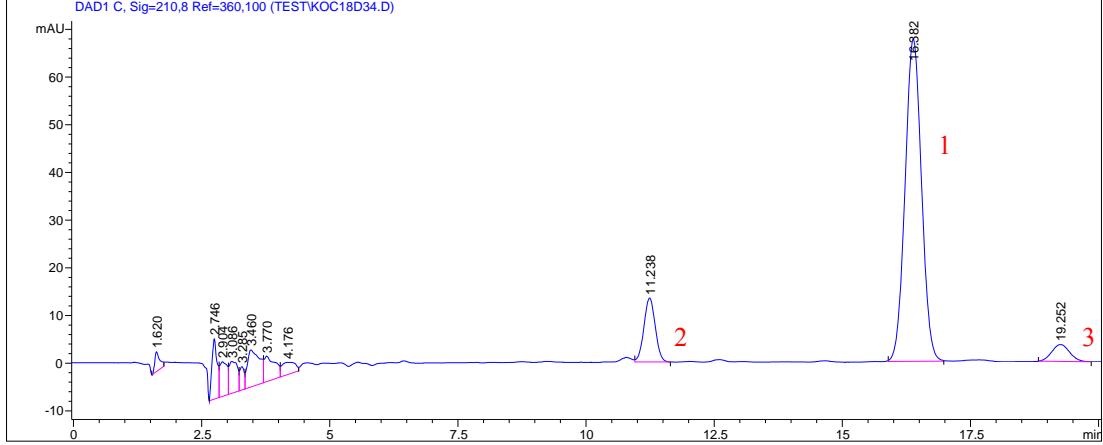
4.3. Mobil Faza Kiral Ajan Eklenecek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Stereoizomerlerinin Analizi

4.3.1. Mobil Faza α -siklodekstrin Eklenecek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri

K1 için, 1 numaralı kolesterol pikinden öncesinde 2 numaralı pik ve sonrasında ise 3 numaralı pik oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.26).

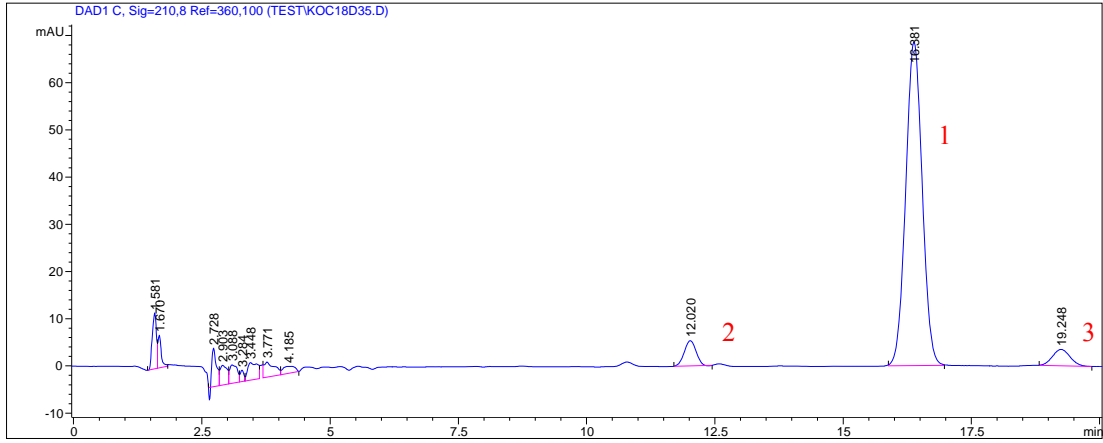
**Şekil 4. 26** Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza α -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K2 için, 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik ve sonrasında 3 numaralı pikin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4.27).



Şekil 4. 27 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza α -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

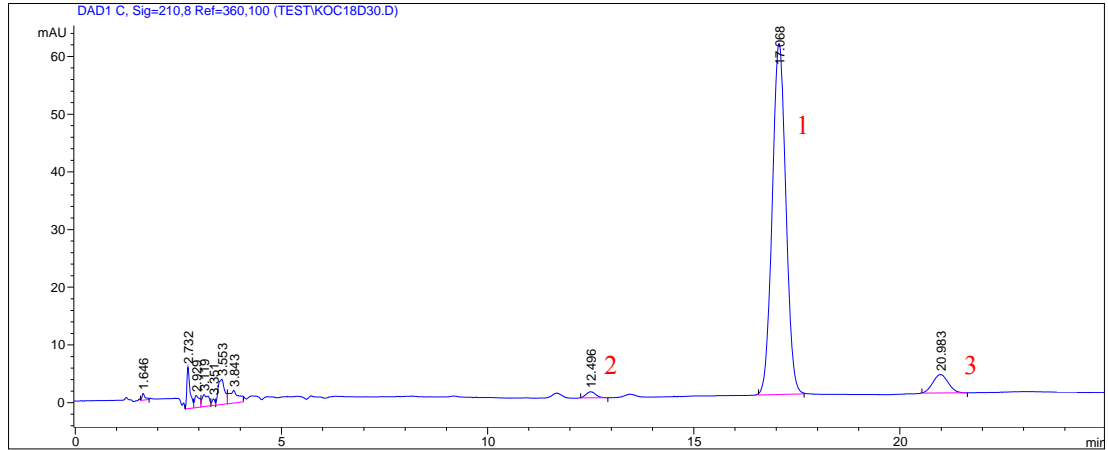
K3 için, 1 numaralı kolesterol piki sonrasında ortaya çıkan 3 numaralı pik gözlemlendi (Şekil 4.28).



Şekil 4. 28 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza α -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

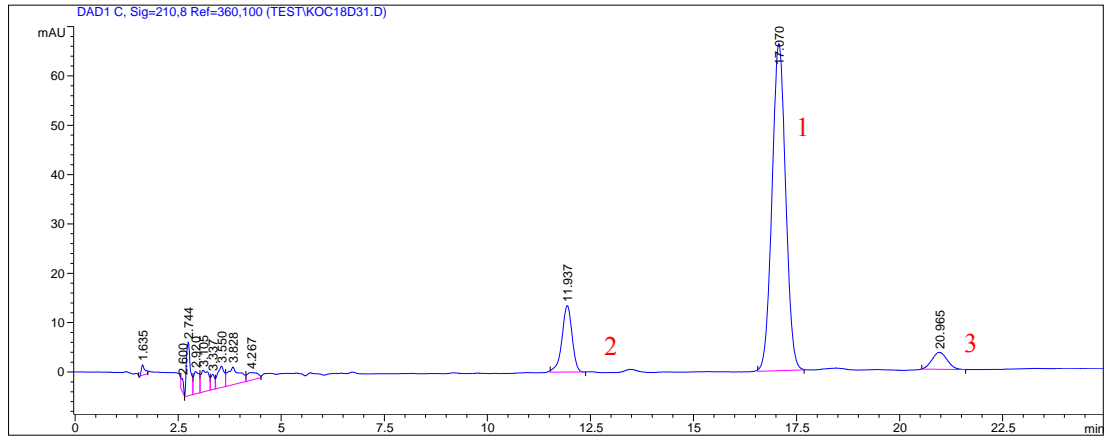
4.3.2. Mobil Faza β -siklodekstrin Eklenecek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri

K1 için, 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik ve sonrasında 3 numaralı pikin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4.29).



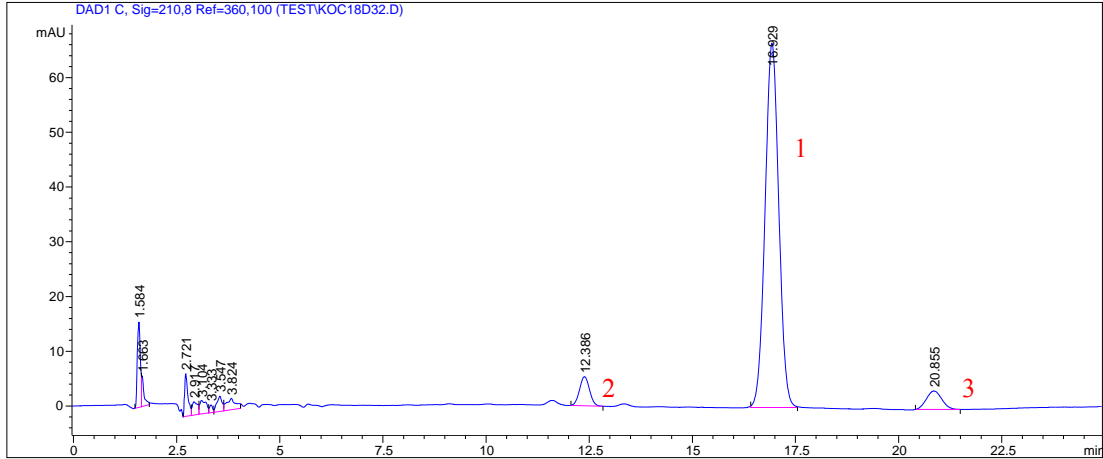
Şekil 4. 29 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza β -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K2 için, 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik ve sonrasında 3 numaralı pikin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4.30).



Şekil 4. 30 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza β -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

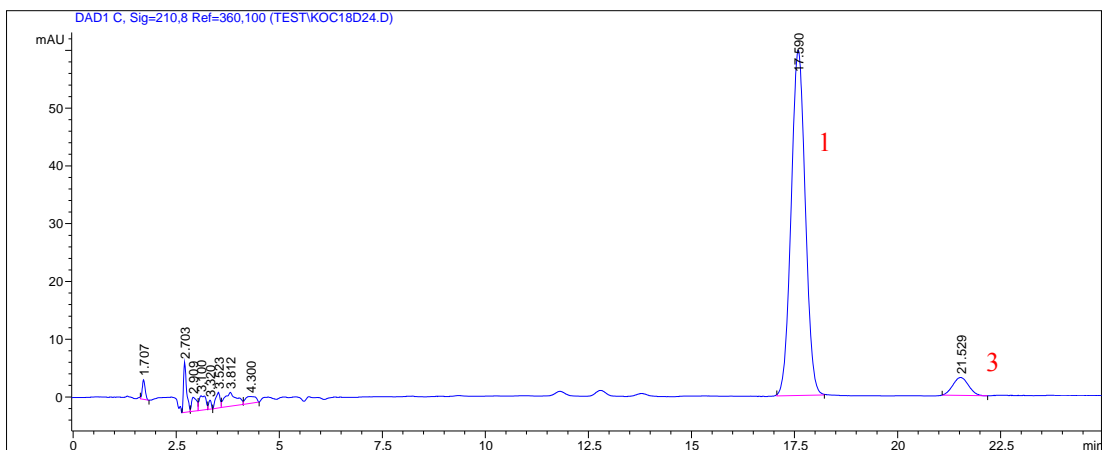
K3 için, 1 numaralı kolesterol piki sonrasında ortaya çıkan 3 numaralı pik gözlemlendi (Şekil 4.31).



Şekil 4. 31 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza β -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

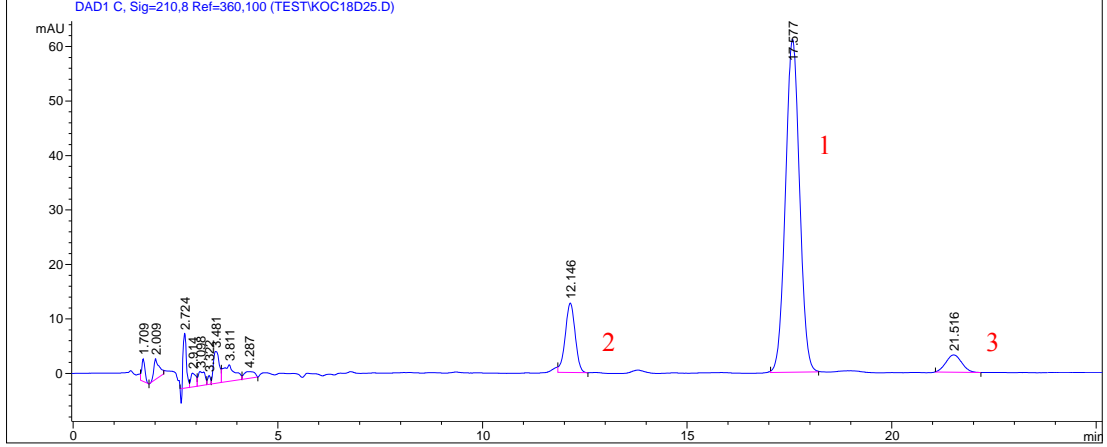
4.3.3. Mobil Faza β -metilsiklodekstrin Eklenecek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri

K1 için, 1 numaralı kolesterol pikinden sonra ortaya çıkan 3 numaralı pik oluşumu görüldü. Ancak kolesterol pikinden önce çıkan pik ölçülemediğine rağmen temel çizgide değişiklikler görüldü (Şekil 4.32).



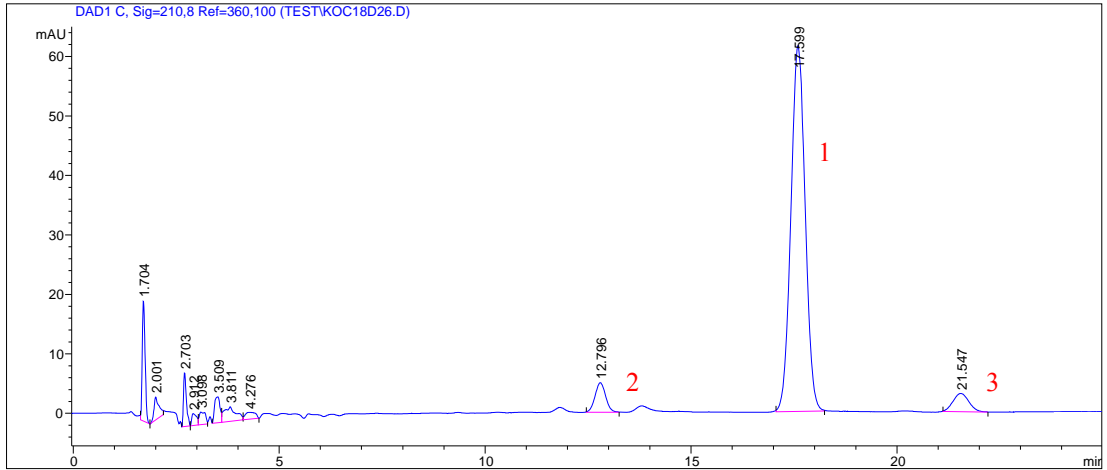
Şekil 4. 32 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza β -metilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K2 için, 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik ve sonrasında 3 numaralı pikin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4.33).



Şekil 4. 33 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza β -metilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

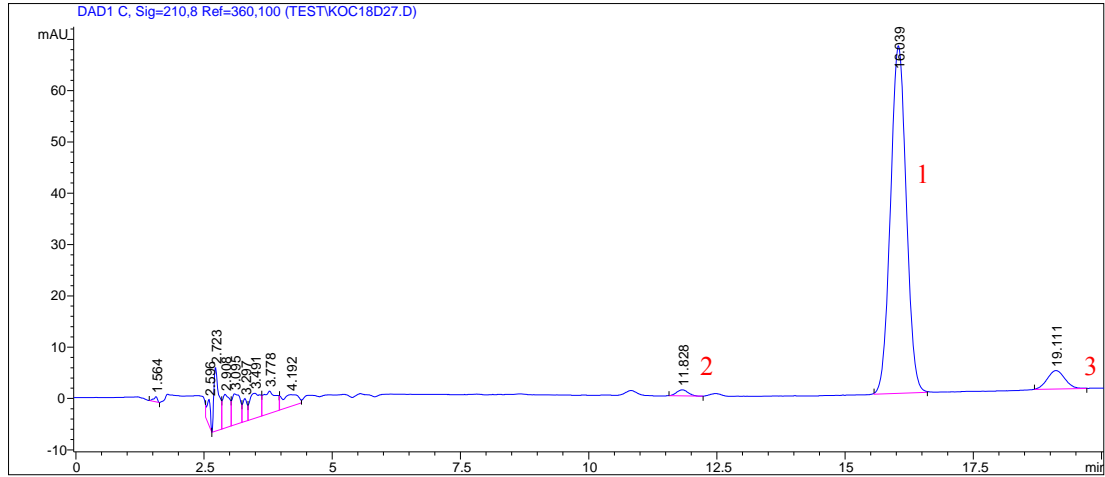
K3 için, 1 numaralı kolesterol piki sonrasında ortaya çıkan 3 numaralı pik gözlemlendi (Şekil 4.34).



Şekil 4. 34 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza β -metilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

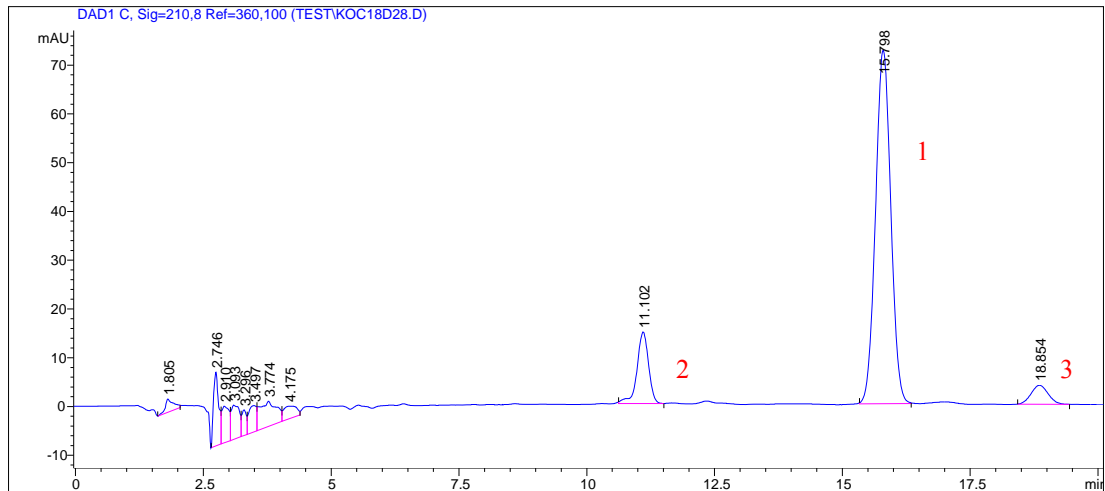
4.3.4. Mobil Faza β -hidroksipropilsiklodekstrin Eklenecek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri

K1 için, 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik ve sonrasında 3 numaralı pikin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4.35).



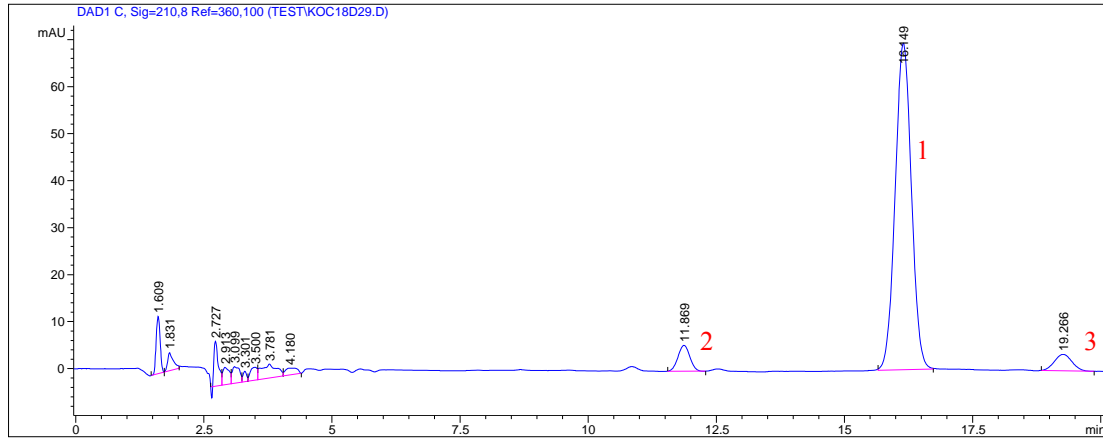
Şekil 4. 35 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza β -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K2 için, 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik ve sonrasında 3 numaralı pikin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4.36).



Şekil 4. 36 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza β -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

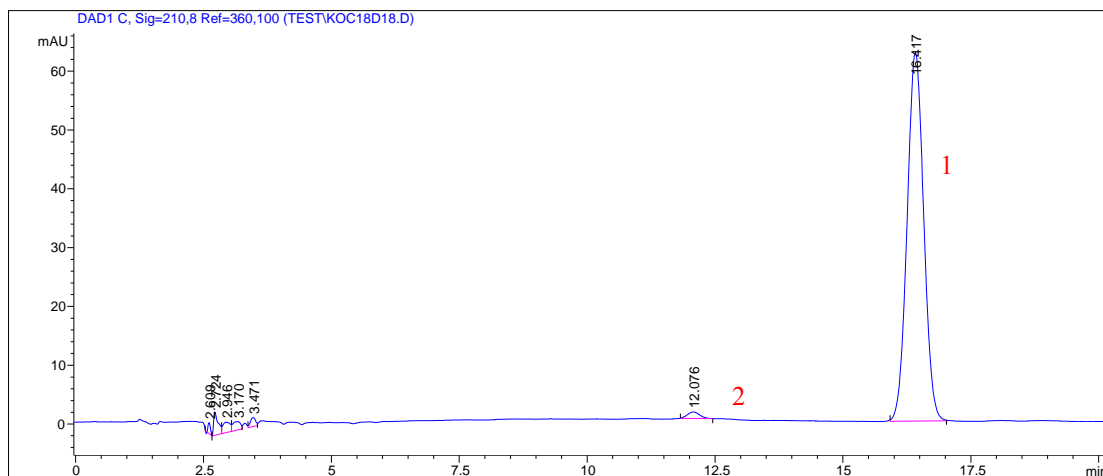
K3 için, 1 numaralı kolesterol piki sonrasında ortaya çıkan 3 numaralı pik gözlemlendi (Şekil 4.37).



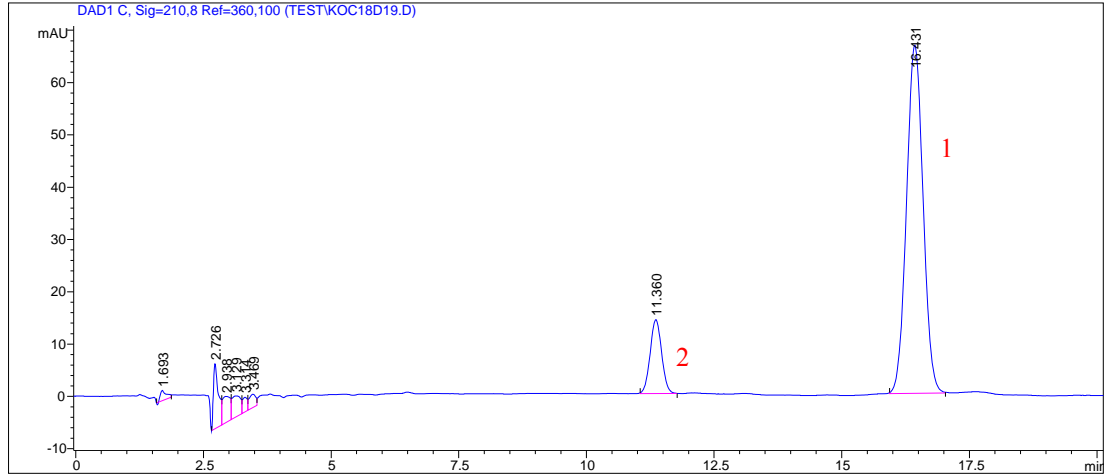
Şekil 4. 37 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza β -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

4.3.5. Mobil Faza γ -siklodekstrin Eklenecek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri

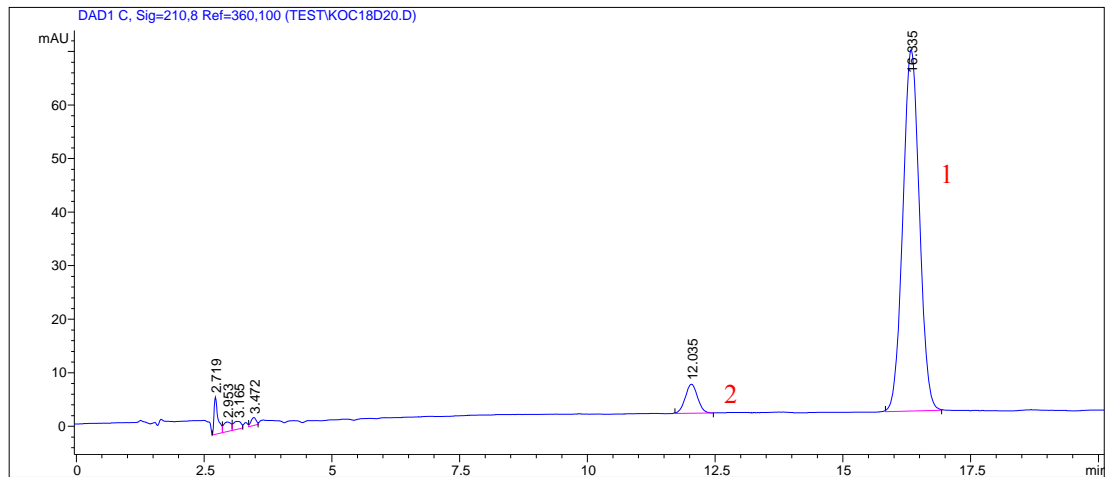
Her üç örnek için, kullanılan diğer siklodekstrinlerden farklı olarak 1 numaralı kolesterol piki sonrasında ortaya çıkan pik gözlemlenmedi. Ancak, K1 ve özellikle K2 için kolesterol piki öncesinde 2 numaralı pik yine görüldü (Şekil 4.38, 4.39).



Şekil 4. 38 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza γ -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram



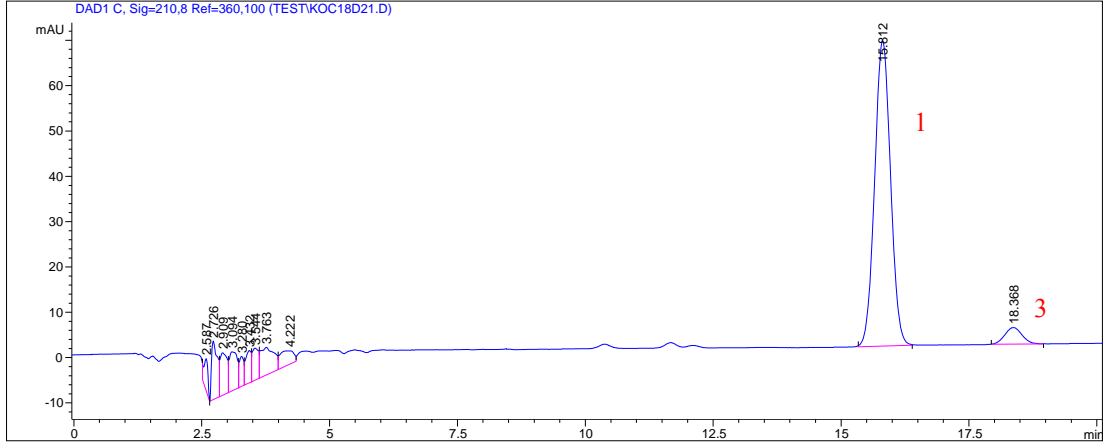
Şekil 4. 39 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza γ -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram



Şekil 4. 40 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza γ -siklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

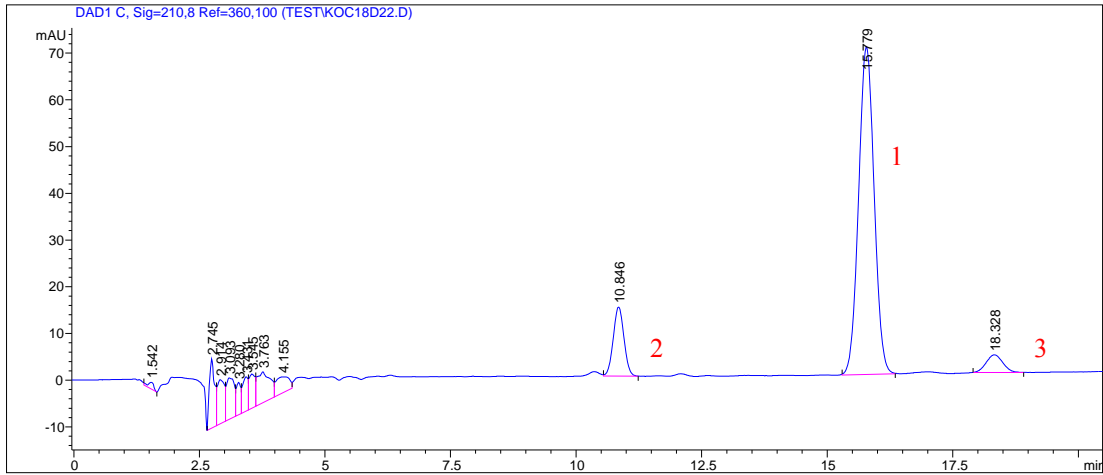
4.3.6. Mobil Faza γ -hidroksipropilsiklodekstrin Eklenerek Yapılan Ters Faz HPLC ile Kolesterol Örneklerinin Analizleri

K1 için, 1 numaralı kolesterol pikinden sonra çıkan 3 numaralı pik görüldü. Ancak, kolesterol pikinden önce çıkan pik ölçülememesine rağmen temel çizgide değişiklikler görüldü (Şekil 4.41).



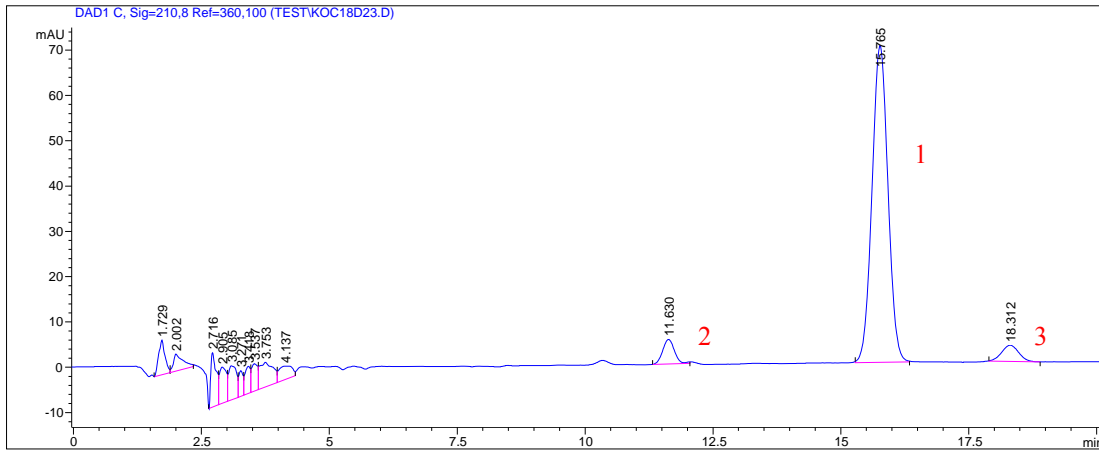
Şekil 4. 41 Yeni hazırlanmış K1' in Mobil Faza γ -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K2 için, 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde 2 numaralı pik ve sonrasında 3 numaralı pikin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4.42).



Şekil 4. 42 Yeni hazırlanmış K2' nin Mobil Faza γ -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

K3 için, 1 numaralı kolesterol piki sonrasında ortaya çıkan 3 numaralı pik gözlemlendi (Şekil 4.43).



Şekil 4. 43 Yeni hazırlanmış K3' ün Mobil Faza γ -hidroksipropilsiklodekstrin katılarak Ters Faz HPLC analizine ait kromatogram

Tablo 4. 5 Siklodekstrin ekleyerek yapılan ters faz HPLC ile analizlerde görülen pikler

Eklenen siklodekstrin	Yeni hazırlanan örnekler		
	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3
α -siklodekstrin	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
β -siklodekstrin	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
β -metilsiklodekstrin	1, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
β -hidroksipropilsiklodekstrin	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
γ -siklodekstrin	1, 2	1, 2	1, 2
γ -hidroksipropilsiklodekstrin	1, 3	1, 2, 3	1, 2, 3

Tablo 4. 6 Siklodekstrin ekleyerek yapılan ters faz HPLC' de görülen piklerin retansiyon süreleri

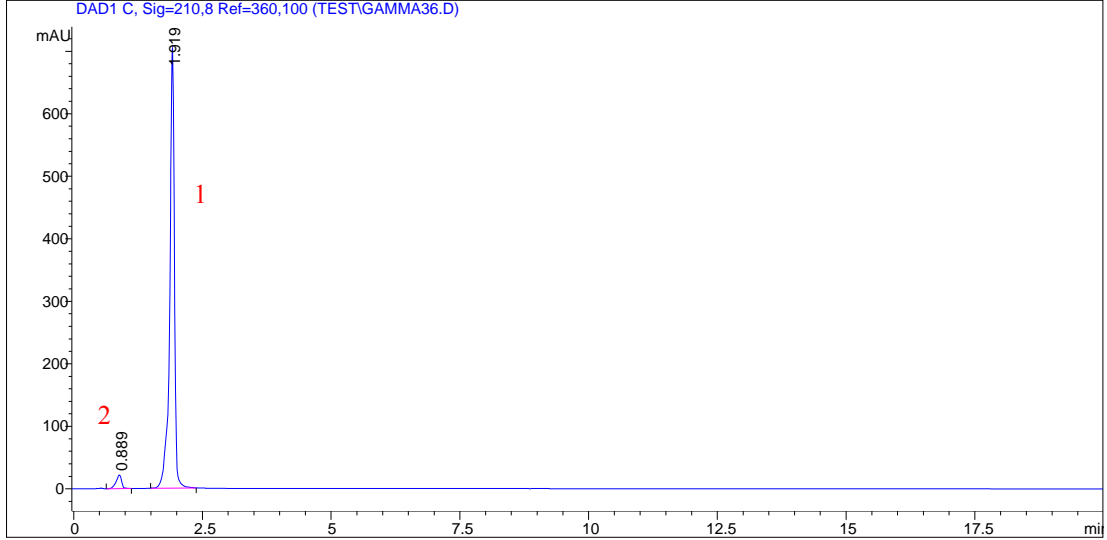
Görülen pikler	Retansiyon süreleri
2 numaralı pik	11.86 ± 0.52 (n=16)
1 numaralı pik	16.51 ± 0.64 (n=18)
3 numaralı pik	19.82 ± 1.25 (n=15)

4.4. Kiral HPLC ile Kolesterolün Stereoizomer Analizleri

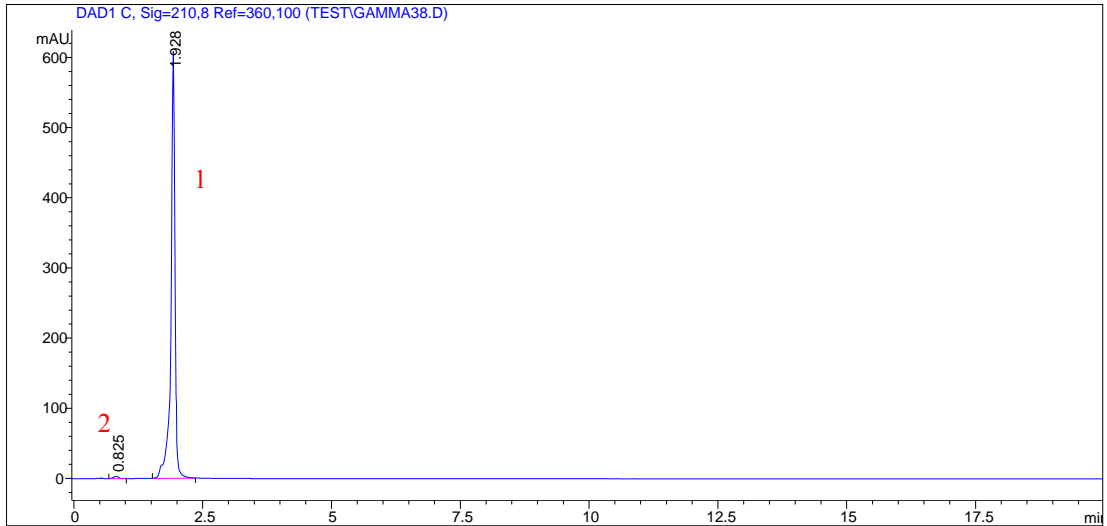
4.4.1. Permetillenmiş γ -siklodekstrin Kiral Kolon ile HPLC Analizleri

4.4.1.1. Yeni Hazırlanmış Kolesterol Örneklerinin Analizleri

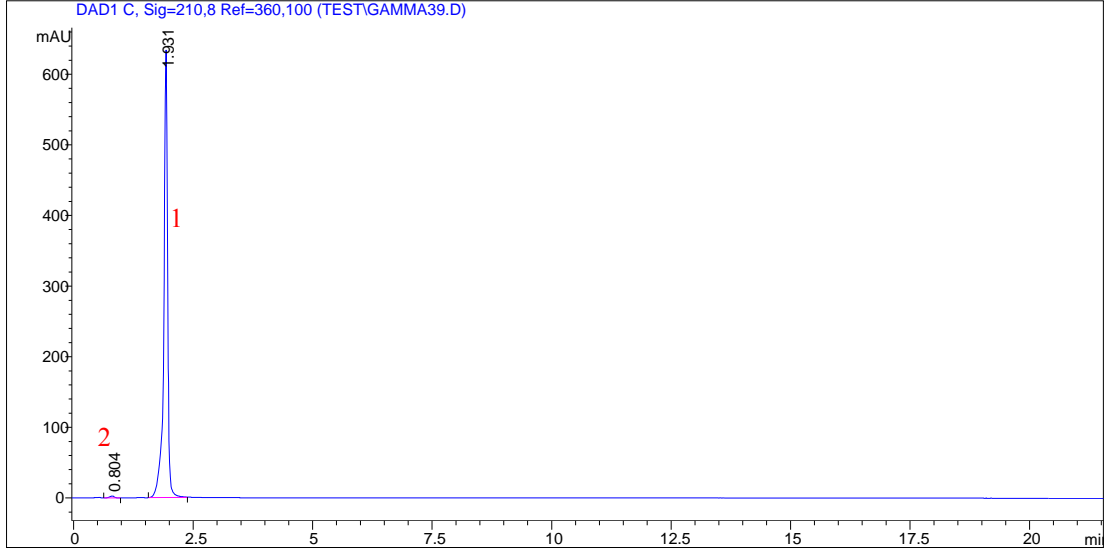
Her üç örnek için, 1 numaralı kolesterol piki ve bunun öncesinde 2 numaralı pik görüldü (Şekil 4.44, 4.45, 4.46).



Şekil 4. 44 Yeni hazırlanmış K1' in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram. Mobil Faz: İzopropanol: asetonitril: su (60:30:10), Akış hızı: 1 mL/dk, UV: 210 nm



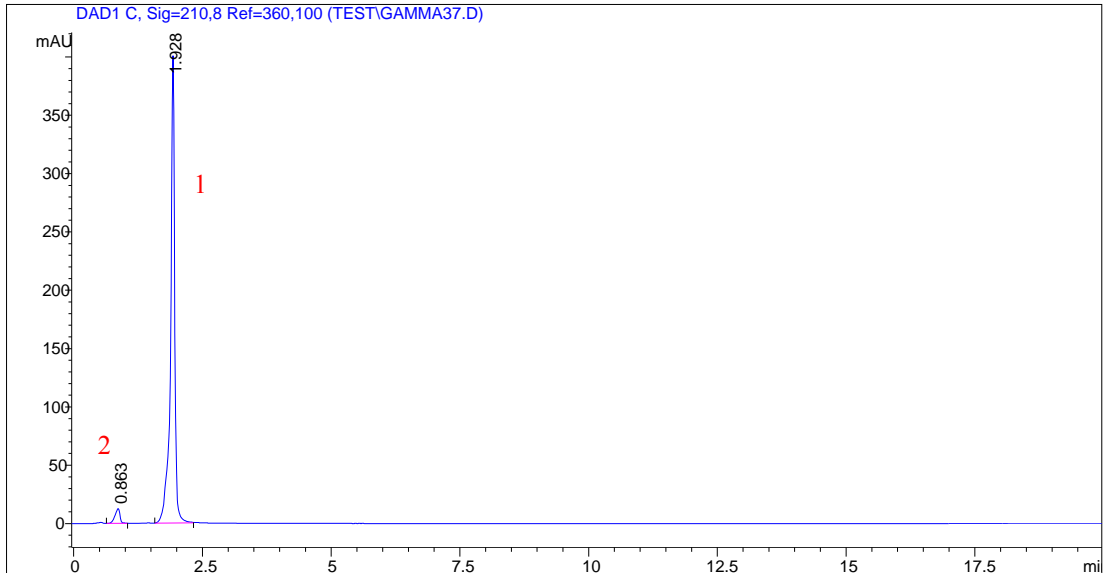
Şekil 4. 45 Yeni hazırlanmış K2' nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



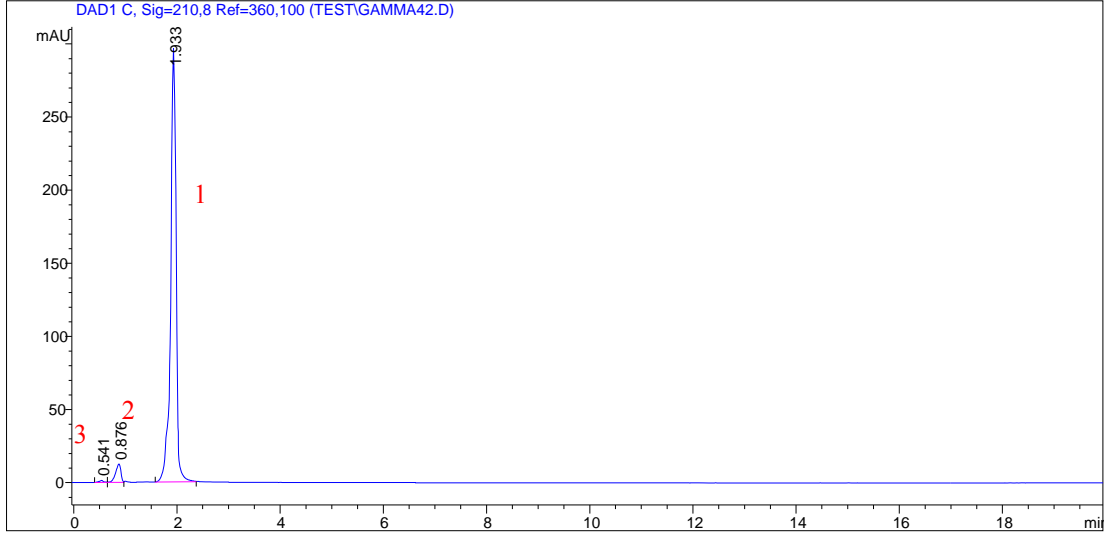
Şekil 4. 46 Yeni hazırlanmış K3' ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

4.4.1.2. UV Işınlarnın Kolesterol Örneklerine Etkisi

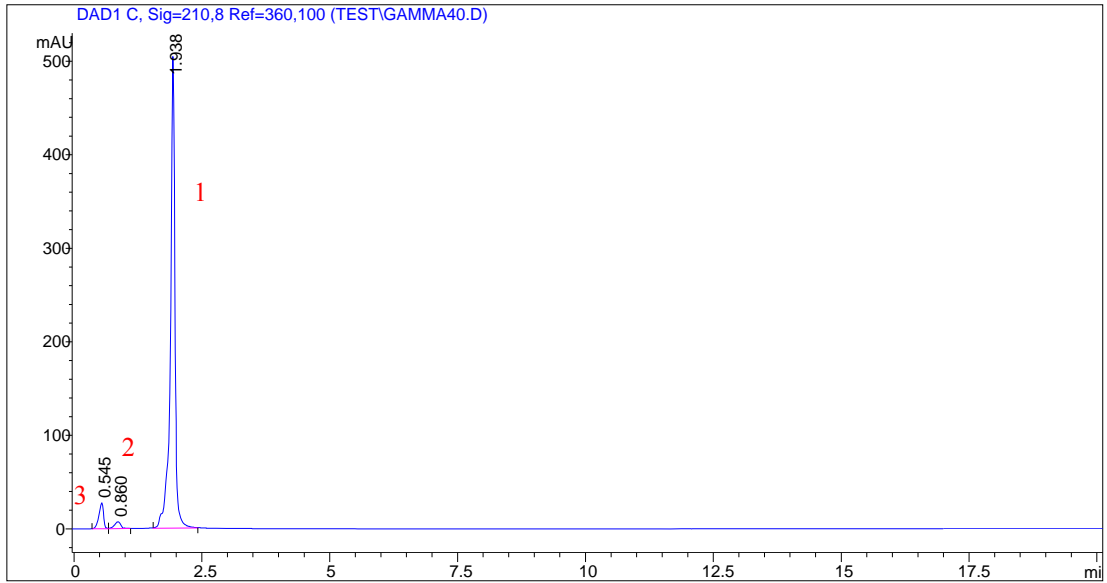
Her üç örnek için, UV' de bekleme işleminin ardından yeni pik oluşumu gözlemlendi. K1 ve K3 için 2 numaralı pikin öncesinde oluşan 3 numaralı pik gözlenirken, K2 için 1 numaralı kolesterol pikinin öncesinde bir pik görüldü (Şekil 4.48, 4.50, 4.52).



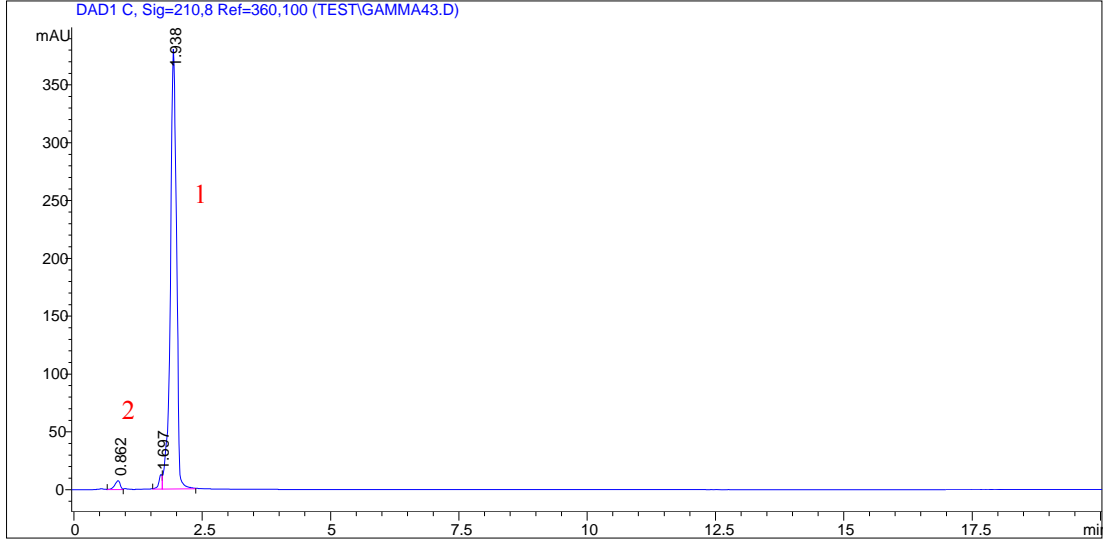
Şekil 4. 47 UV' de 1 Saat bekletilmiş K1' in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



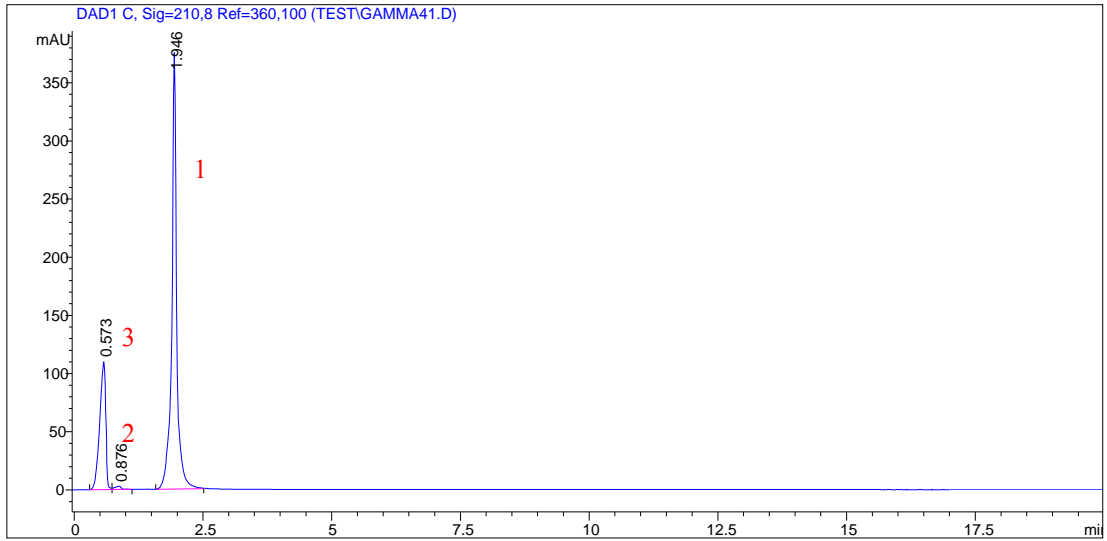
Şekil 4. 48 UV' de 1+2 Saat bekletilmiş K1' in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



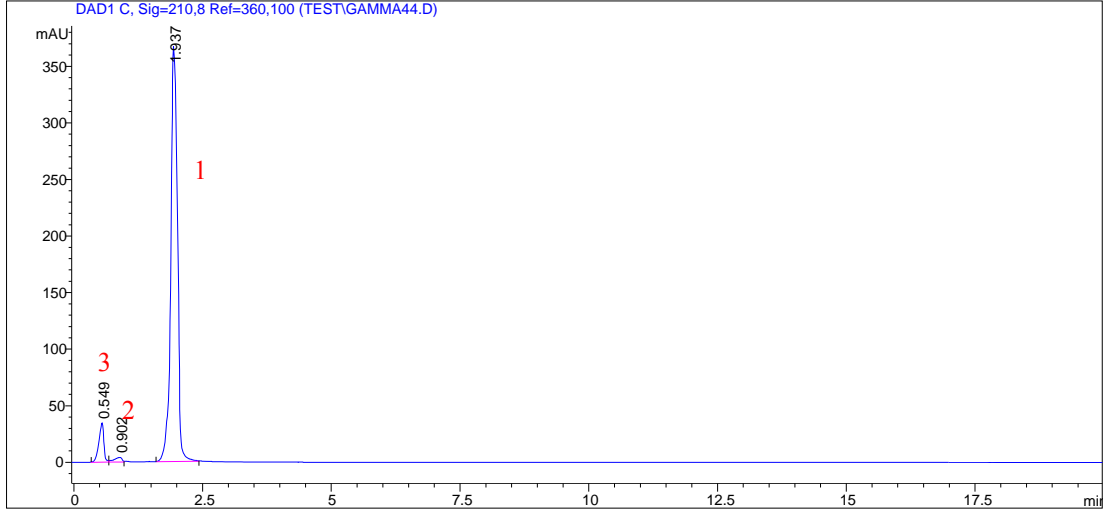
Şekil 4. 49 UV' de 1 Saat bekletilmiş K2' nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



Şekil 4. 50 UV' de 1+2 Saat bekletilmiş K2' nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



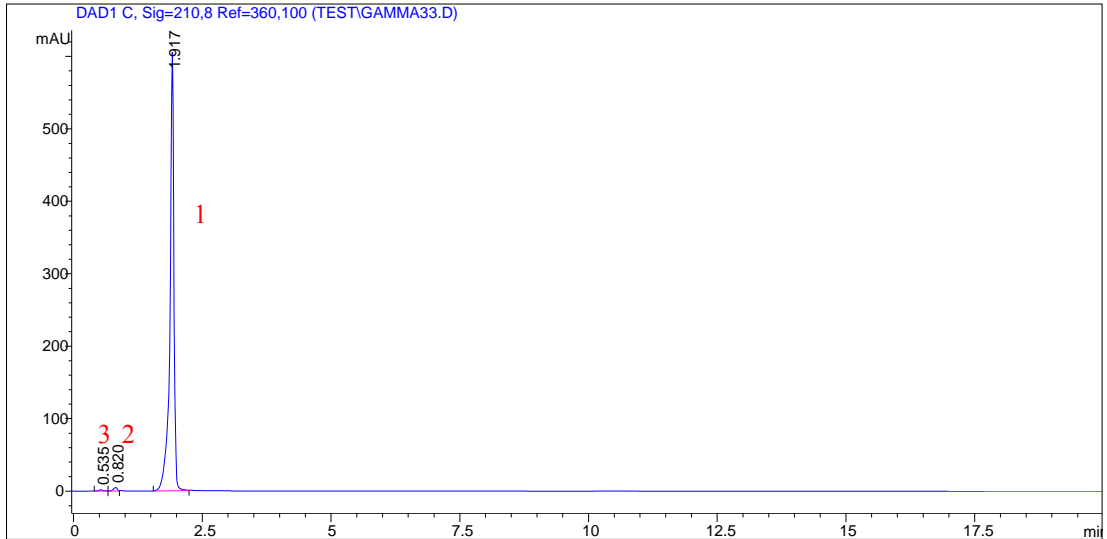
Şekil 4. 51 UV' de 1 Saat bekletilmiş K3' ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



Şekil 4. 52 UV’ de 1+2 Saat bekletilmiş K3’ ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

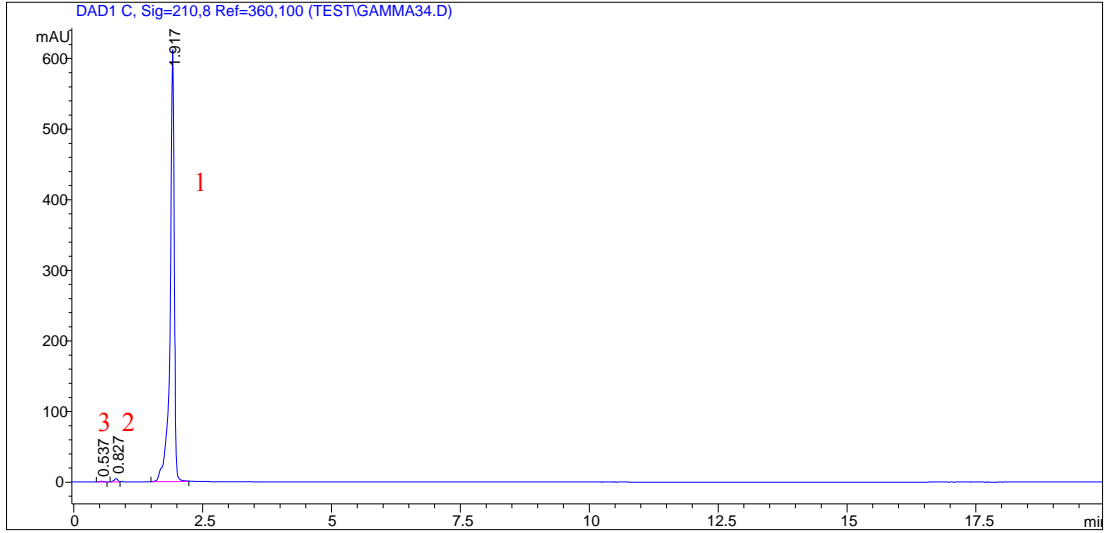
4.4.1.3. Oda Sıcaklığında Bekletmenin Kolesterol Örneklerine Etkisi

K1 için, oda sıcaklığında bekleme ile 3 numaralı pikin ortaya çıktığı gözlemlendi (Şekil 4.53).



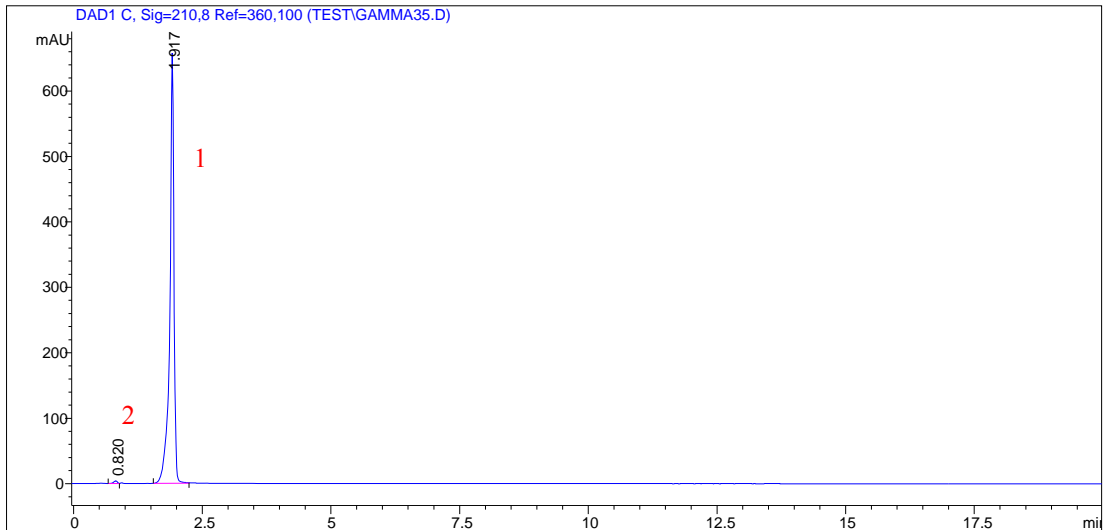
Şekil 4. 53 Oda Sıcaklığında 1 Ay Bekletilmiş K1’ in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

K2 için oda sıcaklığında bekleme ile 3 numaralı pikin ortaya çıktığı gözlemlendi (Şekil 4.54).



Şekil 4. 54 Oda Sıcaklığında 1 Ay Bekletilmiş K2'nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

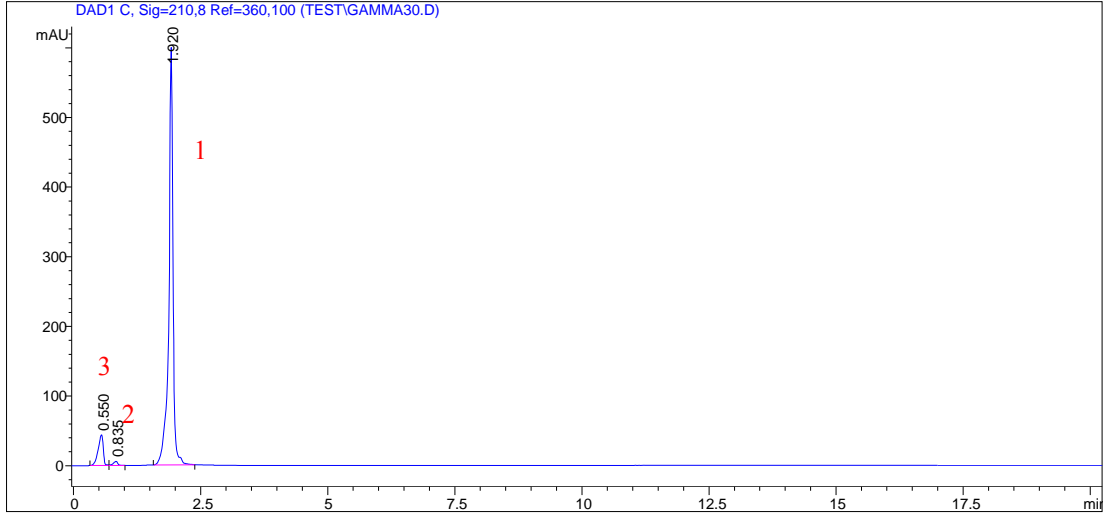
Örnek 3 için oda sıcaklığında bekleme ile değişim gözlenmedi (Şekil 4.55).



Şekil 4. 55 Oda Sıcaklığında 1 Ay Bekletilmiş K3'ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

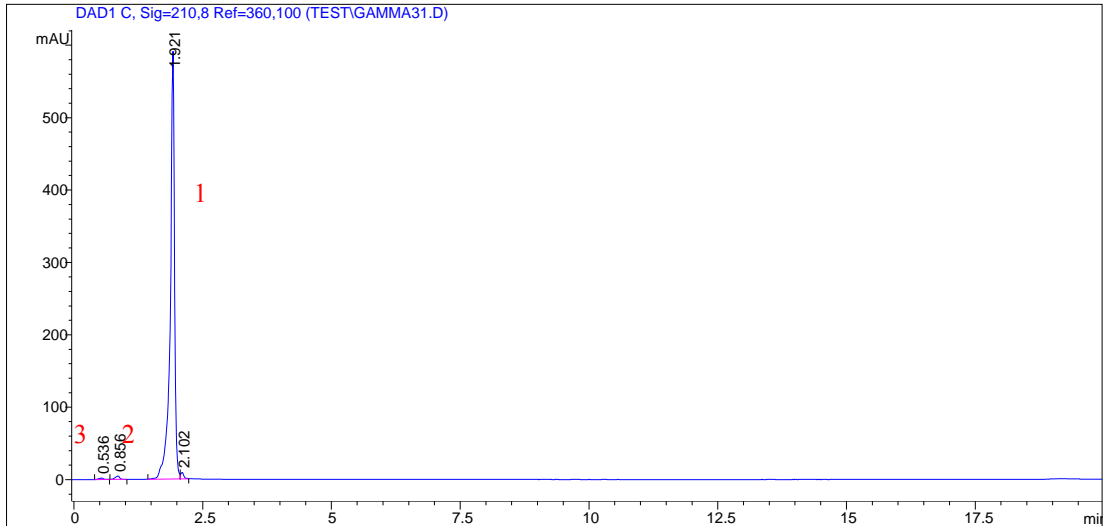
4.4.1.4. +4 °C' de Bekletmenin Kolesterol Örneklerine Etkisi

K1 için, +4 °C' de bekleme ile 3 numaralı pikin ortaya çıktığı gözlemlendi (Şekil 4.56).



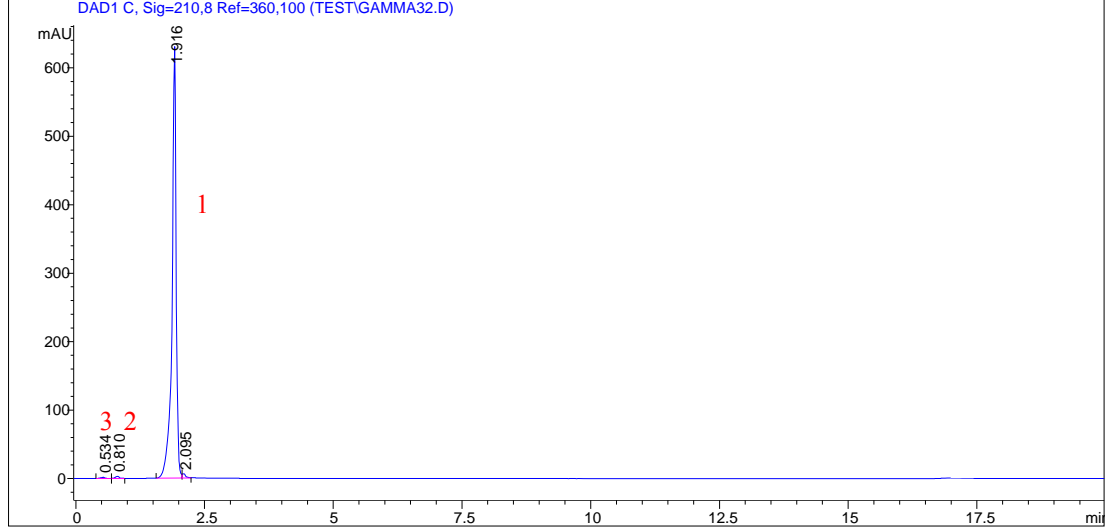
Şekil 4. 56 +4 °C' de 1 Ay Bekletilmiş K1' in permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

K2 için, +4 °C' de bekleme ile 3 numaralı pikin ve 1 numaralı kolesterol piki sonrasındaki pikin ortaya çıktığı gözlemlendi (Şekil 4.57).



Şekil 4. 57 +4 °C' de 1 Ay Bekletilmiş K2' nin permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

K3 için, +4 °C’ de bekleme ile 3 numaralı pikin ve 1 numaralı kolesterol piki sonrasındaki pikin ortaya çıktığı gözlemlendi (Şekil 4.58).



Şekil 4. 58 +4 °C’ de 1 Ay Bekletilmiş K3’ ün permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

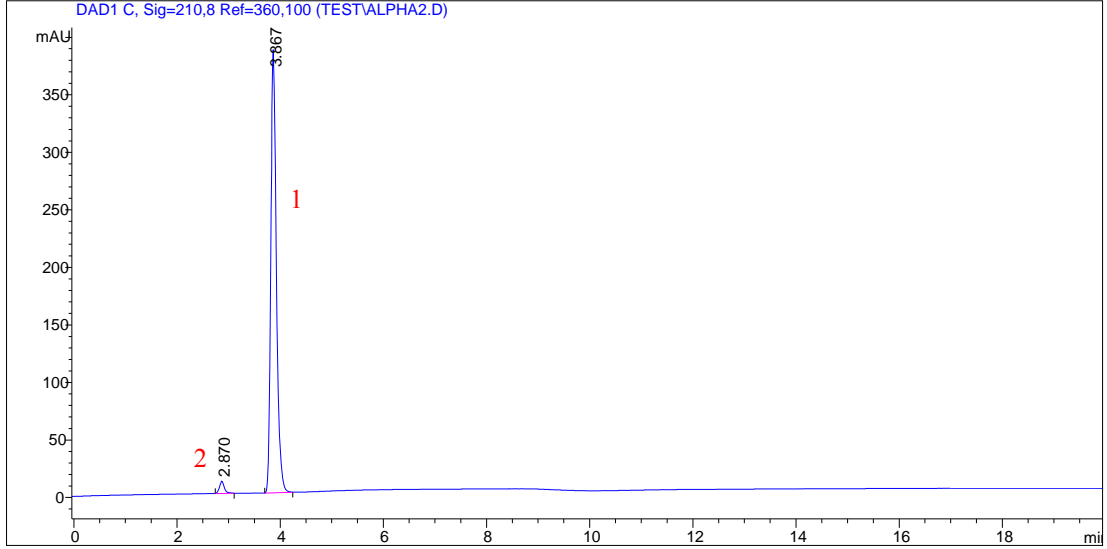
Tablo 4. 7 Permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolon ile yapılan HPLC analizlerinde görülen pikler

Kolesterol Örnekleri	Yeni hazırlanan örnekler	UV’ de bekletilen örnekler		Oda sıcaklığında bekletilen örnekler	+4 °C’ de bekletilen örnekler
		1 saat	1+2 saat		
Örnek 1	1, 2	1, 2	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
Örnek 2	1, 2	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
Örnek 3	1, 2	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2	1, 2, 3

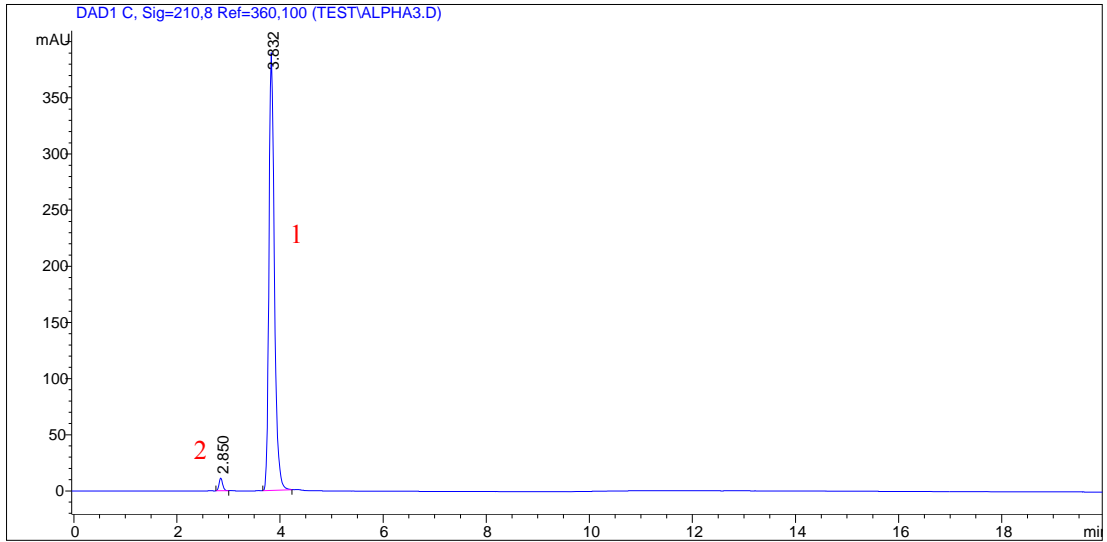
4.4.2. Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) Kiral Kolon ile HPLC Analizleri

4.4.2.1. Yeni Hazırlanmış Kolesterol Örneklerinin Analizleri

K1 ve K2 için, 1 numaralı kolesterol piki ve 2 numaralı pik görüldü (Şekil 4.59, 4.60).

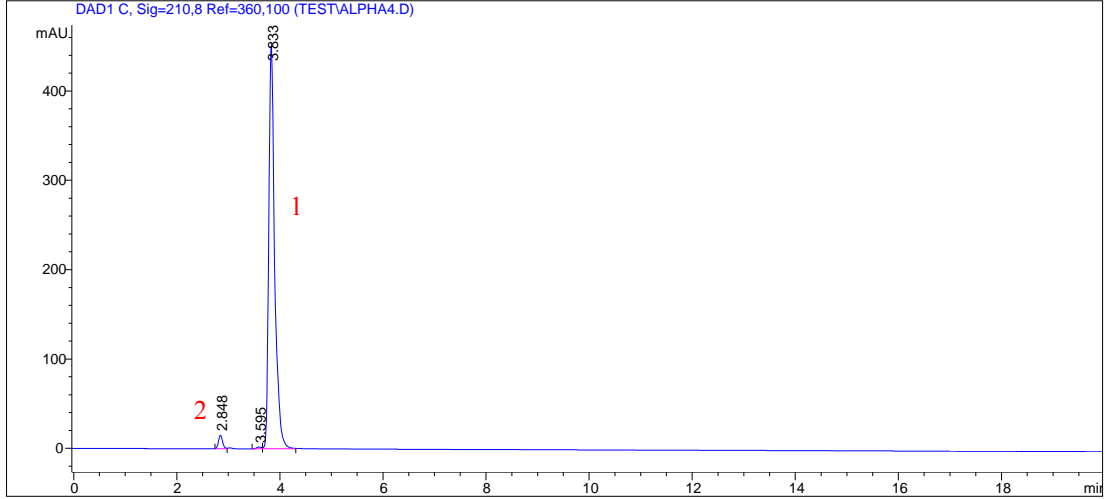


Şekil 4. 59 Yeni Hazırlanmış K1' in Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbammat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram Mobil faz: Hekzan: izopropanol (90:10), Akış hızı: 1 mL/dk, UV: 210 nm



Şekil 4. 60 Yeni Hazırlanmış K2' nin Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbammat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

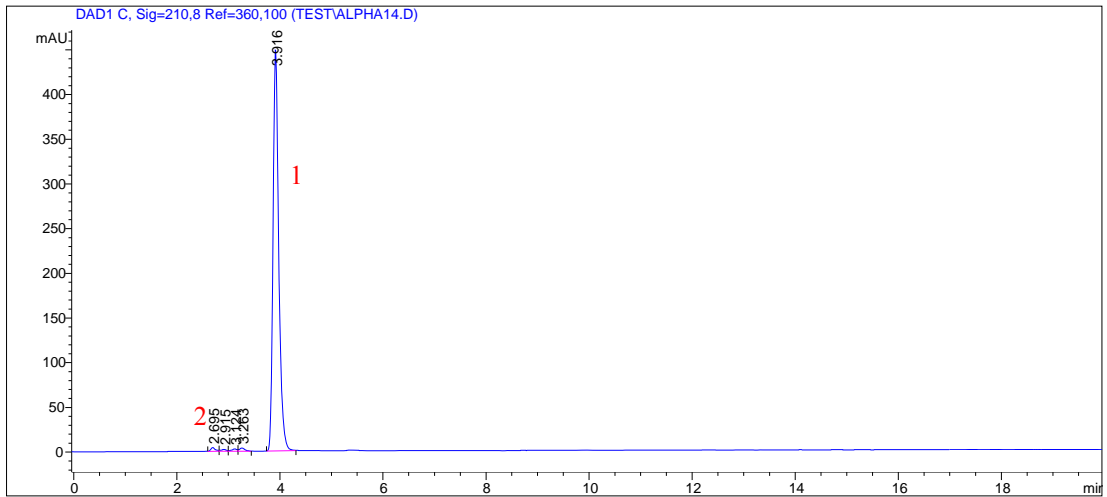
K3 için 1 numaralı kolesterol piki ve 2 numaralı pikin yanında K1 ve K2' den farklı olarak kolesterol piki öncesinde bir pik gözlemlendi (Şekil 4.61).



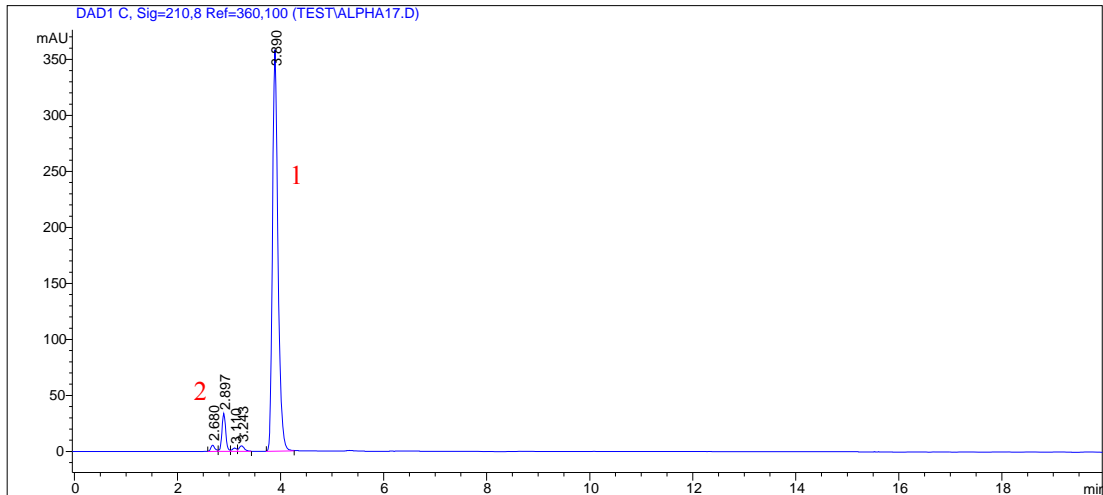
Şekil 4. 61 Yeni Hazırlanmış K3' ün Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

4.4.2.2. UV Işınlının Kolesterol Örneklerine Etkisi

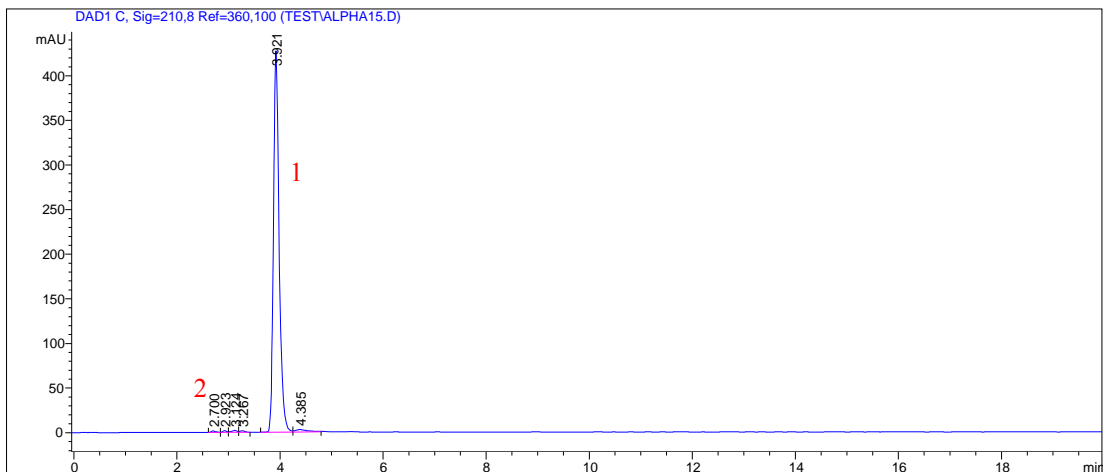
Her üç örnek için, UV' de bekledikten sonra 1 numaralı kolesterol piki ile 2 numaralı pik arasında yeni piklerin ortaya çıktığı gözlemlendi. Ancak K1' den farklı olarak K2 ve K3 için kolesterol piki sonrasında yeni pikler ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4.63, 4.65, 4.67).



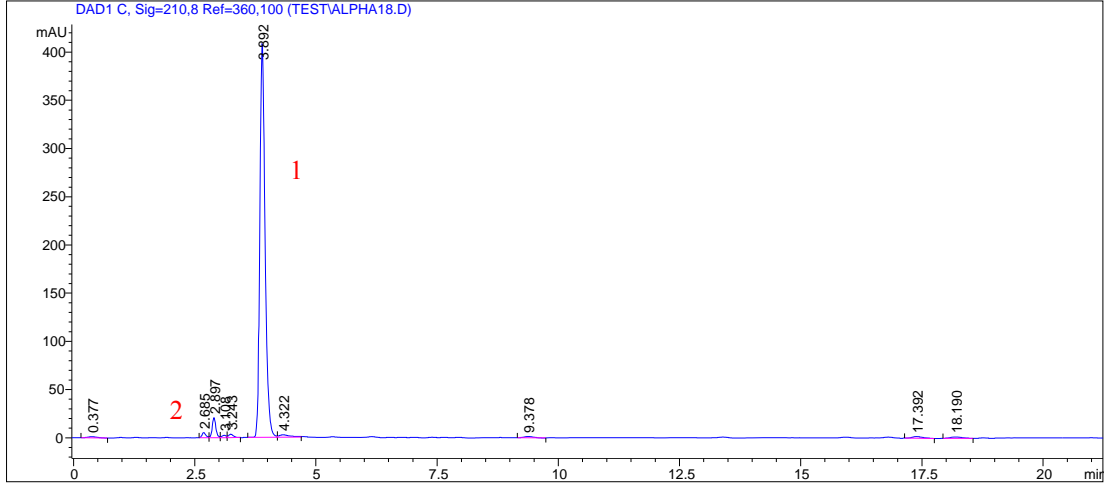
Şekil 4. 62 UV' de 1 Saat Bekletilmiş K1' in Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



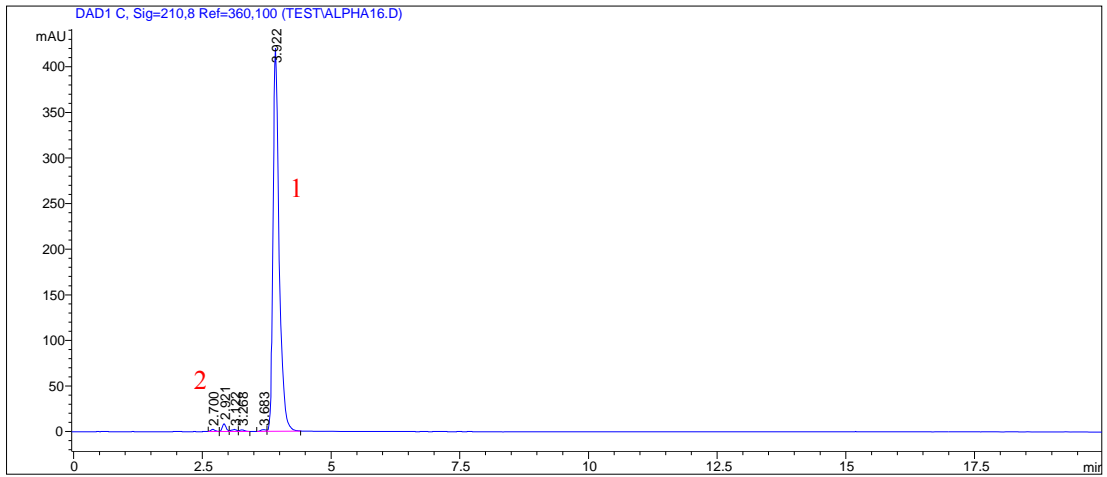
Şekil 4. 63 UV' de 1+2 Saat Bekletilmiş K1' in Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



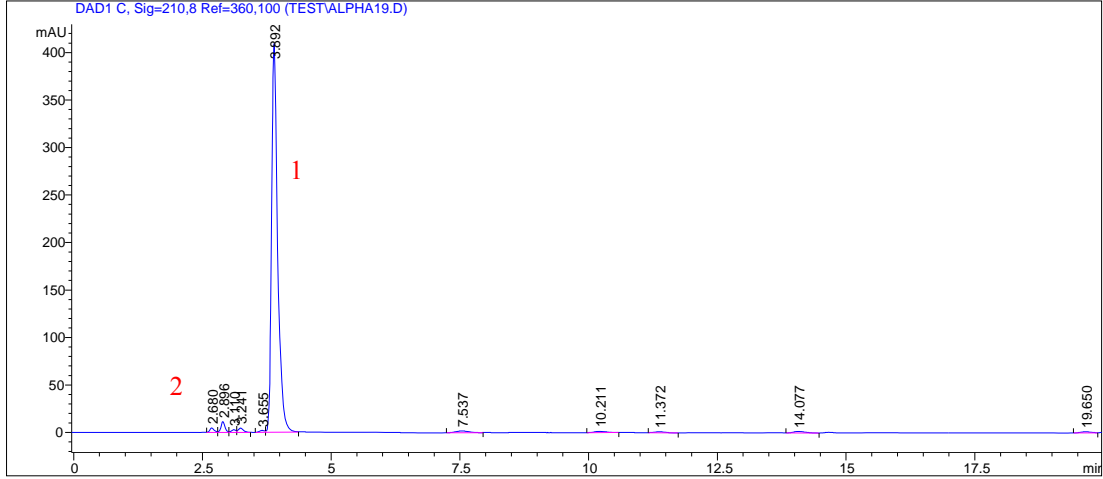
Şekil 4. 64 UV' de 1 Saat Bekletilen K2' nin Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



Şekil 4. 65 UV' de 1+2 Saat Bekletilmiş K2' nin Amiloz tris(3, 5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



Şekil 4. 66 UV' de 1 Saat Bekletilen K3' ün Amiloz tris(3, 5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram



Şekil 4. 67 UV' de 1+2 Saat Bekletilmiş K3' ün Amiloz tris(3, 5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolonla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

Oda sıcaklığında ve +4 °C' de bekletilen kolesterol örneklerinin Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolon ile yapılması planlanan HPLC analizleri kolonun bozulması nedeniyle gerçekleştirilememiştir.

Tablo 4. 8 Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiral kolon ile yapılan HPLC analizlerinde görülen pikler

Kolesterol Örnekleri	Yeni hazırlanan örnekler	UV' de bekletilen örnekler		Oda sıcaklığında bekletilen örnekler	+4 °C' de bekletilen örnekler
		1 saat	1+2 saat		
Örnek 1	1, 2	1, 2, ++	1, 2, ++	-	-
Örnek 2	1, 2	1, 2, ++	1, 2, +++++	-	-
Örnek 3	1, 2	1, 2, ++	1, 2, +++++	-	-

5.TARTIŞMA

Stereoizomerlerin biyolojik aktiviteleri birbirlerinden farklılık gösterebilmektedir. Doğal olarak bulunan proteinleri oluşturan amino asitlerin L konfigürasyonda yer alması, DNA' ın da yapısında yer alan şekerlerin D konfigürasyonda bulunması, bitki ve hayvanları oluşturan moleküllerin büyük kısmının kiral özellik gösterdiğini ve sadece tek bir formunun bu canlılarda yer aldığını doğrulamaktadır.

Limonen molekülünün S konfigürasyonu limon kokusunu verirken, R konfigürasyonu portakal kokusu vermektedir. Benzer şekilde karvon molekülünün S konfigürasyonu nane kokusu verirken, R konfigürasyonu kimyon kokusu vermektedir. Bir molekülün enantiomerlerinin farklı kokulardan sorumlu olmasının gerekçesi burunda bu kokular için yer alan reseptörlerin kiral özellikte olmasıyla açıklanmaktadır.

Epinefrin molekülünün enantiomerleri de farklı etkiler göstermektedir. S konfigürasyonu toksik etki gösterirken, R konfigürasyonu normal hormonal işlemini yerine getirmektedir. Bu sonuç, kiral özellik gösteren bir molekülün enantiomerlerinden sadece bir tanesinin reseptör bölgesinde tanınabileceğini göstermektedir [102].

Bazı proteinler, doğada olmayan D-amino asitlerin sentezlenmesi ile yapıldıkları için D-proteinler olarak adlandırılırlar. D-proteinler, doğal enzimlerin etkin tarafına uyacak uygun bir kiralliğe sahip olmadıklarından proteolitik enzimler tarafından parçalanmaya kısmen dayanıklıdırlar. Bununla birlikte, D-proteinlerin kanda daha uzun bir ömre sahip olmasından dolayı bu durum oldukça ilgi çekici imkanlar sağlamaktadır [102].

Bitki ve hayvanlarda yer alan moleküllerin stereoizomerik formlarının öneminin yanı sıra kiral moleküller ilaç endüstrisi için de önem taşımaktadır. Kiral ilaçların enantiomerleri farklı biyolojik, farmakolojik, farmakodinamik ve toksikolojik etkiler gösterebilmektedir.

Enantiomerlerden biri terapötik etkiye sahipken, diğeri yan etkilerden sorumlu olabilir. Genel anestezide kullanılan ketaminin (+) izomeri terapötik etkiye sahipken (-) izomeri santral sinir sistemini uyararak yan etkilerden sorumlu olabilir. Enantiomerlerin her ikisini de içeren rasematın toksik etkisinden enantiomerlerden biri sorumlu olabilir. Gebelik kusmalarını önlemek için kullanılan Talidomidin R izomeri terapötik etkisini gösterirken, S izomeri teratojenik etki gösterir. Ya da enantiomerlerin her ikisi de terapötik değeri farklı etkilere sahiptir. Propoksifenin (+) izomeri analjezik, (-) izomeri antitussif etki gösterir.

Bu örneklerden de anlaşıldığı gibi, kiral ilaçların enantiomerlerine ayrılması ve her bir enantiomerin farmakolojik, farmakokinetik, farmakodinamik ve toksikolojik özelliklerinin ayrı ayrı incelenmesi zorunludur. Kiral ilaçların enantiomerlerinin biyolojik sistemlerde farklı şekillerde davranması nedeniyle, ilaç araştırmalarında enantiomerlerin incelenmesinin önemi büyüktür [96].

Kolesterol ve benzeri lipidlerin ayrılması ve analizleri için çeşitli kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi, düz faz ve ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisidir [103]. Kolesterol metabolitlerinin analizleri için sıvı kromatografi kütle spektrometrisi [104], oksifitosterol ve oksikolesterol türevlerinin ayrılması ve tanımlanması için gaz kromatografi kütle spektrometri metodları kullanılmaktadır [105]. Enantiomerik steroidlerin kiral ayırımı için kiral sabit fazlar, permetillenmiş beta ve gama siklodekstrin kolonlar ile Amiloz tris (3,5-dimetilfenilkarbammat), kullanılarak HPLC analizleri Kummer ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir [101,106].

Stereoizomerik yapılar olan enantiomerlerin farklı biyolojik cevaplar oluşturması nedeniyle bu yapıların belirlenmesi önem taşımaktadır. Özellikle ilaç endüstrisinde yanlış enantiomerlerin kalitatif veya kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan kiral likit kromatografisi bu alanda ön plana çıkmıştır [106].

Kolesterol, hücre zar yapısına katılım, safra asitlerinin oluşumu ve steroid hormonların sentezlenmesi gibi birçok fizyolojik olayın yanı sıra ateroskleroz gibi

patolojik durumların içinde yer almaktadır. Bu nedenle, 8 tane kiral merkez içeren ve dolayısıyla 256 tane muhtemel stereoizomere sahip olan kolesterol molekülü için stereoizomerlik kavramı büyük önem taşımaktadır.

Bu farklılıklar göz önüne alınarak kolesterol stereoizomerleri ile bazı çalışmalar yapılmıştır. Kolesterol ve 3- α hidroksi izomeri olan epikolesterolün ratlardaki emilimi incelendiğinde, kolesterolün stereoizomerinden iki kattan daha fazla emildiği ve emilen kolesterolün % 50' sinin lenfte esterleşmiş olarak geri alınmasına rağmen epikolesterol için böyle bir durumun olmadığı ortaya konulmuştur [7]. Yine bir diğer kolesterol stereoizomeri olan enantiomerik kolesterol ile yapılan çalışmanın sonuçları, kolesterolün yaklaşık % 50' sinin emildiğini buna karşın serumda enantiomerik kolesterole rastlanmadığını göstermektedir [10]. Şilomikron benzeri emülsiyonların plazmadan uzaklaştırılmasına kolesterol yapısının etkisinin incelendiği araştırmada, epikolesterol ile kolesterolün benzer sonuçlar ortaya çıkardığı görülmektedir [107].

Bu çalışmada farklı kaynaklardan elde edilen kolesterolün içerebileceği muhtemel stereoizomerlerin kromatografik metodlarla ayrılması ve farklı kaynaklardan elde edilen kolesterolün stereoizomerik yapıların karşılaştırılması amaçlandı.

Ters faz HPLC ile yapılan çalışmalarda, UV ışınları altında bekletilen üç örnekten K3 için değişim gözlenmezken, K2 için kolesterol piki öncesinde ortaya çıkan bir pik ve K1 için kolesterol piki öncesi ve sonrasında iki pikin ortaya çıktığı göze çarpmaktadır. UV ışınları altında bekletme ile K1 ve K2 için kolesterol piki öncesinde gözlenen pikin, K3' de zaten var olan 2 numaralı pik ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Oda sıcaklığında ve +4 °C' de bekletilen her üç örnekte benzer şekilde kolesterol piki sonrasında yeni bir pikin ortaya çıktığı gözlemlendi. Birbirine yakın sonuçların elde edilmesi oda sıcaklığında ve +4 °C' de bekletilen örneklerde yeni piklerin ortaya çıkmasında sıcaklığın etkisinin olmadığı görülmektedir. Bazı E-Z

izomerlerin içinde buldukları çözücü, sıcaklık ve asitlik gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak birbirlerine dönüşebilmeleri mümkündür [108]. Bu etkiler göz önüne alınarak, oda sıcaklığında ve +4 °C' de çözücü içerisinde bekletilen kolesterol örnekleri için de dönüşüm mümkün olabilir.

Mobil faza kiral siklodekstrin ajanların eklenmesiyle, γ -siklodekstrin hariç, yapılan ters faz HPLC' de, kolesterol piki sonrasında çıkan pikin mobil faza kiral ajan eklemeyen yapılan ters faz HPLC' de görülmemesinin nedeninin siklodekstrin tarafından ortaya konulan bir farklılık olarak düşünülmekte ve muhtemel bir stereoizomeri işaret etmektedir. Oda sıcaklığında ve +4 °C' de bekleyen kolesterol örneklerinin ters faz HPLC ile analizinde kolesterol piki sonrasında ortaya çıkan pikin de bununla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca yeni hazırlanmış örnek 2 için, ters faz HPLC' de kolesterol piki öncesinde herhangi bir pik gözlenmezken siklodekstrin ajanların mobil faza katıldığı ters faz HPLC' de kolesterol piki öncesinde 2 numaralı pikin ortaya çıktığı gözlenmektedir. İki kromatogram arasındaki bu farklılık, örnek 2 içinde mevcut olan bir stereoizomerin siklodekstrin ajan tarafından tanınarak farklılandırıldığı fikrini düşündürmektedir.

Permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolon ile yapılan çalışmada, UV' de bekletme ile her üç örnek için de yeni piklerin oluşumu gözlenmektedir. Benzer şekilde oda sıcaklığında ve +4 °C' de bekleyen kolesterol örnekleri için yeni pik oluşumu gözlenmektedir. Bu sonuçların, oda sıcaklığında ve +4 °C' de bekleyen kolesterol örneklerinin ters faz HPLC ile yapılan çalışmaların sonuçları ile ilişkili olabileceği görülmektedir. Yeni hazırlanan kolesterol örnekleri ile gözlenemeyen bu piklerin, bekleme sonucu oluşan ve kiral kolon tarafından tanınan stereoizomerik yapılar olduğu düşünülmektedir.

Amiloz tris-(3, 5-dimetilfenilkarbammat) kiral kolonla yapılan çalışmada yeni hazırlanmış kolesterol örnekleri ile yapılan analizde görülmeyen ancak, UV' de bekleme ile oluşan pikler gözlenmektedir. Bu farklılıkların da yine ters faz HPLC ve

permetillenmiş γ -siklodekstrin kiral kolon ile yapılan HPLC çalışmalarında UV ışınları altında bekletilen örneklerin analiz sonuçları ile örtüştüğü görülmektedir.

Gerek mobil faza kiral ajanların katılmasıyla yapılan ters faz HPLC ile gerekse de kiral kolonların kullanımı ile yapılan çalışmalarda ortaya konulan muhtemel stereoizomer olduğu düşünülen yapıların tam olarak aydınlatılması için LC-MS ve NMR gibi daha ileri tekniklerin kullanılmasının gerekli olduğu kanaatine varıldı.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsan vücuduna besinlerle farklı kaynaklardan kolesterol alınmaktadır. Kolesterol stereoizomerlerinin tespiti, alınan kolesterolün besinsel kaynağı hakkında fikir verebilir. Kolesterol çok farklı canlı organizmalar tarafından sentezlenmekte bunlar da farklı besinlerle vücuda alınmaktadır. Hiperkolesterolemi ile koroner kalp hastalığı insidansı arasındaki pozitif korelasyon göz önüne alındığında besinlerle alınan kolesterolün stereoizomerik yapılarının aydınlatılması ile besinsel kolesterol kaynaklarının aterojenik özellikleri değerlendirilebilir.

Bu amaçla koyun yün yağından ve domuz karaciğerinden elde edilen kolesterolün ters faz HPLC, mobil faza siklodekstrin eklenmiş ters faz HPLC ve kiral kolonlar kullanılarak yapılan kiral HPLC ile stereoizomerik analizlerinin sonuçları bazı farklılıkları ortaya koymuştur.

Mobil faza kiral ajan olarak çeşitli siklodekstrinlerin, gama siklodekstrin hariç, eklenmesi ile yapılan ters faz HPLC analizlerinin neticesinde, mobil faza kiral ajan eklemeyen yapılan ters faz HPLC ile belirlenemeyen piklerin ortaya çıktığı görüldü. Tespit edilen bu pikler siklodekstrin tarafından ayrılan bir stereoizomer, başka bir sterol veya kolesterolün değişime uğramış şekli olabilir.

Mobil faza siklodekstrin eklenmesi ile yapılan stereoizomer analizinde domuz karaciğerinden elde edilen kolesterol örneğinde kolesterol pikinden daha önce gelen pik 2 koyun yün yağından elde edilen kolesterol örneğindeki pik 2 den daha belirgin olarak ölçülmektedir. Bu sonuç da farklı kaynaklardan elde edilen kolesterolün stereoizomer içeriğinin birbirinden farklı olabileceğini işaret edebilir.

Sonuçlar, farklı kaynaklardan elde edilmiş olan kolesterollerin izomerik yapılarının heterojen ve birbirinden farklı olabileceğini göstermektedir. Bu yapıların tanımlanması için LC-MS ve NMR gibi analiz teknikleri gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Mouritsen, O. G., Zuckermann, M. J. (2004). What' s so special about cholesterol? *Lipids*, 39(11), 1101-1113
2. Nelson, D. L., Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th Edition. USA: W. H. Freeman
3. Vance, D. E., Bosch, H. V. (2000). Cholesterol in the year 2000. *Biochim Biophys Acta*, 1529, 1-8
4. Westover, E. J., Covey, D. F. (2004). The Enantiomer of Cholesterol. *J Membrane Biol*, 202, 61-72
5. Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*, 9, 125-138
6. Wasowicz, E. (2003). Cholesterol and Phytosterols, *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*, Edited by Zdzislaw E. Sikorski, Anna Kolakowska, 93-107, CRC Press LLC
7. Hernandez, H. H., Chaikoff, I. L., Dauben, W. G., Abraham, S. (1953). The absorption of C¹⁴-labelled epicholesterol in the rat. *J Biol Chem*
8. Harold, F. M., Jayko, M. E. (1954). Metabolism of epicholesterol - 4 - C¹⁴ in the rat. *J Biol Chem*
9. Crowder, C. M., Westover, E. J., Kumar, A. S., Ostlund, R. E., Covey, D. F. (2001). Enantiospecificity of cholesterol function in vivo. *J Biol Chem*, 276(30), 44369-44372
10. Westover, E. J., Lin, X., Riehl, T. E., Ma, L., Stenson, W. F., Covey, D. F., Ostlund, R. E. (2006). Rapid transient absorption and biliary secretion of enantiomeric cholesterol in hamsters. *J Lipid Res*, 47, 2374-2381
11. Xu, F., Rychnovsky, S. D., Belani, J. D., Hobbs, H. H., Cohen, J. C., Rawson, R. B. (2005). Dual roles for cholesterol in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(41), 14551-14556
12. Gürdöl, F., Ademoğlu, E. (2006) *Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri
13. Introduction to Steroids. Erişim: 6 Ekim 2008, <http://www.people.vcu.edu/~urdesai/intro.htm#Conformation>
14. The University of Kentucky, Department of Chemistry. Erişim: 22 Ekim 2008, www.chem.uky.edu/courses/che230/RBG/lecnotes/J4.pdf

15. Sané, A. T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Ménard, D., Beaulieu, J-F., Levy, E. (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res*, 47, 2112-2120
16. Hui, D. Y., Howles, P. N.: Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16, (2), 183-192, 2005
17. Xu, J., Eliat-Adar, S., Loria, C., Goldbourt, U., Howard, B. V., Fabsitz, R. R., Zephier, E. M., Mattil, C., Lee, E. T. (2006). Dietary fat intake and risk of coronary heart disease: The Strong Heart Study¹⁻⁴. *Am J Clin Nutr*, 84, 894-902
18. Grundy, S. M., Bilheimer, D., Blackburn, H., Brown, W. V., Kwiterovich, P. O., Mattson, F., Schonfeld, G., Weidman, W. H. (1982). Rationale of the diet-heart statement of the American Heart Association. Report of the Nutrition Committee. *Circulation*, 65, 839A-854A
19. Pedersen, T. R. (1994). Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian simvastatin survival study (4S). *Lancet*, 344, 1383-1389
20. Shepherd, J., Cobbe, S. M., Ford, I., Isles, C. G., Lorimer, A. R., Macfarlane, P. W., McKillop, J. H., Packard, C. J. (1995). Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, 333, 1301-1307
21. Ikonen, E. (2006). Mechanisms for cellular cholesterol transport: Defects and human disease. *Physiol Rev*, 86, 1237-1261
22. Bloch, K. (1965). The biological synthesis of cholesterol. *Science*, 150, 19-23
23. Parish, E. J., Boos, T. L., Li, S. (2002). The Chemistry of Waxes and Sterols. *Food Lipids*, Edited by Akoh, C. C., Min, D. B., 103-131, Marcel Dekker
24. The Medical Biochemistry Page. Erişim: 10 Ekim 2008, <http://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol.html#synthesis>
25. Waterham, H. R. (2006). Defects of cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett*, 580, 5442-5449
26. Istvan, E. S., Deisenhofer, J. (2000). The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. *Biochim Biophys Acta*, 1529, 9-18

27. Liscum, L. (2002). Cholesterol biosynthesis. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* 4th Edition. Vance, D.E. and Vance, J. (editors), 409-431, Elsevier
28. Istvan, E. (2003). Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis Supplements*, 4, 3-8
29. Gillespie, J. G., Hardie, D. G. (1992). Phosphorylation and inactivation of HMG CoA reductase at the AMP-activated protein kinase site in response to fructose treatment of isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett*, 306, 59-62
30. North Western University. Erişim: 1 Ekim 2008,
<http://www.feinberg.northwestern.edu/nutrition/factsheets/cholesterol.html>
31. Altmann, S. W., Davis, H. R. Jr, Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., Graziano, P. (2004). Niemann-Pick C1-Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 303, 1201-1204
32. Davis, H. R. Jr, Zhu, L. J., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., Yao, X., Iyer, S. P., Lam, M. H., Lund, E. G., Detmers, P. A., Graziano, M. P., Altmann, S. W. (2004). Niemann-Pick C1-Like 1 is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*, 279, 33586-33592
33. Davis, H. R. Jr, Compton, D. S., Hoss, L., Tetzloff, G. (2001). Ezetimibe, a Potent Cholesterol Absorption Inhibitor, Inhibits the Development of Atherosclerosis in ApoE Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 2032-2038
34. Garcia-Calvo, M., Lisnock, J., Bull H. G., Hawes B. E., Burnett, D. A., Braun, M. P., Crona, J. H., Davis, H. R. Jr, Dean, D. C., Detmers, P. A., Graziano, M. P., Hughes, M., Macintyre, D. E., Ogawa, A., O'Neill, K. A., Iyer, S. P., Shevell, D. E., Smith, M. M., Tang, Y. S., Makarewicz, A. M., Ujjainwalla, F., Altmann, S. W., Chapman, K. T., Thornberry, N. A. (2005). The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, (23), 8132-8137
35. Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1990). Regulation of mevalonate pathway. *Nature*, 343, 425-430

36. Goldstein, J. L., Bose-Boyd, R. A., Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, 124, 35-46
37. Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1997). The SREBP Pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89, 331-340
38. Tontonoz, P., Magnelsdorf, D. J. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol*, 17, 985-993
39. Chang, T. Y., Chang, C. C., Cheng, D. (1997). Acyl-coenzymeA: cholesterol acyl transferase. *Annu Rev Biochem*, 66, 613-638
40. Chiang, J. Y. L. Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci* 3, 176-193, 1998. Erişim: 15 Ekim 2008, <http://www.bioscience.org/1998/v3/d/chiang/d176-193.htm>
41. Myant, N. B., Mitropoulos, K. A. (1977). Cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Lipid Res*, 18, 135-153
42. Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Rigotti, A., Iqbal, S. N., Edelman, E. R., Krieger, M. (1997). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, 387, 414-417
43. Kusters, A., Jirsa, M., Groen, A. K. (2003). Genetic background of cholesterol gallstone disease. *Biochim Biophys Acta*, 1637, 1-19
44. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (2004) *Harper Biyokimya* (N. Dikmen, T. Özgünen, Çev.) İstanbul:Nobel Tıp Kitabevleri (2000)
45. Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P., Slotte, J. P. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*, 41, 66-97
46. Maxfield, F. R., Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, 438, 612-621
47. Simons, K., Vaz, V. L. (2004). Model systems, lipid rafts and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys Biomol Struct*, 33, 269-295
48. Simons, K., Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572
49. Simons, K., Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*, 110, 597-603

50. Anderson, R. A., Byrum, R. S., Coates, P. M., Sando, G. N. (1994). Mutations at the lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase gene locus in Wolman disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 2718–2722
51. Liscum, L., Faust, J. R. (1987). Low density lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J Biol Chem*, 262, 17002–17008
52. Nicholls, S. J., Rye, K. A., Barter, P. J. (2005). High-density lipoproteins as therapeutic targets. *Curr Opin Lipidol*, 16, 345–349
53. Gelissen, I. C., Haris, M., Rye, K. A., Quinn, C., Brown, A. J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 534–540
54. Zannis, V. I., Chroni, A., Krieger, M. (2006). Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med*, 84, 276–294
55. Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W. E., Hahmann, H. W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K. J., Schmitz, G. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, 22, 347–351
56. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Genest, J. Jr., Hayden, M. R. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*, 22, 336–345
57. Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., Grishin, N. V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., Hobbs, H. H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, 290, 1771–1775
58. Lee, M. H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., Srivastava, A. K., Salen, G., Dean,

- M., Patel, S. B. (2001). Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet*, 27, 79–83
59. Klett, E. L., Patel, S. (2003). Genetic defenses against noncholesterol sterols. *Curr Opin Lipidol*, 14, 341–345
60. Cali, J. J., Hsieh, C. L., Francke, U., Russell, D. W. (1991). Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem*, 266, 7779–7783
61. Menkes, J. H., Schimschock, J. R., Swanson, P. D. (1968). Cerebrotendinous xanthomatosis. The storage of cholestanol within the nervous system. *Arch Neurol*, 19, 47–53
62. Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J. F., Clark, B. J., Stocco, D. M., Saenger, P., Rogol, A., Miller, W. L. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 267, 1828–1831
63. Stocco, D. M. (2002). Clinical disorders associated with abnormal cholesterol transport: mutations in the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Cell Endocrinol*, 191, 19–25
64. Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261, 921–923
65. Mauch, D. H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E. C., Otto, A., Pfrieder, F. W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, 294, 1354–1357
66. Vance, J. E., Hayashi, H., Katren, B. (2005). Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol*, 16, 193–212
67. Katzov, H., Chalmers, K., Palmgren, J., Andreasen, N., Johansson, B., Cairns, N. J., Gatz, M., Wilcock, G. K., Love, S., Pedersen, N. L., Brookes, A. J., Blennow, K., Kehoe, P. G., Prince, J. A. (2004). Genetic variants of ABCA1 modify Alzheimer disease risk and quantitative traits related to beta-amyloid metabolism. *Hum Mutat*, 23, 358–367
68. Mace, S., Cousin, E., Ricard, S., Genin, E., Spanakis, E., Lafargue-Soubigou, C., Genin, B., Fournel, R., Roche, S., Haussy, G., Massey, F., Soubigou, S.,

- Brefort, G., Benoit, P., Brice, A., Champion, D., Hollis, M., Pradier, L., Benavides, J., Deleuze, J. F. (2005). ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 18, 119–125
69. Wollmer, M. A., Streffer, J. R., Tsolaki, M., Grimaldi, L. M., Lutjohann, D., Thal, D., von Bergmann, K., Nitsch, R. M., Hock, C., Papassotiropoulos, A. (2003). Genetic association of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase with cerebrospinal fluid cholesterol levels, brain amyloid load, and risk for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*, 8, 635–638
70. Jick, H., Zornberg, G. L., Jick, S. S., Seshadri, S., Drachman D. A. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet*, 356, 1627–1631
71. Wolozin, B., Kellman, W., Rousseau, P., Celesia, G. G., Siegel, G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol*, 57, 1439–1443
72. Williams, K. J., Tabas, I. The response to retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 551-561, 1995 Erişim: 1 Kasım 2008, <http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/full/15/5/551>
73. Berliner, J. A., Subbanagounder, G., Leitinger, N., Watson, A. D., Vora, D. (2001). Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 11, 142-147
74. Glass, C. K., Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis. The road ahead. *Cell*, 104, 503-516
75. Navab, M., Ananthramaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Letten, B. J., Ansell, B. J., Fonarow, G. C., Vahabzadeh, K., Hama, S., Hough, G., Kamranpour, N., Berliner, J. A., Lusis, A. J., Fogelman, A. M. (2004). The oxidation hypothesis of atherogenesis: The role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*, 45, 993-1007
76. Quehenberger, O. (2005). Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. *J Lipid Res*, 46, 1582-1590
77. Getz, G. S. (2005). Immune function in atherogenesis. *J Lipid Res*, 46, 1-10
78. Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*, 52, 223-261

79. Kruth, H. S., Jones, N. L., Huang, W., Zhao, B., Ishii, I., Chang, J., Combs, C. A., Malide, D., Zhang, W. (2005). Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 280, 2352-2360
80. Buton, X., Mamdouh, Z., Ghosh, R., Du, H., Kuriakose, G., Beatini, N., Grabowski, G. A., Maxfield, F. R., Tabas, I. (1999). Unique cellular events occurring during the initial interaction of macrophages with matrix-retained or methylated aggregated low density lipoprotein. Prolonged cell-surface contact during which LDL-cholesteryl ester hydrolysis exceeds LDL protein degradation. *J Biol Chem*, 274, 32112-32121
81. Osterud, B., Bjorklid, E. (2003). Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev*, 83, 1069-1112
82. Tabas, I. (1999). Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu Rev Nutr*, 19, 123-139
83. Boren, J. (1998). Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single point mutation in apo-B-100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest*, 101, 2658-2664
84. Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407, 233-241
85. Twickler, T., Dallinga-Thie, G. M., Chapman, M. J., Cohn, J. S. (2005). Remnant lipoproteins and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 7, 140-147
86. Hegele, R. A. (1999). Paraoxonase-genes and disease. *Ann Med*, 31, 217-224
87. Shih, D. M., Xia, Y., Wang, X., Miller, E., Castellani, L. W., Subbanagounder, G., Cheroutre, H., Faull, K. F., Berliner, J. A., Witztum, J. L., Lusis, A. J. (2000). Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem*, 276, 17527-17535
88. Aikawa, M., Libby, P. (2004). The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol* 13, 125-138
89. Corti, R., Hutter, R., Badimon, J. J., Fuster, V. (2004). Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*, 17, 35-44

90. Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D., Farb, A. (2002). Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol*, 15, 439-446
91. Libby, P. (1996). Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol*, 7, 330-335
92. Geng, Y. J., Libby, P. (2002). Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1370-1380
93. Tabas, I. (2004). Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ*, 11(Suppl. 1), S12-S16
94. Fessenden, R. J., Fessenden, J. S., Logue, M. W. (2001). Organik Kimya (Tahsin Uyar, Çev.). Ankara: Güneş Kitabevi. (1998)
95. Hart, H., Hart, D. J., Craine, L. E. (1998). Organik Kimya (Tahsin Uyar, Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık. (1995)
96. İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü. (2007). HPLC tekniği ve uygulamaları kursu, kurs notları. Malatya: İnönü Üniversitesi Basımevi.
97. Wikimedia Commons. Erişim: 1 Kasım 2008, http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Cholesterol_with_numbering.svg
98. The Lipid Library. Erişim: 15 Ekim 2008, <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/cholest/index.htm>
99. Iwanami Introductory Chemistry Series. Erişim 7 Kasım 2008, www.t.soka.ac.jp/chem/iwanami/stereo/stereoCh7.pdf
100. Duncan, I. W., Culbreth, P. H., Burtis, C. A. (1979). Determination of free, total and esterified cholesterol by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 162 (3), 281-292
101. Kummer, M., Palme, H. J., Werner, G. (1996). Resolution of enantiomeric steroids by high performance liquid chromatography on chiral stationary phases. *J Chromatogr A*, 749, 61-68
102. Solomons, G., Fryhle, C. (2002). *Organik Kimya* (G. Okay ve Y. Yıldırım, Çev.). İstanbul: Literatür Yayıncılık. (2000).
103. Hoving, E. B. (1995). Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids. *J Chromatogr B*, 671, 341-362

104. Karu, K., Hornshaw, M., Woffendin, G., Bodin, K., Hamberg, M., Alvelius, G., Sjövall, J., Turton, J., Wang, Y., Griffiths, W. J. (2007). Liquid chromatography-mass spectrometry utilizing multi-stage fragmentation for the identification of oxysterols. *J Lipid Res*, 48, 976-987
105. Grandgirard, A., Martine, L., Joffre, C., Juaneda, P., Berdeaux, O. (2004). Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxysterol derivatives. Application to a phytosterol-enriched food. *J Chromatogr A*, 1040, 239-250
106. Kummer, M., Werner, G. (1998). Chiral resolution of enantiomeric steroids by high-performance liquid chromatography on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) under reverse phase conditions. *J Chromatogr A*, 825, 107-114
107. Mortimer, B. C., Tso, P., Phan, C. T., Beveridge, D. J., Wen, J., Redgrave, T. G. (1995). Features of cholesterol structure that regulate the clearance of chylomicron-like lipid emulsions. *J Lipid Res*, 36, 2038-2053
108. Johnson, W.M.P., O'Keefe, D.F., Rihs, K. (1984). Separation of Geometrical Isomers of Oxime O-Ethers by High-Performans Liquid Chromatography: Use of Extended Multiple Recycle on High-Efficiency Columns. *J Chromatogr*, 291, 449-452

ÖZGEÇMİŞ

6 Ekim 1980' de Malatya' da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimimi Malatya' da tamamladım. 1999 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım. 2005 yılında lisans eğitimimi tamamlayarak mezun oldum. 2006 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı' nda yüksek lisansa başladım. 2008 yılının başında İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı' na Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen görevime devam etmekteyim.