

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYETLE ALINAN BAZI HETEROSİKLİK AROMATİK AMİN
TÜRLERİNİN FARELERDE ATEROSKLEROZ, KAN LİPİD PROFİLİ VE
ENDOTEL DİSFONKSİYON ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Dyt. Armağan Aytuğ YÜRÜK

Beslenme ve Diyetetik Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2020

TEŞEKKÜR

Bu güne kadar eğitimime katkısı olan bütün hocalarıma,

Tezimin planlanması ve yürütülmesindeki katkılarının yanında ihtiyaç duyduğum her anda desteğini ve zamanını esirgemeyen, akademik bilgilerini ve deneyimlerini paylaşmanın yanında yaşadığımız zorluklarda her zaman doğru çözümlü bularak sorunlara farklı bir açıyla bakmamı sağlayan sayın danışman hocam Doç. Dr. Reyhan NERGİZ ÜNAL'a,

Tez İzleme Komitesi'nde yer alarak çalışmamın daha ileriye gitmesine yardım eden sayın Prof. Dr. Neslişah RAKICIOĞLU'na ve Tez İzleme Komitesi'nde bulunmanın yanında materyal desteği vererek çalışmamın hızla devam etmesini sağlayan Doç. Dr. Erkan YILMAZ'a,

İzole edilen dokuların histokimyasal inceleme aşamasında destek veren Prof. Dr. Aytekin AKYOL'a,

Cerrahi müdahale sırasında ihtiyaç duyduğum her anda yardımcı olan değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Dyt. Funda TAMER'e, Uzm. Dyt. Elif UĞUR'a ve Uzm. Dyt. Betül KİŞİOĞLU'na,

Çalışmam süresince her zaman destek ve yardımlarını hissettiğim sevgili ARKADAŞLARIMA,

Son olarak her zaman olduğu gibi bu süreçte de sevgi ve desteklerini esirgemeyen, her şeyi sabır ve anlayışla karşılayarak uzaktan manevi güç veren sevgili AİLEME,

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Uzm. Dyt. Armağan A. YÜRÜK

ÖZET

Yürük, AA. Diyetle Alınan Bazı Heterosiklik Aromatik Amin Türlerinin Farelerde Ateroskleroz, Kan Lipid Profili ve Endotel Disfonksiyon Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Programı, Doktora Tezi. Ankara, 2020. Heterosiklik aromatik aminler protein içeren besinlerin pişirilmesiyle oluşmaktadır. Genel olarak kanser oluşumu üzerindeki etkileri araştırılırken; kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar oldukça yetersizdir. Ayrıca heterosiklik aminlere maruz kalınan sürenin dislipidemi ve ateroskleroz gelişimindeki etkilerini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez heterosiklik aminlerin kısa veya uzun süreli alımının etkilerinin ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların temel oluşum mekanizmaları açısından incelenmesi amacıyla planlanmıştır. C57Bl/6 orijinli (n=80, 3 haftalık, dişi) fare 21 hafta boyunca yüksek yağ ve kolesterol (%20,w/w Hindistan cevizi yağı; %0,2 w/w kolesterol) içeren diyet ile beslenmiştir. Randomize olarak 8 gruba ayrılan farelere 3 ya da 10 hafta boyunca farklı türde heterosiklik amin içeren yüksek yağlı yem verilmiştir (10 mg/kg va PhIP, MeIQx veya PhIP+MeIQx). Müdahalenin sonunda plazma ve karaciğerde total kolesterol, trigliserit, LDL, VLDL, HDL, Apo B, Apo A1; plazmada VCAM-1 ve ICAM-1 düzeyleri kolorimetrik/ELISA yöntemiyle; aortta ICAM-1 ve VCAM-1 miktarı Western Blot yöntemiyle; ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemiyle incelenmiştir. Plazma ve karaciğerde total kolesterol, LDL, Apo A1 ve Apo B düzeyleri hem heterosiklik amin türünden hem de alım süresinden etkilenmemektedir ($p>0,05$). Yüksek yağlı ve kolesterol içeren diyet alan farelerde uzun süreli (10 hafta) heterosiklik aromatik amin alan gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma trigliserit ($p=0,037$) düzeylerinin azaldığı, karaciğer HDL düzeylerinin arttığı ($p=0,025$) bulunmuştur. Aynı heterosiklik amini uzun ve kısa süreli alan gruplar karşılaştırıldığında plazma HDL düzeylerinin PhIP gruplarında kısa ve uzun süre sırasıyla; $0,284\pm 0,03$ ve $0,152\pm 0,01$ mmol/L, MeIQx gruplarında $0,204\pm 0,02$ ve $0,210\pm 0,01$ mmol/L her iki türü birlikte alan gruplarda $0,250\pm 0,02$ ve $0,216\pm 0,01$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Endotel disfonksiyon ve aterosklerotik plak gelişiminde gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Sonuç olarak heterosiklik amin alımının vücutta meydana getirdiği kardiyovasküler hastalık riski ve karsinogenik/mutajenik etki gibi etkileri de göz önüne alınarak diyetle alımının sınırlandırılması önemlidir.

Anahtar Kelimeler:Heterosiklik aromatik amin, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalık

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 3501 programı çerçevesinde 115S623 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Yuruk, AA. Effect of Several Dietary Heterocyclic Aromatic Amine Species on Atherosclerosis, Blood Lipid Profile and Endothelial Dysfunction in Mice. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences Program of Nutrition and Dietetics, Doctor of Philosophy Thesis. Ankara, 2020. Heterocyclic aromatic amines are formed during cooking process of high protein including food. In general, the health outcomes are investigated on cancer development while they are not considered enough on the basis of cardiovascular disease. In addition, there are no studies investigating the effects of exposure duration to heterocyclic aromatic amines on the development of atherosclerosis. Therefore, this study was planned to investigate the effects of short or long term exposure to heterocyclic aromatic amines via diet in terms of atherosclerosis and the basic mechanisms of cardiovascular diseases. C57Bl/6 origin (n=80, 3 weeks old, female) mice were fed with a high fat and cholesterol diet (%20,w/w coconut oil; %0,2 w/w cholesterol) for 21 weeks. Different types of heterocyclic amines containing high fat diets were administered either 3 or 10 weeks after randomisation to 8 groups (10 mg/kg bw PhIP, MeIQx or PhIP+MeIQx). At the end of dietary manipulation total cholesterol, triglyceride, LDL, VLDL, HDL, Apo A1 and Apo B levels determined in the plasma and liver; plasma ICAM-1 and VCAM-1 levels determined by a colorimetric/ELISA method; ICAM-1 and VCAM-1 protein levels determined by Western Blot analysis and expression levels determined by RT-qPCR analysis. The plasma and liver levels of total cholesterol, LDL, Apo A1 and Apo B were not affected by the type and exposure duration of heterocyclic amines. It was found that long-term (10 weeks) intake of heterocyclic aromatic amines decreased plasma triglyceride ($p = 0,037$) levels and increased liver HDL levels ($p = 0,025$) in rats receiving high fat and cholesterol diet. Compared with respectively for the short and long term intake of heterocyclic amines; plasma HDL levels in PhIP groups were $0,284 \pm 0,03$ and $0,152 \pm 0,01$ mmol / L, in MeIQx groups were $0,204 \pm 0,02$ and $0,210 \pm 0,01$ mmol / L and in groups that receiving both types of heterocyclic amines together were $0,250 \pm 0,02$ ve $0,216 \pm 0,01$ mmol/L ($p < 0,05$). There was no statistical difference in endothelial dysfunction and atherosclerotic plaque development between groups ($p > 0,05$). However, despite their potential positive health effects, it is important to limit dietary intake of heterocyclic amines when it is considered their negative health outcomes such as carcinogenic/mutagenic effects, oxidative stress and neurotoxicity.

Key Words: Heterocyclic aromatic amines, atherosclerosis, cardiovascular disease

This thesis was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) within the program 3501 with the project number 115S623.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar	1
1.2. Amaç ve Varsayımlar	4
1.3. Hipotezler	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Risk Faktörleri	5
2.2. Diyetle Alınan Lipid ve Proteinlerin Kardiyovasküler Hastalıklar ile İlişkisi	10
2.2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Lipidler	11
2.2.2. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Proteinler	12
2.3. Aminli Bileşikler ve Sağlık Üzerine Etkileri	15
2.3.1. Heterosiklik Aminlerin Tanımı, Metabolizması ve Etki Mekanizması	17
2.3.2. Heterosiklik Amin Maruziyeti ve Diyetin Heterosiklik Amin İçeriği	25
2.3.3. Heterosiklik Amin Maruziyeti ve Kronik Hastalıklar	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Çalışma Yeri, Zamanı, Dizaynı ve Örneklem Seçimi	33

3.2.	Hayvanların Temini ve Diyet Müdahalesi	34
3.2.1.	Hayvanların Temini ve Bakımı	34
3.2.2.	Uygulanan Diyet Müdahalesi	35
3.3.	Anestezi, Kan Alma, Doku Toplama ve Ötanazi	38
3.3.1.	Anestezi	38
3.3.2.	Kan Alma ve Ötanazi	38
3.3.3.	Organların Diseksiyonu	39
3.4.	Plazma ve Dokularda Lipid Profili ve Endotel Disfonksiyon Parametrelerinin Tayini	39
3.4.1.	Trigliserit Analizi	40
3.4.2.	Total Kolesterol Analizi	41
3.4.3.	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (VLDL-K) Analizi	42
3.4.4.	Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (LDL-K) Analizi	43
3.4.5.	Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (HDL-K) Analizi	44
3.4.6.	Apolipoprotein-B (Apo-B) Analizi	44
3.4.7.	Apolipoprotein A1 (Apo-A1) Analizi	45
3.4.8.	Vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1) Analizi	46
3.4.9.	İnterselüler hücre adezyon molekülü 1 (ICAM-1) Analizi	47
3.5.	Plazmada Kardiyovasküler Hastalık Riskini Gösteren Çeşitli Parametre ve İndekslerin Hesaplanması	48
3.6.	Bazı Proteinlerin Gen Ekspresyonu Analizi	49
3.6.1.	Doku Örneklerinin Hazırlanması	50
3.6.2.	Örneklerde Protein Miktar Tayini	51
3.6.3.	Primerlerin Dizaynı	51
3.6.4.	Gerçek zamanlı qPCR Analizi	51
3.7.	Bazı Enzim ve Peptidlerin Western-Blot Yöntemiyle Analizi	52
3.7.1.	Örneklerin Hazırlanması	52
3.7.2.	Örneklerde Protein Miktar Tayini	52
3.7.3.	Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	53
3.7.4.	Jeldeki Proteinlerin Membrana Transferi (Yarı-Kuru Sistem)	53

3.7.5. Antikorlarla Bağlanma	54
3.7.6. Görüntüleme	54
3.8. Aortun Histokimyasal İncelenmesi	54
3.9. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	55
4. BULGULAR	56
4.1. Farelerin Yem Tüketimleri ve Vücut Ağırlıklarına İlişkin Bulguları	56
4.2. Biyokimyasal Bulgular	64
4.2.1. Lipid ve Lipoprotein Profili ile İlişkili Parametreler	64
4.2.2. Endotel Disfonksiyon ile İlişkili Parametreler	93
4.3. Aortta Endotel Disfonksiyona İlişkin Peptidlerin Ekspresyonu	96
4.4. Aterosklerotik Plak Oluşumuna İlişkin Bulgular	99
5. TARTIŞMA	103
5.1. Farelerin Yem Tüketimleri ve Vücut Ağırlıklarına İlişkin Bulguları	103
5.2. Biyokimyasal Bulgular	106
5.2.1. Lipid ve Lipoprotein Profili ile İlişkili Parametreler	106
5.2.2. Endotel Disfonksiyon ile İlişkili Parametreler	112
5.3. Aterosklerotik Plak Oluşumuna İlişkin Bulgular	114
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	117
6.1. Sonuçlar	117
6.2. Öneriler	131
7. KAYNAKLAR	133
8. EKLER	153
EK-1: Etik Kurul Onayı	
EK-2: Turnitin Ekran Görüntüsü	
EK-3: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACAT-1	Asetil Koenzim A: Kolesterol Asetil Transferaz 1
ACC	Amerikan Kardiyoloji Koleji
ACE	Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
AHA	Amerikan Kalp Birliği
AIA	Amidoimidazoazoren
Apo A1	Apolipoprotein A1
Apo B	Apolipoprotein B
Asetil CoA	Asetil Koenzim A
AαC	2-Amino-9H-Pyrido [2,3-B] İndol
BCA	Bişinkoninik Asit
CETP	Kolesterol Ester Transfer Proteini
CRP	C Reaktif Protein
ECAM-1	Endotel Lökosit Adezyon Molekülü
FFPE	Formalin-Fikse, Parafine Gömülü
F344	Fischer 344 Türü Sıçan
HAA	Heterosiklik Aromatik Amin
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HMG CoA redüktaz	Hidroksimetil Glutaril Koenzim A Redüktaz
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Dairesi
ICAM-1	Hücre İçi Adezyon Molekülü
IFP	2- Amino-1,6 –Dimethylfuro [3,2-E] İmidazo [4,5-B] Pyridine
IQ	İmidazokinolin
LCAT	Lesitin: Kolesterol Asil Transferaz
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipaz
MeIQx	2-Amino-3,8-Dimethylimidazo [4,5- F] Quinoxaline
NAT	N-Asetiltransferaz
NF-κβ	Nükleer Faktör Kappa B
Ox-LDL	Okside LDL

PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PhIP	2 - Amino - 1 -Methyl - 6 –Phenylimidazo [4,5 -B] Pyridine
qRT-PCR	Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SPSS	Statistical Package For Social Science
SREBP-1c	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein 1c
TMAO	Trimeti Amin N- Oksit
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
Trp- P-1	3-Amino-1,4-Dimethyl-5H- Pyrido [4,3-B] İndol
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WCRF	Dünya Kanser Araştırma Fonu
3-HPA	3-Hidroksipropiyonaldehide

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Ateroskleroz oluşum basamakları	8
2.2. PhIP ve MeIQx türü heterosiklik aminlerin önemli metabolik reaksiyonları	23
3.1. Çalışma dizaynı	34
4.1. Farelerin yem tüketimlerinin çalışma süresince değişimleri	57
4.2. Farelerin vücut ağırlıklarının çalışma süresince değişimi	60
4.3. Plazma total kolesterol konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	65
4.4. Karaciğer total kolesterol konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	66
4.5. Plazma trigliserit konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	68
4.6. Karaciğer trigliserit konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	69
4.7. Plazma VLDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	71
4.8. Karaciğer VLDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	72
4.9. Plazma HDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	74
4.10. Karaciğer HDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	75
4.11. Plazma LDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	77
4.12. Karaciğer LDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	78
4.13. Plazma Apo A1 konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	80
4.14. Karaciğer Apo A1 konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	81
4.15. Plazma Apo B konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	83
4.16. Karaciğer Apo B konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	84
4.17. Plazma non-HDL düzeyi ve total kolesterol-HDL oranlarının gruplara göre ortalaması	89
4.18. Plazma LDL-HDL oranı ve ApoB/Apo A1 oranının gruplara göre ortalaması	90
4.19. Plazma aterojenik indeksi ve aterojenik katsayının gruplara göre ortalaması	91
4.20. Plazma VCAM-1 konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	94
4.21. Plazma ICAM-1 konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması	95

Şekil	Sayfa
4.22. Aort örneklerinde endotel disfonksiyona ilişkin Western Blot bant görselleri	96
4.23. Aortta VCAM-1 için Western Blot bant görsellerinden hesaplanan bant yoğunluklarının gruplara göre değişimi.	97
4.24. Aort dokusunda qRT-PCR relatif VCAM-1 mRNA ekspresyonları.	98
4.25. Aort dokusunda qRT-PCR sonuçlarının relatif ICAM-1 mRNA ekspresyonları	99
4.26. Kısa süreli heterosiklik amin alan farelerin aort örneklerinde aterom oluşum durumları	100
4.27. Kısa süre PhIP türü heterosiklik amin alan farelerde gözlenen aortta düz kas hücre yapısındaki değişikliklerin aynı süredeki kontrol grubuyla karşılaştırılması	101
4.28. Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerin aort örneklerinde aterom oluşum durumları	102

TABLULAR

Tablo	Sayfa
2.1. Heterosiklik aminlerin sınıflandırılması	19
2.2. Heterosiklik amin tespit edilen besinler ve pişirme yöntemleri	26
3.1. Uygulanan diyet müdahalesi	36
3.2. Farelere diyet müdahalesi sırasında verilen yemlerin örüntüsü	37
3.3. Kullanılan primerlerin özellikleri	50
4.1. Farelerin yem tüketiminin çalışma dönemlerine göre ortalaması	59
4.2. Farelerin vücut ağırlıklarının çalışma dönemlerine göre ortalaması	63
4.3. Plazma örneklerindeki lipid ve lipoprotein profili parametrelerinin gruplara göre ortalama düzeyleri	85
4.4. Karaciğer örneklerindeki lipid ve lipoprotein profili parametrelerinin gruplara göre ortalama düzeyleri	87
4.5. Kardiyovasküler hastalık riskini gösteren bazı parametre ve indekslerin gruplara göre ortalama değerleri	92
4.6. Plazmada endotel disfonksiyon parametrelerinin gruplara göre ortalama değerleri	93

1. GİRİŞ

1.1. Kuramsal Yaklaşımlar

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün raporuna göre 2012 yılında bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklanan ölümlerin %46,2'si kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle gerçekleşmiştir ve 2012 yılında kardiyovasküler hastalıkların mortalitesi 17,5 milyon iken 2030 yılında 22,2 milyona yükseleceği düşünülmektedir (1). Ayrıca 2012 yılında kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanan ölümlerin 7,4 milyonu iskemik kalp hastalıkları, 6,7 milyonu inme sebebiyle gerçekleşmiştir (1). Kardiyovasküler hastalıkların etiolojisinde dislipidemi, ateroskleroz, yüksek kan basıncı, yüksek kan glikozu, artmış inflamatuvar belirteçler ve protrombotik durum gibi kardiyometabolik risk faktörleri yer almaktadır (2).

Endotelyum fonksiyonunun bozulması birçok farklı ve karmaşık nedenle ortaya çıkmaktadır ancak en temel nedenler; damar kasılmasını/gevşemesini sağlayan moleküller arasındaki dengesizlik, aşırı proinflamatuvar aktivite ve oksidatif stresin artmasıdır (3). Ayrıca antiinflamatuvar ve damar gevşetici etkileri bulunan nitrik oksit molekülünün biyoyararlanımının azalması da endotel disfonksiyon oluşumunu kolaylaştırmaktadır (4). Endotel nitrik oksit sentazın ayrıştırılması sırasında ortaya çıkan serbest radikaller okside LDL üretimini uyarmaktadır (5). Okside LDL nitrik oksit sentaz ekspresyonunu azaltmaktadır (6). Bu şekilde bozulan endotel sinyal dengesi vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu değiştirerek intimada yapısal değişikliklere neden olmaktadır (7).

Ateroskleroz; arterlerin intima tabakasında lipid ve fibröz elemanların birikimi ile oluşan progresif bir hastalıktır. Lipid peroksidasyonu, endotel disfonksiyon ve inflamatuvar medyatörler aracılığı ile vasküler düz kas hücreleri ve plateletlerin damar lümenini daraltmasıyla karakterize vasküler inflamatuvar bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır (8). Ateroskleroz patogenezinde dislipidemi de yer almaktadır. Endotel hasarı takiben, kolesterol açısından zengin makrofajlardan oluşan plak/aterom oluşmakta ve plateletler ile lökositlerin sürece katılımı ile ilerleyerek

ateroskleroz haline gelmektedir (9). Aterosklerozun ilk basamağı olan köpük hücrelerin oluşumu; lipid metabolizmasının düzenlenmesinde görülen bozulmalar sonucunda makrofajların dönüşümüyle gerçekleşmektedir (10).

Heterosiklik aminler nitrojenli bileşikler içeren, özellikle protein içeriği yüksek, besinlerde ısı işlem sırasında oluşmaktadır (11). İmidazokinolin grubundaki heterosiklik aminler pişmiş besinlerde en fazla miktarda oluşan maddelerdir ve öncül maddeleri olan serbest aminoasit, kreatin, kreatinin ve hekzozların maillard reaksiyonu ile oluşurlar (12). Besinlerde işleme sırasında en çok oluşan heterosiklik aminler: MeIQx (2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline) ve PhIP (2 - amino - 1 -methyl - 6 -phenylimidazo [4,5-b] pyridine türleridir (12).

Heterosiklik aromatik aminlerin oluşumu pişirme sıcaklığı, zamanı ve yöntemine göre farklılık göstermektedir. Özellikle tavada ve ızgarada pişirme yöntemleri uygulandığında diğer pişirme yöntemlerine göre daha fazla heterosiklik amin oluştuğu rapor edilmiştir (13). Ayrıca pişirme öncesinde uygulanan marinasyon gibi işlemler ya da baharat vb antioksidan etki gösterebilecek malzemelerin kullanımı heterosiklik amin oluşumunu azaltabilmektedir (14). Yapılan çalışmalarda insanlarda heterosiklik amin maruziyetinin yaklaşık olarak 1-26 ng/kg/gün olduğu yayınlanmıştır (15, 16).

Heterosiklik aminlerin bakteri ve bazı memeli hücre sistemleri üzerinde mutajenik etkileri olduğu bilinmektedir (11, 17, 18). Transgenik Fischer 344 (F344) türü sıçanlarda yapılan bir çalışmada 8 hafta boyunca besinlerde yaygın bulunan heterosiklik amin türü olan PhIP (2 - amino - 1 -methyl - 6 -phenylimidazo [4,5-b] pyridine)'e maruz kalmanın dalak, kolon ve prostat gibi hızlı hücre yenilenmesi olan dokularda mutasyonlara neden olduğunu gösterilmiştir (17). Fakat heterosiklik aminlerin insanlarda kansere yol açtığına yönelik kesin ve yeterli kanıtlar henüz bulunmamaktadır. Bu konuda yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde besinlerde bu bileşiklerin oluşumunun en aza indirilmesi ve maruziyetin azaltılması önem kazanmaktadır.

Heterosiklik aminlerin mutajenik etki mekanizmalarından birinin mast hücreleri ve inflamasyon üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (17-19). Bir çalışmada diğer bir heterosiklik amin türü olan Trp- P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b] indol)'in nitrik oksit üretimini arttırdığı, nitrik oksit ve okside metabolitlerinin genetik materyal üzerinde değişikliklere neden olarak mutajenik etki gösterebileceği tespit edilmiştir (19).

Beslenmenin kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde yer alan bazı risk faktörleriyle ilişkisi olduğu bilinmektedir. Çoğu diyet bileşeni kardiyovasküler hastalıkların risk faktörleriyle yakından ilişkilidir ve Amerikan Kalp Birliği (AHA) 2019 yılında yayınladığı rehberde bireylerin lipid profili, kan basıncı ve inflamasyon durumunu değiştirebileceği için özellikle diyetin içerdiği toplam yağ miktarı ve yağ asit türü, protein, basit karbonhidrat ve sodyum içeriği, posa, çeşitli vitamin ve minerallerin önemini vurgulamıştır (20 , 21, 22). Öte yandan diğer bir diyet bileşeni olan polisiklik aromatik hidrokarbonların, kan basıncı ve kalp atış hızını etkileyerek ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler hastalıklara neden olabileceğine yönelik çalışmalar yayınlanmıştır (23, 24). Heterosiklik aromatik aminler, kardiyovasküler hastalık risk faktörleriyle ilişkilendirilen polisiklik aromatik hidrokarbonlarla benzer kimyasal yapıya sahiptir ve yapılan çalışmalarda sağlık üzerine etkileri daha çok kanser ile ilişkilendirilmektedir (18, 25, 26). Ancak kardiyovasküler hastalıkların altında yatan mekanizmalarda endotel disfonksiyon ve ateroskleroz gelişiminde inflamasyonun etkili olduğu göz önüne alındığında heterosiklik aminlerin kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda da etkili olabileceği düşünülmektedir (27). Sınırlı sayıda da olsa heterosiklik aminlerin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olabileceğine yönelik yayınlar bulunmaktadır (28, 29). Yapılan çalışmalarda heterosiklik aminlerin kardiyak anomalilere ve disfonksiyona yol açabileceği gösterilmiştir (27, 30). Öte yandan bazı heterosiklik aminlerin lipid profilini değiştirerek kardiyovasküler hastalıkların gelişimini etkileyebileceğine yönelik yayınlar da bulunmaktadır (29, 31).

1.2.Amaç ve Varsayımlar

Proteinli besinlere ısı işlem uygulanmasıyla oluşan heterosiklik aromatik aminlerin kanser etiolojisindeki rolünü inceleyen çok sayıda bilimsel araştırma bulunmaktadır. Ancak organizmadaki inflamatuvar süreçlere olan etkileri aracılığı ile dislipidemi, endotel disfonksiyon ve ateroskerozu etkileyebileceği düşünülen heterosiklik aminlerin kardiyovasküler hastalıkların oluşumuna etkilerini inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır. Ayrıca bu çalışmaların hiçbiri heterosiklik aminlere maruziyet süresini dikkate almamıştır. Bu çalışmada farelerde heterosiklik aminlere iki farklı süre boyunca maruz kalmanın kardiyovasküler hastalıkların risk faktörlerine etkileri incelenmiştir. Böylece daha önce direkt olarak ilişkilendirilmemiş bir diyet faktörü olan heterosiklik aminlerin kardiyovasküler hastalık oluşumuna etkilerinin saptanması öngörülmüştür. Böylece, kardiyovasküler hastalıklar için tıbbi beslenme tedavilerinde yeni yaklaşımların geliştirilebilmesi konusunda diğer hayvan ve insan çalışmaları için altyapı niteliğinde veri elde edilmesi planlanmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı yüksek yağ ve kolesterol içeren diyet ek olarak, uzun veya kısa süre ile alınan heterosiklik aromatik aminlerin farelerde dislipidemi, endotel disfonksiyon ve ateroskleroz oluşumu gibi kardiyovasküler hastalık risk faktörleri üzerine etkilerini incelemektir.

1.3. Hipotezler

Bu tezin hipotezi “yüksek yağ ve kolesterol içeren diyet ek olarak, uzun süre alınan heterosiklik aromatik aminler farelerde dislipidemi, endotel disfonksiyon ve ateroskleroz oluşumunu kısa süreli alıma göre farklı etkiler” olarak belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Risk Faktörleri

Günümüzde kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi bulaşıcı olmayan kronik hastalıklar dünya genelindeki ölüm nedenlerinin %70'ini oluşturmaktadır (32). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre 2016 yılında bulaşıcı olmayan kronik hastalıklardan kaynaklanan ölümlerin %31'i kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle gerçekleşmiştir ve 2016 yılında kardiyovasküler hastalıkların mortalitesi 17,9 milyondur (33). Bu ölümlerin %85'i kalp krizi ve inme sebebiyle gerçekleşmiştir (33). Kardiyovasküler hastalıkların etiolojisinde artmış inflamatuvar belirteçler ve protrombotik durum, dislipidemi, yüksek kan basıncı, yüksek kan glikozu ve ateroskleroz gibi kardiyometabolik risk faktörleri yer almaktadır (2, 33).

Diyetle alınan veya karaciğerde *de novo* sentezlenen lipidler vücutta taşınmak için lipoproteinlere ihtiyaç duymaktadır (34). İncebağırsaklardan emilen lipid molekülleri lipoprotein lipaz (LPL) enzimi yardımıyla yapılarındaki trigliseritlerin parçalanmasının ardından şilomikronların yapısına katılarak karaciğer veya ekstrahepatik dokulara taşınmaktadır. Hedef dokularda yeniden esterleştirilerek trigliserit formunda depolanmaktadır. Karaciğerde sentezlenen trigliserit ve kolesterol, çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) yapısına aktarılarak kana salınmaktadır (35). Dolaşımdaki VLDL içeriğindeki trigliserit molekülleri LPL ile yıkılarak molekülün boyutlarını daha küçük hale getirmekte ve düşük dansiteli lipoproteini (LDL) oluşturmaktadır. LDL ve VLDL'nin yapısında bulunan apolipoprotein B (Apo B) karaciğerde sentezlenmektedir ve VLDL ile LDL'nin yapısındaki lipid moleküllerinin taşınmasında görevlidir. Sonraki basamakta VLDL yapısındaki trigliseritler HDL'ye aktarılmaktadır. Bu sırada HDL yapısında bulunan apolipoprotein A1 (Apo A1), lesitin: kolesterol asil transferaz (LCAT) enzimini aktive ederek plazma kolesterol esterlerini oluşturmaktadır. Esterleşen kolesterol molekülleri kolesterol ester transfer proteini (CETP) tarafından VLDL ve diğer lipoproteinlerin yapısına verilmektedir (34). Öte yandan HDL; dolaşımdaki lipid moleküllerini toplayıp karaciğere götürerek ters kolesterol transportunu sağlamakta ve antiatoremik etki

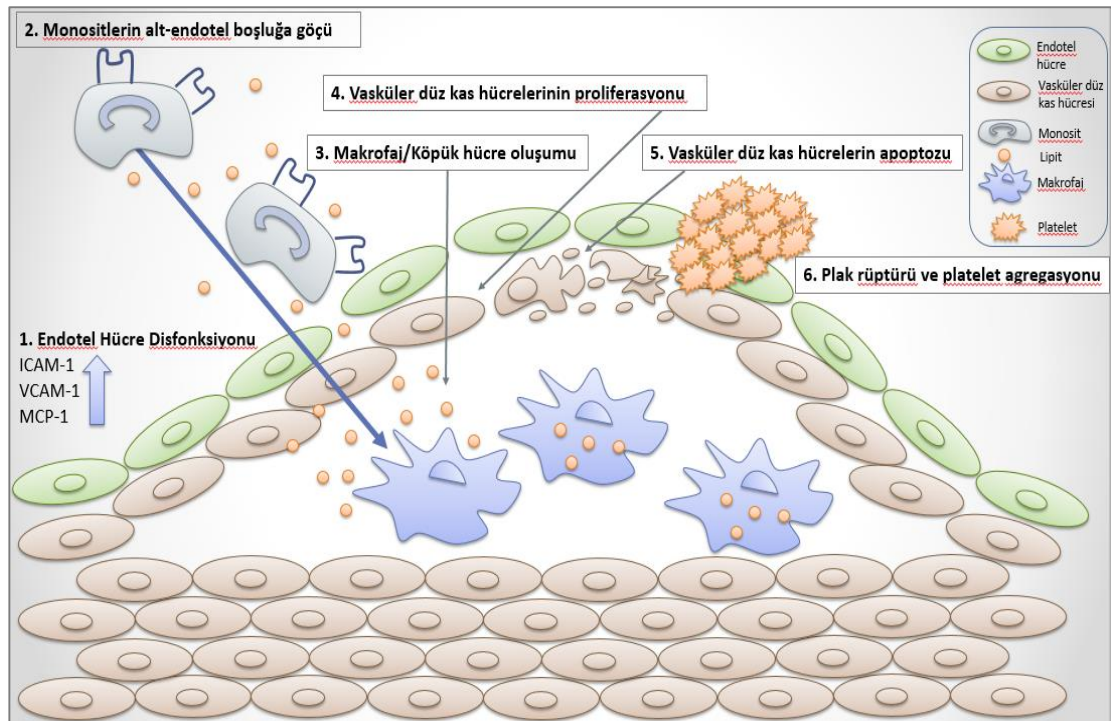
göstermektedir (34). Ayrıca HDL köpük hücrelerin yapısında biriken kolesterolü de toplamaktadır. Aterojenik dislipidemi; plazma LDL ve trigliserit düzeylerinin (dolayısıyla Apo B düzeylerinin) yüksek olması, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyinin (bağlantılı olarak Apo A1 düzeyinin) düşük olması ve düşük yoğunluklu LDL partikülleri miktarının fazla olması şeklinde tanımlanmaktadır (36). Plazmada aterojenik lipid ve lipoproteinlerin düzeyinin artmasıyla makrofajlar bu molekülleri yapılarına almaktadır. Özellikle LDL düzeyi yükseldiğinde bazı enzimatik ve enzimatik olmayan modifikasyonlara uğrayarak sitotoksik etkileri bilinen okside LDL (ox-LDL) oluşmakta ve yapısında daha fazla kolesterol biriktirme, endotel hasara, vasküler düz kas hücre proliferasyonuna, kemotaksise, çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörünün salınmasına yol açmaktadır. Ayrıca ox-LDL diğer hücrelerin gen ekspresyonunu değiştirerek koagülasyon mekanizmalarını da etkileyebilmekte ve bu şekilde aterosklerotik rüptür oluşumunu kolaylaştırmaktadır (34).

Endotel disfonksiyon; aterosklerotik plak oluşumu veya diğer kardiyovasküler olaylar başlamadan çok daha önce gerçekleşen ve ateroskleroz gelişiminde temel rol oynadığı düşünülen bir süreçtir (37). Endotelyum mekanik ve kimyasal uyarılara karşı parakrin, otokrin ve endokrin sistemlerin yönetimi ile nitrik oksit, siklooksijenaz, anjiotensin molekülleri ile vasküler dengeyi ve vasküler kasların tonusunu değiştirerek kan akımının düzenlenmesinde önemli rol almaktadır (7, 38). Endotelyum fonksiyonunun bozulması birçok farklı ve karmaşık nedenle ortaya çıkmaktadır ancak en temel nedenler; damar kasılmasını/gevşemesini sağlayan moleküller arasındaki dengesizlik, aşırı proinflamatuvar aktivite ve oksidatif stresin artmasıdır (3). Ayrıca antiinflamatuvar ve damar gevşetici etkileri bulunan nitrik oksit molekülünün biyoyararlanımının azalması da endotel disfonksiyon oluşumunu kolaylaştırmaktadır (4). Endotel nitrik oksit sentazın ayrıştırılması sırasında ortaya çıkan serbest radikaller ox-LDL üretimini uyarmaktadır (5). ox-LDL nitrik oksit sentaz ekspresyonunu azaltmaktadır (6). Bu şekilde bozulan endotel sinyal dengesi vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu değiştirerek intimada yapısal değişikliklere neden olmaktadır (7). Endotelyumun yukarıdaki kan akımını düzenleyici etkilerine ek olarak lökositlerin endotelyumdan dokulara geçişini, trombozisi ve trombolizisi

düzenlediği yayınlanmıştır (6, 39). Bir diğer kardiyovasküler risk faktörü olan hipertansiyon temel olarak damarların kasılıp gevşeme işlevindeki bozulma ile karakterizedir ve vasküler tonus değişimi ile ortaya çıkmaktadır (40). Bu fonksiyon bozukluğu; nitrik oksit, reaktif oksijen türleri ve endotel disfonksiyon varlığı, rennin anjiotensin sisteminde bozulma ile ortaya çıkabilmektedir (40). Kardiyovasküler risk faktörlerinin oluşmasıyla yakından ilişkili olması nedeniyle endotel disfonksiyon kardiyovasküler hastalık risk faktörleri için bir risk faktörü olabilmektedir.

Ateroskleroz; arterlerin intima tabakasında lipid ve fibröz elemanların birikimi ile oluşan progresif bir hastalıktır. Lipid peroksidasyonu, endotel disfonksiyon ve inflamatuvar medyatörler aracılığı ile vasküler düz kas hücreleri ve plateletlerin damar lümenini daraltmasıyla karakterize vasküler inflamatuvar bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır (8). Ateroskleroz patogeneğinde dislipidemi de yer almaktadır. Endotel hasarı takiben, kolesterol açısından zengin makrofajlardan oluşan plak/aterom oluşmakta ve plateletler ile lökositlerin sürece katılımı ile ilerleyerek ateroskleroz haline gelmektedir (9). Aterosklerozun ilk basamağı olan köpük hücrelerin oluşumu; lipid metabolizmasının düzenlenmesinde görülen bozulmalar sonucunda makrofajların dönüşümüyle gerçekleşmektedir (10). Kandaki lipid moleküllerinin miktarı makrofajların temizleme kapasitesinin üzerine çıktığında meydana gelen lipid birikimine bağlı olarak lipid damlacıkları oluşmakta ve makrofajlar yapısındaki bu lipid damlacıklarıyla birlikte köpük benzeri bir hal almaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar açısından oluşan bu köpük hücreleri aterosklerotik plak oluşumu ve büyümesi için kritik rol almaktadır. Kemirgen makrofaj hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada ox-LDL ile köpük hücre oluşumu tetiklendiğinde bu hücrelerin normalden daha fazla ekstraselüler veziküller oluşturduğu gösterilmiştir (41). Oluşan bu veziküllerin vasküler düz kas hücrelerinin adezyonunu etkilediği ve plateletlerin aterom alanına göç etmesini uyarabildiği bildirilmiştir. Özellikle LDL kolesterol düzeyi yüksek olduğunda oluşan ox-LDL partikülleri damar duvarına yerleşerek aterosklerozu başlatmaktadır. VLDL kolesterol içeriğinin yüksek olması nedeniyle özellikle degrade VLDL'nin aterojenik potansiyeli yüksektir (42). Aterosklerozun ilk basamağı olan endotel hasar, endotel hücrelerden salınan adezyon

molekülleri ve kemoreaktanların etkisiyle monositlerin neointima tabakasına infiltrasyonuyla başlamaktadır (Şekil 2.1.) (8, 43). Ayrıca nitrik oksit aktivitesinin azalmasına bağlı olarak süperoksit anyon, peroksinitrit gibi anyonların oluşumu da artarak endotel hasara yol açmaktadır (42). Damar yapısının intima tabakasında monositler makrofajlara dönüşmekte ve plazma LDL kolesterol düzeyi yüksek olduğunda alt- endotel alanda okside olan LDL partiküllerini yapısına katarak inflamatuvar köpük hücrelerini oluşturmaktadır. Böylece aterosklerotik plak oluşumu başlamaktadır. Bu basamaktan sonra; endotel lökosit adezyon molekülü (ECAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1), hücre içi adezyon molekülü (ICAM-1), siklooksijenaz 2, nitrik oksit sentaz, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve bazı interlökinler gibi inflamatuvar medyatörlerin ve adezyon moleküllerinin salınması ile plateletlerin ve dolaşımdaki diğer hücrelerin aterom bölgesinde birikimi sonucunda aterosklerotik lezyon büyümektedir. Böylece özellikle küçük arterlerin lümeninde oluşan daralma; kan basıncının artmasına ve dolaşım bozukluklarına yol açmaktadır (8, 43).



Şekil 2.1. Ateroskleroz oluşum basamakları (44)'den adapte edilmiştir.

Kardiyovasküler hastalıkların risk faktörlerinin etiolojisi incelendiğinde beslenmenin bu faktörlerle yakın ilişkisi olduğu görülmektedir. Çoğu diyet bileşeni kardiyovasküler hastalıkların risk faktörleriyle yakından ilişkili olsa da Amerikan Kalp Birliği (AHA) 2019 yılında yayınladığı rehberde bireylerin lipid profili, kan basıncı ve inflamasyon durumunu değiştirebileceği için özellikle diyetin içerdiği toplam yağ miktarı ve yağ asit türü, protein, karbonhidrat ve sodyum ile potasyum içeriğinin etkili olduğunu yayınlamıştır (20 , 21, 22). Diyetin toplam yağ miktarı ve yağ asit profili, basit karbonhidrat ve sodyum içeriği ile total antioksidan kapasitesi; bireylerin lipid profili, kan basıncı ve inflamasyon durumunu değiştirebilmektedir (21, 22). Özellikle sodyum (45, 46) ve potasyum alımı (47, 48) hipertansiyonla ilişkili olduğu düşünülen diyetle ilişkili faktörlerden birkaçıdır. Diyetin toplam yağ miktarı ve yağ asit örüntüsü de lipid profilini etkileyerek kardiyovasküler hastalık riskini arttırabilmektedir (49). Ayrıca rafine karbonhidrat tüketiminin de kardiyovasküler hastalık riskini arttırabildiği yayınlanmıştır (50).

Diyetle sodyum alım düzeyi kardiyovasküler hastalık risk faktörlerinden hipertansiyon gelişimi riskiyle yakından ilişkilidir (45, 46). Bir meta analizde bireylerin diyetle sodyum alımındaki azalmanın (4,4 g/gün azaltma) kan basıncını önemli miktarda azalttığı (sistolik 4,18 mmHg; diastolik 2,06 mmHg) yayınlanmıştır (51). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda diyetle düşük miktarda (<3g/gün) sodyum alımının da kardiyovasküler hastalık riskini arttırdığı bildirilmiştir (52, 53). Öte yandan diyetle potasyum alımı ile kan basıncı arasında negatif bir ilişki olduğu bilinmektedir. Yapılan meta analizlerde diyetle yeterli miktarda potasyum alımının (2,8 g/gün) özellikle hipertansif bireylerde kan basıncını düşürücü etkileri olduğu gösterilmiştir (47, 48). Amerikan Kardiyoloji Koleji (ACC) ve Amerikan Kalp Birliği (AHA) diyetle alınan sodyum miktarının 1500 mg/gün düzeyinin altına çekilmesini, alınabilecek ideal potasyum miktarının da 3500-5000 mg/gün olmasını önermektedir (20).

Plazma trigliserit düzeyi, serbest yağ asitleri, çeşitli lipoprotein türleri ve C reaktif protein düzeyleri kardiyovasküler hastalık gelişimi riskini arttırmaktadır (54). Bu parametrelerin enerji dengesi ve adipozitedeki değişimlerden hızla etkilendiği düşünüldüğünde diyetle alınan karbonhidratların kardiyovasküler hastalık gelişimi

riski ile olası ilişkisi dikkat çekmektedir (55). Bir çalışmada diyetle enerjinin karbonhidratlardan gelen oranının %60'ın üzerine çıkmasının kardiyovasküler hastalık öyküsü/riski olan bireylerde arteriyel kalınlaşma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (56). Yapılan çalışmalarda diyetin karbonhidrat içeriği azaltıldığında özellikle HDL düzeyinin arttığı ve trigliserit düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (57, 58). Ayrıca diyetin karbonhidrat oranının azaltılmasıyla total kolesterol ve LDL (59, 60), serbest yağ asitleri (61) ve CRP (62) düzeylerinin de düştüğünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Epidemiyolojik çalışmaların incelendiği bir meta analizde diyetin karbonhidrat miktarının azaltılmasıyla kardiyovasküler hastalık risk faktörlerinde iyileşme sağlandığı bildirilmiştir (63). Diyetin posa içeriği, glikemik indeksi, tam tahılların toplam tahıllara oranı gibi parametrelerin kullanılarak hesaplanan diyetin karbonhidrat indeksinin incelendiği bir çalışmada diyetin karbonhidrat indeksi ve kardiyovasküler hastalık riski arasında negatif ilişki bulunduğu rapor edilmiştir (64). Bu durum kardiyovasküler hastalık riski açısından değerlendirildiğinde diyetin içerdiği karbonhidrat miktarının yanında karbonhidrat türünün de dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Bir meta analizde hem yüksek hem de düşük miktarda karbonhidrat alımının iskemik kalp hastalıklarında mortalite riskini arttırdığı, en düşük riskin karbonhidratlardan gelen enerjinin %50-55 arasında görüldüğü yayınlanmıştır (65). Yapılan çalışmalarda sükröz ve fruktoz gibi basit şekerlerin *de novo* lipogenezi arttırarak dislipidemiye neden olabileceği gösterilmiştir (50). Bu nedenle kardiyovasküler hastalık riskinin azaltılabilmesi için günlük diyetle tüketilen basit şekerlerin günlük enerjiden gelen oranının Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) önerisi olan %10'un altına (uygun olduğu durumda %5'in altına) düşürülmesi gerekmektedir.

2.2. Diyetle Alınan Lipid ve Proteinlerin Kardiyovasküler Hastalıklar ile İlişkisi

Amerikan Kardiyoloji Koleji (ACC) ve Amerikan Kalp Birliği'nin (AHA) 2019 yılında yayınlanan rehberinde diyetle sebze, meyve, kurubaklagiller, yağlı tohumlar, tam tahıl ürünleri ve balık tüketiminin kardiyovasküler hastalık riskini azaltabileceğini yayınlanmıştır (20). Önerilen bu beslenme örüntüsü incelendiğinde diyetle posa alımı ve bitkisel besinlerin tüketiminin arttırılmasının yanında hayvansal doymuş yağ

asitleri kaynaklarının azaltılmasının hedeflendiği görülmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalık riski açısından diyetin içerdiği yağ miktarı ve yağ asit örüntüsü ön plana çıkmıştır. Ancak diyetle hayvansal yağ kaynakları aynı zamanda protein miktarı/kalitesi yüksek besinlerdir. Bu nedenle bu bölümde kardiyovasküler hastalık risk faktörleri diyetin lipid ve protein içeriği açısından değerlendirilecektir.

2.2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Lipidler

Yapılan meta analizlerde diyetle alınan yağ miktarı ve kardiyovasküler hastalık riski arasında bir ilişki olduğu yayınlanmıştır (49). Özellikle diyetle alınan yağın plazma kolesterol seviyelerini direkt olarak etkilediği uzun süredir bilinmektedir (66). Ancak diyet yağının kardiyovasküler hastalıkların oluşumundaki tüm etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır. Diyet yağının inflamatuvar süreçleri aktive ederek ve oksidatif dengeyi değiştirerek ateroskleroz gelişimini kolaylaştırabileceği düşünülmektedir. Özellikle diyetdeki doymuş ve trans yağ asitleri proinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak kardiyovasküler hastalıklara zemin hazırlayabilmektedir (67-70). Ayrıca yüksek miktarda yağ tüketiminin nitrik oksit aracılı endotel fonksiyonu etkileyebileceği düşünülmektedir. Bir çalışma yüksek yağlı (%41, enerji) diyetin nitrik oksit biyoyararlılığını etkileyerek endotel disfonksiyona yol açabileceğini bildirmiştir (71). Bu etkinin diyet yağının endojen nitrik oksit sentaz inhibitörü olan asimetrik dimetil arjinin düzeyini artırması yoluyla gerçekleşebileceği düşünülmektedir (72, 73). Tek bir öğünde yenen aşırı yağlı yiyeceklerin bile adezyon moleküllerinin salınımını artırarak endotelin kaygan yapısını yapışkan ve protrombotik hale getirerek endotel disfonksiyon ve ateroskleroz oluşumuna yatkınlık sağladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (8, 43). Diyetle alınan doymuş yağ asitlerinin doymamış yağ asitleriyle değiştirilmesinin iskemik kalp hastalıkları riskini azalttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (74, 75). Epidemiyolojik bir çalışmanın sonuçlarına göre yağ asit örüntüsünden bağımsız olarak diyetle alınan toplam yağ miktarı azaltıldığında tüm nedenlerle gerçekleşen ölüm riski de azalmaktadır (76). Yapılan bir meta analizde kardiyovasküler hastalık riski açısından

diyetin doymuş yağ içeriğinin etkisi bulunmazken diyetle alınan trans yağ miktarının hastalık riskini arttırdığı yayınlanmıştır (49). Yapılan çalışmalar ışığında; Amerikan Kardiyoloji Koleji (ACC) ve Amerikan Kalp Birliği (AHA) diyetle alınan doymuş yağ asitlerinin tekli ve çoklu doymamış yağ asitleriyle yer değiştirilmesinin ve trans yağ asitleri alımından kaçınılmasının olumlu etkileri olduğunu bildirmiştir (20).

2.2.2. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Proteinler

Diyetteki proteinlerin kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri protein kaynağı olan besinin türü, besinin proteinlerin yanında başka hangi besin öğelerini içerdiği, aminoasit örüntüsü, besinin işlenmesi sırasında uygulanan yöntemler veya oluşan ikincil maddeler gibi birçok faktöre göre değişmektedir. Bu nedenlerle kardiyovasküler hastalıklarda proteinler için bir öneri yapılması gerektiğinde proteinler tüm yönleriyle göz önüne alınmalıdır. Proteinler diyetle hayvansal veya bitkisel kaynaklardan alınabilmektedir. Yumurta, kırmızı et, tavuk, balık eti ve bu etlerin ürünleri, süt ve süt ürünleri diyetle başlıca hayvansal protein kaynağı iken bitkisel protein içeren besinler baklagiller ve tahıllardır. Proteinler sağladıkları termojenik etkilerinin yanında gastrointestinal hormon ve peptidlerin salınımını uyarmaları yoluyla iştahı değiştirerek yağ metabolizması üzerinde dolaylı bir etki oluşturmakta ve kardiyovasküler risk bileşenlerine katkı sağlamaktadır. Yapılan bir meta analizde yüksek miktarda (%27, enerji) protein tüketiminin plazma total kolesterol ve trigliserit düzeylerini düşürücü etkisi olduğu bildirilmiştir (77). Ancak kohort çalışmalarının incelendiği bir meta analizde diyetin protein içeriği ve diyet proteininin birincil kaynağı (bitkisel/hayvansal besinler) ile koroner kalp hastalıkları arasında bir ilişki bulunmamıştır (78).

Kaliteli protein kaynağı olarak düşünülen hayvansal besinler aynı zamanda doymuş yağ asitlerini de yüksek oranda içermektedir ve bu durum kardiyovasküler hastalıklar açısından risk teşkil etmektedir. Kurubaklagiller ve tahıllar gibi bitkisel protein kaynakları içerdiği proteinin yanında bazı vitamin ve mineraller, çeşitli biyoaktif bileşenler ve posa da sağladığı için kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki gösterebilmektedir. Güncel bir çalışmada diyetle yüksek miktarda

bitkisel protein tüketiminin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili mortaliteyi azalttığı bulunmuştur (79). Benzer şekilde PREDIMED (Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet) kohortunun ikincil analiz sonuçlarına göre hayvansal besin alımıyla karşılaştırıldığında sebze tüketiminin yüksek olmasının mortaliteyi %41 azalttığı bildirilmiştir (80). Adventist Sağlık Çalışması-2 kohort verilerine göre protein kaynağı olarak et tüketimi ile mortalite hızında %61 artış olurken, protein kaynağı olarak et yerine yağlı tohumlar tüketildiğinde mortalite hızında %40 azalma olduğu rapor edilmiştir (81). Paralel olarak Song ve ark. diyetle hayvansal kaynaklı proteinlerin bitkisel proteinlerle değiştirilmesinin daha düşük mortalite ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (82). Aynı çalışmada süt ve süt ürünlerinden gelen proteinin bitkisel proteinlerle yer değiştirmesi durumunda kardiyovasküler mortalite hızının %11 arttığı yayınlanmıştır.

Bir besinin içerdiği protein miktarı, aminoasit örüntüsü, yapısındaki esansiyel aminoasit türleri ve bu aminoasitlerin miktarı besinin protein kalitesini belirleyen özelliklerdir. Bazı aminoasit türlerinin kardiyovasküler sistemi farklı mekanizmalarla farklı şekilde etkilediği düşünüldüğünde besinin protein kalitesini belirleyen bu özellikler o besinin kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerini de belirlemektedir. Günlük diyetle özellikle süt ve süt ürünlerinden alınan whey proteinlerinin 3-hidroksi-3-metil glutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz enziminin aktivitesini baskılayarak karaciğerde kolesterol sentezini, yağ asitlerinin emilimini ve taşınmasını azaltarak kardiyovasküler hastalık riskini azaltabileceği bildirilmiştir (83). İnsanlarda yapılan bir çalışmada 12 hafta boyunca 65 g/gün whey proteini alımının plazma LDL ve trigliserit düzeylerini düşürdüğü, HDL ve Apo A1 düzeylerini yükselttiği bildirilmiştir (84). Ayrıca kırmızı et, süt ve yumurta proteinlerinin anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) aktivitesini baskılayarak kan basıncını azaltabileceği de rapor edilmiştir (85-87). Baklagil ve tahıl proteinlerinin ACE inhibisyonu yoluyla kan basıncını azalttığı (88); HMG CoA redüktaz aktivitesini baskılayarak ve sterol düzenleyici öge bağlayıcı protein (SREBP) ekspresyonunu etkileyerek (89) LDL ve total kolesterol düzeylerini azalttığı (90, 91) bildirilmiştir. Bu proteinlerin ayrıca antioksidan özellik göstererek ateroskleroz riskini de azalttığı yayınlanmıştır (92, 93). Aminoasitlerin kardiyovasküler

sistem üzerindeki etkileri incelendiğinde metionin, sistein, homosistein ve taurin gibi kükürtlü aminoasitler dikkat çekmektedir. Plazma sistein ve homosistein düzeyi ile arter hastalıkları ve miyokard infarktüs riski arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (94, 95). Özellikle plazma homosistein düzeyi yükseldiğinde inflamatuvar medyatörlerin artışı, oksidatif hasar ve endotel disfonksiyon oluşumuna bağlı olarak aterosklerotik kalp hastalıkları riski de yükselmektedir (95, 96). Ancak taurinin diğer kükürtlü aminoasitlerin aksine kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olabileceği yayınlanmıştır (97). Bu etkisini antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ile endotel fonksiyonu koruyarak ve nitrik oksit üretimini azaltma yoluyla kan basıncını azaltarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (98, 99). Valin, lösin ve izolösin gibi dallı zincirli aminoasitler de kardiyovasküler hastalıklara zemin hazırlayabilmektedir. Bu aminoasitlerin metabolizması sonucu oluşan metabolitlerinin endojen yağ asidi sentezi için substrat olması nedeniyle plazma lipid profilini değiştirebildiği ve nitrik oksit sentezini baskılayarak kan basıncını arttırabileceği düşünülmektedir (100). Aromatik aminoasitlerden triptofan, fenilalanin ve tirozin vücutta bazı inflamatuvar yolları aktive ederek oksidatif hasar ve endotel disfonksiyon ile ateroskleroza tetikleyerek kardiyovasküler sistemi etkileyebilmektedir (101). Ayrıca tirozin, dopamin sentezinde görev alması nedeniyle merkezi sinir sistemini dolaylı olarak etkilemekte ve kan rennin aktivitesini arttırmakta ve kan basıncını yükseltebilmektedir (102). Benzer şekilde tirozinin kalp ritmini düzenleyen tiroid hormonlarının sentezinde de rolü bulunmaktadır (103). Başka bir aminoasit olan arjinin kardiyovasküler sağlığa etkisini oksidatif denge ve endotel fonksiyonu koruyarak ateroskleroz gelişimini engelleyerek göstermektedir. Nitrik oksit sentezini arttırdığı, serbest radikallerin oluşumunu azalttığı, immun sistem elemanlarının adezyon bölgesinde birikimini engellediği bildirilmiştir (104).

Bunun yanında proteinlerin metabolizması sonucunda ortaya çıkan metabolitler ya da fizyolojik olaylar da kardiyovasküler sistemi etkileyebilmektedir. Deniz ürünlerinden direkt olarak alınabilen ya da endojen olarak sentezlenebilen trimetil amin N- oksit (TMAO) bileşiklerinin ya da yüksek miktarda protein içeren besinlerde ısı ile işleme olduğu bilinen polisiklik/heterosiklik aromatik aminlerin sağlık

üzerinde bazı olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (105-107). Diyet proteinlerinin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkileri düşünüldüğünde bu aminli bileşiklerin oluşturduğu metabolik durumun kardiyovasküler hastalıkların risk faktörlerinin oluşumuna zemin hazırlayabileceği de göz ardı edilmemelidir.

2.3. Aminli Bileşikler ve Sağlık Üzerine Etkileri

İnsanlarda kronik hastalık riski ve diyet arasındaki ilişkiyi araştıran epidemiyolojik çalışmalar incelendiğinde protein içeriği yüksek olan kırmızı et grubunun en fazla ilgi gören diyet bileşenlerinden biri olduğu görülmektedir. Uzun süre ile yüksek miktarda kırmızı et ya da işlenmiş et ürünleri tüketimi ile toplam mortalite riskinin yükselmesinin yanında, kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diabetes mellitus, çeşitli kanser türleri ve inflamatuvar süreçlerin aktive olduğu romatoid artrit gibi hastalıkların riskinde artışla da ilişkili olduğu yayınlanmıştır (108). Fazla miktarda kırmızı et ve işlenmiş et ürünleri tüketiminin sağlık üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (109). Dünya Kanser Araştırma Fonu'na (WCRF) göre kırmızı et ve işlenmiş et ürünleri tüketimi ile kolorektal kanser oluşumu arasında kuvvetli bir ilişki bulunmaktadır (110). Yüksek miktarda protein içeren besinlerin doymuş yağ asitleri ve kolesterol içeriğinin yüksek olması ya da işlenmiş et ürünleri ile fazla miktarda alınan sodyum kardiyovasküler hastalık gelişimine zemin hazırlayabilmektedir. Ek olarak yüksek protein içeren besinlerde bulunan bazı diyet bileşenleri ve diğer bileşiklerin bu ilişkinin ortaya çıkmasının nedeni olabileceği düşünülmektedir (108).

Et ürünlerinin işlenmesinde kullanılan nitrit ve nitratın sodyum tuzlarından oluşan N-nitroso bileşiklerin organizmada DNA katımı oluşturarak mutajenik etki gösterebileceği bildirilmiştir (111-113). Akrilamid; proteinler ve indirgen bir şeker varlığında oluşan ve vücutta karsinojenik ve toksik etkileri olduğu bildirilen bir moleküldür (114). Yüksek protein içerikli besinlerle ilişkilendirilecek bir diğer bileşik olan TMAO vücutta mikrobiyotik faaliyetler sonucunda sentezlenmesinin yanında bazı proteinli besinlerle de alınabilmektedir (115, 116). Yapılan çalışmalarda plazmada TMAO düzeyinin artmasının kardiyovasküler hastalık riskini arttırabileceği bildirilmiştir (115, 116). Karaciğerde ters kolesterol transportunu inhibe ederek ve

safla asitleri metabolizmasını etkileyerek plazma kolesterol düzeylerini arttırdığı ve böylece aortta aterosklerotik plak oluşumunu tetikleyebileceği bildirilmiştir (116, 117). Ayrıca TMAO'nun platelet fonksiyonunu direkt olarak etkileyerek trombozise yatkınlığı arttırabileceği ve vasküler endotel hücrelerde inflamatuvar süreçleri tetikleyebileceği yayınlanmıştır (118, 119).

Proteinli besinlerin özellikle kuru ısıda pişirilmesiyle oluşan polisiklik aromatik hidrokarbonların da sağlığı olumsuz etkilediği bilinmektedir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar bazı endüstriyel ve tarımsal işlemler sonucunda da oluşabilen, hava ve su kaynaklarının yanında besinlerde de bulunabilen kalıcı ve yarı uçucu organik bileşiklerdir (120). Genel olarak kömür, yağ, evsel ya da tarımsal atıklar, odun ve tütün gibi organik materyallerde piroliz sonucunda oluşmaktadır (121, 122). Yapısındaki hidrokarbon halkalarında hidrofobik ve lipofilik çift bağlar taşıyan iki veya daha fazla benzen halkası bulunmaktadır (123). Sadece karbon ve hidrojen atomları içermektedirler ancak azot, kükürt ve oksijen atomlarının benzen halkasına kolayca bağlanmasıyla polisiklik aromatik hidrokarbon molekülü heterosiklik aromatik aminlere dönüşebilmektedir (124). Molekül ağırlıklarına göre iki gruba ayrılmaktadır. İki ya da üç halka içeren polisiklik hidrokarbonlar düşük molekül ağırlıklı grupta iken; dört ve daha fazla halka yapısına sahip olanlar yüksek molekül ağırlıklı grupta yer almaktadır (120).

Polisiklik aromatik hidrokarbonların gıda kaynaklarına geçişi özellikle kontamine olmuş toprak ve su kaynaklarıyla yetiştirilen tahıl, meyve ve sebzeler yoluyla olmaktadır (125). Ayrıca karayollarına veya endüstriyel alanlara yakın yerlerde kontamine olmuş toprak ve su ile yetiştirilen bitkisel besin kaynaklarının yanında bu alanlarda otlayan hayvanlar veya su kaynaklarında yetişen balık ve su ürünlerinde de polisiklik hidrokarbon bulaşı olabilmektedir (126). Piroliz sonucunda oluşmaları nedeniyle ızgara, barbekü, tüksüleme veya kızartma gibi bazı kuru ısıda pişirme yöntemleri de polisiklik hidrokarbon oluşumuna yol açabilmektedir (127).

Bazı polisiklik aromatik hidrokarbon türlerinin kardiyovasküler hastalık gelişim riskiyle yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir (128). Ayrıca çeşitli polisiklik hidrokarbon türlerinin tümör gelişimine, büyüme ve üreme sistemi bozukluklarına,

endokrin bozukluklara, karaciğer ve böbrek hasarına, ısı regülasyonunda bozulmalara (129-131), hemolitik anemiye ve görmede bozulmalara (132, 133) yol açabileceği bildirilmiştir.

Yapılan çalışmaların çoğu diyetle polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruziyet ile ilgili olsa da güncel çalışmalar heterosiklik aminlerin sağlık üzerindeki etkilerine yoğunlaşmaya başlamıştır. Protein içeren besinlerin yüksek miktarda kuru ısıya maruz kalmasıyla oluştuğu bilinen heterosiklik aromatik aminlerin de sağlık üzerinde bazı olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Heterosiklik amin aracılı DNA katımının tümör oluşturuıcı özelliği bilinen onkogenler ve tümör baskılayıcı genler üzerinde mutasyona neden olarak tümör oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir (106, 107). Heterosiklik aromatik aminlerin yaygın olarak kanser patogenezi ile ilişkili olduğu bilirse de kardiyovasküler sistemin bileşenleri üzerinde de olumsuz etkileri olabileceğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (27, 30). Örneğin sıçanlarda (F344) yapılan bir çalışmada 8 hafta boyunca besinlerde yaygın bulunan heterosiklik amin türü olan PhIP'e maruz kalmanın dalak, kolon ve prostat gibi hızlı hücre yenilenmesi olan dokularda mutasyonlara neden olduğunu gösterilmiştir (17). Kardiyovasküler sisteme etkileri incelendiğinde PhIP'in rat (F344) kalplerinde O-asetiltransferaz aktivitesi ile N-hidroksi formuna yani biyolojik olarak genotoksisite için aktif formuna dönüştüğü saptanmıştır (134). Yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde besinlerde bu bileşiklerin oluşumunun en aza indirilmesi ve maruziyetin azaltılmasının kanser ve kardiyovasküler hastalıklar için önemi ortaya çıkmaktadır.

2.3.1. Heterosiklik Aminlerin Tanımı, Metabolizması ve Etki Mekanizması

İlk kez 1977 yılında Japonya'da yüksek sıcaklıkta pişmiş et ürünlerinde oluştuğu keşfedilen heterosiklik aminler; özellikle protein içeriği yüksek besinlerde ısı işlem sırasında oluşan ve oldukça yüksek oranda mutajenik/karsinojenik etkileri olduğu bildirilen apolar bileşikler olarak tanımlanmaktadır (11, 135). Temel olarak iki grup heterosiklik amin bulunmaktadır. Özellikle 100-300 °C arasındaki sıcaklıklarda oluşanlara amidoimidazoazoren (AIA) grubu termik heterosiklik aminler veya imidazokinolin (IQ) tipi bileşikler adı verilir (11). Bu gruptaki heterosiklik aminler

pişmiş besinlerde en fazla miktarda oluşan maddelerdir ve öncü maddeleri olan serbest aminoasit, kreatin, kreatinin ve hekzozların maillard reaksiyonu ile oluşurlar (12). Aminoasit ve proteinlerin pirolizi ile 300 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda oluşan heterosiklik aminlere (aminokarbonil grubu) pirolitik ya da non IQ tipi bileşikler adı verilir (11). Besinlerde ısı işlem uygulaması sırasında en fazla miktarda oluşan heterosiklik amin türleri: MeIQx, PhIP, IFP (2- amino-1,6 –dimethylfuro [3,2-e] imidazo [4,5-b] pyridine) ve AαC (2-amino-9H-pyrido [2,3-b] indol) olduğu bildirilmiştir (12). Bu heterosiklik aminler Tablo 2.1. de gösterilmiştir.

Besinlerde en fazla oluşan PhIP ve MeIQx türü heterosiklik aminlerin metabolizması sırasında gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Doğada bulunan diğer karsinojenik kimyasallara benzer şekilde heterosiklik aminlerin genetik materyal üzerinde toksik etki göstermesi için metabolik aktivasyona uğraması gerekmektedir (28). Sitokrom P450 gibi faz I (oksidasyon) enzimleri heterosiklik aminleri aktive ederek genotoksik metabolitlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (28, 30, 134). Bu aktivasyon sürecinde hidrosilasyon ve oksidasyon basamakları kilit rol almaktadır. Öncelikle yapıdaki ekzosiklik amin grupları N-oksidasyona uğramaktadır (Şekil 2.2.). Heterosiklik aminlerin N-oksidasyon reaksiyonları karaciğerde ve bazı ekstrahepatik dokularda daha çok CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 aracılığı ile katalize olmaktadır (11, 28, 136, 137). Ekstrahepatik dokulardaki oksidasyon reaksiyonları çoğunlukla CYP1A1 ve CYP1B1 enzimleri tarafından uyarılmaktadır (136). Heterosiklik halka sisteminin N-oksidasyona uğramasının ardından N-asetiltransferaz-1 (NAT-1) ve N-asetiltransferaz-2 (NAT-2) gibi faz II enzimlerinin yer aldığı asetilasyon, glukuronidasyon veya sülfonasyon tepkimeleri ile detoksifiye edilerek oluşan metabolitler idrarla atılmaktadır (138) (Şekil 2.2.).

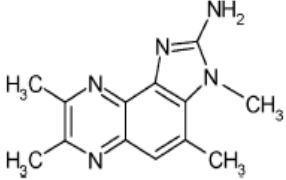
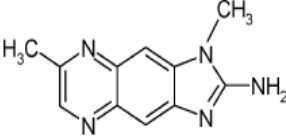
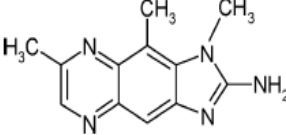
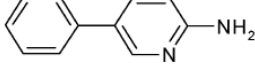
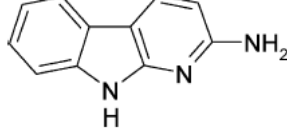
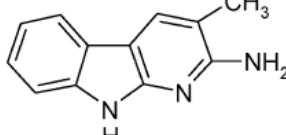
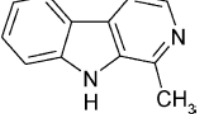
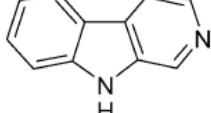
Tablo 2.1. Heterosiklik aminlerin sınıflandırılması (11)'dan adapte edilmiştir.

Kimyasal Adı	Kısa Adı, Polaritesi	Moleküler yapısı
Termik Heterosiklik Aminler		
2-amino-1,6-dimetilimidazo [4,5-b]-piridin	DMIP, polar	
2-amino-1,5,6-trimetillimidazo [4,5-b]- pridin	1,5,6-TMIP, polar	
2-amino-3,5,6-trimetilimidazo [4,5-b]-pridin	3,5,6-TMIP, polar	
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]- pridin	PhIP, polar	
2-amino-1-metil-6-(4'-hidroksifenil)- imidazo[4,5-b]- pridin	4'-OH-PhIP, polar	
2-amino-1,6-dimetil-furo[3,2-e]imidazo[4,5-b]-pridin	I FP, polar	
İmidazokinolin derivatifleri		
2-amino-1-metilimidazo[4,5-f]- kinolin	iso-IQ, polar	
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]- kinolin	IQ, polar	

Tablo 2.1. (Devam) Heterosiklik aminlerin sınıflandırılması (11)'dan adapte edilmiştir.

Kimyasal Adı	Kısa Adı, Polaritesi	Moleküler yapısı
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]-kinolin	MeIQ, polar	
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kinokzalin	IQx, polar	
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]- kinokzalin	4-MeIQx, polar	
2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]- kinokzalin	8-MeIQx, polar	
2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]- kinokzalin	7,8-DiMeIQx, polar	
2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]- kinokzalin	4,8-DiMeIQx, polar	
2-amino-4-hidroksimetil-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]-kinokzalin	4-CH2OH-8-MeIQx, polar	

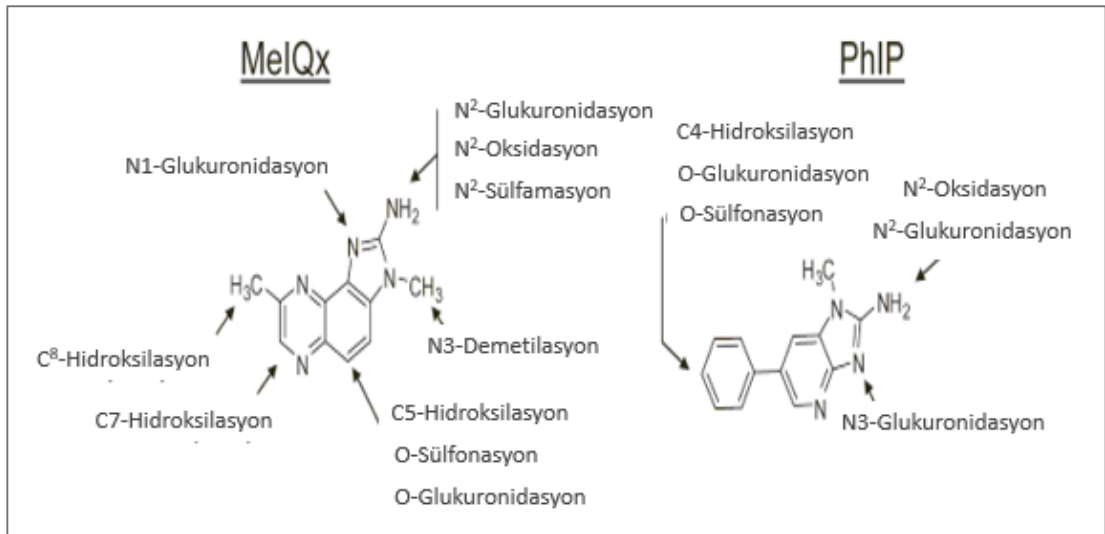
Tablo 2.1. (Devam) Heterosiklik aminlerin sınıflandırılması (11)'dan adapte edilmiştir.

Kimyasal Adı	Kısa Adı, Polaritesi	Moleküler yapısı
2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5-f]-kinokzalin	TriMeIQx, polar	
2-amino-1,7-dimetilimidazo[4,5-g]-kinokzalin	7-MeIQx, polar	
2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5-g]-kinokzalin	7,9-DiMeIQx, polar	
Fenilpridin derivatifi		
2-amino-5-fenilpridin	Phe-P-1, apolar	
Pridoindol derivatifi: α-Karboniller		
2-amino-9H-prido[2,3-b]indol	AαC, apolar	
2-amino-3-metil-9H-prido[2,3-b]indol	MeAαC, apolar	
β-Karboniller		
1-metil-9H-prido[3,4-b]indol	Harman, apolar	
9H-prido[3,4-b]indol	Nor-harman, apolar	
γ-Karboniller		

Tablo 2.1. (Devam) Heterosiklik aminlerin sınıflandırılması (11)'dan adapte edilmiştir.

Kimyasal Adı	Kısa Adı, Polaritesi	Moleküler yapısı
3-amino-1,4-dimetil-5H- prido[4,3-b]- indol	Trp-P-1, apolar	
3-amino-1-metil-5H-prido[4,3- b]indol	Trp-P-2, apolar	
Pridoimidazo derivatifleri: δ-Karboniller		
2-aminodiprido-[1,2-α:30,20- d]imidazol	Glu-P-2, apolar	
2-amino-6-metildiprido-[1,2- α:30,20- d]imidazol	Glu-P-1, apolar	
Tetraazafluoranthene derivatifleri		
4-amino-6-metil-1H- 2,5,10,10b- tetraazafluoranthene	Orn-P-1, apolar	
Benzimidazol derivatifleri		
4-amino-1,6-dimetil-2- metilamino-1H,6H-pirrolo- [3,4-f]benzimidazol-5,7-dion	Cre-P-1, apolar	
Karbazol derivatifleri		
3,4-siklopenten-prido [3,2-α]karbazol	Lys-P-1, apolar	

Öte yandan yapılan çalışmalar diyetle alınan heterosiklik aromatik aminlerin %10'unun herhangi bir metabolizasyon/aktivasyon sürecine girmeden kolona ulaşabildiğini ve buradaki doğal flora tarafından metabolize edilebildiğini göstermiştir (139, 140). Heterosiklik aminlerin bağırsaklarda mikrobiyotik hücre duvarına direkt olarak bağlanabildiği gösterilmiştir ve heterosiklik aminlerin bağırsak mukozası tarafından emiliminin engellenmesi nedeniyle bu durumun bir detoksifikasyon mekanizması olabileceği düşünülmektedir (141, 142).



Şekil 2.2. PhIP ve MelQx türü heterosiklik aminlerin önemli metabolik reaksiyonları

Potansiyel başka bir detoksifikasyon mekanizması olarak diyetle alınan bazı heterosiklik aminlerin mikrobiyota tarafından akrolein konjugatlarına dönüştürülerek mutajenik etkilerinin azaltıldığı gösterilmiştir (143, 144). Bu reaksiyon gliserolün *Enterococcus* spp., *Lactobacillus reuteri* (145), *Lactobacillus rossiae* ve *Eubacterium hallii* (143, 146) türü bakteriler tarafından 3-hidroksipropiyonaldehit (3-HPA)'e dönüştürülmesiyle başlamaktadır. 3-HPA bir dizi kimyasal tepkime sonucunda akroleine dönüşmekte ve akrolein de heterosiklik aminlere bağlanarak heterosiklik aminlerin M1 türü metabolitlerini oluşturmaktadır (144). Bu dönüşüm heterosiklik aminlerin metabolik aktivasyonunun başladığı bölgelerini bloke etmekte ve DNA katımını engellemektedir (143, 147). Öte yandan doğal mikrofloraya veya steril bağırsaklara sahip olan kemirgenlerle yapılan başka çalışmalarda intestinal mikrobiyota varlığının heterosiklik aminlerin aktivasyonunda görev alarak DNA

hasarına yol açtığı gösterilmiştir (148, 149). Bakteriyel β -glukuronidaz enzimlerinin heterosiklik aminleri metabolize ederek mutajenik etkisi olan başka ara metabolitler oluşturabileceği yayınlanmıştır (140, 150-152).

Faz I enzimatik reaksiyonları sonucunda oluşan heterosiklik amin metabolitleri NAT-1, NAT-2 ve sülfotransferaz enzimleri için substrat olmakta ve ortaya kararsız ester molekülleri çıkmaktadır (28). Oluşan kararsız ester ara molekülleri heterolitik bölünmeye maruz kalarak nitrenium veya karbenium bileşiklerine dönüşmektedir. Bu bileşiklerin DNA'ya kovalent olarak bağlanmasıyla da DNA katımı oluşmaktadır (153, 154). Ayrıca bu tür metabolitlerin DNA sarmalındaki ipliklerin kopmasına, bazı kromozomal anomalilere ve mutasyonlara neden olabileceği gösterilmiştir (155). Ayrıca bazı heterosiklik amin türlerinin karaciğer hücrelerinde oksidatif stresi arttırarak apoptoza yol açabileceği (156), TP53 geninin ekspresyonunu uyararak hücre döngüsünü ve apoptotik süreçleri bozarak tümör oluşumuna yol açabileceği (157) bildirilmiştir. Güncel bir çalışmada MeIQx türü heterosiklik aminlerin otofagozom olgunlaşmasını inhibe ederek otofajik süreçleri engellediği bildirilmiştir (158). Kemirgenlerle yapılan bir çalışmada Trp-1 türü heterosiklik aminlerin makrofajlardan indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunu ve nitrik oksit üretimini uyardığı ve hücre içi reaktif oksijen türlerini arttırarak nükleer faktör kappa B (NF-kB) aracılı inflamatuvar süreçlerin aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (19). Öte yandan hayvan ve insanlarla yapılan çalışmalarda bazı heterosiklik amin türlerinin kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine girebileceğini rapor edilmiştir (159-161). Hücre hatlarında yapılan bazı çalışmalar diyetle alınan bazı heterosiklik amin türlerinin özellikle dopaminerjik nöronlarda nörotoksik etki gösterebileceğini bildirmiştir (157, 162). Heterosiklik aminlerin oksidatif strese yol açarak hücre protein ve lipidlerde hasar oluşturduğu rapor edilmiştir (162).

Deneyel ve epidemiyolojik çalışmaların ışığında Uluslararası Kanser Araştırmaları Dairesi'nin (IARC) karsinojenik bileşikler sınıflandırmasına göre IQ türü heterosiklik aminler, olasılıkla karsinojen grubuna (2A) dahil edilirken MeIQ, MeIQx, PhIP gibi heterosiklik aminler düşük olasılıkla karsinojen grubunda (2B) yer almaktadır (163).

2.3.2. Heterosiklik Amin Maruziyeti ve Diyetin Heterosiklik Amin İçeriği

Özellikle protein içeriği yüksek olan besinlerde bulunabileceği yayınlanan (Bkz.Tablo 2.2.) heterosiklik aromatik aminlerin oluşumu pişirme sıcaklığı, pişirme süresi ve pişirme yöntemine göre farklılık göstermektedir ancak oluşum miktarının en çok pişirme sıcaklığına göre değiştiği bildirilmiştir (164). Özellikle pişirme sıcaklığı artışıyla birlikte AIA türlerinin oluşumunun arttığı ifade edilmektedir. Çeşitli besinlerde pişirme sıcaklığının heterosiklik amin oluşumuna etkisini inceleyen bir çalışmada (164) 150 °C'de oluşan toplam heterosiklik amin miktarının 1 ng/g'ın altında olduğu, pişirme sıcaklığı 175 °C olduğunda oluşan toplam miktarın 2 ng/g'dan daha düşük olduğu bildirilmiştir. Farklı sıcaklıklarda (150 °C, 200 °C ve 250 °C) pişirilen etlerde heterosiklik amin oluşumunu inceleyen bir çalışmada en düşük miktarın 150 °C'de oluştuğu ve oluşum miktarının sıcaklıkla doğru orantılı olarak arttığı rapor edilmiştir (165).

Pişirme yönteminin incelendiği çalışmalarda kavurma (166), ızgarada pişirme (167), mangalda pişirme, kızartma (168) ile tüksüleme (169) yöntemleriyle heterosiklik amin oluşumu gözlenebileceği bildirilmiştir. Özellikle kavurma ve ızgarada pişirme yöntemleri uygulandığında diğer pişirme yöntemlerine göre daha fazla heterosiklik amin oluştuğu rapor edilmiştir (13).

Ayrıca pişirme öncesinde uygulanan marinasyon gibi işlemler ya da baharat gibi antioksidan etki gösterebilecek malzemelerin kullanımı heterosiklik amin oluşumunu azaltabilmektedir (14). Yapılan çalışmalarda biberiye, kekik, adaçayı, sarımsak, alıç ekstraktı gibi antioksidan özellikli diyet bileşenlerinin hazırlanan köftelerin yüzeyine veya direkt olarak köfte harcına eklenmesiyle oluşan toplam heterosiklik amin miktarının kontrol gruplarına göre %100'e kadar azaltabileceği bildirilmiştir (165, 170). Ayrıca etlerin yüzeyinin galeta unu veya pane harcı gibi bir tabaka ile kaplanarak direkt kuru ısı ile temasının kesilmesinin de heterosiklik amin oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (171). Benzer şekilde yeşil çay, soğan, sarımsak veya kırmızı şarap ile yapılan marinasyon işleminin de heterosiklik amin oluşumunu azaltabileceği bildirilmiştir (172, 173).

Tablo 2.2. Heterosiklik amin tespit edilen besinler ve pişirme yöntemleri

Besin	Piştirme Yöntemi	Heterosiklik Amin Türü	
Peynir Türleri (174, 175)	Tütsüleme	Trp-P2	MeAαC
		PhIP	MeIQx
		Trp-P1	Harman
		AαC	Nor-harman
Sığır Eti (167, 176-178)	Kızartma Izgara	Harman	MeIQ
		Nor-harman	MeIQx
		IQ	DiMeIQx
			PhIP
Sucuk (179)	Mangalda Piştirme	IQ	MeIQx
		IQx	DiMeIQx
		MeIQ	PhIP
Köfte (180, 181)	--	IQ	DiMeIQx
		IQx	PhIP
		MeIQ	AαC
Bira (182)	--	PhIP	
Şarap Türleri (182)	--	IQ	MeIQx
		MeIQ	PhIP
Kahve (183)	Demlenmiş	Harman	Nor-harman
Kahve (184)	Kavrulmuş	AαC	
Hazır Bulyon (185)	--	IQ	MeIQ
			DiMeIQx

Et türüne göre en çok kızarmış biftek, sonrasında sırasıyla tavuk, hindi, hamburger ve köftelerde heterosiklik amin oluştuğu yayınlanmıştır (26). Avrupa'da heterosiklik amin içeriği en yüksek besin olan pişmiş etlerde oluşma miktarının incelendiği bir çalışmaya göre etlerden ortalama olarak 69,4 ng/gün heterosiklik amin alınırken; PhIP tüm heterosiklik amin türleri arasında en fazla oluşan türdür (ortalama 47,6 ng/gün) (26). Amerika'da yapılan bir çalışmaya göre iyi pişmiş etlerde oluşan toplam heterosiklik amin miktarı 1-500 ng/g iken PhIP (1-450 ng/g), IQ (1,7-240 ng/g) ve MeIQx (1-89 ng/g) en fazla miktarda oluşan türlerdir (186). Ülkemizde yapılan bir

çalışmaya göre restoranlarda tüketime hazır olan farklı köfte örneklerinde oluşan toplam heterosiklik amin miktarı ortalama olarak 5,54 ng/g iken en çok oluşan türlerin IQx (en fazla 3,81 ng/g) ve PhIP (en fazla 1,93 ng/g) olduğu ancak hiçbir örnekte MeIQx türü heterosiklik amin tespit edilemediği bildirilmiştir (180). Başka bir çalışmada köfte örneklerinde oluşan toplam heterosiklik amin miktarının 0,43-6,88 ng/g arasında değiştiği rapor edilmiştir (181).

Diyetle alınan heterosiklik amin miktarının en aza indirilmesi için; uygun pişirme yöntemlerinin seçilmesi; ızgara ve kızartma yapmak yerine buğulama veya mikrodalga fırınların kullanılması, fazla pişirmeden kaçınılması, mangalda pişirme yöntemi tercih edilecekse etlerin suyunun alınabilmesi için mikrodalgada ısıtmak gibi bir ön işlemin uygulanması, yanmış/kararmış et parçalarının tüketiminden kaçınılması önerilmektedir (187).

Heterosiklik amin oluşumunun; pişirme yöntemi, süresi, besin türü (yapısındaki protein miktarı ve aminoasit türüne bağlı olarak), pişirme öncesinde/sırasında uygulanan işlemler gibi nedenlerden etkilenmesi ile et tüketim miktarı ve beslenme alışkanlıklarındaki çeşitlilikler, insanlarda heterosiklik amin alım düzeyinin saptanmasını zorlaştırmaktadır. İdrarla atım miktarı, belirli pişirme derece ve süresinde oluşan ortalama heterosiklik amin miktarı, besin tüketimi ya da beslenme alışkanlığı gibi verilerden ortalama maruziyet düzeyleri hesaplanabilmektedir (188). Yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak 1-26 ng/kg/gün heterosiklik amin alındığı yayınlanmıştır (15, 16). Amerika'da yapılan bir çalışmada PhIP (9,2 ng/kg/gün), MeIQx (1,4 ng/kg/gün) ve DiMeIQx (0,28 ng/kg/gün) türlerinin en çok maruz kalınan heterosiklik aminler olduğu ve toplam heterosiklik amin alım düzeyinin 13,5 ng/kg/gün olduğu bildirilmiştir (15). Güncel bir çalışmada diyetle alınan günlük heterosiklik amin miktarının birkaç mikrograma ulaştığı bildirilmiştir (189).

Avrupa Konseyi diyetle alınan günlük heterosiklik amin miktarının 1 µg düzeyinin altında olmasını önermektedir (190). Bu bilgiler ışığında heterosiklik amin maruziyetinin birkaç yolla azaltılabileceği düşünülmektedir. Diyetle alımını azaltabilmek için pişirme sürecinde heterosiklik amin oluşumunun en aza indirilmesi

(191), vücuda alınan heterosiklik aminlerin aktivasyonu ve metabolizmasının engellenmesi (192) ve biyoyararlılığının azaltılması (193) heterosiklik aminlerin potansiyel olumsuz etkilerinin azaltılmasını sağlayabilmektedir.

2.3.3. Heterosiklik Amin Maruziyeti ve Kronik Hastalıklar

Heterosiklik aminlerin vücuttaki etkileri incelendiğinde en büyük mekanizmanın DNA katımı olduğu görülmektedir (153, 154). Ayrıca heterosiklik amin metabolitlerinin DNA sarmalındaki ipliklerin kopmasına, bazı kromozomal anomalilere ve mutasyonlara neden olabileceği gösterilmiştir (155). Bazı heterosiklik amin türlerinin oksidatif stresi arttırarak apoptoza yol açabileceği (156), otofajik süreçleri engelleyebileceği (158), hücre döngüsü ve apoptotik süreçlerin dengesini bozarak tümör oluşumuna yol açabileceği (157) bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli mekanizmalarla hücre içi reaktif oksijen türlerini arttırarak inflamatuvar süreçlerin aktivasyonuna neden olabileceği yayınlanmıştır (19). Heterosiklik aminlerin genel karsinojenik/mutajenik etkilerinin yanında yukarıda bahsedilen olumsuz etkilerinin gerçekleştiği veya bu olumsuz metabolik durumlardan etkilenen doku ve organlara göre klinik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Yapılan bir meta analizde etlerin hazırlanması sırasında yüksek miktarda heterosiklik amin oluşturduğu bilinen pişirme yöntemlerinin (ızgara, mangalda pişirme, kavurma ve kızartma) kullanılması ve uzun pişirme süresi uygulama sıklığındaki artışın tip 2 diabetes mellitus riskini arttırdığı bildirilmiştir (194). Aynı çalışmada hesaplanan heterosiklik amin alım miktarının artmasının da tip 2 diabetes mellitus riski ile ilişki olduğu yayınlanmıştır. Bu ilişkinin potansiyel mekanizmasının heterosiklik aminlerin JAK/STAT (Janus kinaz/transkripsiyon proteinlerinin sinyal aktarımı ve aktivasyonu) ve MAPK (mitojenle aktive edilmiş protein kinaz) yollarında inflamatuvar süreçleri tetiklemesi üzerinden gerçekleşebileceği düşünülmektedir (195). Ayrıca polisiklik aromatik hidrokarbonların proinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyararak insülin salınımını etkileyebileceği rapor edilmiştir (196). Heterosiklik aminlerin polisiklik aromatik hidrokarbonlarla benzer kimyasal yapıya sahip oldukları ve metabolik süreçlerinin benzer mekanizmalarla gerçekleştiği düşünüldüğünde heterosiklik

aminlerin insülin salınımını da etkileyerek diyabet oluşumuna zemin hazırlayabileceği düşünülmektedir. Merkezi sinir sistemi hücreleri üzerinde nörotoksik etkisi olduğu gösterilen (157, 162) heterosiklik aminlerin Parkinson hastalığı ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir (157, 162). Harman türü heterosiklik aminlerin plazma seviyesinin esansiyel titreme ile ilişkili olduğu (197) ve Parkinson hastalarında plazma harman düzeyinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (198). Heterosiklik aminlerin çeşitli hastalıklarla ilişkili olabileceğini gösteren birkaç çalışma bulunmaktadır ancak literatürde kanser oluşumu ve kardiyovasküler sağlık üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar daha fazladır. Bu durumun heterosiklik aminlerin yol açtığı genotoksikasyon, oksidatif stres, bozulmuş apoptoz dengesi ve inflamasyon durumunun özellikle kanser ve kardiyovasküler hastalıkların patogenezi ile yakından ilişkili olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

2.3.3.1. Heterosiklik Aminler ve Kanser

DNA katımı kimyasal karsinogenez oluşumunda önemli bir faktördür. Heterosiklik amin aracılı DNA katımının tümör oluşturuca özelliği bilinen onkogenler ve tümör baskılayıcı genler üzerinde mutasyona neden olarak tümör oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir (106, 107). Bir çalışmada bazı heterosiklik amin türlerinin DNA katımı oluşturma miktarları ölçülmüş ve en yüksek katımı AαC ve PhIP türü heterosiklik aminler gerçekleştirirken; MeIQx türü heterosiklik aminlerin neden olduğu katım miktarı belirleme limitinin altında olduğu bildirilmiştir (199). Heterosiklik aminlerin bakteriler ve bazı memeli hücre sistemleri üzerinde mutajenik etkileri olduğu yayınlanmıştır (11, 17, 18). Heterosiklik aminler arasında MeIQx türünün en fazla mutajenik olduğu; IQ, 4-8 DiMeIQ, MeIQ ve PhIP türlerinin sırasıyla daha az mutajenik etkileri olduğu bildirilmiştir (186, 200). Yapılan klinik çalışmalar incelendiğinde bir çalışmada PhIP maruziyetinin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini azaltırken katalaz aktivitesini arttırdığı ve tümör baskılayıcı p16 proteininin ekspresyonunu azalttığı yayınlanmıştır (201). MeIQx türü heterosiklik aminlerin insanlarda kolorektal kanser riskini arttırabildiği ve pankreatik kanser oluşumu ile ilişkili olabileceği yayınlanmıştır. Sıçanlarda (F344) yapılan bir çalışmada 8 hafta boyunca PhIP'e maruz kalmanın dalak,

kolon ve prostat gibi hızlı hücre yenilenmesi olan dokularda mutasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (17). PhIP'in sıçan kalplerinde O-asetiltransferaz aktivitesi ile N-hidroksi formuna yani biyolojik olarak genotoksisite için aktif formuna dönüştüğü saptanmıştır (134). Heterosiklik aminlerin özellikle kalpte yüksek miktarda DNA katımı oluşturmalarına rağmen kardiyovasküler sistemin diğer dokuları ile ilgili henüz yeteri kadar araştırma bulunmamaktadır (202-205). Transgenik F344 sıçanlarda yemlerle PhIP alımı sonrasında DNA katımının mitokondride neden olduğu mutasyonlar sonucu hasar olduğu ve kalp hücrelerinde dejenerasyon, nekroz ve infiltrasyon olduğu saptanmıştır (27). Heterosiklik amin türünün etkisinin incelendiği bir çalışmada miyositlerde PhIP türünün IQ türlerine göre daha fazla DNA katımına neden olduğu yayınlanmıştır.

Fakat heterosiklik aminlerin insanlarda kansere yol açtığına yönelik kesin ve yeterli kanıtlar henüz bulunmamaktadır. Deneysel ve epidemiyolojik çalışmaların ışığında Uluslararası Kanser Araştırmaları Dairesi'nin (IARC) karsinojenik bileşikler sınıflandırmasına göre IQ türü heterosiklik aminler, olasılıkla karsinojen grubuna (2A) dahil edilirken MeIQ, MeIQx, PhIP türleri düşük olasılıkla karsinojen grubunda (2B) yer almaktadır (163). Yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde besinlerde bu bileşiklerin oluşumunun en aza indirilmesi ve maruziyetin azaltılmasının önemi ortaya çıkmaktadır.

2.3.3.2. Heterosiklik Aminler ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Heterosiklik aromatik aminlerin mutajenik etki mekanizmalarından birinin mast hücreleri ve inflamasyon üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (17-19). Bir çalışmada prostat bezinin ventral bölgesinde PhIP'in mutajenik etkisi gözlenmiştir (17). Bu bölgede aynı zamanda stromal mast hücreleri ve makrofajların da yoğun olarak gözlemlendiği rapor edilmiştir. Benzer şekilde başka bir çalışmada diğer bir heterosiklik amin türü olan Trp- P-1'in nitrik oksit üretimini arttırdığı, nitrik oksit ve okside metabolitlerinin genetik materyal üzerinde değişikliklere neden olarak mutajenik etki gösterebileceği yayınlanmıştır (19). Bu durum heterosiklik aromatik aminlerin mutajenik etkilerini direkt katım reaksiyonlarının yanında inflamasyon üzerinden de gösterebileceğini düşündürmektedir. Kardiyovasküler hastalıkların

altında yatan mekanizmalardan olan endotel disfonksiyon ve aterosklerozun gelişiminde de inflamasyonun etkili olduğu göz önüne alındığında heterosiklik aminlerin kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda etkili olabileceği fikri ön plana çıkmaktadır.

Hücre kültürü çalışmalarında IQ ve PhIP'in miyositlerde inflamasyon ile birlikte hücre dejenerasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir (30, 206). Aynı çalışmada, bu hasarın antioksidanlar (α -tokoferol, glutatyon vb.) tarafından in-vitro koşullarda engellenebileceği gösterilmiştir (206). Yapılan çalışmalarda özellikle MeIQx ve PhIP türü heterosiklik aminlerin kardiyomiyositlerde sitotoksositeye neden olarak kardiyak disfonksiyona yol açabileceği yayınlanmıştır (27, 30). Bazı heterosiklik amin türlerinin (PhIP, IQ) kalp ve diğer organlarda (akciğer, mide) oksidatif stres kaynaklı doku hasarı oluşturabildiği ve bunu süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan aktiviteye sahip enzimleri baskılayarak ve malondialdehit (MDA) gibi oksidatif stres parametrelerini arttırarak yapabileceği rapor edilmiştir (201). Diğer yandan endotel disfonksiyon için önemli olan, antioksidan etkileri bulunan ve uzun dönemde proinflamasyonu tetikleyen nitrik oksidin makrofajlarda üretimini ve reaktif oksijen türleri oluşumu ile inflamasyonu (NF- κ B) uyarabileceği de gösterilmiştir (19). Güncel bir çalışmada MeIQx türü heterosiklik aminlerin karaciğer hücrelerinde lipidomik profili bozduğu rapor edilmiştir (158). Bu etkinin heterosiklik aminlerin otofajik/apoptotik süreçler üzerinde yarattığı olumsuz etkilerden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir. Bir çalışmada kontrol grubunda normal kardiyak morfoloji görülürken yaklaşık iki hafta süresince 100 mg/kg heterosiklik amin alan sıçanlarda bazı kardiyak anomalilerin yanında miyosit nekrozu, T tübül genişlemesi, miyofibriller dağılmalar gibi inflamasyon göstergeleri gözlenmiş ve heterosiklik aminlerin karsinogenik olmalarının yanında kardiyak hasara da neden olabileceği sonucuna varılmıştır (30). Öte yandan bazı heterosiklik aminlerin lipid profilini değiştirerek kardiyovasküler hastalıklara yatkınlığa neden olabileceğine yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. Üç hafta boyunca PhIP (75 mg/kg) verilen sıçanlarda (F344) serum trigliserit ve fosfolipid düzeyleri kontrol grubuna göre artarken; HDL, total kolesterol ve serbest yağ asitlerinde anlamlı bir fark görülmemiştir (31). Ancak bir çalışmada iki

hafta boyunca A α C türü (12,1 mg/kg) heterosiklik amin alımının yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde (Apo E knock-out) aterosklerotik plak boyutunu ve arter duvarının media tabakasının kalınlığını azaltarak kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki gösterebileceği yayınlanmıştır. Benzer şekilde apo E knock out farelerde diğer bir kardiyovasküler hastalık risk faktörü olan dislipidemi ile ilişkili parametrelerden total kolesterol düzeylerini kontrol grubuna göre azaltırken LDL düzeyini değiştirmedeği bildirilmiştir (29).

Bu konuda az sayıda çalışma olmasına rağmen heterosiklik aminlerin kan lipid profilini etkileyebileceği ihtimali kardiyovasküler hastalıklar açısından olası etkileşimleri de beraberinde getirmektedir. Dolayısıyla, heterosiklik aminlerin inflamasyonu arttırarak kronik hastalık riski ile ilişkili olabileceği hipotezi yeni olup, endotel disfonksiyon, lipid/lipoprotein profili ve vasküler aterom içeriğinin incelendiği araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

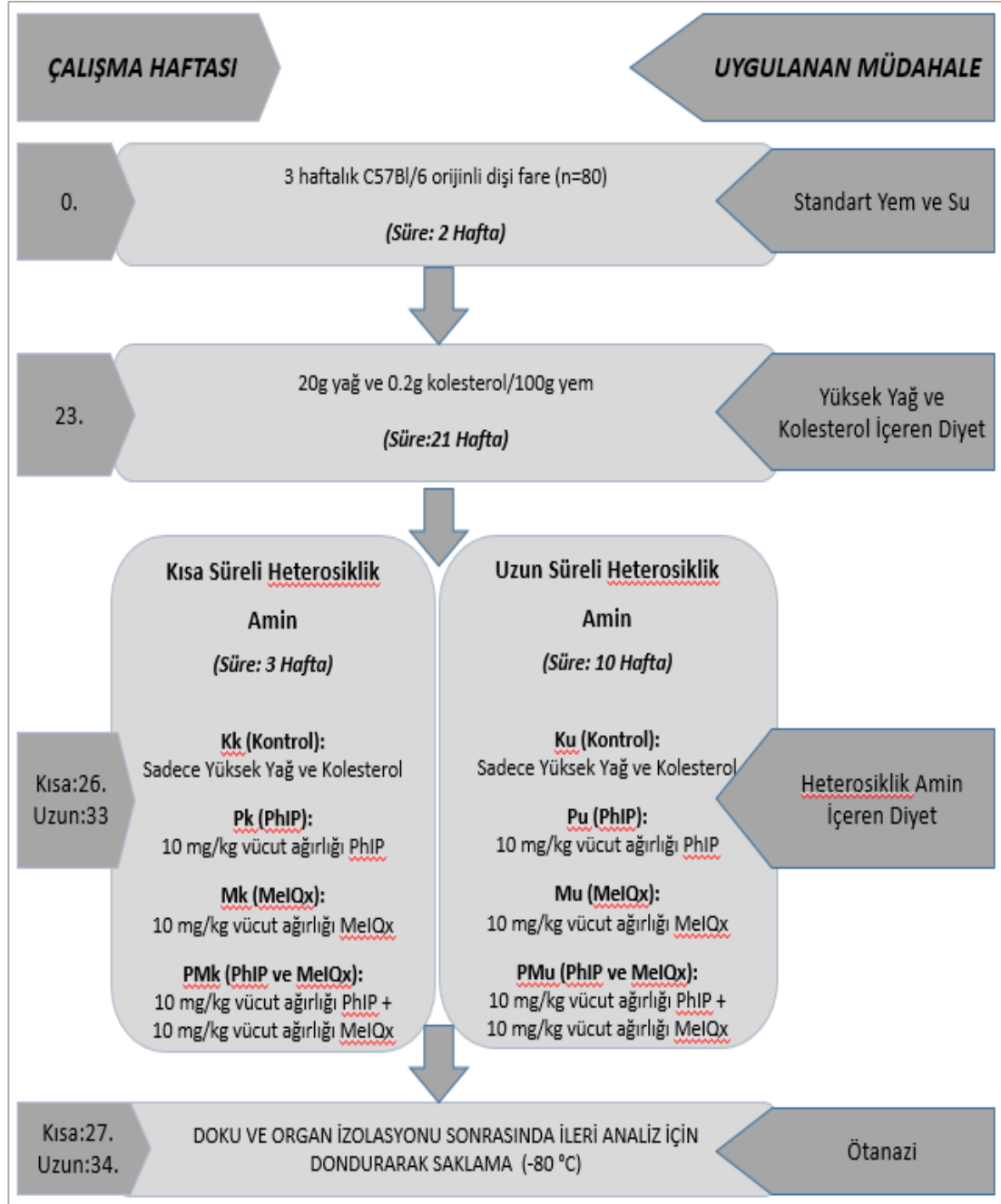
Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 03.02.2015 tarihli toplantısında 2015/10-09 karar numarası ile onaylanmıştır. Çalışmanın bütün aşamalarında yer alan uygulamalar Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Yönergesi'ne ve Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı'nın Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmeliği'ne uygun olarak yürütülmüştür.

Araştırma için gerekli bütçe, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'ndan (TÜBİTAK) alınan ve tez danışmanının yürütücü olduğu TÜBİTAK 3501-Kariyer Geliştirme Programı ile karşılanmıştır (Proje No:115S623).

3.1 Çalışma Yeri, Zamanı, Dizaynı ve Örneklem Seçimi

Bu çalışma için kullanılacak deney hayvanı sayısını belirlemek için güç analizi yapılmıştır. Hesaplama bilimsel yayınlar ve proje ekibinin daha önceki hayvan çalışmalarından edindiği tecrübeleri ile elde edilmiş iki ortalama arasındaki fark kullanılmıştır (207-209). Hesaplama sonucuna göre gerekli hayvan sayısı her bir grup için $n=10$ olarak bulunmuştur ve sekiz grup için toplam $n=80$ fare çalışmaya dahil edilmiştir. Ancak çalışma boyunca gerçekleşen hayvan kayıpları ve yapılan kontrol analizleri nedeniyle her bir deney grubunda $n=7-8$ fare olacak şekilde toplam $n=60$ fare ile çalışma tamamlanmıştır.

Bu çalışmanın dizaynı üç bölümden oluşmaktadır (Bkz. Şekil 3.1.). Farelerin bakımı ve diyet müdahalesini kapsayan birinci bölümünde farelerin diyet müdahalesi sırasında bakımları Hacettepe Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi'nde yürütülmüştür. Çalışmanın ikinci kısmında anestezi altında kan alma; doku ve organ izolasyonları gibi cerrahi işlemler yer almaktadır ve bu aşama Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Ünitesi'nde yapılmıştır. Üçüncü aşamada yer alan izole edilen organ ve dokuların saklanması ve ileri laboratuvar analizleri ise Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Araştırma Laboratuvarları'nda yürütülmüştür.



Şekil 3.1: Çalışma Dizayını.

3.2 Hayvanların Temini ve Diyet Müdahalesi

3.2.1 Hayvanların Temini ve Bakımı

Çalışmada kullanılan aynı soydan gelen (inbred), 80 adet 3 haftalık dişi C57Bl/6 kökenli fare (ApoE +/-) özel bir firmadan bir yıl süresince belirli aralıklarla temin edilmiştir (Deney Hayvanları A.Ş., Türkiye). Teslim alınan fareler 0,1 grama duyarlı

hassas terazi (A&D EK-6000H Scale, A&D, Japonya) ile tartılarak, saydam polikarbon kafeslere alınmıştır. Çalışmada farelerin yem tüketimlerinin bireysel olarak kaydedilmesi nedeniyle her fare ayrı bir kafese yerleştirilmiştir. Farelerin hepsinin bakımı için aynı optimal koşullar (22 ± 2 °C, 12 saat dönüşümlü aydınlık/karanlık ortam, %45 nem) sağlanmıştır. Çalışma boyunca farelerin ağırlığı iki günde bir 0,1 grama duyarlı hassas terazi (A&D EK-6000H Scale, A&D, Japonya) ile ölçülerek kayıt edilmiştir.

3.2.2 Uygulanan Diyet Müdahalesi

Diyet planı farelerin ağırlık ve günlük beklenen yem tüketimleri göz önüne alınarak oluşturulmuştur. Farelere başlangıçta verilen kontrol yemi, sonraki aşamada verilen heterosiklik amin içeren veya içermeyen batı tipi yüksek yağ ve kolesterol içeren deney yemleri Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Araştırma Laboratuvarları'nda belirli bir protokol dahilinde hazırlanmıştır. Bu protokolün oluşturulması sırasında Amerikan Beslenme Enstitüsü'nün kemirgenler için önerdiği AIN-93M yem formülasyonu temel alınmıştır (209, 210) ve Türk Standartları Enstitüsü'nün yürürlükte bulunan "Hayvan Yemleri-Laboratuvar Hayvanı Yemleri Standardı" na (TS 9313) uygun olarak hazırlanmıştır (211). Uygulanan formülasyonda yer alan; nişasta (Kimbiotek, Türkiye), maltodekstrin (MP Biomedicals, ABD), selüloz (Sigma Aldrich, Almanya); kazein (Sigma Aldrich, Almanya), L-sistein (Virtilis Fermentasyon, Türkiye), mısır yağı (Kimbiotek, Türkiye), AIN-93M mineral ve vitamin karışımları (MP Biomedicals, ABD), kolin bitartarat (MP Biomedicals, ABD) ve tetrahidrokinon (MP Biomedicals, ABD) kemirgenlerin gereksinimine göre eklenmiştir. Farelerin yemlerine doymuş yağ kaynağı olarak eklenen Hindistan cevizi yağı (Naturol Gıda ve Kimya San. Tic. Ltd. Şti, Türkiye) ve kolesterole (Sigma Aldrich, Almanya) ek olarak PhIP (Toronto Research Chemicals, Kanada) veya MeIQx (Toronto Research Chemicals, Kanada) türü heterosiklik aminler eklenmiştir. Eklenen heterosiklik amin türü belirlenirken insanlarda günlük diyetle en sık maruz kalınan türler dikkate alınarak PhIP ve MeIQx türleri seçilmiştir. Diyete eklenecek heterosiklik amin miktarını belirlemek için heterosiklik aminlerin çeşitli

etkilerini inceleyen hayvan çalışmalarının yanı sıra insanlarda yaklaşık olarak hesaplanan günlük alım düzeylerini yansıtabilecek miktarlar hedeflenmiştir. Bu amaçla farelerin vücut ağırlığı başına 10 mg/gün heterosiklik amin amin alması hedeflenmiş ve günlük 5 g yem tükettikleri düşünülerek yeme eklenecek miktarlar hesaplanmıştır. Homojen bir karışım elde edebilmek için yeme eklenen maddelerin suda çözünürlükleri veya su çekme, yağda çözünme gibi özellikleri dikkate alınarak, her bir komponent için farklı hız ve sürelerde protokolda belirlenen sıra ile karışmaları sağlanmıştır (210). Elde edilen karışım, kullanılabildiği kadar +4°C'de saklanmıştır. Çalışma süresince farelerin yem tüketimleri günlük olarak kaydedilmiştir.

Farelere çalışma süresince kısıtlama olmaksızın (*ad libitum*) su ve yem verilmiştir. Diyet müdahalesi Tablo 3.1'de belirtildiği gibi yapılmıştır.

Tablo 3.1. Uygulanan diyet müdahalesi

Müdahale Grubu	HAA Süresi (Hafta)	Batı tarzı diyet*	PhIP** (10 mg/kg)	MeIQx** (10 mg/kg)
Kk: Kontrol	3	+		
Pk: PhIP	3	+	+	
Mk: MeIQx	3	+		+
PMk: PhIP + MeIQx	3	+	+	+
Ku: Kontrol	10	+		
Pu: PhIP	10	+	+	
Mu: MeIQx	10	+		+
PMu: PhIP + MeIQx	10	+	+	+

*Batı tarzı diyet: 20g doymuş yağ (Hindistan cevizi yağı) ve 0,2g kolesterol /100g yem içermektedir. ** Eklenen heterosiklik amin miktarı vücut ağırlığına göre hesaplanmıştır.

Çalışma süresince kontrol ve deney grupları için hazırlanan yemlerin makro ve mikro besin ögesi içeriği aynıdır. Gruplara verilen yemler arasındaki tek fark heterosiklik amin türü ve/veya miktarıdır. Bu yemlerin örüntüsü Tablo 3.2.'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Farelere diyet müdahalesi sırasında verilen yemlerin örüntüsü

Diyetin Örüntüsü	Yemler			
	Kontrol (K)	PhIP (P)	MelQx* (M)	PhIP ve MelQx* (PM)
Enerji (kkal/g yem)	4,6	4,6	4,6	4,6
Karbonhidrat (%enerji)	50,0	50,0	50,0	50,0
Protein (%enerji)	11,0	11,0	11,0	11,0
Yağ (%enerji)	39,0	39,0	39,0	39,0
Kolesterol (g/kg yem)	2,0	2,0	2,0	2,0
Karbonhidrat kaynağı (g/kg yem)				
Mısır nişastası	465,0	465,0	465,0	465,0
Maltodekstrin	155,0	155,0	155,0	155,0
Selüloz	50,0	50,0	50,0	50,0
Protein kaynağı (g/kg yem)				
Kazein	140,0	140,0	140,0	140,0
L-sistein	1,8	1,8	1,8	1,8
Yağ kaynağı (g/kg yem)				
Mısır yağı	40,0	40,0	40,0	40,0
Hindistan cevizi yağı	160,0	160,0	160,0	160,0
Diğer (g/kg yem)				
Mineral karışımı	35,0	35,0	35,0	35,0
Vitamin karışımı	10,0	10,0	10,0	10,0
Kolin bitartarat	2,5	2,5	2,5	2,5
tert-bütilhidrokinon	0,01	0,01	0,01	0,01
PhIP (mg/kg yem)	--	60,0	--	60,0
MelQx (mg/kg yem)	--	--	60,0	60,0

*Yeme eklenen heterosiklik amin miktarı farelerin bir günlük ortalama yem tüketimleri baz alınarak belirlenmiştir. Kontrol (K) Yüksek yağ ve kolesterol içeren; PhIP (P) Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; MelQx (M)Yüksek yağlı, kolesterol ve MelQx içeren diyet; PhIP ve MelQx (PM) Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MelQx içeren diyet

Diyet müdahalesi öncesinde farelerin yem tüketiminde olabilecek bireysel farklılıkları belirleyebilmek, standart koşulları ve farelerin laboratuvar ortamına

adapte olmasını sağlayabilmek için farelerin hepsine çalışmanın ilk iki haftasında sınırsız (*ad libitum*) izokalorik standart laboratuvar yemi verilmiştir. Bu aşamada verilen yem de aynı protokol takip edilerek hazırlanmıştır. Bu sürenin sonunda diyet müdahalesine başlanmıştır (Şekil 3.1).

3.3 Anestezi, Kan Alma, Doku Toplama ve Ötanazi

Standardizasyon (wash out, 2 hafta) ve diyet müdahalesinin (24 veya 31 hafta) ardından deney süresi sonunda fareler anestezi altında kan alma, doku/organ izolasyonu ve ötanazi işlemleri yapılarak deney sonlandırılmıştır. Bu aşamalar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir. Cerrahi müdahale beş saatlik açlık sırasında yapılmıştır. Bunun için müdahalenin beş saat öncesinde farelerin kafeslerindeki yem ve suları alınarak açlık durumunda kan ve doku örnekleri toplanmıştır (207, 209).

3.3.1 Anestezi

Fareler genel anestezi altına alınmıştır. Terminal vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra hazırlanan ketamin (0,1 mg/g vücut ağırlığı) (Richter Pharma, Avusturya) ve ksilazin (0,02 mg/g vücut ağırlığı) (Alfasan International B.V., Hollanda) kokteyli subkutan yoldan enjekte edilerek anestezi işlemi gerçekleştirilmiştir (207).

İşleme alınacak fare diğerlerinden ayrılarak müdahale odasına alınmış ve stres düzeyi en aza indirilerek enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Anestezi derinliği parmak kısırtma yöntemi ile sıklıkla kontrol edilerek farenin tepki vermesinin sonlandığı noktada cerrahi müdahaleye başlanmıştır (207, 209). Fare ötanazi edilene kadar uygulanan tüm cerrahi işlemler sırasında anestezi derinliği izlemine devam edilmiştir.

3.3.2 Kan Alma ve Ötanazi

Farelerin derin anesteziye girmesi için gerekli olan süre beklendikten ve parmak kısırtma yanıtı ile derin anestezi durumu doğrulandıktan sonra fareler sabitlenerek cerrahi müdahaleye başlanmıştır. Antikoagülan olarak laboratuvar

koşullarında sodyum sitrat (Merck Chemicals, Almanya) ile hazırlanan sitrat çözeltisi (12,9 mM) kullanılmıştır.

Cerrahi operasyona gergin şekilde duran farenin alt orta kadranından başlanmış, her iki yandan yukarı doğru kaburgalara gelinceye kadar deri ve kas doku yavaşça kesilerek iç organların ortaya çıkması sağlanmıştır. Daha sonra uygun boyuttaki sitratlı enjektörle kan (vena kava yolu) alındıktan sonra eksanguinasyon yöntemiyle ötanazi gerçekleştirilmiştir. Alınan sitratlı kan polipropilen kapaklı tüplere transfer edilerek mikrosantrifüj cihazıyla (Selecta Microtronic-BL, İspanya) 8736 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra plazma ayrılarak temiz polipropilen kapaklı tüplere alınmış ve -80 °C'de analiz gününe kadar saklanmıştır.

3.3.3 Organların Diseksiyonu

Eksanguinasyon yöntemiyle ötenaziden sonra sterilize serum fizyolojik (%0,9 NaCl izotonik SF) ile perfüzyon yapılmıştır. Farelerin aort ve karaciğer dokuları mikroskop altında çevre dokulardan dikkatli bir şekilde izole edildikten sonra ağırlıkları tartılmış ve polipropilen kapaklı tüplerde analiz gününe kadar -80°C'deki dondurucuda saklanmıştır (208, 209, 212).

3.4 Plazma ve Dokularda Lipid Profili ve Endotel Disfonksiyon Parametrelerinin Tayini

Lipid profili ve endotel disfonksiyon parametreleri analizleri için plazmada herhangi bir ön işlem uygulanmazken karaciğer dokuları homojenize edilmiştir. Karaciğer dokusu fosfat tampon çözeltisi (PBS: phosphate buffered saline) ile karıştırılarak mikrohomojenizatör (T25 İka Labortechnik, Almanya) ile homojenize edilmiştir. Ardından 9400 g'de 10 dk santrifüj (Nüve 048, Türkiye) edilmiştir. Santrifüj işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra süpernatant polipropilen kapaklı tüplere alınarak protein miktarı tayini yapılmıştır. Alınan karaciğer dokusundaki protein miktarının belirlenmesi bişinkoninik asit (BCA) yöntemiyle hazır kit (DC Protein Assay Kit II, Katalog no: 5000112, Bio-Rad, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Mikroplaka

kuyularına bazik bakır tartarat çözeltisi eklenmiştir. Ardından folin reaktanı eklenerek bazik ortamda karaciğer örneklerinin içerdiği protein moleküllerinin bakır tartarat çözeltisi yardımıyla folin reaktanının indirgemesi sağlanmıştır. Bu aşamada mikrolaka kuyularındaki solüsyon mavi renge dönüşmektedir. Protein yapısındaki aminoasitlerden tirozin ve triptofan öncelikli olarak renk değişimini sağlarken sistin, sistein ve histidin aminoasitleri de renk değişimine daha düşük oranda katkıda bulunmaktadır. Gerçekleşen renk değişimi kolorimetrik mikrolaka okuyucu (ChromMate 4300, Awareness Technology Inc, ABD) ile 750 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine göre örneklerin içerdiği protein miktarı farklı konsantrasyonlarda hazırlanan serum albümin solüsyonları yardımıyla oluşturulan “protein standart eğrisi” kullanılarak hesaplanmıştır. Örneklerin içerdiği protein miktarı karaciğerde yapılan lipid profili analizlerinde düzeltme faktörü olarak kullanılarak elde edilen sonuçlar gram proteine düşen miktar olarak belirtilmiştir. Yapılan tüm analizler Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Araştırma Laboratuvarları’nda gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 Trigliserit Analizi

Trigliserit analizi plazma ve karaciğerde hazır kitler ile (Katalog no: 201-02-0376, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Çin) yapılmıştır. Seçilen kit örneklerdeki trigliserit miktarını çift antikorlu sandviç ELISA yöntemini kullanarak belirlemektedir. Fare trigliserit monoklonal antikor ile kaplanmış olarak gelen mikrolaka kuyusuna plazma ve karaciğer dokusu örnekleri uygun konsantrasyonda eklenerek en yüksek bağlanma için inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda her kuyuya kit içeriğinde gelen biyotinle işaretlenmiş trigliserit antikorları ve streptavidin-horseradish peroxidase (streptavidin-HRP) eklenmiştir. Mikrolaka yeniden inkübe edilerek plazma ve karaciğer dokusunda bulunan trigliserit moleküllerinin bu antikorlara bağlanarak immün kompleks oluşturması sağlanmıştır. Inkübasyonda immün kompleks oluşturmayan enzimler sürenin sonunda yıkama işlemleri ile mikrolaka kuyularından uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki adımda Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu sağlamıştır.

Gerekli sürenin sonunda durdurma solüsyon kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonunda durdurma solüsyonunun sağladığı asidik ortamın etkisiyle 450 nm dalga boyunda en uygun absorpsiyonu sağlayan sarı bir renk oluşmaktadır. Örneklerin içerdiği trigliserit miktarına paralel olarak oluşan renk yoğunlukları, kolorimetrik mikropilaka okuyucu (Chrommate 4300, Awareness Technology Inc, ABD) ile tayin edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan ve trigliserit konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların absorbans değerleri kullanılarak oluşturulan “trigliserit standart eğrisi” yardımıyla her bir örneğin içerdiği trigliserit miktarı hesaplanmıştır. Uygulanan dilüsyon oranına ve karaciğer örneğinin içerdiği protein miktarına göre gerekli düzeltmeler yapılarak örneklerin içerdiği trigliserit düzeyi belirlenmiştir.

3.4.2 Total Kolesterol Analizi

Total kolesterol analizi plazma ve karaciğerde hazır kitler ile (Katalog no: 201-02-0379, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Çin) yapılmıştır. Seçilen kit örneklerdeki total kolesterol miktarını çift antikorlu sandviç ELISA yöntemini kullanarak belirlemektedir. Fare total kolesterol monoklonal antikoruna ile kaplanmış olarak gelen mikropilaka kuyusuna plazma ve karaciğer dokusu örnekleri uygun konsantrasyonda eklenerek en yüksek bağlanma için inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda her kuyuya kit içeriğinde gelen biyotinle işaretlenmiş total kolesterol antikorları ve streptavidin-HRP eklenmiştir. Mikropilaka yeniden inkübe edilerek plazma ve karaciğer dokusunda bulunan total kolesterol moleküllerinin bu antikorlara bağlanarak immün kompleks oluşturması sağlanmıştır. Inkübasyonda immün kompleks oluşturmayan enzimler sürenin sonunda yıkama işlemleri ile mikropilaka kuyularından uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki adımda Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu sağlamıştır. Gerekli sürenin sonunda durdurma solüsyon kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonunda durdurma solüsyonunun sağladığı asidik ortamın etkisiyle 450 nm dalga boyunda en uygun absorpsiyonu sağlayan sarı bir renk oluşmaktadır. Örneklerin içerdiği total kolesterol miktarına paralel olarak oluşan renk yoğunlukları, kolorimetrik mikropilaka okuyucu (Chrommate 4300, Awareness Technology Inc,

ABD) ile tayin edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan ve total kolesterol konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların absorpsiyon değerleri kullanılarak oluşturulan “total kolesterol standart eğrisi” yardımıyla her bir örnekteki total kolesterol miktarı hesaplanmıştır. Uygulanan dilüsyon oranına ve karaciğer örneğinin içerdiği protein miktarına göre gerekli düzeltmeler yapılarak örneklerin içerdiği total kolesterol düzeyi belirlenmiştir.

3.4.3 Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (VLDL-K) Analizi

VLDL-K analizi plazma ve karaciğerde hazır kitler ile (Katalog no: 201-02-1283, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Çin) yapılmıştır. Seçilen kit örneklerdeki VLDL-K miktarını çift antikorlu sandviç ELISA yöntemini kullanarak belirlemektedir. Fare VLDL-K monoklonal antikorunu ile kaplanmış olarak gelen mikropłaka kuyusuna plazma ve karaciğer dokusu örnekleri uygun konsantrasyonda eklenerek en yüksek bağlanma için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyuya kit içeriğinde gelen biyotinle işaretlenmiş VLDL-K antikorları ve streptavidin-HRP eklenmiştir. Mikropłaka yeniden inkübe edilerek plazma ve karaciğer dokusunda bulunan VLDL-K moleküllerinin bu antikorlara bağlanarak immün kompleks oluşturması sağlanmıştır. İnkübasyonda immün kompleks oluşturmayan enzimler sürenin sonunda yıkama işlemleri ile mikropłaka kuyularından uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki adımda Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu sağlanmıştır. Gerekli sürenin sonunda durdurma solüsyon kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonunda durdurma solüsyonunun sağladığı asidik ortamın etkisiyle 450 nm dalga boyunda en uygun absorpsiyonu sağlayan sarı bir renk oluşmaktadır. Örneklerin içerdiği VLDL-K miktarına paralel olarak oluşan renk yoğunlukları, kolorimetrik mikropłaka okuyucu (Chrommate 4300, Awareness Technology Inc, ABD) ile tayin edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan ve VLDL-K konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların absorpsiyon değerleri kullanılarak oluşturulan “VLDL-K standart eğrisi” yardımıyla her bir örnekteki VLDL-K miktarı hesaplanmıştır. Uygulanan dilüsyon oranına ve karaciğer

örneğinin içerdiği protein miktarına göre gerekli düzeltmeler yapılarak örneklerin içerdiği VLDL-K düzeyi belirlenmiştir.

3.4.4 Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (LDL-K) Analizi

LDL-K analizi plazma ve karaciğerde hazır kitler ile (Katalog no: 201-02-0333, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Çin) yapılmıştır. Seçilen kit örneklerdeki LDL-K miktarını çift antikorlu sandviç ELISA yöntemini kullanarak belirlemektedir. Fare LDL-K monoklonal antikorlu ile kaplanmış olarak gelen mikropłaka kuyusuna plazma ve karaciğer dokusu örnekleri uygun konsantrasyonda eklenerek en yüksek bağlanma için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyuya kit içeriğinde gelen biyotinle işaretlenmiş LDL-K antikorları ve streptavidin-HRP eklenmiştir. Mikropłaka yeniden inkübe edilerek plazma ve karaciğer dokusunda bulunan LDL-K moleküllerinin bu antikorlara bağlanarak immün kompleks oluşturması sağlanmıştır. İnkübasyonda immün kompleks oluşturmayan enzimler sürenin sonunda yıkama işlemleri ile mikropłaka kuyularından uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki adımda Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu sağlamıştır. Gerekli sürenin sonunda durdurma solüsyon kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonunda durdurma solüsyonunun sağladığı asidik ortamın etkisiyle 450 nm dalga boyunda en uygun absorpsiyonu sağlayan sarı bir renk oluşmaktadır. Örneklerin içerdiği LDL-K miktarına paralel olarak oluşan renk yoğunlukları, kolorimetrik mikropłaka okuyucu (Chrommate 4300, Awareness Technology Inc, ABD) ile tayin edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan ve LDL-K konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların absorbans değerleri kullanılarak oluşturulan “LDL-K standart eğrisi” yardımıyla her bir örnekteki LDL-K miktarı hesaplanmıştır. Uygulanan dilüsyon oranına ve karaciğer örneğinin içerdiği protein miktarına göre gerekli düzeltmeler yapılarak örneklerin içerdiği LDL-K düzeyi belirlenmiştir.

3.4.5 Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (HDL-K) Analizi

HDL-K analizi plazma ve karaciğerde hazır kitler ile (Katalog no: 201-02-0332, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Çin) yapılmıştır. Seçilen kit örneklerdeki HDL-K miktarını çift antikorlu sandviç ELISA yöntemini kullanarak belirlemektedir. Fare HDL-K monoklonal antikorunu ile kaplanmış olarak gelen mikrolaka kuyusuna plazma ve karaciğer dokusu örnekleri uygun konsantrasyonda eklenerek en yüksek bağlanma için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyuya kit içeriğinde gelen biyotinle işaretlenmiş HDL-K antikorları ve streptavidin-HRP eklenmiştir. Mikrolaka yeniden inkübe edilerek plazma ve karaciğer dokusunda bulunan HDL-K moleküllerinin bu antikorlara bağlanarak immün kompleks oluşturması sağlanmıştır. İnkübasyonda immün kompleks oluşturmayan enzimler sürenin sonunda yıkama işlemleri ile mikrolaka kuyularından uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki adımda Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu sağlamıştır. Gerekli sürenin sonunda durdurma solüsyonu kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonunda durdurma solüsyonunun sağladığı asidik ortamın etkisiyle 450 nm dalga boyunda en uygun absorpsiyonu sağlayan sarı bir renk oluşmaktadır. Örneklerin içerdiği HDL-K miktarına paralel olarak oluşan renk yoğunlukları, kolorimetrik mikrolaka okuyucu (Chrommate 4300, Awareness Technology Inc, ABD) ile tayin edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan ve HDL-K konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların absorbans değerleri kullanılarak oluşturulan "HDL-K standart eğrisi" yardımıyla her bir örnekteki HDL-K miktarı hesaplanmıştır. Uygulanan dilüsyon oranına ve karaciğer örneğinin içerdiği protein miktarına göre gerekli düzeltmeler yapılarak örneklerin içerdiği HDL-K düzeyi belirlenmiştir.

3.4.6 Apolipoprotein-B (Apo-B) Analizi

Apo-B analizi plazma ve karaciğerde hazır kitler ile (Katalog no: 201-02-1481, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Çin) yapılmıştır. Seçilen kit örneklerdeki Apo-B miktarını çift antikorlu sandviç ELISA yöntemini kullanarak belirlemektedir. Fare Apo-B monoklonal antikorunu ile kaplanmış olarak gelen

mikroplaka kuyusuna plazma ve karaciğer dokusu örnekleri uygun konsantrasyonda eklenerek en yüksek bağlanma için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyuya kit içeriğinde gelen biyotinle işaretlenmiş Apo-B antikoları ve streptavidin-HRP eklenmiştir. Mikroplaka yeniden inkübe edilerek plazma ve karaciğer dokusunda bulunan Apo-B moleküllerinin bu antikora bağlanarak immün kompleks oluşturması sağlanmıştır. İnkübasyonda immün kompleks oluşturmayan enzimler sürenin sonunda yıkama işlemleri ile mikroplaka kuyularından uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki adımda Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu sağlanmıştır. Gerekli sürenin sonunda durdurma solüsyon kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonunda durdurma solüsyonunun sağladığı asidik ortamın etkisiyle 450 nm dalga boyunda en uygun absorpsiyonu sağlayan sarı bir renk oluşmaktadır. Örneklerin içerdiği Apo-B miktarına paralel olarak oluşan renk yoğunlukları, kolorimetrik mikroplaka okuyucu (Chrommate 4300, Awareness Technology Inc, ABD) ile tayin edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan ve Apo-B konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların absorbans değerleri kullanılarak oluşturulan "Apo-B standart eğrisi" yardımıyla her bir örnekteki Apo-B miktarı hesaplanmıştır. Uygulanan dilüsyon oranına ve karaciğer örneğinin içerdiği protein miktarına göre gerekli düzeltmeler yapılarak örneklerin içerdiği Apo-B düzeyi belirlenmiştir.

3.4.7 Apolipoprotein A1 (Apo-A1) Analizi

Apo-A1 analizi plazma ve karaciğerde hazır kitler ile (Katalog no: 201-02-0104, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Çin) yapılmıştır. Seçilen kit örneklerdeki Apo-A1 miktarını çift antikorlu sandviç ELISA yöntemini kullanarak belirlemektedir. Fare Apo-A1 monoklonal antikoruna ile kaplanmış olarak gelen mikroplaka kuyusuna plazma ve karaciğer dokusu örnekleri uygun konsantrasyonda eklenerek en yüksek bağlanma için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyuya kit içeriğinde gelen biyotinle işaretlenmiş Apo-A1 antikoları ve streptavidin-HRP eklenmiştir. Mikroplaka yeniden inkübe edilerek plazma ve karaciğer dokusunda bulunan Apo-A1 moleküllerinin bu antikora bağlanarak

immün kompleks oluşturması sağlanmıştır. İnkübasyonda immün kompleks oluşturmayan enzimler sürenin sonunda yıkama işlemleri ile mikropkaya kuyularından uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki adımda Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu sağlamıştır. Gerekli sürenin sonunda durdurma solüsyon kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonunda durdurma solüsyonunun sağladığı asidik ortamın etkisiyle 450 nm dalga boyunda en uygun absorpsiyonu sağlayan sarı bir renk oluşmaktadır. Örneklerin içerdiği Apo-A1 miktarına paralel olarak oluşan renk yoğunlukları, kolorimetrik mikropkaya okuyucu (Chrommate 4300, Awareness Technology Inc, ABD) ile tayin edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan ve Apo-A1 konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların absorbans değerleri kullanılarak oluşturulan "Apo-A1 standart eğrisi" yardımıyla her bir örnekteki Apo-A1 miktarı hesaplanmıştır. Uygulanan dilüsyon oranına ve karaciğer örneğinin içerdiği protein miktarına göre gerekli düzeltmeler yapılarak örneklerin içerdiği Apo-A1 düzeyi belirlenmiştir.

3.4.11 Vasküler Hücre Adezyon Molekülü 1 (VCAM-1) Analizi

VCAM-1 analizi plazma ve karaciğerde hazır kitler ile (Katalog no: 201-02-0281, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Çin) yapılmıştır. Seçilen kit örneklerdeki VCAM-1 miktarını çift antikorlu sandviç ELISA yöntemini kullanarak belirlemektedir. Fare VCAM-1 monoklonal antikoru ile kaplanmış olarak gelen mikropkaya kuyusuna plazma ve karaciğer dokusu örnekleri uygun konsantrasyonda eklenerek en yüksek bağlanma için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyuya kit içeriğinde gelen biyotinle işaretlenmiş VCAM-1 antikorları ve streptavidin-HRP eklenmiştir. Mikropkaya yeniden inkübe edilerek plazma ve karaciğer dokusunda bulunan VCAM-1 moleküllerinin bu antikorlara bağlanarak immün kompleks oluşturması sağlanmıştır. İnkübasyonda immün kompleks oluşturmayan enzimler sürenin sonunda yıkama işlemleri ile mikropkaya kuyularından uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki adımda Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu sağlamıştır. Gerekli sürenin sonunda durdurma solüsyon kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonunda durdurma

solüsyonunun sağladığı asidik ortamın etkisiyle 450 nm dalga boyunda en uygun absorpsiyonu sağlayan sarı bir renk oluşmaktadır. Örneklerin içerdiği VCAM-1 miktarına paralel olarak oluşan renk yoğunlukları, kolorimetrik mikropilaka okuyucu (Chrommate 4300, Awareness Technology Inc, ABD) ile tayin edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan ve VCAM-1 konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların absorbans değerleri kullanılarak oluşturulan “VCAM-1 standart eğrisi” yardımıyla her bir örnekteki VCAM-1 miktarı hesaplanmıştır. Uygulanan dilüsyon oranına ve karaciğer örneğinin içerdiği protein miktarına göre gerekli düzeltmeler yapılarak örneklerin içerdiği VCAM-1 düzeyi belirlenmiştir.

3.4.12. İnterselüler Hücre Adezyon Molekülü 1 (ICAM-1) Analizi

ICAM-1 analizi plazma ve karaciğerde hazır kitler ile (Katalog no: 201-02-0280, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Çin) yapılmıştır. Seçilen kit örneklerdeki ICAM-1 miktarını çift antikorlu sandviç ELISA yöntemini kullanarak belirlemektedir. Fare ICAM-1 monoklonal antikoru ile kaplanmış olarak gelen mikropilaka kuyusuna plazma ve karaciğer dokusu örnekleri uygun konsantrasyonda eklenerek en yüksek bağlanma için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyuya kit içeriğinde gelen biyotinle işaretlenmiş ICAM-1 antikorları ve streptavidin-HRP eklenmiştir. Mikropilaka yeniden inkübe edilerek plazma ve karaciğer dokusunda bulunan ICAM-1 moleküllerinin bu antikorlara bağlanarak immün kompleks oluşturması sağlanmıştır. İnkübasyonda immün kompleks oluşturmayan enzimler sürenin sonunda yıkama işlemleri ile mikropilaka kuyularından uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki adımda Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu sağlamıştır. Gerekli sürenin sonunda durdurma solüsyon kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonunda durdurma solüsyonunun sağladığı asidik ortamın etkisiyle 450 nm dalga boyunda en uygun absorpsiyonu sağlayan sarı bir renk oluşmaktadır. Örneklerin içerdiği ICAM-1 miktarına paralel olarak oluşan renk yoğunlukları, kolorimetrik mikropilaka okuyucu (Chrommate 4300, Awareness Technology Inc, ABD) ile tayin edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan ve ICAM-1 konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların absorbans

değerleri kullanılarak oluşturulan “ICAM-1 standart eğrisi” yardımıyla her bir örnekteki ICAM-1 miktarı hesaplanmıştır. Uygulanan dilüsyon oranına ve karaciğer örneğinin içerdiği protein miktarına göre gerekli düzeltmeler yapılarak örneklerin içerdiği ICAM-1 düzeyi belirlenmiştir.

3.5. Plazmada Kardiyovasküler Hastalık Riskini Gösteren Çeşitli Parametre ve İndekslerin Hesaplanması

Kardiyovasküler hastalık riskini gösteren farklı ölçek ve indeksler bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında plazmada tayin edilen kolesterol ve lipoprotein parametreleri ile hesaplanabilen güncel ve görece sık kullanılan parametre ve indeksler kullanılmıştır.

- **Plazma non- HDL düzeyi;** Farelerin ölçülen total kolesterol düzeyinden plazma HDL düzeyinin çıkarılması ile hesaplanmıştır (213).

$$\text{Plazma non-HDL düzeyi: Total Kolesterol (mmol/L) - HDL (mmol/L)}$$

(2.1.)

- **Castelli risk indeksleri;** İki farklı formülasyon kullanılarak hesaplanmaktadır.

Total kolesterol/HDL; plazmada ölçülen total kolesterol düzeyleri ile plazma HDL düzeyleri oranlanarak hesaplanmıştır (214).

$$\text{Castelli Risk İndeksi I: } \frac{\text{Total Kolesterol (mmol/L)}}{\text{HDL (mmol/L)}}$$

(2.2.)

LDL/HDL; plazma LDL ve plazma HDL düzeylerinin oranlanmasıyla elde edilmiştir (214).

$$\text{Castelli Risk İndeksi I: } \frac{\text{LDL (mmol/L)}}{\text{HDL (mmol/L)}}$$

(2.3.)

Apo B/Apo A1; hesaplaması için plazmada ölçülen Apo B ve plazma Apo A1 düzeyleri oranlanmıştır (213).

$$\text{Apo B/Apo A1: } \frac{\text{Apo B (mmol/L)}}{\text{Apo A1 (mmol/L)}}$$

(2.4.)

- **Plazma Aterojenik İndeksi;** plazmada ölçülen trigliserit düzeyi ile plazma HDL düzeyi oranlandıktan sonra çıkan sonucun 10 tabanında logaritması alınarak hesaplanmıştır (213, 215).

$$\text{Plazma Aterojenik İndeksi: } \log_{10} \left(\frac{\text{Trigliserit (mmol/L)}}{\text{HDL (mmol/L)}} \right)$$

(2.5.)

- **Aterojenik Katsayı;** plazmada ölçülen total kolesterol düzeyinden plazma HDL düzeyi çıkarıldıktan sonra bulunan sonucun plazma HDL düzeyine oranlanmasıyla elde edilmiştir (213).

$$\text{Aterojenik Katsayı: } \frac{(\text{Total Kolesterol (mmol/L)} - \text{HDL (mmol/L)})}{\text{HDL (mmol/L)}}$$

(2.6)

3.6 Bazı Proteinlerin Gen Ekspresyonu Analizi

Moleküler düzeyde endotel disfonksiyon belirteci olarak VCAM-1 ve ICAM-1 moleküllerinin gen ekspresyonu nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR: quantitative real time polimerase chain reaction) yöntemiyle aort damar dokusunda saptanmıştır. qRT-PCR analizleri sırasında gerekli olan materyaller ve kimyasalların seçimi ile adapte edilmiş protokollerin uygulanması sırasında Oligomer A.Ş. (Türkiye)' den destek alınmıştır. Bu analiz LightCycler® 480 Sistemi (Roche Molecular Systems, İsviçre) kullanılarak yapılmıştır (216).

Başlangıç olarak aort örnekleri sıvı nitrojen kullanılarak küçük parçalar haline getirilmiştir. Sonrasında NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel, Almanya) kiti

kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA, qRT- qPCR için bir şablonun üretilmesi için Thermo Fisher RevertAid cDNA sentez kiti (Thermo-Scientific, ABD) kullanılarak cDNA'ya ters transkribe edilmiştir. 1 µg RNA ters transkripsiyon sistemine eklenmiş ve 25 °C'de 5 dakika ve 42 °C'de 60 dakika reaksiyon için beklenmiştir. Gerçek zamanlı qPCR'ler LightCycler 480 Sistemi ve yazılımı ile mikrolakada; iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, ABD) kullanılarak ön dejenerasyon için 30 saniye 95 °C; denatürasyon için 15 saniye boyunca 95 °C; ve 40 döngü için 60 °C'de 60 saniye uzatma şeklinde gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi analizi için 65 ile 95 °C arası 0,5°C artış olacak şekilde sinyaller toplanmıştır. Her bir numune için üç tekrar seti bulunmaktadır ve her bir genin ekspresyon seviyesi, aynı RNA numunesi içinde Gapdh geni temel alınarak normalize edilmiştir. Genler için relatif ekspresyon seviyeleri örnekler arasındaki en düşük ekspresyona sahip olan örneğin ekspresyon seviyesi 1 olacak şekilde hesaplanmıştır. Primerler ve bunların sekansları Tablo 3.3'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3. Kullanılan primerlerin özellikleri

Primer Adı	Sekans Bilgisi	Uzunluk
VCAM-1 F	TGGAGGTCTACTCATTCCCTGA	71 bp
VCAM-1 R	GACAGGTCTCCCATGCACAA	
ICAM-1 F	AGCTCGGAGGATCACAAACG	116 bp
ICAM-1 R	TCCAGCCGAGGACCATACAG	
Gapdh F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	123 bp
Gapdh R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

3.6.1 Doku Örneklerinin Hazırlanması

-80 °C'de saklanan aort dokuları sıvı nitrojende homojenize edilerek proteinlerin ayrıştırılması için hazır hale getirilmiştir. Protein saflaştırma işlemi

NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel, Almanya) kiti kullanılarak yapılmıştır. Saflaştırma işlemi kitte bulunan protokole uygun olarak yapılmıştır. Protein örnekleri PSB-TCEP tampon çözeltisinde çözülmüştür. Sonrasında 95°C'de 3 dakika inkübe edilerek protein çözünme ve denatürasyonu sağlanmıştır. Protein örneklerinin miktar tayini aşamasına geçilmiştir.

3.6.2 Örneklerde Protein Miktar Tayini

Homojenize edilen aort dokusundaki protein miktarının belirlenmesi Protein Quantification Assay (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Gerçekleşen renk değişimi kolorimetrik mikropilaka okuyucu (Synergy HT, BioTek Inc, ABD) ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine göre örneklerin içerdiği protein miktarı farklı konsantrasyonlarda hazırlanan serum albümin solüsyonları yardımıyla oluşturulan “protein standart eğrisi” kullanılarak hesaplanmıştır. Her örneğin farklı miktarda protein içermesi nedeniyle bazı örnekler dilüe edilerek hepsinin eşit miktarda protein içermesi sağlanmıştır.

3.6.3. Primerlerin Dizaynı

Primerlerin dizaynı, Primer3 adlı çevrimiçi aracı ile yapılmıştır (217). Dizayn edilen primerler NCBI Primer Blast çevrimiçi aracı kullanılarak spesifisite kontrolü yapılmıştır. Primer erime sıcaklıkları 60°C'de ortak olacak şekilde optimize edilmiştir. Primer sekans bilgileri ve çoğaltılan bölge uzunluk bilgileri Tablo 3.3.'de gösterilmiştir.

3.6.4. Gerçek zamanlı qPCR Analizi

Gerçek zamanlı qPCR (RT-qPCR) analizi, LightCycler 480 Sistemi ve yazılımı ile mikropilakalarda; iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, ABD) kullanılarak ön dejenerasyon için 30 saniye 95 °C; denatürasyon için 15 saniye boyunca 95 °C; ve 40 döngü için 60 °C'de 60 saniye uzatma şeklinde gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi analizi için 65 ile 95 °C'ler arası 0,5°C artış olacak şekilde sinyaller toplanmıştır. Her bir numune için üç tekrar seti bulunmaktadır ve her bir genin ekspresyon seviyesi, aynı RNA numunesi içinde Gapdh geni baz alınarak normalize edilmiştir.

3.7 Bazı Enzim ve Peptidlerin Western-Blot Yöntemiyle Analizi

Bu tez çalışmasında endotel disfonksiyon belirteçleri aort dokusunda Western-Blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Western-Blot analizi temel olarak protein elektroforezi, proteinlerin yürütülen jelden nitroselüloz membrana aktarılması ve primer ve HRP-konjüge sekonder antikörlerle hedef proteinlerin tespit edilmesini içeren analiz yöntemidir (218).

Western-Blot analizi; örneklerin hazırlanması, örneklerin içerdiği protein miktarının belirlenmesi, poliakrilamid jel elektroforezi, proteinlerin poliakrilamid jelden membrana transfer edilmesi, antikörlerle bağlanma ve görüntüleme basamaklarını içermektedir. Bu basamaklar sonraki bölümlerde ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

3.7.1 Örneklerin Hazırlanması

Aort dokuları -80 °C'de alınıp sıvı nitrojende homojenize edilerek proteinlerin ayrıştırılması için hazır hale getirilmiştir. Protein saflaştırma işlemi NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel, Almanya) kiti kullanılarak yapılmıştır. Saflaştırma işlemi kitte bulunan protokole uygun olarak yapılmıştır. Protein örnekleri PSB-TCEP tampon çözeltisinde çözülmüştür. Sonrasında 95°C'de 3 dakika inkübe edilerek protein çözünme ve denatürasyonu sağlanmıştır. Protein örneklerinin miktar tayini aşamasına geçilmiştir.

3.7.2 Örneklerde Protein Miktar Tayini

Homojenize edilen aort dokusundaki protein miktarının belirlenmesi Protein Quantification Assay (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Gerçekleşen renk değişimi kolorimetrik mikropilaka okuyucu (Synergy HT, BioTek Inc, ABD) ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine göre örneklerin içerdiği protein miktarı farklı konsantrasyonlarda hazırlanan serum albümin solüsyonları yardımıyla oluşturulan "protein standart eğrisi" kullanılarak

hesaplanmıştır. Her örneğin farklı miktarda protein içermesi nedeniyle bazı örnekler dilüe edilerek hepsinin eşit miktarda protein içermesi sağlanmıştır.

3.7.3 Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Bu analiz için %10'luk poliakrilamid yürütme jeli ve %5'lik poliakrilamid yükleme jeli laboratuvar ortamında hazırlanmıştır. Jel solüsyonları hazırlandıktan sonra dökme işlemine geçilmiştir. Bunun için dikey elektroforez sistemi jel hazırlama standı (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, ABD) kurularak cam plakalar arasına jel dökülmüştür. Örnek ve diğer solüsyonların ekleneceği kuyuların oluşturulabilmesi için yükleme jelinin dökülmesinin ardından vertikal elektroforez sistemi tarağı cam plakaların arasına baloncuk oluşturmayacak şekilde yerleştirilerek jelin katılması beklenmiştir. Katılma tamamen doğrulandıktan sonra tarak çıkarılmış ve cam plakalar yürütme tampon çözeltisi (Tris/Trisin/SDS; Bio-Rad, ABD) içeren vertikal elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, ABD) tankına yerleştirilmiştir. Protein belirteci (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo-Scientific, ABD) ve örnekler kuyulara yüklenerek elektroforez uygulanmıştır (80V 30 dk; 100V 90 dk).

3.7.4 Jeldeki Proteinlerin Membrana Transferi (Yarı-Kuru Sistem)

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılmış halde bulunan proteinlerin transfer edileceği poliviniliden diflorid (PVDF) membrana transfer tampon çözeltisi ile yeniden elektroforez tankına (Trans-Blot Turbo Transfer System, BioRad, ABD) alınarak sağlanmıştır (25V 30 dk). Transfer gerçekleşikten sonra proteinleri içeren PVDF membran pH 7,6 olan TRIS tampon çözeltisi (TBS: TRIS buffered saline) ile yıkanmıştır (Sigma Aldrich, Almanya). Sonraki aşamada %5 bloklama çözeltisi hazırlanarak spesifik olmayan protein-antikor bağlanmalarını önlenmiştir.

3.7.5 Antikorlarla Bağlanma

TBS-T solüsyonu ile yıkamanın ardından PVDF membran 1:1000 oranında dilue edilen birincil antikorlar VCAM-1 (Katalog no: AB134047, Cell Signaling Technology, ABD), CD54/ICAM-1 (Katalog no: AB119871, Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık), β -Actin (Katalog no: AB1801, Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık) ile +4 °C'de 12-16 saat inkübe edilmiştir. Sonraki aşamada PVDF membran birincil antikorla bağlanmaya uygun olan ve 1:5000 oranında dilue edilen ikincil antikor (anti-rabbit IgG (H+L) Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık) ile oda sıcaklığında bir saat boyunca inkübe edilmiştir.

3.7.6 Görüntüleme

Bağlanan ikincil antikor, peroksidaz reaksiyonu gerçekleştiren kemilüminesans substratı (Clarity Western ECL Substrate, Bio-rad, ABD) ile tespit edilmiştir. Peroksidaz enzimi çeşitli ara ürünler oluşturarak luminolün 3-aminofitalata oksidasyonunu katalizlemektedir. Reaksiyon 428 nm'de düşük yoğunlukta ışımaya sağlamaktadır. Kemilüminesans ile görünür hale getirilen protein-antikor kompleksinin fotoğraflama işlemi görüntüleme cihazında (Amersham Imager 600, Roche, İsviçre) fotoğrafları çekilerek yapılmıştır. Membranlardan elde edilen bantların renk yoğunluğu Image J adlı program yardımıyla hesaplanmıştır (219).

3.8 Aortun Histokimyasal İncelenmesi

Aort örneklerinde histokimyasal boyama için izolasyon aşaması sonrasında diğer analizlerden farklı bir örnek hazırlama/saklama protokolü kullanılmıştır. Farelerden dikkatli bir şekilde izole edilen aort damar dokusu %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içinde +4 C°'de fikse edilmiştir. Doku takibi sonrasında her örnekten formalin-fikse, parafine gömülü (FFPE) doku blokları hazırlanmıştır. FFPE dokulardan 4 mikron kalınlığında seri kesitler alınarak hematoksilen eozin boyası ile boyanmıştır. Boyanmış doku preparatları ışık mikroskobu altında incelenmiş ve atherosklerotik plak oluşumu açısından değerlendirilmiştir.

3.9 Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmadan elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Science) 23.0 (220) ve GraphPad Prism 8.2.0 (221) istatistik programları ile değerlendirilmiş ve ortalama (\bar{x}), standart hata (Sx) olarak ifade edilmiştir. Bağımsız dört grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında sayısal verilere uygun olan parametrik olmayan hipotez testi (Kruskal-Wallis testi) kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılmasında ise post-hoc olarak parametrik olmayan (Mann-Whitney U testi) hipotez testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ değeri ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

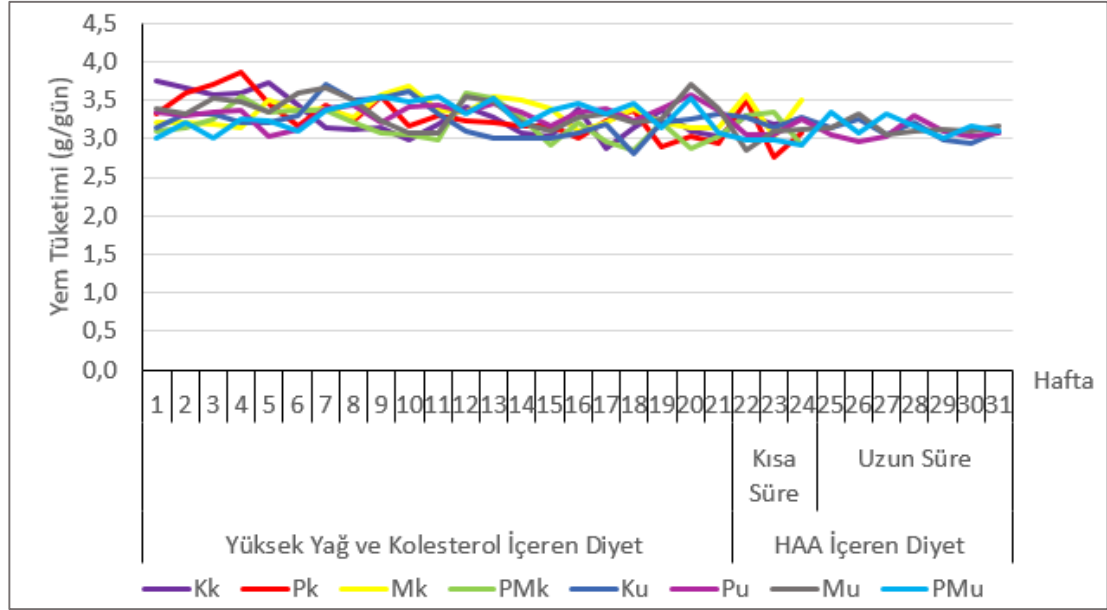
Çalışmada yer alan farelere ait bulgular yem tüketimleri ve vücut ağırlıkları, biyokimyasal bulgular, aterosklerotik plak oluşumuna ilişkin bulgular ve aorta endotel disfonksiyona ilişkin peptidlerin ekspresyonu başlıkları altında alınan heterosiklik amin türü ve alım süresine göre gruplar arasındaki karşılaştırmaları aşağıda verilmiştir.

4.1 Farelerin Yem Tüketimleri ve Vücut Ağırlıklarına İlişkin Bulguları

Farelerin çalışma boyunca bireysel olarak takip edilen yem tüketimi eğilimleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Yem tüketimleri açısından diyet müdahalesinin her dönemi için ayrı ayrı olmak üzere hem farklı heterosiklik amin türlerine göre hem de aynı heterosiklik amin türünde alım süresine göre farklılık durumu incelenmiştir (Tablo 4.1). Farelerin ortalama vücut ağırlıklarına ve yem tüketimlerine göre aldıkları heterosiklik amin miktarı hesaplanmıştır. Buna göre PhIP türü heterosiklik amin alan fareler ortalama olarak 8,0 mg/kg vücut ağırlığı heterosiklik amin alırken MeIQx türü alan fareler 8,3 mg/kg vücut ağırlığı, hem PhIP he MeIQx türü heterosiklik amin alan fareler ise 16,6 mg/kg vücut ağırlığı heterosiklik amin almıştır.

Diyet müdahalesi öncesindeki standardizasyon dönemindeki yem tüketimlerinin hem kısa süreli, hem de uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde benzer olduğu görülmüştür (kısa ve uzun süreli gruplar için sırasıyla $p=0,534$ ve $p=0,055$). Benzer şekilde kısa ve uzun süreli heterosiklik amin alacak grupların yem tüketimleri açısından da gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Sadece yüksek yağlı diyet verilen 21 haftalık müdahale döneminde kısa süre ile heterosiklik amin alacak grupların yem tüketimleri incelendiğinde kontrol grubunun yem tüketimi $3,3\pm 0,06$ g/gün iken PhIP alan grupta $3,3\pm 0,05$ g/gün, MeIQx alan grupta $3,3\pm 0,04$ g/gün ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $3,2\pm 0,06$ g/gün olduğu görülmüştür. Grupların yem tüketimleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,226$).



Şekil 4.1. Farelerin yem tüketimlerinin çalışma süresince değişimleri. K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir.

Uzun süre ile heterosiklik amin alacak grupların yem tüketimleri incelendiğinde kontrol grubunun yem tüketimi $3,2 \pm 0,06$ g/gün iken PhIP alan grupta $3,3 \pm 0,03$ g/gün, MeIQx alan grupta $3,4 \pm 0,04$ g/gün ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $3,3 \pm 0,06$ g/gün olduğu görülmüştür. Grupların yem tüketimi miktarlarının istatistiksel açıdan benzer olduğu bulunmuştur ($p=0,129$).

Müdahale dönemleri arasındaki yem tüketim miktarları incelendiğinde yüksek yağlı diyet heterosiklik amin eklendiğinde farelerin yem tüketimlerinin sayısal olarak azaldığı; ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Yüksek yağlı diyet dönemi ve heterosiklik amin içeren diyet dönemi için genel ortalama sırasıyla; $3,3 \pm 0,42$; $3,1 \pm 0,33$ g/gün'dür.

Yüksek yağ ve kolesterol içeren diyet ek olarak heterosiklik amin verilen diyet dönemindeki yem tüketimleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan grupların benzer miktarda yem tükettiği görülmüştür ($p=0,707$). Bu dönemde kontrol grubunun yem tüketimi $3,3 \pm 0,06$ g/gün iken PhIP alan grupta $3,3 \pm 0,05$ g/gün, MeIQx

alan grupta $3,3\pm 0,04$ g/gün ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $3,2\pm 0,06$ g/gün yem tüketildiği bulunmuştur. Diyetle uzun süre heterosiklik aminlere maruz kalan gruplardan kontrol grubunun yem tüketimi $3,2\pm 0,06$ g/gün iken PhIP alan grupta $3,3\pm 0,03$ g/gün, MeIQx alan grupta $3,4\pm 0,04$ g/gün ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $3,3\pm 0,06$ g/gün yem tüketildiği bulunmuştur. Bu dönemde de grupların yem tüketimi miktarları istatistiksel olarak birbirine benzerdir ($p=0,798$).

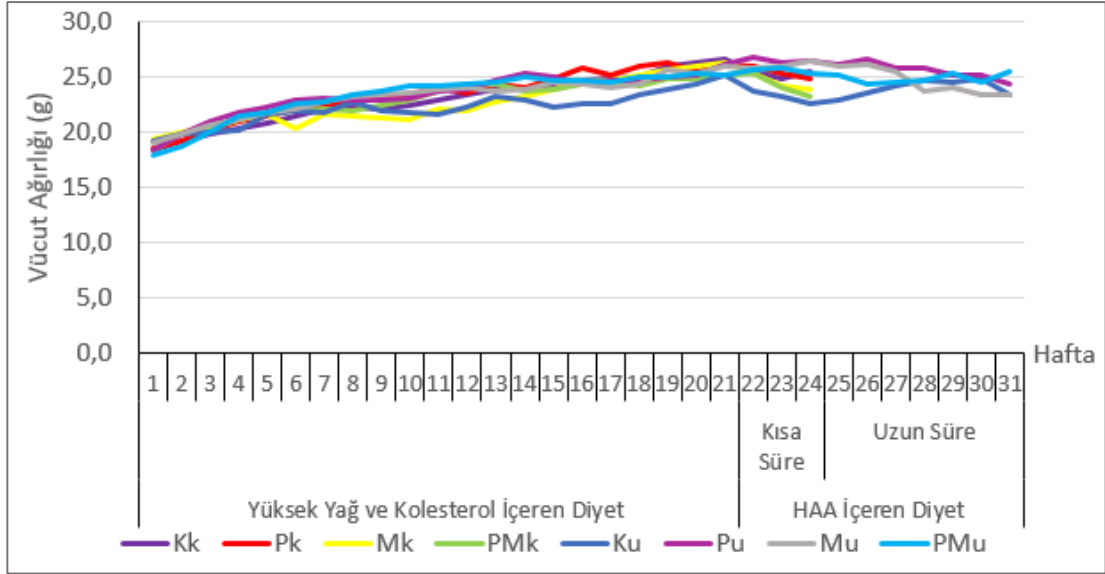
Bu çalışmada ayrıca aynı türde heterosiklik aminlere farklı sürelerde maruz kalan grupların yem tüketimleri de karşılaştırılmıştır. Kısa ve uzun süre kontrol diyeti alan iki grupta yem tüketimlerinin istatistiksel olarak farklı olmadığı bulunmuştur. Kısa süreli grupta yem tüketimi $3,3\pm 0,06$ g/gün; uzun süreli grupta ise $3,2\pm 0,06$ g/gün, $p>0,05$ 'dür. PhIP türü heterosiklik aminin farklı sürelerde alımının yem tüketimine etkileri incelendiğinde kısa süre alan grupta $3,3\pm 0,05$ g/gün iken uzun süreli alan grupta $3,3\pm 0,03$ g/gün yem tüketimi olduğu ve bu miktarların istatistiksel olarak birbirine benzer olduğu görülmüştür ($p>0,05$). Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($3,3\pm 0,04$ g/gün) veya uzun ($3,4\pm 0,04$ g/gün) süre ile alan grupların yem tüketimi karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan gruplardan kısa süreli gruptaki farelerin yem tüketimi $3,2\pm 0,06$ g/gün iken uzun süreli gruptaki farelerin $3,3\pm 0,06$ g/gün yem tükettiği görülmüştür. Bu tüketim miktarları arasında da diğer gruplarda olduğu gibi istatistiksel açıdan fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.1. Farelerin yem tüketiminin çalışma dönemlerine göre ortalaması

Yem tüketimi (g/gün)	HAA Alım Süresi	K $\bar{X} \pm Sx$	P $\bar{X} \pm Sx$	M $\bar{X} \pm Sx$	PM $\bar{X} \pm Sx$	P1 değeri	X ² faktörü
Müdahale öncesi	Kısa (k)	3,7±0,39	3,3±0,23	3,2±0,41	3,1±0,29	0,534	2,190
	Uzun (u)	3,1±0,14	3,3±0,35	3,4±0,20	2,6±0,13	0,055	7,605
	P2 değeri	0,600	0,916	0,753	0,133	--	--
	X ² faktörü	9,500	12,500	10,500	3,500	--	--
Yüksek yağ ve kolesterol içeren diyet	Kısa (k)	3,3±0,06	3,3±0,05	3,3±0,04	3,2±0,06	0,226	4,349
	Uzun (u)	3,2±0,06	3,3±0,03	3,4±0,04	3,3±0,06	0,129	5,673
	P2 değeri	0,624	0,227	0,428	0,122	--	--
	X ² faktörü	200,500	172,000	188,500	158,500	--	--
Yüksek yağ, kolesterol ve HAA içeren diyet	Kısa (k)	3,3±0,06	3,3±0,05	3,3±0,04	3,2±0,06	0,707	1,394
	Uzun (u)	3,2±0,06	3,3±0,03	3,4±0,04	3,3±0,06	0,798	1,013
	P2 değeri	0,311	0,942	0,516	1,000	--	--
	X ² faktörü	9,500	17,000	13,000	17,500	--	--

K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Veriler ortalama \pm standart hata ($\bar{X} \pm Sx$) olarak gösterilmiştir. P1: Gruplar arasındaki karşılaştırmada non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. P2: Kısa ve uzun dönem arasındaki karşılaştırmada non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak verilmiştir.

Farelerin çalışma boyunca bireysel olarak takip edilen ağırlık değişimleri Şekil 4.2.de gösterilmiştir. Ağırlık değişimi açısından diyet müdahalesinin her dönemi için ayrı ayrı olmak üzere hem farklı heterosiklik amin türlerine göre, hem de aynı heterosiklik amin türünde alım süresine göre farklılık durumu incelenmiştir (Tablo 4.2.).



Şekil 4.2. Farelerin vücut ağırlıklarının çalışma süresince değişimi. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir.

Diyet müdahalesi öncesindeki standardizasyon dönemindeki ağırlık değişimlerinin hem kısa süreli, hem de uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde benzer olduğu görülmüştür (kısa ve uzun süre sırasıyla $p=0,927$ ve $p=0,373$). Benzer şekilde kısa ve uzun süreli heterosiklik amin alacak grupların ağırlık değişimleri açısından da gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Sadece yüksek yağlı diyet verilen 21 haftalık müdahale döneminde kısa süre ile heterosiklik amin alacak grupların ağırlık değişimleri incelendiğinde kontrol grubunun ağırlığı $22,7\pm 0,45$ g iken PhIP alan grupta $23,2\pm 0,48$ g, MeIQx alan grupta $22,2\pm 0,45$ g ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $22,9\pm 0,41$ g olduğu

görülmüştür. Grupların yem tüketimleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,490$). Uzun süre ile heterosiklik amin alacak grupların ağırlık değişimleri incelendiğinde kontrol grubunun ortalama ağırlığının $22,7\pm 0,25$ g iken PhIP alan grubun ağırlığının $23,4\pm 0,33$ g, MeIQx alan grubun ağırlığının $23,2\pm 0,40$ g ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grubun ortalama ağırlığının $23,3\pm 0,47$ g olduğu görülmüştür. Grupların yem tüketimi miktarlarının istatistiksel açıdan benzer olduğu bulunmuştur ($p=0,173$).

Yüksek yağ ve kolesterol içeren diyetle ek olarak heterosiklik amin verilen diyet dönemindeki ağırlık değişimleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan grupların benzer ağırlıklara sahip olduğu görülmüştür ($p=0,557$). Bu dönemde kontrol grubunun ağırlığının $24,2\pm 0,74$ g iken PhIP alan grubun ağırlığının $24,9\pm 0,59$ g, MeIQx alan grubun ortalama ağırlığının $23,5\pm 0,42$ g ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grubun ağırlığının $23,8\pm 0,86$ g olduğu bulunmuştur. Diyetle uzun süre heterosiklik aminlere maruz kalan gruplardan kontrol grubunun ortalama ağırlığının $24,0\pm 0,30$ g iken PhIP alan grubun ağırlığının $24,8\pm 0,38$ g, MeIQx alan grubun ağırlığının $24,6\pm 0,32$ g ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grubun ortalama ağırlığının $24,6\pm 0,24$ g olduğu bulunmuştur. Bu dönemde de grupların yem tüketimi miktarları istatistiksel olarak birbirine benzerdir ($p=0,360$).

Bu çalışmada ayrıca aynı türde heterosiklik aminlere farklı sürelerde maruz kalan grupların ağırlık değişimleri de karşılaştırılmıştır. Kısa ve uzun süre kontrol diyeti alan iki grupta ağırlık değişimlerinin istatistiksel olarak farklı olmadığı bulunmuştur (Kısa süreli grupta $24,2\pm 0,74$ g; uzun süreli grupta $24,0\pm 0,30$ g, $p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin farklı sürelerde alımının ağırlık değişimlerine etkileri incelendiğinde kısa süre alan grupta $24,9\pm 0,59$ g iken uzun süreli alan grubun ortalama ağırlığının $24,8\pm 0,38$ g olduğu ve bu miktarların istatistiksel olarak birbirine benzer olduğu görülmüştür ($p>0,05$). Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($23,5\pm 0,42$ g) veya uzun ($24,6\pm 0,32$ g) süre ile alan grupların ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan gruplardan kısa süreli gruptaki

farelerin ortalama ağırlığı $23,8 \pm 0,86$ g iken uzun süreli gruptaki farelerin ağırlığının $24,6 \pm 0,24$ g olduğu görülmüştür. Bu tüketim miktarları arasında da diğer gruplarda olduğu gibi istatistiksel açıdan fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$).

Tablo 4.2. Farelerin vücut ağırlıklarının çalışma dönemlerine göre ortalaması

Vücut Ağırlığı (g)	HAA Alım Süresi	K	P	M	PM	P1 değeri	X ² faktörü
		$\bar{X} \pm Sx$	$\bar{X} \pm Sx$	$\bar{X} \pm Sx$	$\bar{X} \pm Sx$		
Müdahale öncesi	Kısa (k)	18,3±0,59	18,5±0,78	17,0±2,32	18,3±1,49	0,927	0,462
	Uzun (u)	14,9±4,35	18,5±1,91	19,1±1,07	21,0±0,84	0,373	3,122
	P2 değeri	0,857	1,000	0,905	0,359	--	--
	X ² faktörü	4,000	12,000	9,000	4,000	--	--
Yüksek yağ ve kolesterol içeren diyet	Kısa (k)	22,7±0,45	23,2±0,48	22,2±0,45	22,9±0,41	0,490	2,417
	Uzun (u)	22,7±0,25	23,4±0,33	23,2±0,40	23,3±0,47	0,173	4,988
	P2 değeri	0,681	0,940	0,174	0,268	--	--
	X ² faktörü	164,000	217,000	166,000	176,000	--	--
Yüksek yağ, kolesterol ve HAA içeren diyet	Kısa (k)	24,2±0,74	24,9±0,59	23,5±0,42	23,8±0,86	0,557	2,077
	Uzun (u)	24,0±0,30	24,8±0,38	24,6±0,32	24,6±0,24	0,360	3,211
	P2 değeri	1,000	0,938	0,279	0,533	--	--
	X ² faktörü	16,000	16,500	10,000	12,000	--	--

K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MelQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MelQx içeren diyet. Veriler ortalama \pm standart hata ($\bar{X} \pm Sx$) olarak gösterilmiştir. P1: Gruplar arasındaki karşılaştırmada non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. P2: Kısa ve uzun dönem arasındaki karşılaştırmada non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4.2 Biyokimyasal Bulgular

Farelerin plazma ve karaciğer örneklerindeki lipid profili parametreleri ve endotel fonksiyon belirteçlerinin düzeyi saptanmıştır. Ayrıca lipid profili parametrelerinden hesaplanan çeşitli aterojenik risk parametreleri ve indeksleri de verilmiştir.

4.2.1 Lipid ve Lipoprotein Profili ile İlişkili Parametreler

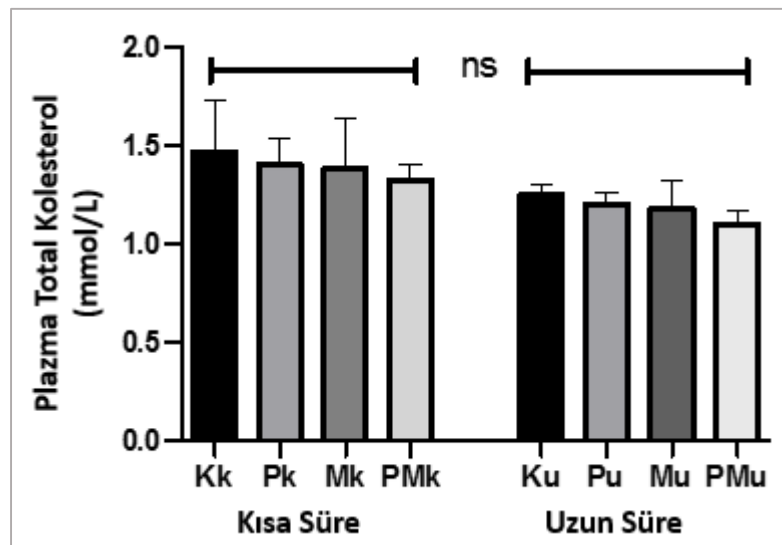
Lipid parametrelerinden total kolesterol, trigliserit, HDL, LDL, VLDL, Apo A1 ve Apo B'nin farelerin plazma ve karaciğer örneklerindeki düzeyleri hem alınan heterosiklik amin türüne hem de heterosiklik amin alım süresine göre karşılaştırılmıştır.

Farelerin plazma total kolesterol düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre fark oluşmadığı görülmüştür ($p=0,066$) (Şekil 4.3.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma total kolesterol düzeyi $1,2\pm 0,00$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $1,4\pm 0,14$ mmol/L, MeIQx alan grubun $1,4\pm 0,26$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $1,3\pm 0,08$ mmol/L olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde plazma total kolesterol düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,074$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma total kolesterol düzeyi $1,3\pm 0,05$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $1,2\pm 0,06$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $1,2\pm 0,14$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $1,1\pm 0,07$ mmol/L olduğu görülmüştür.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $1,2\pm 0,00$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $1,3\pm 0,05$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa

veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $1,4 \pm 0,14$ mmol/L ve $1,2 \pm 0,06$ mmol/L). MelQx türü heterosiklik aminleri kısa ($1,4 \pm 0,26$ mmol/L) veya uzun ($1,2 \pm 0,14$ mmol/L) süre ile almanın plazma total kolesterol düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma total kolesterol düzeyi $1,3 \pm 0,08$ mmol/L iken uzun süreli maruz kalanlarda $1,1 \pm 0,07$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p > 0,05$).

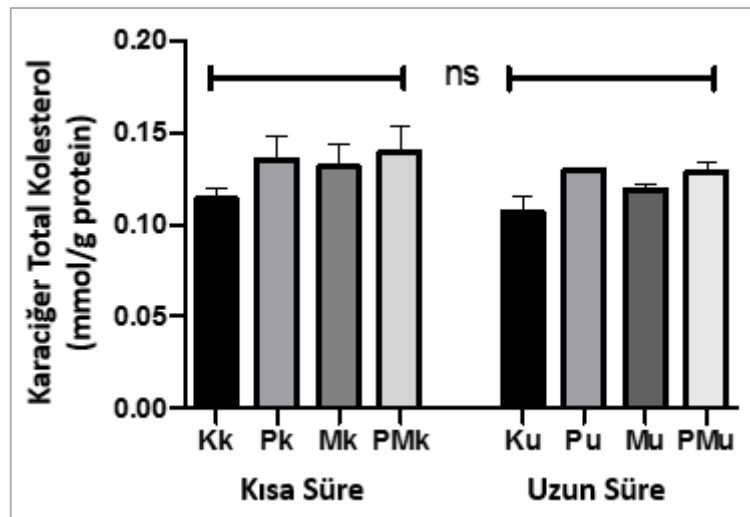


Şekil 4.3. Plazma total kolesterol konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MelQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MelQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. $^{ns}p > 0,05$.

Farelerin karaciğer total kolesterol düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan fareler arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmadığı görülmüştür ($p = 0,631$) (Şekil 4.4.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer total kolesterol düzeyi $0,11 \pm 0,006$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,14 \pm 0,013$ mmol/g

protein, MeIQx alan grubun $0,13\pm 0,012$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer total kolesterol düzeyi ortalaması $0,14\pm 0,013$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur.

Benzer şekilde karaciğer total kolesterol düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,097$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer total kolesterol düzeyi $0,11\pm 0,009$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,13\pm 0,001$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,12\pm 0,003$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer total kolesterol düzeyinin $0,13\pm 0,005$ mmol/g protein olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4. Karaciğer total kolesterol konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması.

K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. $^{ns}p>0,05$.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,11\pm 0,006$ mmol/g protein iken uzun süreli alan

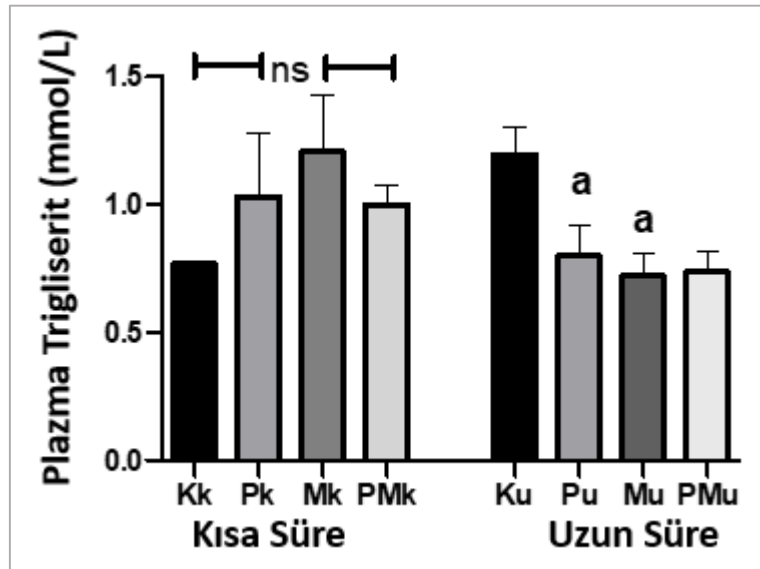
farelerde $0,11\pm 0,009$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,14\pm 0,013$ mmol/ g protein ve $0,13\pm 0,001$ mmol/g protein). Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($0,13\pm 0,012$ mmol/g protein) veya uzun ($0,12\pm 0,003$ mmol/g protein) süre ile almanın karaciğer total kolesterol düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda karaciğer total kolesterol düzeyi $0,14\pm 0,013$ mmol/g protein iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,13\pm 0,005$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

Farelerin plazma trigliserit düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre fark oluşmadığı görülmüştür ($p=0,444$) (Şekil 4.5.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma trigliserit düzeyi $0,8\pm 0,01$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $1,0\pm 0,25$ mmol/L, MeIQx alan grubun $1,2\pm 0,22$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $1,0\pm 0,07$ mmol/L olarak bulunmuştur.

Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde plazma trigliserit düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olduğu bulunmuştur ($p=0,037$). Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde gruplar arasındaki farklılık durumu incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma trigliserit düzeyi $1,2\pm 0,11$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,8\pm 0,12$ mmol/L ($p=0,032$), MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,7\pm 0,09$ mmol/L ($p=0,016$), hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,7\pm 0,08$ mmol/L olduğu görülmüştür.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,8\pm 0,01$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $1,2\pm 0,11$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $1,0\pm 0,25$ mmol/L ve $0,8\pm 0,12$ mmol/L).

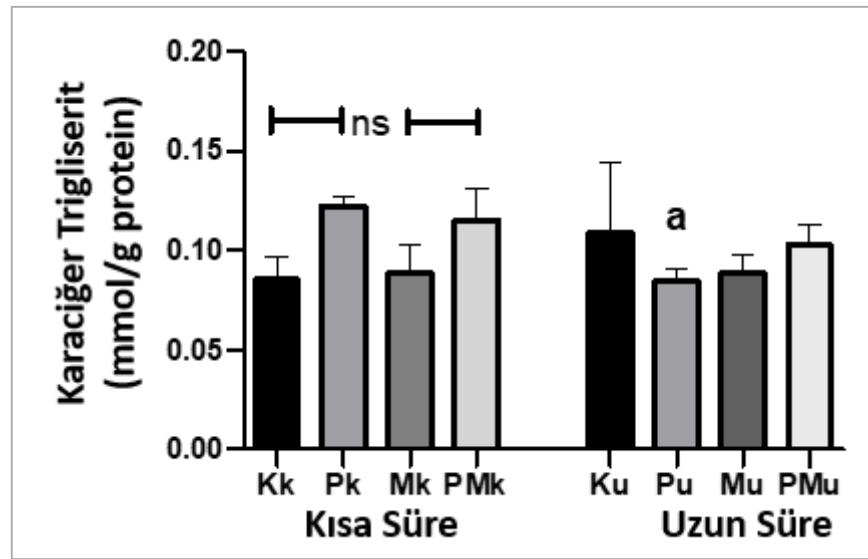
Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($1,2\pm 0,22$ mmol/L) veya uzun ($0,7\pm 0,09$ mmol/L) süre ile almanın plazma trigliserit düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma trigliserit düzeyi $1,0\pm 0,07$ mmol/L iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,7\pm 0,08$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).



Şekil 4.5. Plazma trigliserit konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. **a:** Aynı alım süresindeki kontrol grubuna göre $p<0,05$ (Mann Whitney-U hipotez testi uygulanmıştır.) ^{ns} $p>0,05$.

Farelerin karaciğer trigliserit düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan fareler arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmadığı görülmüştür ($p=0,126$) (Şekil 4.6.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer trigliserit düzeyi $0,09\pm 0,012$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,12\pm 0,005$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,09\pm 0,014$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer trigliserit düzeyi ortalaması $0,12\pm 0,016$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur.

Karaciğer trigliserit düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,691$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer trigliserit düzeyi $0,11\pm0,036$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,08\pm0,006$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,09\pm0,009$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer trigliserit düzeyinin $0,10\pm0,011$ mmol/g protein olduğu görülmüştür.



Şekil 4.6. Karaciğer trigliserit konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. **a:** Aynı heterosiklik amin türünü kısa süre ile alan gruba göre $p<0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır). $^{ns}p>0,05$

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,09\pm0,012$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,11\pm0,036$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa süreli alan farelerin karaciğer trigliserit düzeyleri uzun süre ile alanlara göre anlamlı şekilde yüksektir (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,12\pm0,005$ mmol/ g protein ve $0,08\pm0,006$ mmol/g protein, $p=0,016$). MeIQx türü heterosiklik

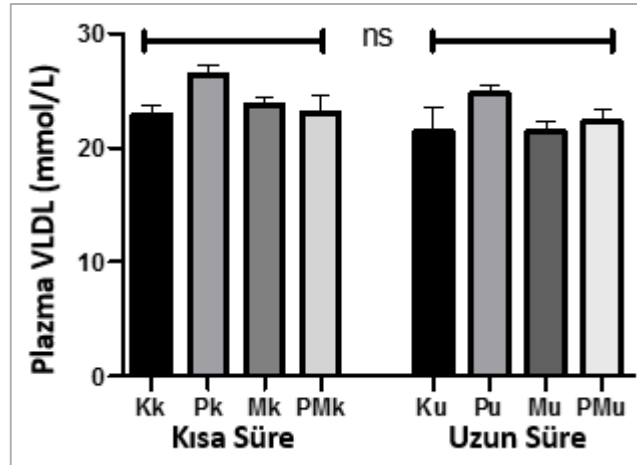
aminleri kısa ($0,09\pm 0,014$ mmol/g protein) veya uzun ($0,09\pm 0,009$ mmol/g protein) süre ile almanın karaciğer trigliserit düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda karaciğer trigliserit düzeyi $0,12\pm 0,016$ mmol/g protein iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,10\pm 0,011$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

Farelerin plazma VLDL düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre fark oluşmadığı görülmüştür ($p=0,080$) (Şekil 4.7.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma VLDL düzeyi $22,9\pm 0,83$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $26,4\pm 0,86$ mmol/L, MeIQx alan grubun $23,8\pm 0,62$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $23,0\pm 1,51$ mmol/L olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde plazma VLDL düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,229$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma VLDL düzeyi $21,4\pm 2,05$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $24,8\pm 0,78$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $21,4\pm 0,99$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $22,2\pm 1,07$ mmol/L olduğu saptanmıştır.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $22,9\pm 0,83$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $21,4\pm 2,05$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $26,4\pm 0,86$ mmol/L ve $24,8\pm 0,78$ mmol/L). Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($23,8\pm 0,62$ mmol/L) veya uzun ($21,4\pm 0,99$ mmol/L) süre ile almanın plazma VLDL düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma VLDL düzeyi $23,0\pm 1,51$ mmol/L iken

uzun süreli maruz kalanlarda $22,2 \pm 1,07$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p > 0,05$).



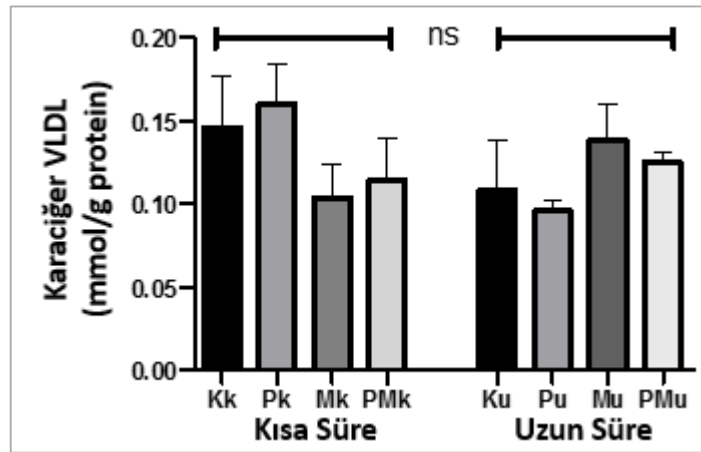
Şekil 4.7. Plazma VLDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. ^{ns} $p > 0,05$.

Farelerin karaciğer VLDL düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan fareler arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmadığı görülmüştür ($p = 0,294$) (Şekil 4.8.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer VLDL düzeyi $0,15 \pm 0,03$ mmol/g protein olarak bulunurken; PhIP alan grubun $0,16 \pm 0,02$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,10 \pm 0,02$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer VLDL düzeyi ortalaması $0,11 \pm 0,03$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur.

Karaciğer VLDL düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür ($p = 0,366$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer VLDL düzeyi $0,11 \pm 0,03$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin

0,10±0,01 mmol/g protein, MelQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin 0,14±0,02 mmol/g protein, hem PhIP hem de MelQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer VLDL düzeyinin 0,13±0,01 mmol/g protein olduğu saptanmıştır.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde 0,15±0,03 mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde 0,11±0,03 mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; 0,16±0,02 mmol/g protein ve 0,10±0,01 mmol/g protein).



Şekil 4.8. Karaciğer VLDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MelQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MelQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. ^{ns} $p>0,05$.

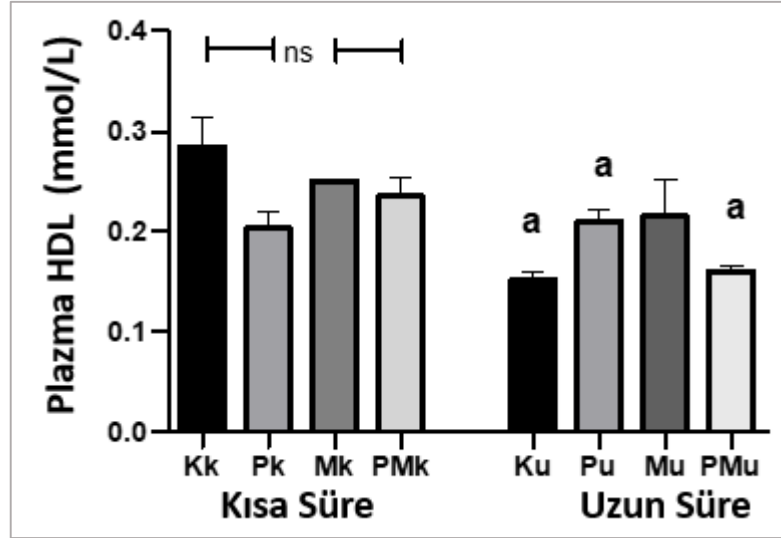
MelQx türü heterosiklik aminleri kısa (0,10±0,02 mmol/g protein) veya uzun (0,14±0,02 mmol/g protein) süre ile alınan karaciğer VLDL düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda karaciğer VLDL düzeyi 0,11±0,03 mmol/g

protein iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,13\pm 0,01$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

Farelerin plazma HDL düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre fark oluşmadığı görülmüştür ($p=0,134$) (Şekil 4.9.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma HDL düzeyi $0,284\pm 0,03$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,204\pm 0,02$ mmol/L, MeIQx alan grubun $0,250\pm 0,00$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $0,236\pm 0,02$ mmol/L olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde plazma HDL düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre farklı olmadığı saptanmıştır ($p=0,280$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma HDL düzeyi $0,152\pm 0,01$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,210\pm 0,01$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,216\pm 0,04$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,160\pm 0,01$ mmol/L olduğu görülmüştür.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde ($0,284\pm 0,03$ mmol/L) uzun süreli alan farelere göre ($0,152\pm 0,01$ mmol/L) anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0,029$). Benzer şekilde PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,204\pm 0,02$ mmol/L ve $0,210\pm 0,01$ mmol/L, $p<0,001$). MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($0,250\pm 0,00$ mmol/L) veya uzun ($0,216\pm 0,04$ mmol/L) süre ile almanın plazma HDL düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik aminini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma HDL düzeyi $0,236\pm 0,02$ mmol/L iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,160\pm 0,01$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,014$).



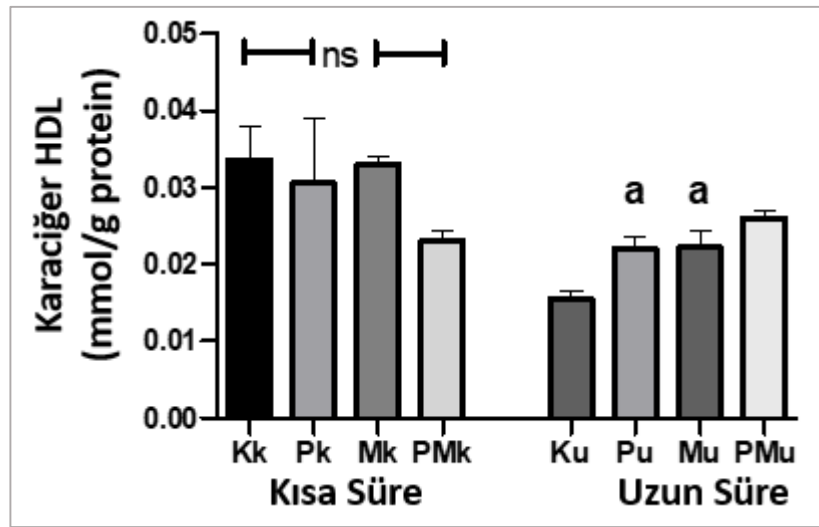
Şekil 4.9. Plazma HDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. **a:** Aynı heterosiklik amin türünü kısa süre ile alan gruba göre $p < 0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır). ^{ns} $p > 0,05$

Farelerin karaciğer HDL düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan fareler arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmadığı görülmüştür ($p=0,226$) (Şekil 4.10.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer HDL düzeyi $0,034 \pm 0,005$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,030 \pm 0,009$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,033 \pm 0,001$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer HDL düzeyi ortalaması $0,023 \pm 0,001$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur.

Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde karaciğer HDL düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür ($p=0,025$). Gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer HDL düzeyi $0,016 \pm 0,001$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,022 \pm 0,002$ mmol/g protein ($p=0,027$), MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,022 \pm 0,002$ mmol/g protein ($p=0,016$), hem

PHIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer HDL düzeyinin $0,026\pm 0,001$ mmol/g protein olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,033\pm 0,005$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,015\pm 0,001$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,030\pm 0,009$ mmol/g protein ve $0,022\pm 0,002$ mmol/g protein).



Şekil 4.10. Karaciğer HDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. **a:** Aynı heterosiklik amin türünü kısa süre ile alan gruba göre $p<0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır). ^{ns} $p>0,05$

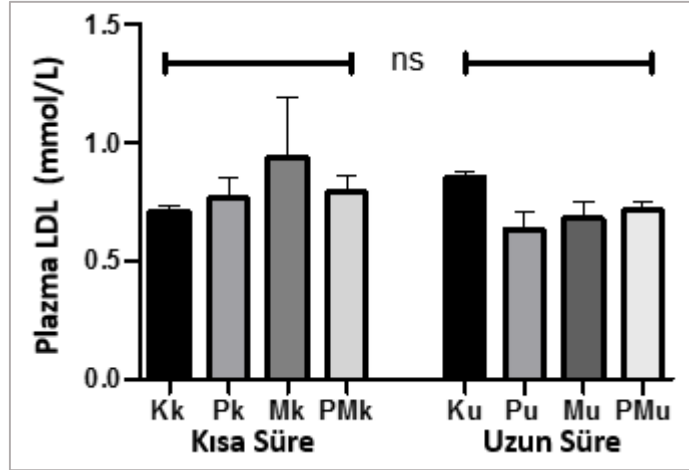
Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($0,033\pm 0,001$ mmol/g protein) veya uzun ($0,022\pm 0,002$ mmol/g protein) süre ile alınan karaciğer HDL düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda karaciğer HDL düzeyi $0,023\pm 0,001$ mmol/g protein iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,026\pm 0,001$

mmol/g protein olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

Farelerin plazma LDL düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre fark oluşmadığı görülmüştür ($p=0,951$) (Şekil 4.11.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma LDL düzeyi $0,7\pm0,02$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,8\pm0,08$ mmol/L, MeIQx alan grubun $0,9\pm0,25$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $0,8\pm0,07$ mmol/L olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde plazma LDL düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,070$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma LDL düzeyi $0,9\pm0,02$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,6\pm0,08$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,7\pm0,07$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,7\pm0,03$ mmol/L olduğu saptanmıştır.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,7\pm0,02$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $0,9\pm0,02$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,8\pm0,08$ mmol/L ve $0,6\pm0,08$ mmol/L). Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($0,9\pm0,25$ mmol/L) veya uzun ($0,7\pm0,07$ mmol/L) süre ile almanın plazma LDL düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma LDL düzeyi $0,8\pm0,07$ mmol/L iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,7\pm0,03$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

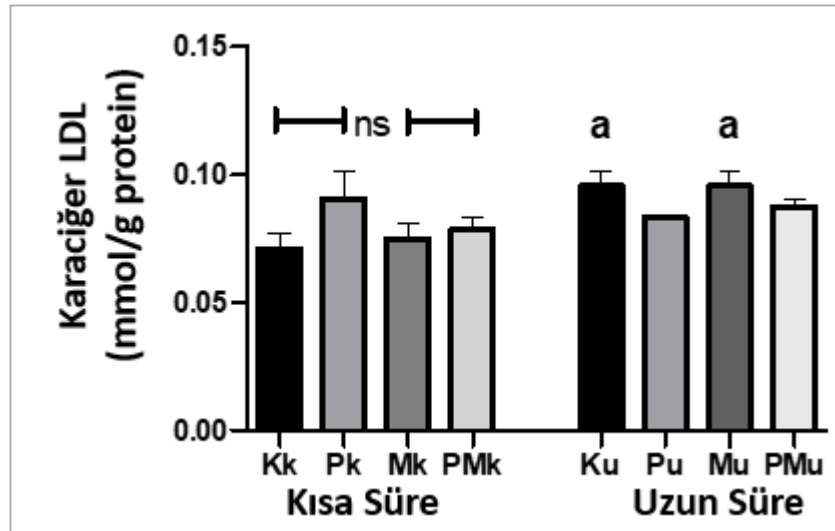


Şekil 4.11. Plazma LDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. ^{ns} $p > 0,05$.

Farelerin karaciğer LDL düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan fareler arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmadığı görülmüştür ($p=0,341$) (Şekil 4.12.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer LDL düzeyi $0,07 \pm 0,006$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,09 \pm 0,010$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,08 \pm 0,006$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer LDL düzeyi ortalaması $0,08 \pm 0,004$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur.

Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde karaciğer LDL düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p=0,100$). Gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer LDL düzeyi $0,10 \pm 0,006$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,08 \pm 0,001$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,10 \pm 0,006$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer LDL düzeyinin $0,09 \pm 0,003$ mmol/g protein olduğu saptanmıştır.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,07 \pm 0,006$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,10 \pm 0,006$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p < 0,001$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,09 \pm 0,010$ mmol/g protein ve $0,08 \pm 0,001$ mmol/g protein). MeIQx türü heterosiklik aminlerin kısa ($0,08 \pm 0,006$ mmol/g protein) süre ile alınmasının uzun ($0,10 \pm 0,006$ mmol/g protein) süre ile alım ile karşılaştırıldığında karaciğer LDL düzeyinin daha düşük olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda karaciğer LDL düzeyi $0,08 \pm 0,004$ mmol/g protein iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,09 \pm 0,003$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p > 0,05$).

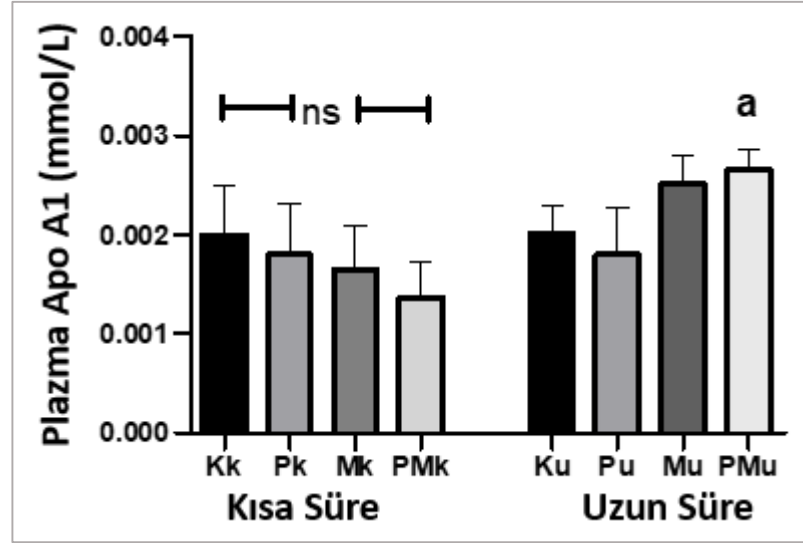


Şekil 4.12. Karaciğer LDL konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. **a:** Aynı heterosiklik amin türünü kısa süre ile alan gruba göre $p < 0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır). ^{ns} $p > 0,05$

Farelerin plazma Apo A1 düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre fark oluşmadığı görülmüştür ($p=0,415$) (Şekil 4.13.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma Apo A1 düzeyi $0,0020\pm 0,00$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,0018\pm 0,00$ mmol/L, MeIQx alan grubun $0,0016\pm 0,00$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $0,0014\pm 0,00$ mmol/L olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde plazma Apo A1 düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,303$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma Apo A1 düzeyi $0,0020\pm 0,00$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,0018\pm 0,00$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,0025\pm 0,00$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,0027\pm 0,00$ mmol/L olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,0020\pm 0,00$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $0,0020\pm 0,00$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,0018\pm 0,00$ mmol/L ve $0,0018\pm 0,00$ mmol/L). Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($0,0016\pm 0,00$ mmol/L) veya uzun ($0,0025\pm 0,00$ mmol/L) süre ile alınan plazma Apo A1 düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik aminini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma Apo A1 düzeyi $0,0014\pm 0,00$ mmol/L iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,0027\pm 0,00$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,015$).



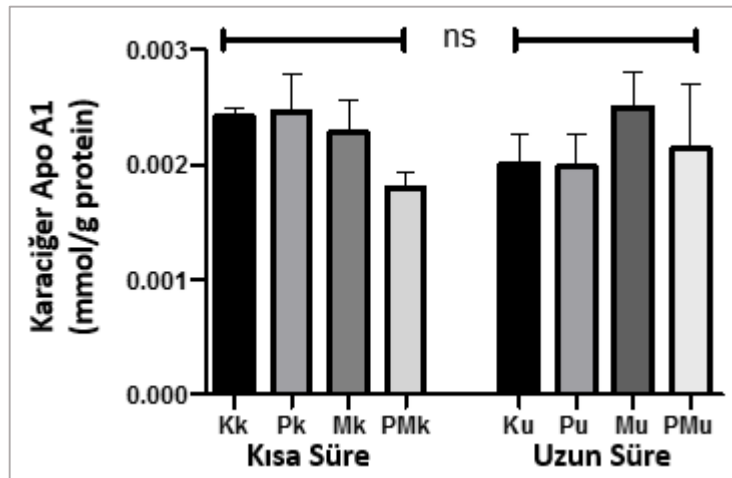
Şekil 4.13. Plazma Apo A1 konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. **a:** Aynı heterosiklik amin türünü kısa süre ile alan gruba göre $p < 0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır)

Farelerin karaciğer Apo A1 düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan fareler arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmadığı görülmüştür ($p=0,179$) (Şekil 4.14.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer Apo A1 düzeyi $0,0024 \pm 0,0$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,0025 \pm 0,00$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,0023 \pm 0,00$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer Apo A1 düzeyi ortalaması $0,0018 \pm 0,00$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur.

Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde karaciğer Apo A1 düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p=0,518$). Gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer Apo A1 düzeyi $0,0020 \pm 0,00$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,0020 \pm 0,00$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,0025 \pm 0,00$ mmol/g protein, hem PhIP hem

de MelQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer Apo A1 düzeyinin $0,0021\pm 0,00$ mmol/g protein olduğu görülmüştür.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,0024\pm 0,00$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,0020\pm 0,00$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,0025\pm 0,00$ mmol/g protein ve $0,0020\pm 0,00$ mmol/g protein). Benzer şekilde MelQx türü heterosiklik aminleri kısa ($0,0023\pm 0,00$ mmol/g protein) veya uzun ($0,0025\pm 0,00$ mmol/g protein) süre ile almanın karaciğer Apo A1 düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda karaciğer Apo A1 düzeyi $0,0018\pm 0,00$ mmol/g protein iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,0021\pm 0,00$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

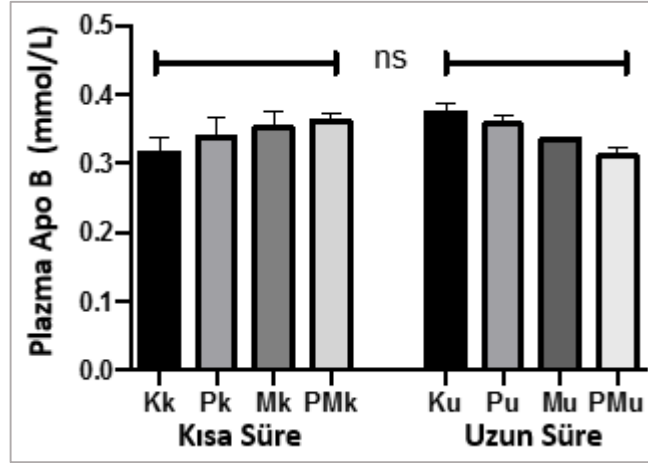


Şekil 4.14. Karaciğer Apo A1 konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MelQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MelQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. ^{ns} $p>0,05$.

Farelerin plazma Apo B düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre fark oluşmadığı görülmüştür ($p=0,440$) (Şekil 4.15.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma Apo B düzeyi $0,3\pm 0,02$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,3\pm 0,03$ mmol/L, MeIQx alan grubun $0,4\pm 0,02$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $0,4\pm 0,01$ mmol/L olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde plazma Apo B düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,076$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma Apo B düzeyi $0,4\pm 0,02$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,4\pm 0,01$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,3\pm 0,00$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,3\pm 0,01$ mmol/L olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,3\pm 0,02$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $0,4\pm 0,02$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,3\pm 0,03$ mmol/L ve $0,4\pm 0,01$ mmol/L). Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($0,4\pm 0,02$ mmol/L) veya uzun ($0,3\pm 0,00$ mmol/L) süre ile alınan plazma Apo B düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma Apo B düzeyi $0,4\pm 0,01$ mmol/L iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,3\pm 0,01$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

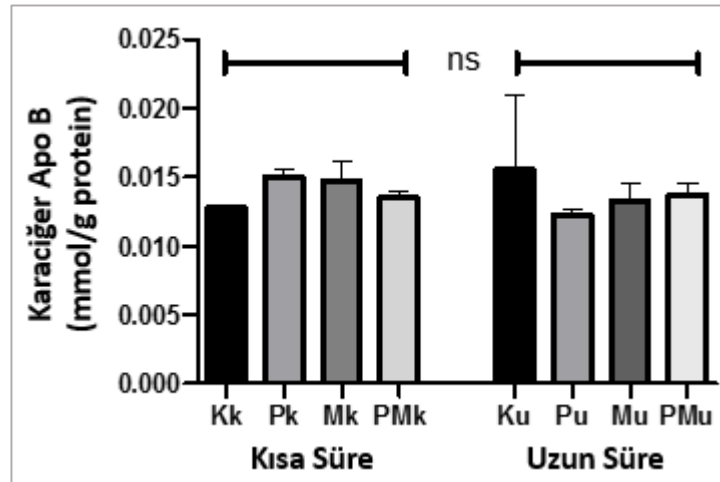


Şekil 4.15. Plazma Apo B konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. $^{ns}p > 0,05$.

Farelerin karaciğer Apo B düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan fareler arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmadığı görülmüştür ($p=0,191$) (Şekil 4.16.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer Apo B düzeyi $0,01 \pm 0,000$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,02 \pm 0,001$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer Apo B düzeyi ortalaması $0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur.

Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde karaciğer Apo B düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p=0,823$). Gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer Apo B düzeyi $0,02 \pm 0,006$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,01 \pm 0,000$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer Apo B düzeyinin $0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein olduğu görülmüştür.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,01 \pm 0,000$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,02 \pm 0,006$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,02 \pm 0,001$ mmol/g protein ve $0,01 \pm 0,000$ mmol/g protein). Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein) veya uzun ($0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein) süre ile almanın karaciğer Apo B düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda karaciğer Apo B düzeyi $0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p > 0,05$).



Şekil 4.16. Karaciğer Apo B konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. ^{ns} $p > 0,05$.

Farelerin plazma (Tablo 4.3.) ve karaciğerdeki (Tablo 4.4.) biyokimyasal parametrelerinin ortalama değerleri ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Plazma örneklerindeki lipid ve lipoprotein profili parametrelerinin gruplara göre ortalama düzeyleri

Parametre (Plazma)	HAA Alım	K	P	M	PM	P1 değeri	χ ² faktörü
	Süresi	$\bar{X} \pm Sx$	$\bar{X} \pm Sx$	$\bar{X} \pm Sx$	$\bar{X} \pm Sx$		
Total Kolesterol (mmol/L)	Kısa (k)	1,2±0,00	1,4±0,14	1,4±0,26	1,3±0,08	0,066	1,369
	Uzun (u)	1,3±0,05	1,2±0,06	1,2±0,14	1,1±0,07	0,074	1,249
	P2 değeri	1,000	0,451	1,000	0,074	--	--
	X ² faktörü	2,500	4,500	12,000	1,500	--	--
Trigliserit (mmol/L)	Kısa (k)	0,8±0,01	1,0±0,25	1,2±0,22	1,0±0,07	0,444	2,675
	Uzun (u)	1,2±0,11	0,8±0,12^a	0,7±0,09^a	0,7±0,08	0,037*	8,489
	P2 değeri	0,190	0,286	0,095	0,114	--	--
	X ² faktörü	1,000	5,000	4,000	1,000	--	--
VLDL (mmol/L)	Kısa (k)	22,9±0,83	26,4±0,86	23,8±0,62	23,0±1,51	0,080	6,750
	Uzun (u)	21,4±2,05	24,8±0,78	21,4±0,99	22,2±1,07	0,229	4,322
	P2 değeri	0,690	0,310	0,151	0,905	--	--
	X ² faktörü	10,000	7,000	5,000	9,000	--	--
HDL (mmol/L)	Kısa (k)	0,284±0,03	0,204±0,02	0,250±0,00	0,236±0,02	0,134	5,573
	Uzun (u)	0,152±0,01^b	0,210±0,01^b	0,216±0,04	0,160±0,01^b	0,280	3,836
	P2 değeri	0,029*	<0,001*	0,857	0,014*	--	--
	X ² faktörü	0,000	1,000	4,000	4,197	--	--

K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Veriler ortalama ± standart hata ($\bar{X} \pm Sx$) olarak gösterilmiştir. **P1:** Gruplar arasında Kruskal Wallis hipotez testi uygulanmıştır. **P2:** Kısa ve uzun dönem arasında Mann Whitney-U hipotez testi uygulanmıştır. ^a: Aynı heterosiklik amin türünü kısa süre ile alan gruba göre p<0,05 (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır). ^b: Aynı alım süresindeki kontrol grubuna göre p<0,05 (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır).

Tablo 4.3. (Devam) Plazma örneklerindeki lipid ve lipoprotein profili parametrelerinin gruplara göre ortalama düzeyleri

Parametre (Plazma)	HAA Alım Süresi	K $\bar{X} \pm Sx$	P $\bar{X} \pm Sx$	M $\bar{X} \pm Sx$	PM $\bar{X} \pm Sx$	P1 değeri	X ² faktörü
LDL (mmol/L)	Kısa (k)	0,7±0,02	0,8±0,08	0,9±0,25	0,8±0,07	0,951	0,349
	Uzun (u)	0,9±0,02	0,6±0,08	0,7±0,07	0,7±0,03	0,070	7,068
	P2 değeri	0,133	0,533	0,486	0,486	--	--
	X ² faktörü	0,000	2,000	5,000	5,000	--	--
APO A1 (mmol/L)	Kısa (k)	0,0020±0,00	0,0018±0,00	0,0016±0,00	0,0014±0,00	0,415	2,851
	Uzun (u)	0,0020±0,00	0,0018±0,00	0,0025±0,00	0,0027±0,00^a	0,303	3,639
	P2 değeri	0,530	0,917	0,222	0,015*	--	--
	X ² faktörü	9,000	11,500	6,000	0,000	--	--
APO B (mmol/L)	Kısa (k)	0,3±0,02	0,3±0,03	0,4±0,02	0,4±0,01	0,440	2,701
	Uzun (u)	0,4±0,02	0,4±0,01	0,3±0,00	0,3±0,01	0,076	6,864
	P2 değeri	0,139	0,800	1,000	0,071	--	--
	X ² faktörü	0,000	2,000	7,500	1,000	--	--

K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MelQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MelQx içeren diyet. Veriler ortalama \pm standart hata ($\bar{X} \pm Sx$) olarak gösterilmiştir. **P1:** Gruplar arasındaki karşılaştırmada non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. **P2:** Kısa ve uzun dönem arasındaki karşılaştırmada non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. ^a: Aynı heterosiklik amin türünü kısa süre ile alan gruba göre p<0,05 (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır.) *İstatistiksel anlamlılık p<0,05 olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.4. Karaciğer örneklerindeki lipid ve lipoprotein profili parametrelerinin gruplara göre ortalama düzeyleri

Parametre (Karaciğer)	HAA Alım Süresi	K $\bar{X} \pm Sx$	P $\bar{X} \pm Sx$	M $\bar{X} \pm Sx$	PM $\bar{X} \pm Sx$	P1 değeri	X ² faktörü
Total Kolesterol (mmol/g protein)	Kısa (k)	0,11±0,006	0,14±0,013	0,13±0,012	0,14±0,013	0,631	1,729
	Uzun (u)	0,11±0,009^a	0,13±0,001	0,12±0,003	0,13±0,005	0,097	6,327
	P2 değeri	<0,001*	1,000	0,629	0,800	--	--
	X ² faktörü	1,000	6,000	4,000	3,000	--	--
Trigliserit (mmol/g protein)	Kısa (k)	0,09±0,012	0,12±0,005	0,09±0,014	0,12±0,016	0,126	5,728
	Uzun (u)	0,11±0,036	0,08±0,006^a	0,09±0,009	0,10±0,011	0,691	1,462
	P2 değeri	0,800	0,016*	0,786	0,686	--	--
	X ² faktörü	2,000	1,000	6,000	6,000	--	--
VLDL (mmol/g protein)	Kısa (k)	0,15±0,03	0,16±0,02	0,10±0,02	0,11±0,03	0,294	3,717
	Uzun (u)	0,11±0,03	0,10±0,01	0,14±0,02	0,13±0,01	0,366	3,170
	P2 değeri	0,400	0,095	0,249	0,325	--	--
	X ² faktörü	8,000	4,000	6,500	5,500	--	--
HDL (mmol/g protein)	Kısa (k)	0,034±0,005	0,030±0,009	0,033±0,001	0,023±0,001	0,226	4,356
	Uzun (u)	0,015±0,001	0,022±0,002^b	0,022±0,002^b	0,026±0,001	0,025*	9,369
	P2 değeri	0,133	0,434	0,095	0,348	--	--
	X ² faktörü	0,000	2,500	0,000	1,500	--	--

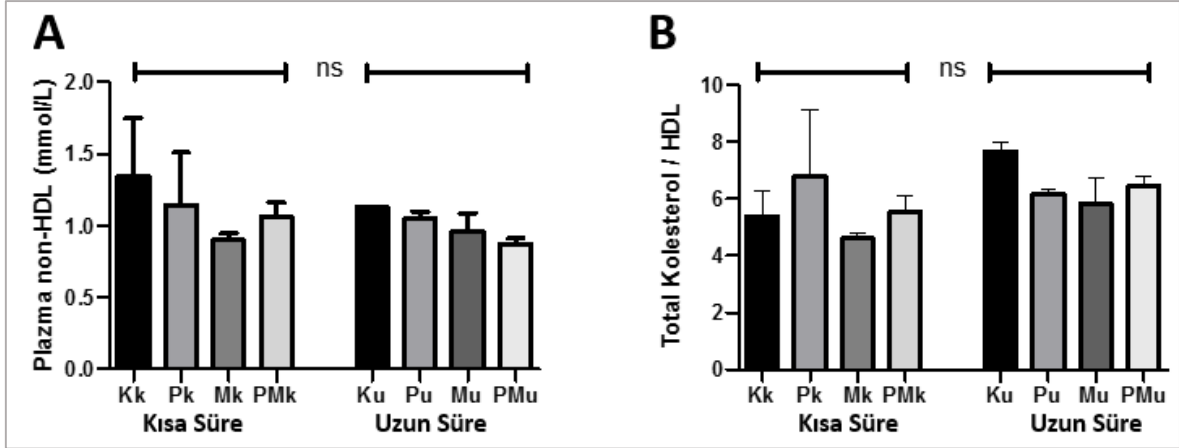
K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Veriler ortalama \pm standart hata ($\bar{X} \pm Sx$) olarak gösterilmiştir. **P1:** Kruskal Wallis hipotez testi uygulanmıştır. **P2:** Kısa ve uzun dönem arasındaki karşılaştırmada non-parametrik Mann Whitney-U hipotez testi uygulanmıştır. ^a: Aynı heterosiklik amin türünü kısa süre ile alan gruba göre $p < 0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır). ^b: Aynı alım süresindeki kontrol grubuna göre $p < 0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır).

Tablo 4.4. (Devam) Karaciğer örneklerindeki lipid ve lipoprotein profili parametrelerinin gruplara göre ortalama düzeyleri

Parametre (Karaciğer)	HAA Alım Süresi	K $\bar{X} \pm Sx$	P $\bar{X} \pm Sx$	M $\bar{X} \pm Sx$	PM $\bar{X} \pm Sx$	P1 değeri	X ² faktörü
LDL (mmol/g protein)	Kısa (k)	0,07±0,006	0,09±0,010	0,08±0,006	0,08±0,004	0,341	3,351
	Uzun (u)	0,10±0,006^a	0,08±0,001	0,10±0,006^a	0,09±0,003	0,100	6,240
	P2 değeri	<0,0001*	1,000	<0,0001*	0,267	--	--
	X ² faktörü	0,000	4,000	0,000	1,000	--	--
APO A1 (mmol/g protein)	Kısa (k)	0,0024±0,00	0,0025±0,00	0,0023±0,00	0,0018±0,00	0,179	4,899
	Uzun (u)	0,0020±0,00	0,0020±0,00	0,0025±0,00	0,0021±0,00	0,518	2,273
	P2 değeri	0,172	0,293	0,690	0,222	--	--
	X ² faktörü	5,500	7,000	10,000	6,000	--	--
APO B (mmol/g protein)	Kısa (k)	0,01±0,000	0,02±0,001	0,01±0,001	0,01±0,001	0,191	4,748
	Uzun (u)	0,02±0,006	0,01±0,000	0,01±0,001	0,01±0,001	0,823	0,910
	P2 değeri	0,806	0,057	0,589	1,000	--	--
	X ² faktörü	4,000	0,000	4,000	2,500	--	--

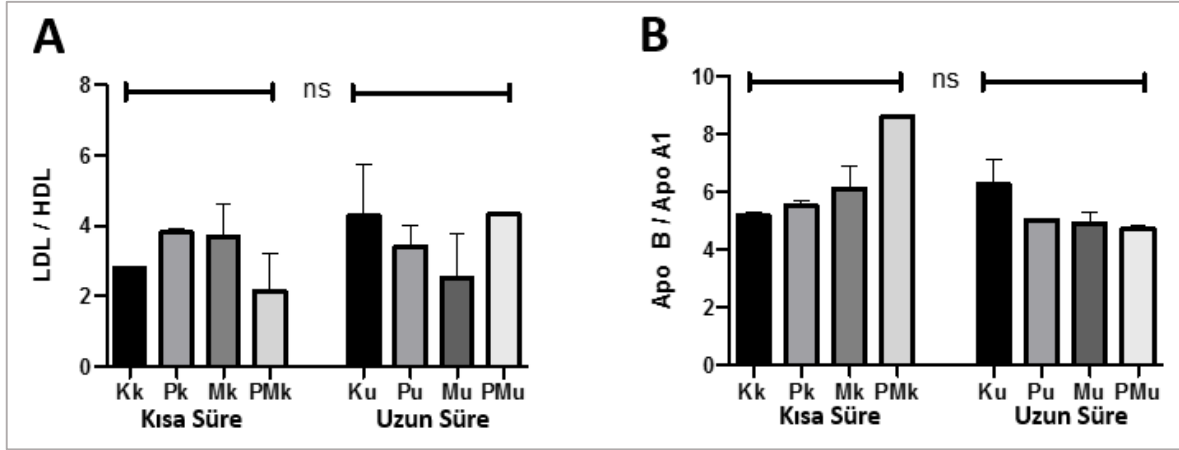
K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Veriler ortalama \pm standart hata ($\bar{X} \pm Sx$) olarak gösterilmiştir. **P1:** Gruplar arasındaki karşılaştırmada non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. **P2:** Kısa ve uzun dönem arasındaki karşılaştırmada non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. *İstatistiksel anlamlılık $p < 0,0001$ olarak kabul edilmiştir. ^a: Aynı heterosiklik amin türünü kısa süre ile alan gruba göre $p < 0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır)

Farelerin plazma kolesterol ve lipoprotein bulgularından hesaplanan çeşitli aterojenik risk belirteçleri oranlarının gruplara göre değişimi Şekil 4.17., 4.18 ve 4.19.'da gösterilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde plazma non-HDL düzeyinin ve total kolesterol-HDL oranının maruz kalınan heterosiklik amin türünden ve alım süresinden etkilenmediği görülmüştür ($p>0,05$).



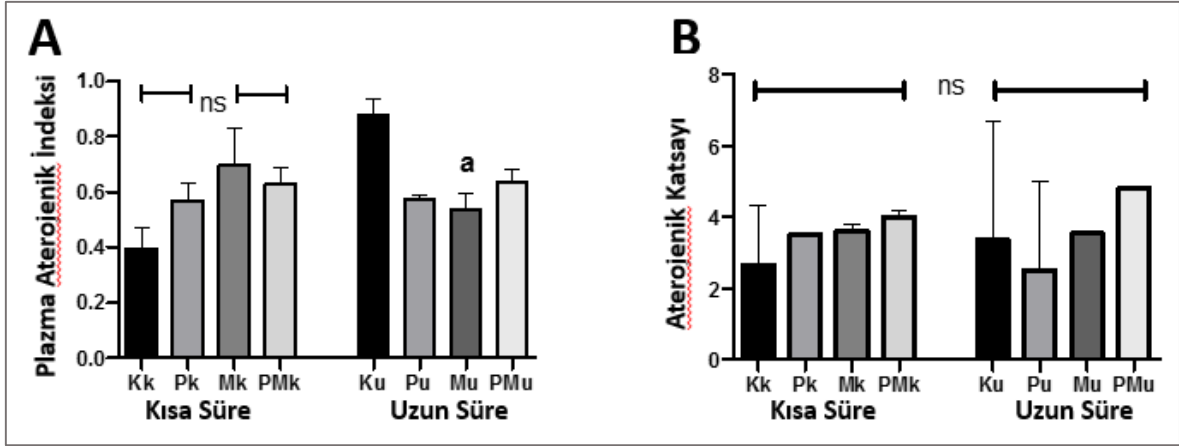
Şekil 4.17. Plazma non-HDL düzeyi ve total kolesterol-HDL oranlarının gruplara göre ortalaması. A: Ortalama plazma non-HDL konsantrasyonu. **B:** Ortalama plazma Total Kolesterol/HDL konsantrasyonu. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. $^{ns}p>0,05$.

LDL- HDL oranı ve Apo B-Apo A1 oranı hem kısa hem de uzun süre heterosiklik amin alan gruplarda kontrol grubuna benzerdir (Şekil 4.18.). Ayrıca aynı tür heterosiklik amin alan farelerde de bu parametrelerin oranlarının farklı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).



Şekil 4.18. Plazma LDL-HDL oranı ve ApoB/Apo A1 oranının gruplara göre ortalaması. A: LDL-HDL oranı **B:** Apo B/Apo A1 oranı. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. ^{ns} $p > 0,05$.

Diyetin aterojenik indeksi kısa süre heterosiklik amin alan gruplarda kontrol grubuna benzerdir (Şekil 4.20). Ancak uzun süre heterosiklik amin alan gruplardan sadece MeIQx türü heterosiklik amin alımının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur ($p=0,020$). Farklı türde heterosiklik amin alan grupların hesaplanan kardiyovasküler risk belirteçleri açısından her grubun ortalama değerleri Tablo 4.5.de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Plazma aterojenik indeksi ve aterojenik katsayının gruplara göre ortalaması.

A: Plazma aterojenik indeksi. **B:** Aterojenik katsayı. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. **a:** Aynı alım süresindeki kontrol grubuna göre $p < 0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır). ^{ns} $p > 0,05$.

Kardiyovasküler hastalık riskini gösteren bazı parametre ve indekslerin gruplara göre ortalama değerleri hem kısa süreli hem de uzun süreli heterosiklik aminlere maruz kalan grupların kontrol grupları ile karşılaştırılması Tablo 4.5. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 4.5. Kardiyovasküler hastalık riskini gösteren bazı parametre ve indekslerin gruplara göre ortalama değerleri

Parametre (Plazma)	HAA Alım Süresi	K	P	M	PM	P değeri	X ² faktörü
Non-HDL	Kısa (k)	1,3±0,41	1,1±0,37	0,9±0,05	1,1±0,10	0,726	1,311
	Uzun (u)	1,1±0,00	1,1±0,05	1,0±0,12	0,9±0,04	0,322	3,493
Total Kolesterol/HDL	Kısa (k)	5,4±0,90	6,8±2,30	4,6±0,20	5,5±0,55	0,647	1,653
	Uzun (u)	7,7±0,32	6,2±0,15	5,8±0,91	6,4±0,38	0,174	4,963
LDL/HDL	Kısa (k)	2,8±0,09	3,8±0,10	3,7±0,90	2,1±1,07	0,407	2,903
	Uzun (u)	4,3±1,45	3,4±0,60	2,5±1,25	4,3±0,03	0,201	4,633
Apo B/Apo A1	Kısa (k)	5,2±0,13	5,5±0,20	6,1±0,80	8,6±0,00	0,217	4,462
	Uzun (u)	6,3±0,85	5,0±0,00	4,9±0,40	4,7±0,10	0,254	4,071
Plazma Aterojenik İndeksi	Kısa (k)	0,4±0,08	0,6±0,06	0,7±0,14	0,6±0,06	0,174	4,977
	Uzun (u)	0,9±0,06	0,6±0,00	0,5±0,06^a	0,6±0,05	0,045*	8,593
Aterojenik Katsayı	Kısa (k)	2,7±1,66	3,5±0,00	3,6±0,20	4,0±0,20	0,608	1,831
	Uzun (u)	3,4±3,35	2,5±2,50	3,5±0,09	4,8±0,00	0,908	0,548

K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Veriler ortalama ± standart hata ($\bar{X} \pm S_x$) olarak gösterilmiştir. **P1:** Gruplar arasındaki karşılaştırmada non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. **P2:** Kısa ve uzun dönem arasındaki karşılaştırmada non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. *İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. ^a: Aynı alım süresindeki kontrol grubuna göre $p < 0,05$ (non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır).

4.2.2 Endotel Disfonksiyon ile İlişkili Parametreler

Farelerde endotel disfonksiyon belirteci olarak plazmada VCAM-1 ve ICAM-1 seviyeleri Tablo 4.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Plazmada endotel disfonksiyon parametrelerinin gruplara göre ortalama değerleri

Parametre (Plazma)	HAA Alım Süresi	K $\bar{X} \pm Sx$	P $\bar{X} \pm Sx$	M $\bar{X} \pm Sx$	PM $\bar{X} \pm Sx$	P1 değeri	χ^2 faktörü
VCAM-1 (mmol/L)	Kısa (k)	13,8±0,42	15,5±0,50	14,9±0,40	15,2±0,11	0,067	7,159
	Uzun (u)	14,0±0,34	13,2±0,26	12,4±0,38	12,3±0,45	0,054	7,630
	P2 değeri	1,000	0,100	0,100	0,057	--	--
	χ^2 faktörü	4,000	0,000	0,000	0,000	--	--
ICAM-1 (mmol/L)	Kısa (k)	20,4±0,35	22,6±0,74	21,4±0,55	22,5±0,09	0,061	7,372
	Uzun (u)	20,8±0,60	18,8±0,32	19,0±0,50	18,0±0,81	0,118	5,878
	P2 değeri	0,700	0,100	0,074	0,200	--	--
	χ^2 faktörü	3,000	0,000	0,500	0,000	--	--

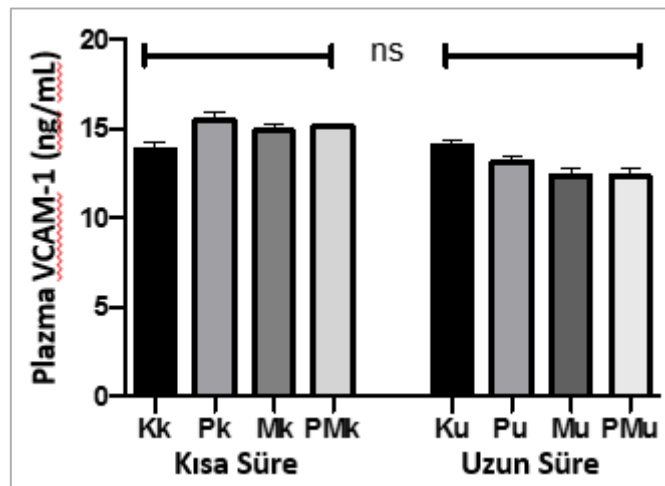
K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MelQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MelQx içeren diyet. Veriler ortalama \pm standart hata ($\bar{X} \pm Sx$) olarak gösterilmiştir. **P1:** Gruplar arasındaki karşılaştırmada non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. **P2:** Kısa ve uzun dönem arasındaki karşılaştırmada non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. *İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Farelerin plazma VCAM-1 düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre fark oluşmadığı görülmüştür ($p=0,067$) (Şekil 4.20.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma VCAM-1 düzeyi $13,8 \pm 0,42$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $15,5 \pm 0,50$ mmol/L, MelQx alan grubun $14,9 \pm 0,40$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MelQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $15,2 \pm 0,11$ mmol/L olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde plazma VCAM-1 düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,054$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma VCAM-1 düzeyi $14,0 \pm 0,34$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $13,2 \pm 0,26$ mmol/L, MelQx türü

heterosiklik amine maruz kalan farelerin $12,4 \pm 0,38$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $12,3 \pm 0,45$ mmol/L olduğu saptanmıştır.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $13,8 \pm 0,42$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $14,0 \pm 0,34$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $15,5 \pm 0,50$ mmol/L ve $13,2 \pm 0,26$ mmol/L). Benzer şekilde MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($14,9 \pm 0,40$ mmol/L) veya uzun ($12,4 \pm 0,38$ mmol/L) süre ile almanın plazma VCAM-1 düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Her iki tür heterosiklik aminini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma VCAM-1 düzeyi $15,2 \pm 0,11$ mmol/L iken uzun süreli maruz kalanlarda $12,3 \pm 0,45$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p > 0,05$).



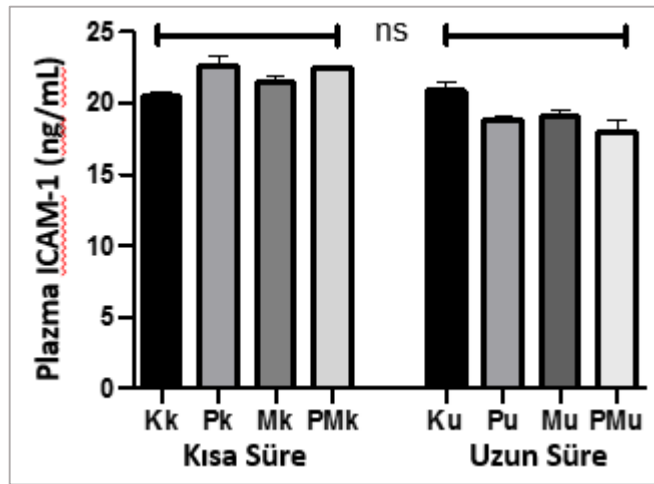
Şekil 4.20. Plazma VCAM-1 konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. $^{ns}p > 0,05$.

Farelerin plazma ICAM-1 düzeyleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre fark oluşmadığı görülmüştür ($p = 0,061$) (Şekil 4.21.). Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma ICAM-

1 düzeyi $20,4 \pm 0,35$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $22,6 \pm 0,74$ mmol/L, MeIQx alan grubun $21,4 \pm 0,55$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $22,5 \pm 0,09$ mmol/L olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde plazma ICAM-1 düzeylerinin uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde de kontrol grubuna göre farklı olmadığı tespit edilmiştir ($p=0,118$). Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma ICAM-1 düzeyi $20,8 \pm 0,60$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $18,8 \pm 0,32$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $19,0 \pm 0,50$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $18,0 \pm 0,81$ mmol/L olduğu görülmüştür.

Ayrıca bu heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $20,4 \pm 0,35$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $20,8 \pm 0,60$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $22,6 \pm 0,74$ mmol/L ve $18,8 \pm 0,32$ mmol/L).



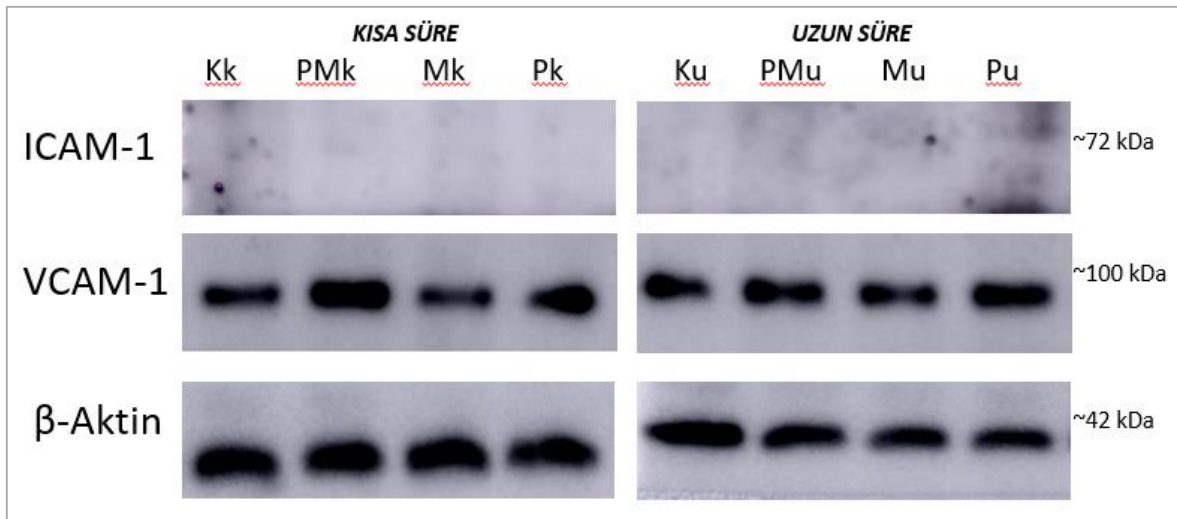
Şekil 4.21. Plazma ICAM-1 konsantrasyonlarının gruplara göre ortalaması. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. Non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. $^{ns}p>0,05$.

MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($21,4 \pm 0,55$ mmol/L) veya uzun ($19,0 \pm 0,50$ mmol/L) süre ile almanın plazma ICAM-1 düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma ICAM-1 düzeyi $22,5 \pm 0,09$ mmol/L iken uzun süreli maruz kalanlarda $18,0 \pm 0,81$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p > 0,05$).

4.3. Aortta Endotel Disfonksiyona İlişkin Peptidlerin Ekspresyonu

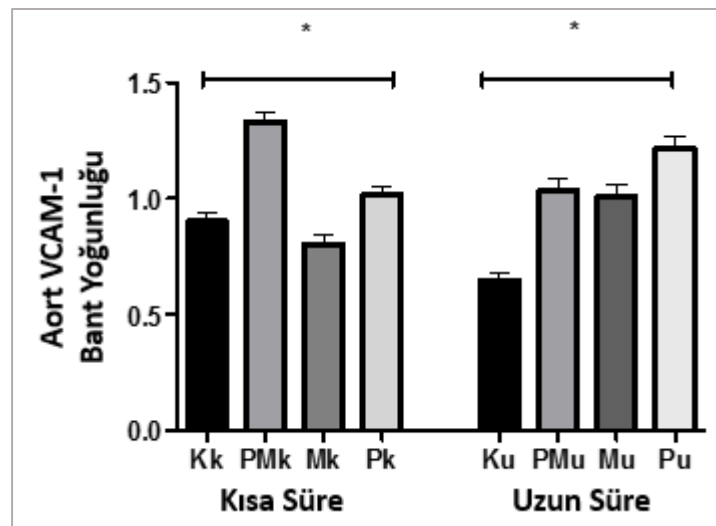
Farelerin diyet alımlarına bağlı olarak endotel disfonksiyona ilişkin peptidlerin Western-Blot analizi sonucunda oluşturulan bant görselleri (Şekil 4.22) ve bant genişliklerinden hesaplanan protein miktarlarının gruplara göre düzeyleri (Şekil 4.23) değerlendirilmiştir.

Yapılan Western Blot analizleri sonucunda farklı sürelerde ve farklı antikorlarla çeşitli denemeler yapılmasına rağmen ICAM-1 için bant oluşumu görüntülenememiştir. VCAM-1 molekülü ve β -aktin için uygun bant görselleri elde edilebilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Aort örneklerinde endotel disfonksiyona ilişkin Western Blot bant görselleri. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir.

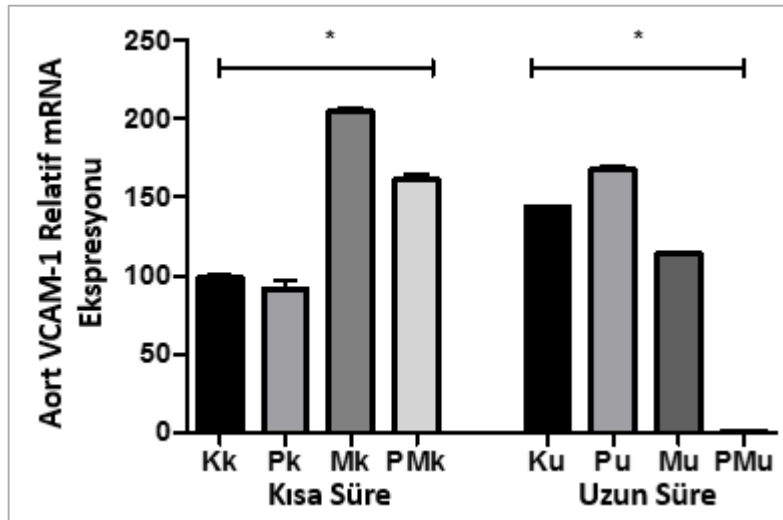
VCAM-1 ve β -aktin için elde edilen bantlardaki renk yoğunluğu ve bant genişliği verilerinden her grup için hesaplanan ortalama protein miktarları Şekil 4.23.'te gösterilmiştir. Kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde protein miktarı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p=0,023$). Ancak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında farklı heterosiklik amin alan gruplardan elde edilen protein miktarı yani bant yoğunluğu istatistiksel olarak farklı değildir ($p>0,05$). Kısa süreli alıma benzer şekilde yapılan Kruskal Wallis analizi sonucunda uzun süreli heterosiklik amin alan fareler için de elde edilen protein miktarlarında gruplar arasında farklılık bulunduğu görülmüştür ($p=0,027$). Uzun süre heterosiklik amin alan gruplarla yapılan ikili karşılaştırmalarda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).



Şekil 4.23. Aortta VCAM-1 için Western Blot bant görsellerinden hesaplanan bant yoğunluklarının gruplara göre değişimi. K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MelQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MelQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. *Non-parametrik, Kruskal Wallis testine göre $p<0,05$.

Aort dokusundaki VCAM-1 ekspresyonu qRT-PCR yöntemiyle analiz edilmiş ve her grubun ekspresyon düzeyi en düşük ekspresyona sahip olan gruba göre relatif olarak hesaplanarak Şekil 4.24.'de gösterilmiştir. Buna göre kısa süreli heterosiklik amin alan gruplarda mRNA ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p=0,022$). Ancak kontrol grubu ($98,7\pm 1,82$) ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda PhIP

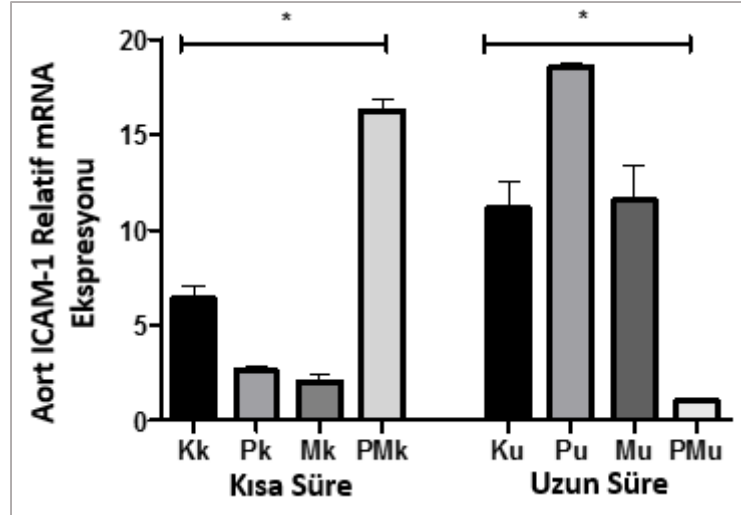
(91,0±5,99). MeIQx (204,6±2,51) grupları ile PhIP ve MeIQx (161,3±3,24) grubu için istatistiksel fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Yapılan Kruskal Wallis testi sonucuna göre kısa süreli alıma benzer şekilde uzun süreli heterosiklik amin alan grupların VCAM-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin de farklı olduğu bulunmuştur ($p=0,015$). Fakat PhIP (167,6±2,73). MeIQx (114,2±1,21), PhIP ve MeIQx (1,0±0,10) gruplarının ekspresyon düzeyi kontrol grubu (143,3±0,88) ile karşılaştırıldığında istatistiksel fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).



Şekil 4.24. Aort dokusunda qRT-PCR relatif VCAM-1 mRNA ekspresyonları. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. *Non-parametrik, Kruskal Wallis testine göre $p<0,05$.

Aort dokusundaki ICAM-1 ekspresyonu qRT-PCR yöntemiyle analiz edilmiş ve her grubun ekspresyon düzeyi en düşük ekspresyona sahip olan gruba (PMu) göre relatif olarak hesaplanarak Şekil 4.25.'te gösterilmiştir. Buna göre kısa süreli heterosiklik amin alan gruplarda mRNA ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p=0,032$). Ancak kontrol grubu (6,4±0,64) ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda PhIP (2,6±0,29). MeIQx (2,0±0,44) grupları ile PhIP ve MeIQx (16,2±0,58) grubu için istatistiksel fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre kısa süreli alıma benzer şekilde uzun süreli heterosiklik amin alan grupların ICAM-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin de farklı olduğu bulunmuştur ($p=0,025$). Fakat PhIP (18,5±0,20). MeIQx

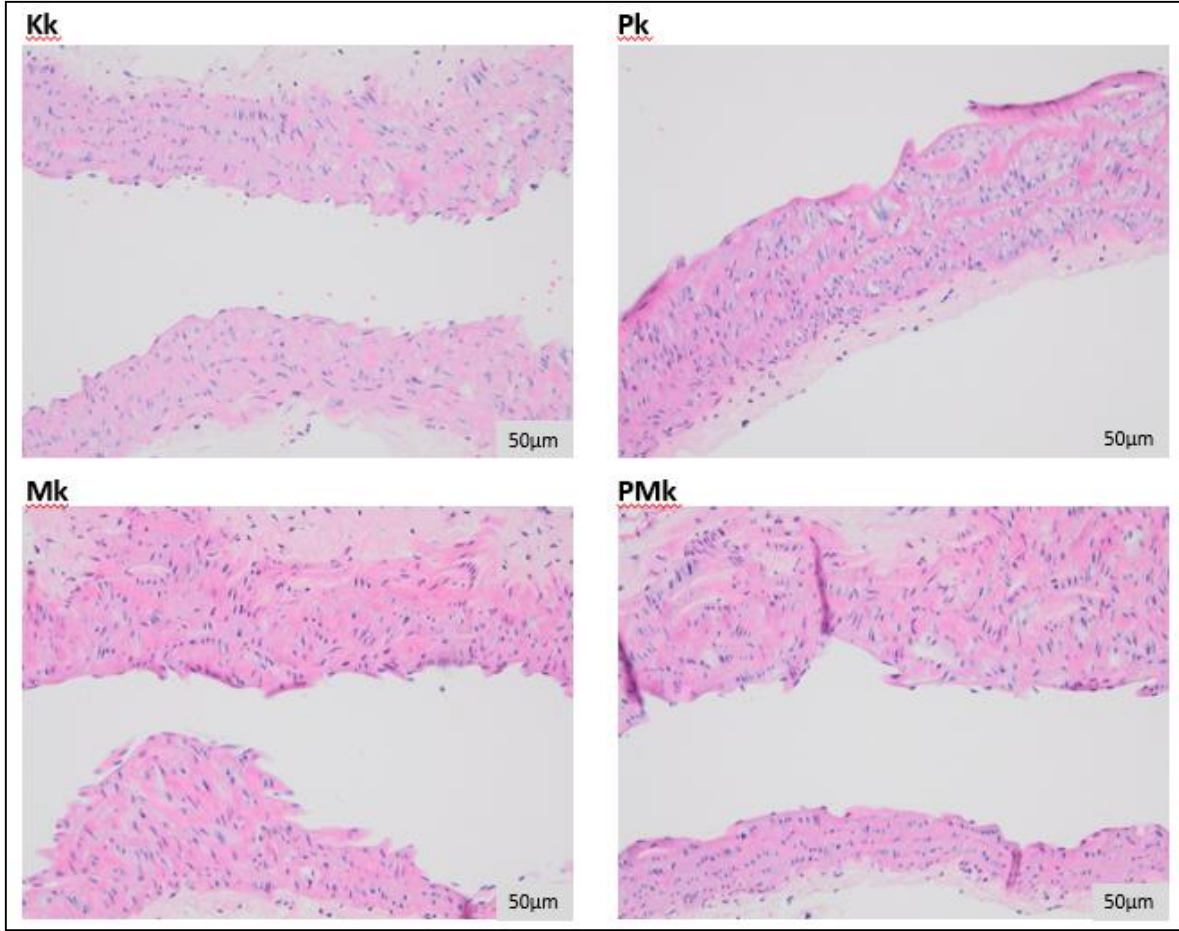
(11,5±1,79), PhIP ve MeIQx (1,0±0,12) gruplarının ekspresyon düzeyi kontrol grubu (11,1±1,43) ile karşılaştırıldığında istatistiksel fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).



Şekil 4.25. Aort dokusunda qRT-PCR sonuçlarının relatif ICAM-1 mRNA ekspresyonları. K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. *Non-parametrik, Kruskal Wallis testine göre $p<0,05$.

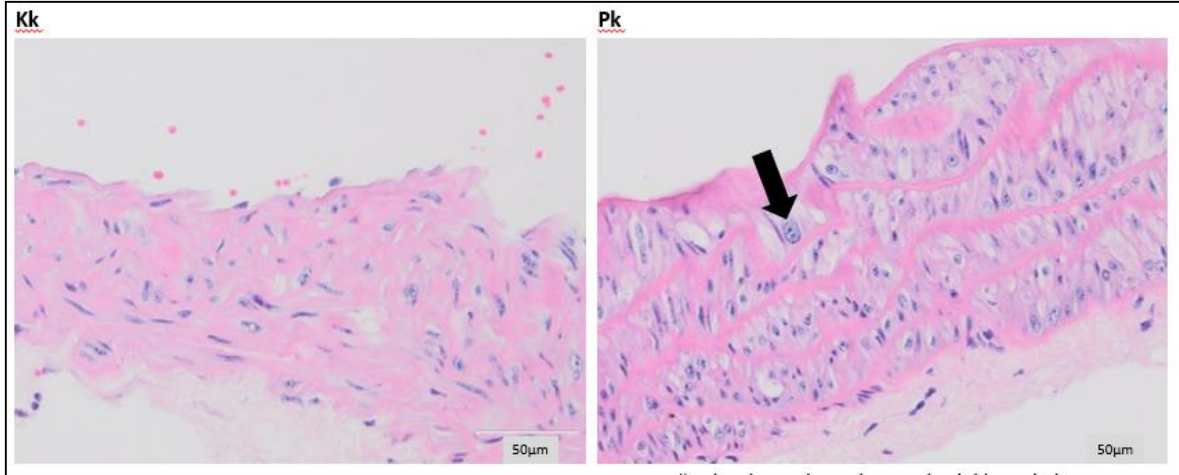
4.4. Aterosklerotik Plak Oluşumuna İlişkin Bulgular

Aort örneklerinde yapılan hematoksilen-eozin boyama sonucunda dokuda aterosklerotik plak oluşumu incelenmiştir. Uzun süreli yüksek yağlı ve kolesterole ek olarak kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde aortta aterosklerotik plak veya aterom oluşmadığı görülmüştür (Şekil 4.26).



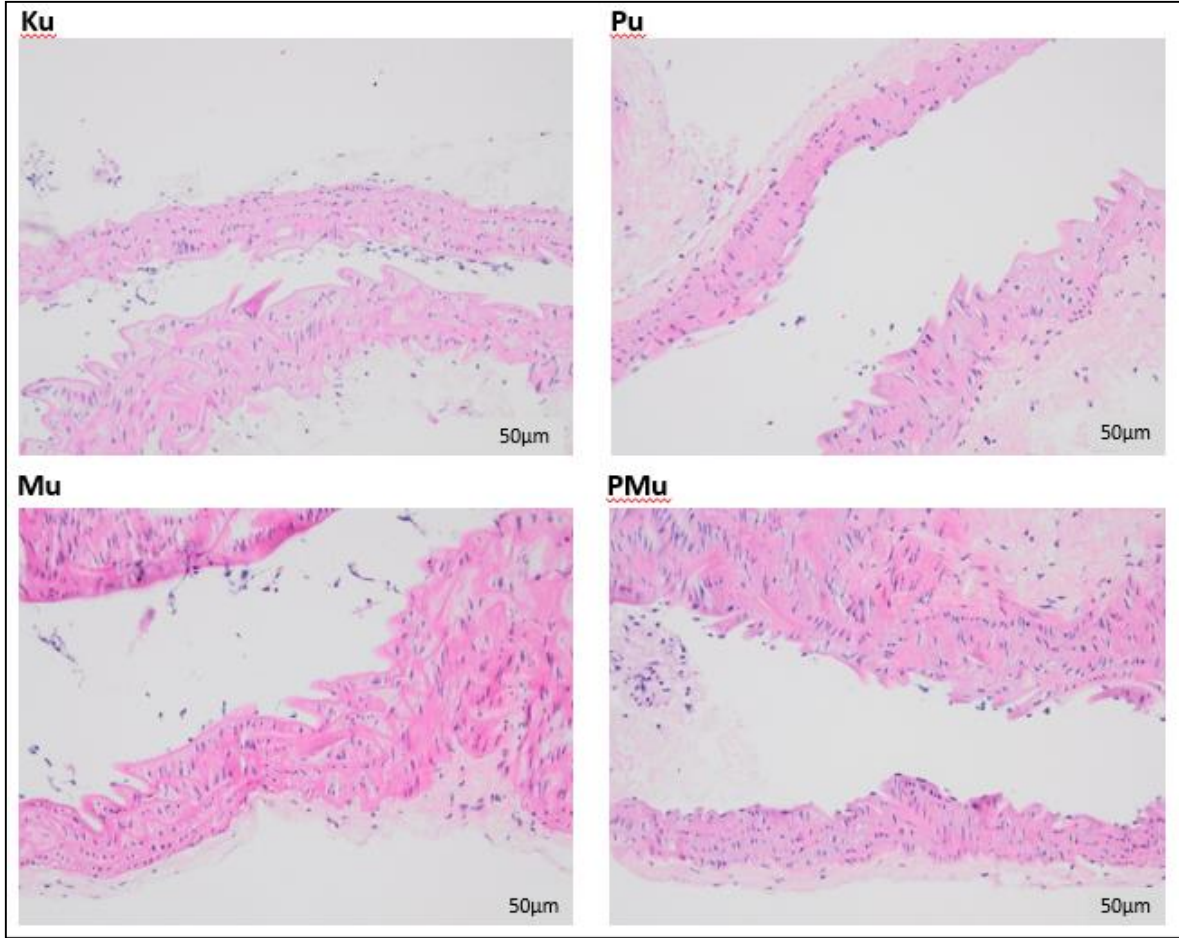
Şekil 4.26. Kısa süreli heterosiklik amin alan farelerin aort örneklerinde aterom oluşum durumları. K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir.

Ancak kısa süre ile PhIP türü heterosiklik amin alan farelerde diğer gruplardan farklı olarak aort duvarındaki bazı düz kas hücrelerinde farklılaşmayı işaret eden birtakım değişiklikler olduğu bulunmuştur (Şekil 4.27). Bu hücresel düzeydeki değişikliklerin hücre çekirdeklerinde büyüme ve nükleollerde belirginleşme şeklinde olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.27. Kısa süre PhIP türü heterosiklik amin alan farelerde gözlenen aortta düz kas hücre yapısındaki değişikliklerin aynı süredeki kontrol grubuyla karşılaştırılması. K: Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MeIQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MeIQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir.

Uzun süreli yüksek yağlı ve kolesterole ek olarak uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde aortta aterosklerotik plak veya aterom oluşmadığı görülmüştür (Şekil 4.28). Kısa süre ile PhIP türü heterosiklik amin alan grupta görülen hücresel farklılaşma durumu uzun süre PhIP türü heterosiklik amin alan fareler de dahil olmak üzere hiçbir grupta görülmemiştir.



Şekil 4.28.Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerin aort örneklerinde aterom oluşum durumları. **K:** Yüksek yağlı, kolesterol içeren diyet; **P:** Yüksek yağlı, kolesterol ve PhIP içeren diyet; **M:** Yüksek yağlı, kolesterol ve MelQx içeren diyet; **PM:** Yüksek yağlı, kolesterol, PhIP ve MelQx içeren diyet. Grup kodlarının yanında yer alan **k:** kısa süre heterosiklik amin, **u:** uzun süre heterosiklik amin maruziyetini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojik temelinde dislipidemi, inflamasyon, endotel disfonksiyon ve ateroskleroz bulunmaktadır (8, 43). Besinlerle maruz kalınan karsinojenik heterosiklik amin türlerinin bu sürece etkileri, metabolik aktivasyon sonucu kardiyovasküler dejenerasyon, genotoksisite ve sitotoksisite oluşturarak kardiyovasküler hastalıkları tetiklemesi olabileceği düşünülmektedir (29). Heterosiklik aminlerin özellikle kalpte yüksek miktarda DNA katımı oluşturduğunun bilinmesine rağmen (202-205) diyetle heterosiklik amin alımının kardiyovasküler sistemin diğer dokularına etkisi ve aterosklerotik mekanizmalara potansiyel katkıları ile ilgili henüz yeteri kadar araştırma bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışma besinlerle en çok maruz kalınan PhIP ve MeIQx türü heterosiklik aminlerin ateroskleroz patogenezi için temel mekanizmalar olan endotel disfonksiyon, dislipidemi ve aterosklerotik plak oluşumu süreçleri üzerine etkilerinin hücresel ve moleküler düzeyde kardiyovasküler hastalık riski açısından saptanması amacıyla yürütülmüştür.

Bu çalışmada farelerden elde edilen bulgular günlük diyetleri ile farklı türde heterosiklik amin alan gruplar için değerlendirilmiştir. Yem tüketimi, günlük enerji ve makro besin ögeleri alımları ile bağlantılı olarak vücut ağırlıkları ve plazma, karaciğer ve aort dokusunda moleküler düzeyde yapılan analizlerin sonuçları değerlendirilmiştir.

5.1. Farelerin Yem Tüketimleri ve Vücut Ağırlıklarına İlişkin Bulguları

Diyetle alınan yağ asitlerinin gastrik boşalmayı yavaşlatarak, iştahı düzenleyen anoreksijenik hormon ve peptidlerden kolesistokinin, peptid YY ve glukagon benzeri protein-1 (GLP-1) salgılanmasını uyararak ve besin alımını arttıran ghrelin hormonunun salınımını inhibe ederek besin alımını azalttığı bilinmektedir (222). Bu çalışmada yüksek yağlı diyet döneminde farelerin maruz kaldığı yüksek yağ (%40, enerji-20g/100g yem) ve kolesterol (0,2 mg/100g yem) içeren yem tüketimleri açısından hem kısa (Bkz. Şekil 4.1.) hem de uzun süre ile heterosiklik aminlere maruz kalan tüm gruplarının kontrol gruplarından farklı olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde yüksek yağ ve kolesterol (>%35, enerji) içeren diyetin farelerde yem tüketimini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak

değiştirmediyi gösteren birkaç çalışma bulunmaktadır (223-226). Bu tez çalışmasında tüm gruplar yüksek yağ ve kolesterol (20g/100g yem) içeren yem tüketmiştir ve bu durumun gruplar arasında fark olmamasına yol açtığı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının sonucunda 26-37 haftalık dişi farelerin günlük yem tüketimlerinin 3,0-3,5 g/gün civarında olduğu bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.1.). Bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak Cong ve ark. yüksek yağlı diyet (>%35, enerji) tüketen farelerin yem tüketiminin 3,0-3,5 g/gün arasında olduğunu (223); Paalvast ve ark. da ortalama yem tüketimlerinin 3,2-3,8 g/gün arasında değiştiğini bildirmiştir (225). Ayrıca başka bir çalışmada daha düşük (2,0-2,5 g/gün) yem tüketimi rapor edilmiştir (224). Bu değerler farelerin ortalama yem tüketimi olarak kabul edilen 5 g/gün düzeyinin altındadır. Bu durumun farelere verilen yemin yüksek yağ içeriğine bağlı olarak enerji içeriğinin yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Böylece fareler günlük enerji gereksinimlerini daha düşük miktarda yem tüketerek karşılayabilmektedir. Ayrıca bir çalışmada diyetle yüksek miktarda yağ alımının (%60, enerji) C57Bl/6 türü farelerde hipotalamusta TNF-alfa, IL-6 ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırarak yem tüketimini kontrol grubuna göre azalttığı bildirilmiştir (227). Özellikle yüksek miktarda yağ içeren yemler kırılmaya ve dağılmaya daha müsait hale gelmektedir. Ayrıca bazı fareler kafesteki yemlerle oynayarak dökülmesine sebep olabilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda yem tüketimi verilerinin hiç verilmemesinin (228-230), verildiği durumlarda da genel eğilimi gösterecek şekilde grafiklerle ifade edilmesinin (223), yukarıda bahsedilen nedenlerle farelerin yem tüketimi ölçümünün kesin bir doğrulukla yapılamaması ve yapılan ölçümlerin güvenilirliğinin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yüksek yağ ve kolesterole ek olarak heterosiklik amin içeren diyet dönemindeki yem tüketimleri karşılaştırıldığında da gruplar arasında fark olmadığı görülmüştür (Bkz. Tablo 4.1.). Benzer şekilde heterosiklik amin alım süresinin de yem tüketimi üzerine etkisi bulunmamaktadır.

Yüksek yağlı diyet alan farelerde yem tüketiminin değişmemesi ya da azalmasına rağmen yemlerin enerji yoğunluğunun daha fazla olması günlük alınan toplam enerji miktarını arttırarak ve vücut ağırlığında artışa neden olabilmektedir (223). Bu çalışmada

yüksek yağlı diyet (20g/100g yem) döneminde vücut ağırlıklarında genel bir artış eğilimi bulunurken heterosiklik amin içeren diyet döneminde vücut ağırlıklarında azalma eğilimi olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.2.). Ancak her iki diyet dönemindeki bu eğilimler istatistiksel bir fark yaratmamaktadır (Bkz. Tablo 4.2.). Vücut ağırlığındaki artış eğiliminin farelerin nispeten genç yaşta (3 hafta) çalışmaya dahil edilmesi nedeniyle ağırlık artışının devam etmesi ve enerji alımının yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kontrol grupları da dahil olmak üzere tüm farelere aynı miktarda yağ ve kolesterol eklenmiş (20g/100 g yem) yem verildiği düşünüldüğünde bu durum beklenen bir sonuçtur. Ayrıca aynı çalışma grubunun aynı tür farelerle daha önce yaptığı bir çalışmada benzer süre boyunca standart laboratuvar yemi alan farelerin verileriyle karşılaştırıldığında tüm grupların vücut ağırlığının arttığı belirlenmiştir (226). Güncel çalışmalar değerlendirildiğinde farklı miktarlarda yüksek yağlı diyet (>%35, enerji) alan farelerde kontrol grubuna göre daha fazla ağırlık artış olduğu görülmektedir (223-225, 228-232). Bir çalışmada yüksek yağlı diyete (%21 w/w, 0,15 w/w kolesterol) ek olarak A α C türü heterosiklik amin alan (2 hf, 12,1 mg/kg) farelerde vücut ağırlığının kontrol grubuna göre düştüğü ve bu etkinin verilen doza paralel olduğu yayınlanmıştır (29). Benzer şekilde yüksek yağlı (23,5 w/w, mısır yağı) diyete ek olarak PhIP türü heterosiklik amin alan (8 doz, 85 mg/kg) sıçanların vücut ağırlığının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı bildirilmiştir (233). Bir çalışmada yüksek miktarda (100 mg/kg) PhIP türü heterosiklik aminlerin yedinci dozdan itibaren sıçanlarda toksik etki yarattığı ve sağ kalan hayvanların vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (234). Bu çalışmada istatistiksel olarak literatüre benzer sonuçların elde edilmemesinin; farelerin heterosiklik amin türlerine çok daha düşük dozlarda (10 mg/kg ve 20 mg/kg) maruz kalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda heterosiklik aminlerin vücutta doza göre toksik etki gösterebileceği yayınlanmıştır (11, 157, 199). Normal şartlarda diğer ksenobiyotikler gibi heterosiklik aminlerin etkilerinin de vücutta birikim ile zaman içinde ortaya çıkması beklenmektedir ancak özellikle ilk haftalarda görülen vücut ağırlığı azalmasının oluşabilecek minimal bir akut etki sonucunda gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

5.2 Biyokimyasal Bulgular

5.2.1 Lipid ve Lipoprotein Profili ile İlişkili Parametreler

Yayınlanan epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda plazma lipid profili ile kardiyovasküler hastalık riski arasında bir ilişki olduğu yayınlanmıştır (235, 236). Plazma lipid profili ve kardiyovasküler hastalık riski arasındaki ilişkiye ek olarak diyetle alınan kolesterol ve yağ miktarı ile yağ asidi türlerinin plazma lipid profilini değiştirebileceği uzun zamandır bilinmektedir (66). Bu ilişki 1980’li yıllarda ortaya atılmış olan “diyet- kalp hipotezi” ya da diğer adıyla “lipid hipotezi” olarak da bilinmektedir (237, 238). Lipid hipotezi geniş kitlelerce kabul edilmektedir ancak diyet yağı ve plazma lipid profili arasındaki ilişkinin tüm mekanizması hala net olarak açıklanamamıştır. Genel olarak; diyetle yüksek miktarda doymuş yağ asitleri alımının endojen kolesterol sentezini tetiklediği düşünülmektedir (239). Diyetle alınan doymuş yağ asitleri endojen kolesterol sentezinde önemli rolü bulunan hidroksimetil glutaril koenzim A redüktaz (HMG CoA redüktaz) enzimi aktivitesi artışına neden olabilmektedir (240). Asetil koenzim A: kolesterol asetil transferaz 1 (ACAT-1) aktivasyonunu arttırarak (241), asetil koenzim A (asetil CoA) gibi endojen kolesterol sentezi substratlarını arttırarak veya sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1c (SREBP-1c) sinyalizasyonunda bozulmaya (242) neden olarak endojen kolesterol sentezini arttırabilmektedir.

Diyetle alınan yağ miktarı ve yağ asitlerinin kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanan mortalite riskini inceleyen klinik ve epidemiyolojik çalışmalar incelendiğinde farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Yeni tanı almış kardiyovasküler hastalıklara sahip bireylerin incelendiği bir kohort çalışmasında karbonhidrat alımında aynı miktardaki artışla karşılaştırıldığında diyetle doymuş yağ asitlerinden gelen enerjinin %5 oranında arttırılmasının kardiyovasküler hastalık gelişimi riskini %29 oranında yükselttiği bildirilmiştir (243). Benzer şekilde 500000’in üzerinde örnekleme sahip bir meta analizde çeyrekliklere göre karşılaştırıldığında diyetle doymuş yağ asitleri alımındaki artış kardiyovasküler mortalite ile ilişkili bulunmuştur (244). Ancak güncel bir meta analizde diyetle alınan toplam yağ miktarı ve doymuş yağ asitlerini alım düzeyi ile kardiyovasküler hastalık riski arasında bir ilişki bulunmadığı yayınlanmıştır (49). Paralel olarak son yıllarda yapılan farklı meta

analizlerde de diyetin doymuş yağ asitleri içeriği ve kardiyovasküler hastalık mortalitesi arasında bir ilişki bulunmamıştır (245, 246). Diyetle alınan yağ miktarı ve plazma lipid profilini inceleyen çalışmalardan elde edilen farklı sonuçların çalışma dizaynları arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Diyetle alınan doymuş yağ asitlerinin miktarının yanında çoklu ve tekli doymamış yağ asitleri alım miktarının farklı olması, uygulanan diyetle kardiyovasküler risk faktörlerine etki ettiği bilinen basit karbonhidratlar, posa, çeşitli vitamin ve mineraller gibi diğer diyet bileşenlerinin tüketim miktarları da klinik sonuçları etkileyebilmektedir.

Çalışmanın bu bölümünde batı tipi yüksek yağ içeren (20g/100 g yem, kolesterol-0,2 mg/100g yem) diyete ek olarak verilen heterosiklik amin türlerinin kardiyovasküler hastalık risk etmenlerinden lipid ve lipoprotein profili üzerine etkileri incelenmiştir. Standart laboratuvar yemi alan çeşitli kemirgen türlerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek yağ ve/veya kolesterol içeren diyetin (>%35) plazma ve karaciğerde total kolesterol, trigliserit, LDL kolesterol düzeylerini arttırdığı ve HDL düzeylerini azalttığı (224, 229-231), plazma VLDL düzeylerini etkilemediği bildirilmiştir (225). Bu çalışmada literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak kontrol grupları da yüksek miktarda doymuş yağ asitleri ve kolesterol içeren diyet almıştır. Bu nedenle lipid profili bulguları karşılaştırılırken sadece maruz kalınan heterosiklik aminlerin potansiyel etkileri göz önüne alınmıştır. Ancak aynı çalışma grubunun aynı tür farelerle daha önce yaptığı bir çalışmada benzer süre boyunca standart laboratuvar yemi alan farelerin verileriyle de karşılaştırma yapılmıştır (226).

Bu çalışmada farelerin plazma total kolesterol düzeyleri incelendiğinde maruz kalınan heterosiklik amin türünün aynı alım süresindeki kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığı bulunmuştur (Bkz Şekil 4.3.). Ayrıca hem kısa süreli hem de uzun süreli heterosiklik amin alımının plazma total kolesterol düzeyleri açısından fark yaratmadığı görülmüştür. Benzer şekilde Isimura ve ark. PhIP türü heterosiklik aminlerin (3 hf, 75 mg/kg) F344 türü sıçanlarda plazma total kolesterol düzeylerini değiştirmedeğini bildirmiştir (31). Ancak başka bir çalışmada ise yüksek miktardaki diyet yağına (23,5 w/w, mısır yağı) ek olarak PhIP türü heterosiklik amin (75 mg/kg, 2 hf) alımının plazma total kolesterol düzeyini anlamlı ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (247). Öte yandan;

Lopez-Mendez ve ark. yüksek yağlı diyet (%21 w/w doymuş yağ asitleri- %0,15 w/w kolesterol) alan apo E knock-out farelerde yüksek doz (12,1 mg/kg, 2 hf) AαC türü heterosiklik amin alımının total kolesterol düzeyini düşürdüğünü bildirmiştir (29). Ancak Lopez Mendez ve ark. yaptığı çalışmada farelere farklı bir heterosiklik amin olan AαC verildiği dikkat çekmektedir. Yapılan bir klinik çalışmada diyetle yüksek miktarda kolesterol alımının (600 mg/gün) insanlarda plazma total kolesterol düzeylerini arttırdığı tespit edilmiştir (248). Başka bir çalışmada diyetle alınan kolesterol düzeyinde gerçekleşecek 100 mg/gün artışın plazma total kolesterol (2,2 mg/dl) düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (249). Öte yandan yapılan bir meta analizde serum total kolesterol düzeyinin yaklaşık olarak %14 oranında azaltılmasının miyokard infarktüs insidansında azalma veya koroner kalp hastalıkları mortalitesi üzerinde olumlu etkileri olmadığı saptanmıştır (250). Başka bir meta analizde diyetle alınan günlük kolesterol miktarının 300 mg düzeyinin üzerinde olmasının plazma total kolesterol (11,2 mg/dl) düzeylerinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (251). Bu çalışmada farelerin karaciğer total kolesterol düzeyleri incelendiğinde plazma düzeylerine paralel olarak hem heterosiklik amin türünün hem de heterosiklik aminlere maruziyet süresinin değişiklik yaratmadığı görülmüştür (Bkz Şekil 4.4.). Bu sonuçlara paralel olarak bir çalışmada PhIP türü heterosiklik amin alımının (3 hf, 75 mg/kg) karaciğerdeki total kolesterol düzeylerini değiştirmedeği yayınlanmıştır (31). Bu durum heterosiklik aminlerin karaciğerde üretilen ya da metabolize edilen total kolesterol miktarları üzerinde etkili olmayabileceğini göstermektedir.

Kısa süreli heterosiklik amin alan grupların plazma trigliserit düzeylerinin kontrol grubuna benzer olduğu bulunmuştur (Bkz Şekil4.5). Uzun süreli PhIP ve MeIQx türü heterosiklik amin alan farelerde ise kontrol grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır (Bkz Tablo 4.3.). Aynı çalışma grubunun aynı tür farelerle daha önce yaptığı çalışmada standart laboratuvar yemi alan farelerin verileriyle de karşılaştırıldığında yüksek yağlı diyet alan tüm müdahale gruplarının plazma trigliserit içeriği daha yüksek bulunmuştur (226). Ayrıca heterosiklik amin alım süresi plazma trigliserit düzeylerini değiştirmemiştir (Bkz Şekil 4.5). Bu çalışmadaki kısa süreli gruba yakın sürede PhIP alımının etkilerinin incelendiği bir çalışmada PhIP türü heterosiklik aminlerin (3 hf, 75 mg/kg) F344 türü sıçanlarda plazma trigliserit düzeylerini arttırdığı yayınlanmıştır (31). Ancak verilen heterosiklik amin dozunun

bu çalışmada verilerden çok yüksek olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Yapılan bir klinik çalışmada diyetle yüksek miktarda kolesterol alımının (600 mg/gün, 4 hf) insanlarda plazma trigliserit düzeylerini değiştirmedeği saptanmıştır (248). Bir kohort çalışmada plazma trigliseritlerinde 0,25 mmol/L düzeyindeki artışın kardiyovasküler hastalık riskinde %18 oranında artma ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (252). Benzer şekilde Framingham kalp çalışmasında plazma trigliserit düzeyinin yüksek (>1,7 mmol/L) olmasının koroner arter hastalığı riskindeki artışla ilişkili olduğu bildirilmiştir (253). Bu çalışmadaki farelerin karaciğer trigliserit düzeyleri heterosiklik amin türünden etkilenmezken; alım süresine göre karşılaştırıldığında sadece uzun süre PhIP maruziyetinin azaltıcı etkisi olduğu görülmüştür (Bkz Tablo 4.4.). Ancak aynı çalışma grubunun daha önceden yaptığı çalışmanın standart yem alan grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer trigliserit düzeyinin yüksek yağ ve heterosiklik amin alan gruplarda yüksek olduğu görülmüştür (226). Bu sonuçlara göre heterosiklik aminlerin karaciğer trigliserit düzeylerini arttırıcı etkisi olduğu ancak heterosiklik amin alım süresi arttığında bu etkilerin bir miktar azaldığı sonucuna varılabilmektedir. Bu durumun nedeni artan heterosiklik amin maruziyeti ile üretilen ve metabolize edilen trigliserit miktarları arasındaki dengenin değişmesi olabileceği düşünülmektedir. VLDL düzeyleri incelendiğinde hem plazma hem de karaciğer VLDL seviyesinin heterosiklik amin alım süresi veya heterosiklik amin türünden etkilenmediği saptanmıştır (Bkz Şekil 4.7. ve 4.8.). Literatürde heterosiklik aminlerin plazma VLDL düzeylerine etkilerini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır.

Farelerin plazma HDL düzeyleri incelendiğinde heterosiklik amin türünün istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (Bkz Şekil 4.9.). Ayrıca kısa süreli kontrol, PhIP ve PhIP ile MeIQx karışımı alan grupların plazma HDL düzeyleri uzun süre alan gruplara göre yüksek bulunmuştur (Bkz Tablo 4.3.). Bu çalışmadaki kısa süreli heterosiklik amin maruziyetine karşılık gelecek şekilde yüksek miktarda yağ (23,5 w/w) PhIP türü heterosiklik aminleri (75 mg/kg) iki hafta süreyle alan sıçanlarda plazma trigliserit düzeylerinin yükseldiği bildirilirken (247) F344 türü sıçanlarda üç hafta süreyle aynı dozda ve türdeki heterosiklik amine maruz kalan sıçanlarda plazma kolesterol düzeyinin değişmediği yayınlanmıştır (31). El Sisi ve ark. farelere yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içeren diyet (23,5 w/w, mısır yağı) uygularken Isimura ve ark. standart laboratuvar

yemi verdiğini rapor etmiştir. Sonuçlar arasındaki farklılığın diyet müdahalesi protokolünden ve her iki çalışmada da farklı türde sıçanların kullanılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada diyetle alınan kolesterol düzeyinde gerçekleşen 100 mg/gün artışın plazma HDL (0,3 mg/dL) düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (249). Bir meta analizde diyetle alınan günlük kolesterol miktarının 300 mg düzeyinin üzerinde olmasının plazma HDL (3,2 mg/dL) düzeylerinde artmaya neden olduğu yayınlanmıştır (251). Bu çalışmada karaciğer HDL düzeyleri kısa süre heterosiklik amin alan gruplarda benzerdir ancak uzun süre PhIP türü ve MeIQx türü heterosiklik amin alan farelerde kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksektir (Bkz Tablo 4.4.). Heterosiklik amin alım süresi açısından karşılaştırıldığında farelerin karaciğer HDL düzeylerinin benzer olduğu görülmektedir. Hem heterosiklik amin türüne hem de alım süresine göre karşılaştırıldığında plazma Apo A1 düzeylerinin benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.13.). Her iki alım süresinde de farklı heterosiklik amin türleri karaciğer Apo A1 düzeylerini etkilememektedir. Ancak kısa dönem PhIP ve MeIQx karışımı heterosiklik amin alan grubun karaciğer Apo A1 düzeylerinin aynı tür heterosiklik aminleri uzun süre alan gruba göre düşük olduğu bulunmuştur (Bkz Tablo 4.4.).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre heterosiklik amin türü ve bu maddelere maruz kalınan süre plazma LDL düzeylerini değiştirmemektedir (Bkz. Şekil 4.11.). Bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak Lopez-Mendez ve ark. yüksek yağlı (%21 w/w doymuş yağ asitleri- %0,15 w/w kolesterol) diyet alan apo E knock-out farelerde yüksek doz (12,1 mg/kg, 2 hf) AαC türü heterosiklik amin alımının plazma LDL düzeylerine etki etmediğini bildirmiştir (29). Ancak yüksek çoklu doymamış yağ (%23,5 w/w) içeren diyete ek olarak iki hafta boyunca PhIP türü (75 mg/kg) heterosiklik amin alan sıçanlarda plazma LDL düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bildirilmiştir (247). El Sisi ve ark. yaptığı çalışmanın bu çalışmadan farklı sonuçlar elde etmesinin nedeninin heterosiklik aminlerin direkt olarak gavaj yoluyla verilmesi olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yine çalışmalarda kullanılan hayvan türlerinin farklı olduğuna dikkat edilmelidir. Yapılan bir klinik çalışmada diyetle yüksek miktarda kolesterol alımının (600 mg/gün, 4 hf) insanlarda plazma total kolesterol ve HDL düzeylerini arttırırken; plazma trigliserit ve LDL düzeylerini değiştirmedeği yayınlanmıştır (248). Bir meta analizde diyetle alınan günlük kolesterol miktarının 300 mg

düzeinin üzerinde olmasının plazma LDL (6,7 mg/dL) düzeylerinde artışa neden olduğu yayınlanmıştır (251). Başka bir çalışmada diyetdeki doymuş yağ asitleri oranında sağlanan %10'luk bir azalmanın LDL kolesterol düzeyinde düşme sağlayarak kardiyovasküler hastalık riskini %7'ye kadar azaltabileceği yayınlanmıştır (254). Benzer şekilde sağlıklı bireylerle yapılan çalışmaların değerlendirildiği bir meta analizde diyetle doymuş yağ asitlerinden gelen enerjinin artmasının plazma LDL düzeyini arttırdığı sonucuna varılmıştır (255). Bu çalışmada farelerin karaciğer LDL düzeyleri incelendiğinde heterosiklik amin türü fark yaratmazken; uzun süre alım ile karşılaştırıldığında kısa süre kontrol ve MeIQx diyeti alan grupların daha düşük LDL düzeyine sahip olduğu bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.12.). Yüksek yağlı diyetin süresi göz önüne alındığında kısa süre alan gruplarda plazma LDL düzeylerinin düşük olması beklenen bir sonuçtur. Ancak diğer iki grupta fark görülmemesinin nedeninin alınan heterosiklik aminlerin etkisi olabileceği düşünülmektedir. Plazma ve karaciğerdeki Apo B düzeylerinin heterosiklik amin türü veya alım süresinden etkilenmediği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.15. ve 4.16.).

Doymuş yağ asitlerinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi incelenirken alınan doymuş yağ asitlerinin zincir uzunluğunun da hastalık riski ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (256). İlgili çalışmada kısa ve uzun zincirli doymuş yağ asitleri ile koroner kalp hastalıkları arasında bir ilişki bulunmazken; en düşük miktarda alan grupta karşılaştırıldığında uzun zincirli doymuş yağ asitlerini en yüksek miktarda alan grupta koroner kalp hastalıkları riskinin daha yüksek olduğu yayınlanmıştır. Sağlıklı erkeklerle yapılan bir çalışmada uzun zincirli doymuş yağ asitlerinden 19 g/gün stearik asit (18:0) alımının aynı miktardaki palmitik asit (16:0) tüketimiyle karşılaştırıldığında trombojenik ve aterosklerotik risk faktörlerinde iyileşme sağladığı bildirilmiştir (257). Ayrıca diyetle alınan doymuş yağ asitlerinin kaynağı da kardiyovasküler hastalık riski açısından önem arz etmektedir. Bir çalışmada bireyler 50 g/gün bitkisel (Hindistan cevizi yağı), hayvansal (tuzsuz tereyağı) doymuş yağ asitlerini veya doymamış yağ asitlerini (zeytinyağı) 4 hafta boyunca tüketmiştir. LDL kolesterol düzeylerini sadece tereyağı tüketiminin arttırdığı, Hindistan cevizi yağının ise HDL kolesterol düzeyini diğer yağ türlerine göre anlamlı şekilde arttırdığı bildirilmiştir (258). Bu tez çalışmasında doymuş yağ asitleri kaynağı olarak Hindistan cevizi yağının kullanılması farklı tür ve sürede heterosiklik amin alan farelerde

sonuçların dislipidemi, endotel disfonksiyon ve ateroskleroz gelişimi açısından gruplar arasında benzer olmasının bir diğer nedeni olabileceği düşünülmektedir. Daha aterojenik etkileri olduğu gösterilen hayvansal doymuş yağ asitleri kaynaklarının kullanılması heterosiklik amin türü ve alım süresinin yaratabileceği potansiyel farklılıkların daha kolay gösterilmesini sağlayabileceği düşünülmektedir.

İlgili literatür incelendiğinde bazı lipid profili parametreleri kullanılarak çeşitli kardiyovasküler hastalık riski hesaplama yöntemleri olduğu görülmektedir (213-215, 259). Non HDL, total kolesterol-HDL oranı, LDL-HDL oranı, Apo B-Apo A1 oranı, diyetin aterojenik indeksi ve aterojenik katsayı en sık kullanılan kardiyovasküler risk hesaplama yöntemleridir. Bu hesaplamalardan çıkan sonuçların yüksek olması aterojenik lipid profili göstergesidir ve kardiyovasküler hastalık riskini arttırmaktadır. Yayınlanan bir çalışmada LDL kolesterol düzeyi ile karşılaştırıldığında HDL-TG oranının kardiyovasküler riski belirlemede daha etkili olabileceği bildirilmiştir (260). Kardiyovasküler riski gösteren bu parametreler için literatürde bazı sınır değerler belirlenmiştir (213-215, 259). Bu çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde non-HDL, total kolesterol-HDL oranı, LDL-HDL oranı ve Apo B-Apo A1 oranının maruz kalınan heterosiklik amin türünden ve alım süresinden etkilenmediği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.17., 4.18. ve 4.19.). Diyetin aterojenik indeksi kısa süre heterosiklik amin alan gruplarda kontrol grubu ile benzerdir. Ancak uzun süre heterosiklik amin alan gruplar arasında sadece MeIQx alımının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.5.). Ancak bu çalışmada bir kemirgen türü kullanıldığı için hesaplanan değerlerin literatürde insanlar için geliştirilmiş sınır değerler ile karşılaştırılmasının yanıltıcı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle hesaplanan her parametre literatürdeki sınır değerler ile değil; kendi içindeki kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır.

5.2.2 Endotel Disfonksiyon ile İlişkili Parametreler

Diyetle alınan yağ miktarı ve yağ asit türleri ile kardiyovasküler hastalık riski arasındaki ilişki daha çok dislipidemi üzerinden değerlendirilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu diyet bileşenlerinin kardiyovasküler hastalık gelişimindeki potansiyel etkilerini endotel disfonksiyonu etkileyerek de gösterebileceği bildirilmiştir (261). Yetişkin

bireylerde öğün sonrasında plazma lipid düzeylerindeki artışın endotel fonksiyonu geçici olarak bozabildiği yayınlanmıştır (261, 262). Özellikle nitrik oksit aracılı endotelyuma bağlı vazodilasyondaki bozulma ateroskleroz oluşum sürecinin erken basamaklarında görülmekte ve aterosklerotik kalp hastalıklarının oluşumuna katkı sağlayabilmektedir (6, 263). Bazı hayvan çalışmalarında da yüksek yağlı (>%35, enerji) diyetin endotel nitrik oksit sentaz aktivitesi ve nitrik oksit üretiminde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (264, 265). Benzer şekilde düzenli olarak yüksek miktarda (>% 35, enerji) yağ içeren bir diyet tüketen sağlıklı yetişkinlerde, AHA'nın yağ alımı önerilerini karşılayan bir diyet tüketen yetişkinlerle karşılaştırıldığında azalmış nitrik oksit biyoyararlılığındaki azalmaya bağlı olarak endotel bağımlı vazodilasyon fonksiyonunda bozulmalar görüldüğü bildirilmiştir (71).

Yüksek yağ ve kolesterol içeren diyetin endotel disfonksiyon ve ateroskleroz gelişimine etkilerinin bilinmesine rağmen heterosiklik aromatik aminlerin bu risk faktörleri üzerindeki olası etkileri ve bu etkilerin mekanizması tam olarak incelenmemiştir. Yüksek miktarda doymuş yağ asitleri ve kolesterol içeren diyetin (>%35, enerji) endotel disfonksiyon göstergesi olan adezyon moleküllerine etkileri incelendiğinde; VCAM-1 ve ICAM-1 düzeylerinin hem plazmada (228, 266) hem de aortta (232) arttığı yayınlanmıştır. Ancak bu çalışmada farelerin plazma VCAM-1 düzeyleri karşılaştırıldığında hem kısa süre hem de uzun süre heterosiklik amin alımının kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik yaratmadığı görülmüştür (Bkz Tablo 4.6.). Ayrıca heterosiklik amin alım süresine göre de gruplar arasında fark bulunmamaktadır. Plazma ICAM-1 düzeyi hem heterosiklik amin türünden hem de heterosiklik amin alım süresinden etkilenmemektedir. Yapılan bir çalışmada özellikle plazma VCAM-1 düzeyiyle aortda aterom boyutu arasında pozitif korelasyon olduğu rapor edilmiştir (228).

Bu tez çalışmasında ayrıca aort dokusunda VCAM-1 ve ICAM-1 ile ilişkili peptidlerin düzeyleri RT-qPCR ve Western Blot yöntemleriyle analiz edilmiştir. Ancak yapılan farklı denemelere rağmen sadece Western Blot analizinde ICAM-1 için bant elde edilememiştir (Bkz Şekil 4.22.). Bant yoğunluklarından hesaplanan protein miktarları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (Bkz. Şekil 4.23.). Analizlerden elde edilen bulgular kısa süre heterosiklik amin alımının plazma VCAM-1 ve ICAM-1 düzeyleri ile paralel olarak aort dokusundaki düzeyleri ve gen ekspresyonlarının

kontrol grubuna göre farklı olmadığını göstermektedir (Bkz. Şekil 4.24. ve 4.25.). Benzer şekilde diyetle uzun süre heterosiklik aminlere maruz kalmak da aort dokusunda VCAM-1 ve ICAM-1 ile ilişkili peptidlerin düzeyini ve genetik ekspresyonunu etkilememektedir. Bu çalışmanın tersine Park ve ark. yaptıkları araştırma sonucunda yüksek yağlı diyetin (%45, enerji, %0,15 kolesterol) aortta ICAM-1, VCAM-1 ve e-selectin ekspresyonlarını arttırdığı bildirmiştir (232). Yapılan başka bir çalışmada tipik batı tarzı diyetin (%40, enerji) aortta ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonlarının arttığı rapor edilmiştir (267). Ancak söz konusu çalışmada kontrol grubuna standart laboratuvar yemi verildiği ve bu farkın beklenen bir sonuç olduğu göz ardı edilmemelidir.

5.3. Aterosklerotik Plak Oluşumuna İlişkin Bulgular

Ateroskleroz; arterlerin intima tabakasında lipid ve fibröz elemanların birikimi ile karakterize, progresif bir hastalıktır. Endotel hasarı takiben, kolesterol açısından zengin makrofajlardan oluşan plak/aterom oluşmakta ve plateletler ile lökositlerin sürece katılımı ile ilerleyerek ateroskleroz haline gelmektedir (9). Aortta oluşan aterosklerotik plak kompozisyonunun incelendiği bir çalışmada aterom içeriğinin çoğunlukla doymamış yağ asitlerinden oluştuğu ve kardiyovasküler sistem sağlığı için sadece doymuş yağ asitlerinin değil çoklu doymamış yağ asitlerinin diyetle alınan miktarının da önemli olduğunu rapor etmiştir (191).

Yapılan çalışmalar yüksek yağlı diyet (>%35, enerji) alan farelerde aortik plak boyutlarının kontrol grubuna göre arttığı yayınlanmıştır (228, 230, 232, 268). Bu çalışmada yapılan histopatolojik boyamadan elde edilen bulgulara göre yüksek yağ ve kolesterol içeren diyetle birlikte kısa süreyle heterosiklik amin türlerine maruz kalmanın plak oluşumunu etkilemediği saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.26.). Buna karşın heterosiklik aromatik aminlerin plak oluşumuna etkisinin incelendiğinde bir çalışmada Aac türü heterosiklik aminlerin (12,1 mg/kg, 2hf) yüksek yağlı diyet (%21 w/w doymuş yağ asitleri- %0,15 w/w kolesterol) alan apoE knock-out farelerde plak boyutunu kontrol grubuna göre azaltarak olumlu etki ettiği bildirilmiştir (29). Ancak kısa süre ile PhIP türü heterosiklik amin alan farede diğer örneklerden farklı olarak aort duvarındaki bazı düz kas hücrelerinde farklılaşmayı işaret eden birtakım değişiklikler olduğu bulunmuştur (Şekil 4.27.). Bu

hücresel düzeydeki değişikliklerin hücre çekirdeklerinde büyüme ve nükleollerde belirginleşme şeklinde olduğu gözlenmiştir. Kısa süreli heterosiklik amin maruziyetine benzer şekilde uzun süre ile heterosiklik amin farelerde de ateroskleroz gelişimi gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.28).

Yüksek yağ içeren diyetle heterosiklik aminlere maruz kalan farelerde alınan ve bazı toksik etkileri olduğu bilinen bu aminlerin metabolizması sırasında endotel disfonksiyon ve ateroskleroz patogenezini etkileyecek/engelleyecek yollar oluşturup oluşturmadığı net olarak bilinmemektedir. Literatürde heterosiklik aminlerin direkt olarak ateroskleroz oluşumuna etkisini incelemesi yönüyle tek olan ve çalışma tasarımı olarak bu çalışmayla bazı ortak yönleri bulunan Lopez Mendez ve ark. yaptıkları çalışmada yüksek yağlı (%21 w/w doymuş yağ asitleri- %0,15 w/w kolesterol) diyetle beslenen apo E knock-out farelerde A α C türü heterosiklik aminlerin (12,1 mg/kg, 2 hf) plak boyutunu kontrol grubuna göre azaltarak ateroskleroza karşı olumlu etki ettiği yayınlanmıştır (29). Yazarlar, ilgili heterosiklik aminin ateroskleroz gelişiminde yer alan hücrelerin proliferasyonu veya fonksiyonu üzerine inhibe edici etkisi olabileceği, infiltre edici monositik hücrelerin proliferasyonuna veya düz kas hücrelerinin neo-intima tabakasına geçişine müdahale edebileceğini bildirmiştir. Ayrıca bu tez çalışması kapsamında incelenen lipid parametreleri ya da endotel disfonksiyon belirteçleri düzeyinin çok yükselmesine bağlı olarak ilgili moleküllerin vücutta çeşitli proteazlar ya da nötrofiller tarafından parçalanmasını ya da albümin veya alfa makroglobulinler tarafından toplanmasını tetikleyen bir savunma mekanizması gelişebileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde bu savunma mekanizmalarının heterosiklik aminlerin aktivasyonu sonucunda oluşan toksik metabolitlerin temizlenmesi için de oluşturulmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu hipotezlerin kontrol edilebilmesi veya doğrulanabilmesi için bu konuda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarının literatürdeki diğer çalışmalarla benzer ve farklı yönleri olduğu dikkat çekmektedir. Özellikle çalışmalarda kullanılan hayvan türleri (sıçan, fare... vb), aynı türdeki hayvanların genetik özellikleri (Apo E, Cyp1a...vb *knock-out*), çalışmalarda verilen heterosiklik aminlerin veriliş yolları (yeme ekleme, gavaj... vb), veriliş dozları ve süreleri, müdahale boyunca hayvanların tükettiği yemlerin içeriği (yüksek oranda

doymuş/çoklu doymamış yağ asitleri içeren, standart laboratuvar yemi... vb), hayvanların tükettiği doymuş yağ asitlerinin kaynağı (bitkisel, hayvansal... vb) gibi çalışma dizaynı farklılıkları sonuçların karşılaştırılmasını etkilemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Heterosiklik aminlerin yetişkin farelerde fazla miktarda alınmasının vücutta endotel disfonksiyon, dislipidemi ve ateroskleroz üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi ile Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen genel sonuçlar ve öneriler aşağıda özetlenmiştir.

6.1. Sonuçlar

Kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojik temelinde lipoprotein metabolizmasında anomali, kronik inflamasyon, endotel hasar ve aterotromboz vardır. Heterosiklik aminlerin bu sürece olası etkisinin, metabolik aktivasyon sonucunda kardiyovasküler dejenerasyon, genotoksisite ve sitotoksisite oluşturarak kardiyovasküler hastalıkları tetikleme olabileceği düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, besinlerle en çok maruz kalınan heterosiklik amin türlerinin ateroskleroz patogenezi için temel mekanizmalar olan endotel disfonksiyon, dislipidemi ve aterotromboz süreçleri üzerine etkileri hücresel ve moleküler düzeyde kardiyovasküler hastalıklar açısından saptanmıştır.

Genel olarak elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; yüksek yağ ve kolesterol içeren diyetle birlikte kısa süre heterosiklik amin alımının lipid profilini kontrol grubuna göre olumsuz etkileyerek kardiyovasküler hastalıklara yatkınlığı arttırdığı görülmüştür. Yüksek yağlı diyetle birlikte uzun süre alınan heterosiklik aminler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dislipidemik etkileri azaltma eğilimindedir. Heterosiklik amin türü ve alım süresinin endotel disfonksiyon ve ateroskleroz oluşumu üzerinde etkisi gösterilememiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak maddeler halinde sunulmuştur.

1. Sadece yüksek yağ içeren diyet verilen 21 haftalık müdahale döneminde kısa süre ile heterosiklik amin alacak grupların yem tüketimleri; kontrol grubunda $3,3 \pm 0,06$ g/gün iken PhIP alan grupta $3,3 \pm 0,05$ g/gün, MeIQx alan grupta $3,3 \pm 0,04$ g/gün ve

- her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $3,2\pm 0,06$ g/gün olduğu görülmüştür ($p=0,226$).
2. Uzun süre ile heterosiklik amin alan grupların yem tüketimleri incelendiğinde kontrol grubunun yem tüketimi $3,2\pm 0,06$ g/gün iken PhIP alan grupta $3,3\pm 0,03$ g/gün, MeIQx alan grupta $3,4\pm 0,04$ g/gün ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $3,3\pm 0,06$ g/gün olarak bulunmuştur ($p=0,129$).
 3. Yüksek yağlı diyet dönemi ve heterosiklik amin içeren diyet dönemindeki yem tüketimi ortalaması sırasıyla; $3,3\pm 0,42$; $3,1\pm 0,33$ g/gün'dür ($p>0,05$).
 4. Yüksek yağ ve kolesterol içeren diyete ek olarak heterosiklik amin verilen diyet dönemindeki yem tüketimleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan gruplarda kontrol grubunun yem tüketimi $3,3\pm 0,06$ g/gün iken PhIP alan grupta $3,3\pm 0,05$ g/gün, MeIQx alan grupta $3,3\pm 0,04$ g/gün ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $3,2\pm 0,06$ g/gün olduğu bulunmuştur ($p=0,707$).
 5. Diyetle uzun süre heterosiklik aminlere maruz kalan gruplardan kontrol grubunun yem tüketimi $3,2\pm 0,06$ g/gün iken PhIP alan grupta $3,3\pm 0,03$ g/gün, MeIQx alan grupta $3,4\pm 0,04$ g/gün ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $3,3\pm 0,06$ g/gün yem tüketildiği bulunmuştur ($p=0,798$).
 6. Aynı heterosiklik aminleri kısa ve uzun süre kontrol diyeti alan iki grupta yem tüketimlerinin kısa ve uzun süreli gruplarda sırasıyla kontrol grubu için $3,3\pm 0,06$ g/gün ve $3,2\pm 0,06$ g/gün ($p>0,05$); PhIP gruplarında $3,3\pm 0,05$ g/gün ve $3,3\pm 0,03$ g/gün ($p>0,05$), MeIQx gruplarında $3,3\pm 0,04$ g/gün ve $3,4\pm 0,04$ g/gün ($p>0,05$), her iki tür heterosiklik amini birlikte alan gruplarda $3,2\pm 0,06$ g/gün ve $3,3\pm 0,06$ g/gün'dür ($p>0,05$).
 7. Yüksek yağlı diyet döneminde farelerin vücut ağırlığı sayısal olarak artma eğilimindedir.
 8. Sadece yüksek yağlı diyet verilen 21 haftalık müdahale döneminde kısa süre ile heterosiklik amin alacak grupların ağırlık değişimleri kontrol grubunda $22,7\pm 0,45$ g iken PhIP alan grupta $23,2\pm 0,48$ g, MeIQx alan grupta $22,2\pm 0,45$ g ve her iki

- heterosiklik amin türünü birlikte alan grupta $22,9\pm 0,41$ g olduğu görülmüştür ($p=0,490$).
9. Uzun süre ile heterosiklik amin alacak grupların ağırlık değişimleri incelendiğinde kontrol grubunun ortalama ağırlığının $22,7\pm 0,25$ g iken PhIP alan grubun ağırlığının $23,4\pm 0,33$ g, MeIQx alan grubun ağırlığının $23,2\pm 0,40$ g ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grubun ortalama ağırlığının $23,3\pm 0,47$ g olduğu görülmüştür ($p=0,173$).
 10. Yüksek yağ ve kolesterol içeren diyetle ek olarak heterosiklik amin verilen diyet dönemindeki ağırlık değişimleri incelendiğinde kısa süreli heterosiklik amin alan gruplarda kontrol grubunun ağırlığının $24,2\pm 0,74$ g iken PhIP alan grubun ağırlığının $24,9\pm 0,59$ g, MeIQx alan grubun ortalama ağırlığının $23,5\pm 0,42$ g ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grubun ağırlığının $23,8\pm 0,86$ g olduğu bulunmuştur ($p=0,557$).
 11. Diyetle uzun süre heterosiklik aminlere maruz kalan gruplardan kontrol grubunun ortalama ağırlığının $24,0\pm 0,30$ g iken PhIP alan grubun ağırlığının $24,8\pm 0,38$ g, MeIQx alan grubun ağırlığının $24,6\pm 0,32$ g ve her iki heterosiklik amin türünü birlikte alan grubun ortalama ağırlığının $24,6\pm 0,24$ g olduğu bulunmuştur ($p=0,360$).
 12. Kısa ve uzun süre aynı diyeti alan iki grupta kontrol yemi alanlar için kısa ve uzun dönemde sırasıyla $24,2\pm 0,74$ g ve $24,0\pm 0,30$ g ($p>0,05$), PhIP gruplarında $24,9\pm 0,59$ g ve $24,8\pm 0,38$ g ($p>0,05$), MeIQx grubunun $23,5\pm 0,42$ g ve $24,6\pm 0,32$ g ($p>0,05$), her iki tür heterosiklik amini birlikte alan gruplarda $23,8\pm 0,86$ g ve $24,6\pm 0,24$ g olduğu görülmüştür ($p>0,05$).
 13. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma total kolesterol düzeyi $1,2\pm 0,00$ mmol/L iken PhIP alan grubun $1,4\pm 0,14$ mmol/L, MeIQx alan grubun $1,4\pm 0,26$ mmol/L ve hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $1,3\pm 0,08$ mmol/L olarak bulunmuştur ($p=0,066$).
 14. Plazma total kolesterol düzeyleri uzun süreli heterosiklik amin alan gruplarda incelendiğinde kontrol grubunun ortalaması $1,3\pm 0,05$ mmol/L iken, PhIP grubunda $1,2\pm 0,06$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $1,2\pm 0,14$

- mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $1,1\pm 0,07$ mmol/L olduğu görülmüştür ($p=0,074$).
15. Aynı heterosiklik aminlere maruz kalan gruplarda plazma total kolesterol düzeyi kısa ve uzun süre için sırasıyla kontrol grubunda $1,2\pm 0,00$ mmol/L ve $1,3\pm 0,05$ mmol/L ($p>0,05$), PhIP grubunda $1,4\pm 0,14$ mmol/L ve $1,2\pm 0,06$ mmol/L ($p>0,05$), MeIQx gruplarında $1,4\pm 0,26$ mmol/L ve $1,2\pm 0,14$ mmol/L ($p>0,05$), her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde $1,3\pm 0,08$ mmol/L ve $1,1\pm 0,07$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$).
16. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer total kolesterol düzeyi $0,11\pm 0,006$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,14\pm 0,013$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,13\pm 0,012$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $0,14\pm 0,013$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur.
17. Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer total kolesterol düzeyi $0,11\pm 0,009$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,13\pm 0,001$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,12\pm 0,003$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer total kolesterol düzeyinin $0,13\pm 0,005$ mmol/g protein olduğu görülmüştür ($p=0,097$).
18. Aynı heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,11\pm 0,006$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,11\pm 0,009$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$), PhIP türü kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,14\pm 0,013$ mmol/g protein ve $0,13\pm 0,001$ mmol/g protein, MeIQx türü $0,13\pm 0,012$ mmol/g protein ve $0,12\pm 0,003$ mmol/g protein, her iki tür heterosiklik amini $0,14\pm 0,013$ mmol/g ve $0,13\pm 0,005$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$).
19. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma trigliserit düzeyi $0,8\pm 0,01$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $1,0\pm 0,25$ mmol/L, MeIQx alan grubun $1,2\pm 0,22$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem

- MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $1,0\pm 0,07$ mmol/L olarak bulunmuştur ($p=0,444$).
20. Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde plazma trigliserit düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olduğu bulunmuştur ($p=0,037$), Uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde gruplar arasındaki farklılık durumu incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma trigliserit düzeyi $1,2\pm 0,11$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,8\pm 0,12$ mmol/L ($p=0,032$), MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,7\pm 0,09$ mmol/L ($p=0,016$), hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,7\pm 0,08$ mmol/L olduğu görülmüştür.
21. Aynı heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,8\pm 0,01$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $1,2\pm 0,11$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$), PhIP türü kısa ve uzun süre için sırasıyla; $1,0\pm 0,25$ mmol/L ve $0,8\pm 0,12$ mmol/L, MeIQx türü $1,2\pm 0,22$ mmol/L ve $0,7\pm 0,09$ mmol/L, iki tür heterosiklik aminini birlikte alan farelerde $1,0\pm 0,07$ mmol/L ve $0,7\pm 0,08$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$).
22. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer trigliserit düzeyi $0,09\pm 0,012$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,12\pm 0,005$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,09\pm 0,014$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer trigliserit düzeyi ortalaması $0,12\pm 0,016$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p=0,126$).
23. Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer trigliserit düzeyi $0,11\pm 0,036$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,08\pm 0,006$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,09\pm 0,009$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer trigliserit düzeyinin $0,10\pm 0,011$ mmol/g protein olduğu görülmüştür ($p=0,691$).
24. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,09\pm 0,012$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,11\pm 0,036$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$), PhIP türü

- heterosiklik aminin kısa süreli alan farelerin karaciğer trigliserit düzeyleri uzun süre ile alanlara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,12 \pm 0,005$ mmol/ g protein ve $0,08 \pm 0,006$ mmol/g protein, $p=0,016$), MeIQx türü heterosiklik aminleri kısa ($0,09 \pm 0,014$ mmol/g protein) veya uzun ($0,09 \pm 0,009$ mmol/g protein) süre ile almanın karaciğer trigliserit düzeyi açısından anlamlı farklılık yaratmadığı görülmüştür ($p>0,05$), Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda karaciğer trigliserit düzeyi $0,12 \pm 0,016$ mmol/g protein iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,10 \pm 0,011$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).
25. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma VLDL düzeyi $22,9 \pm 0,83$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $26,4 \pm 0,86$ mmol/L, MeIQx alan grubun $23,8 \pm 0,62$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $23,0 \pm 1,51$ mmol/L olarak bulunmuştur ($p=0,080$).
26. Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma VLDL düzeyi $21,4 \pm 2,05$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $24,8 \pm 0,78$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $21,4 \pm 0,99$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $22,2 \pm 1,07$ mmol/L olduğu görülmüştür ($p=0,229$).
27. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $22,9 \pm 0,83$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $21,4 \pm 2,05$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$), PhIP türü $26,4 \pm 0,86$ mmol/L ve $24,8 \pm 0,78$ mmol/L, MeIQx türü $23,8 \pm 0,62$ mmol/L ve $21,4 \pm 0,99$ mmol/L, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde $23,0 \pm 1,51$ mmol/L ve $22,2 \pm 1,07$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$).
28. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer VLDL düzeyi $0,15 \pm 0,03$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,16 \pm 0,02$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,10 \pm 0,02$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer VLDL düzeyi ortalaması $0,11 \pm 0,03$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p=0,294$).

29. Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer VLDL düzeyi $0,11\pm 0,03$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,10\pm 0,01$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,14\pm 0,02$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer VLDL düzeyinin $0,13\pm 0,01$ mmol/g protein olduğu saptanmıştır ($p=0,366$).
30. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,15\pm 0,03$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,11\pm 0,03$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$), PhIP türü $0,16\pm 0,02$ mmol/g protein ve $0,10\pm 0,01$ mmol/g protein, MeIQx türü $0,10\pm 0,02$ mmol/g protein ve $0,14\pm 0,02$ mmol/g protein, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde $0,11\pm 0,03$ mmol/g protein ve $0,13\pm 0,01$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$).
31. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma HDL düzeyi $0,284\pm 0,03$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,204\pm 0,02$ mmol/L, MeIQx alan grubun $0,250\pm 0,00$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $0,236\pm 0,02$ mmol/L olarak bulunmuştur ($p=0,134$).
32. Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma HDL düzeyi $0,152\pm 0,01$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,210\pm 0,01$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,216\pm 0,04$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,160\pm 0,01$ mmol/L olduğu görülmüştür ($p=0,280$).
33. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde ($0,284\pm 0,03$ mmol/L) uzun süreli alan farelere göre ($0,152\pm 0,01$ mmol/L) anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0,029$), Benzer şekilde PhIP türü $0,204\pm 0,02$ mmol/L ve $0,210\pm 0,01$ mmol/L, $p<0,001$, MeIQx türü $0,250\pm 0,00$ mmol/L ve $0,216\pm 0,04$ mmol/L, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde $0,236\pm 0,02$ mmol/L ve $0,160\pm 0,01$ mmol/L olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,014$).

34. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer HDL düzeyi $0,034\pm0,005$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,030\pm0,009$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,033\pm0,001$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer HDL düzeyi ortalaması $0,023\pm0,001$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur($p=0,226$).
35. Gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer HDL düzeyi $0,015\pm0,001$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,022\pm0,002$ mmol/g protein ($p=0,027$), MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,022\pm0,002$ mmol/g protein ($p=0,016$), hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer HDL düzeyinin $0,026\pm0,001$ mmol/g protein olduğu görülmüştür($p=0,025$).
36. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,034\pm0,005$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,015\pm0,001$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$), PhIP türü $0,030\pm0,009$ mmol/g protein ve $0,022\pm0,002$ mmol/g protein, MeIQx türü $0,033\pm0,001$ mmol/g protein ve $0,022\pm0,002$ mmol/g protein, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde $0,023\pm0,001$ mmol/g protein ve $0,026\pm0,001$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$).
37. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma LDL düzeyi $0,7\pm0,02$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,8\pm0,08$ mmol/L, MeIQx alan grubun $0,9\pm0,25$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $0,8\pm0,07$ mmol/L olarak bulunmuştur($p=0,951$).
38. Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma LDL düzeyi $0,9\pm0,02$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,6\pm0,08$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,7\pm0,07$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,7\pm0,03$ mmol/L olduğu görülmüştür ($p=0,070$).

39. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,7\pm 0,02$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $0,9\pm 0,02$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$), PhIP türü $0,8\pm 0,08$ mmol/L ve $0,6\pm 0,08$ mmol/L, MeIQx türü $0,9\pm 0,25$ mmol/L ve $0,7\pm 0,07$ mmol/L, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde $0,8\pm 0,07$ mmol/L ve $0,7\pm 0,03$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$).
40. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer LDL düzeyi $0,07\pm 0,006$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,09\pm 0,010$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,08\pm 0,006$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer LDL düzeyi ortalaması $0,08\pm 0,004$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur($p=0,341$).
41. Gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer LDL düzeyi $0,10\pm 0,006$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,08\pm 0,001$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,10\pm 0,006$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer LDL düzeyinin $0,09\pm 0,003$ mmol/g protein olduğu görülmüştür($p=0,100$).
42. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,07\pm 0,006$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,10\pm 0,006$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p<0,001$), PhIP türü heterosiklik aminin kısa veya uzun süre ile alınmasının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (kısa ve uzun süre için sırasıyla; $0,09\pm 0,010$ mmol/g protein ve $0,08\pm 0,001$ mmol/g protein). MeIQx türü heterosiklik aminlerin kısa ($0,08\pm 0,006$ mmol/g protein) süre ile alımının uzun ($0,10\pm 0,006$ mmol/g protein) süre ile alım ile karşılaştırıldığında karaciğer LDL düzeyinin daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda karaciğer LDL düzeyi $0,08\pm 0,004$ mmol/g protein iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,09\pm 0,003$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

43. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma Apo A1 düzeyi $0,0020 \pm 0,00$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,0018 \pm 0,00$ mmol/L, MeIQx alan grubun $0,0016 \pm 0,00$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $0,0014 \pm 0,00$ mmol/L olarak bulunmuştur ($p=0,415$).
44. Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma Apo A1 düzeyi $0,0020 \pm 0,00$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,0018 \pm 0,00$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,0025 \pm 0,00$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,0027 \pm 0,00$ mmol/L olduğu görülmüştür ($p=0,303$).
45. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,0020 \pm 0,00$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $0,0020 \pm 0,00$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p>0,05$), PhIP türü $0,0018 \pm 0,00$ mmol/L ve $0,0018 \pm 0,00$ mmol/L ($p>0,05$), MeIQx türü $0,0016 \pm 0,00$ mmol/L ($p>0,05$) ve $0,0025 \pm 0,00$ mmol/L, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde $0,0014 \pm 0,00$ mmol/L ve $0,0027 \pm 0,00$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p=0,015$).
46. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer Apo A1 düzeyi $0,0024 \pm 0,0$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,0025 \pm 0,00$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,0023 \pm 0,00$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer Apo A1 düzeyi ortalaması $0,0018 \pm 0,00$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p=0,179$).
47. Gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer Apo A1 düzeyi $0,0020 \pm 0,00$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,0020 \pm 0,00$ mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,0025 \pm 0,00$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer Apo A1 düzeyinin $0,0021 \pm 0,00$ mmol/g protein olduğu görülmüştür ($p=0,518$).
48. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,0024 \pm 0,00$ mmol/g protein iken uzun süreli alan

- farelerde $0,0020 \pm 0,00$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$), PhIP türü $0,0025 \pm 0,00$ mmol/g protein ve $0,0020 \pm 0,00$ mmol/g protein, MeIQx türü $0,0023 \pm 0,00$ mmol/g protein $0,0025 \pm 0,00$ mmol/g protein, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde $0,0018 \pm 0,00$ mmol/g protein ve $0,0021 \pm 0,00$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$).
49. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma Apo B düzeyi $0,3 \pm 0,02$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,3 \pm 0,03$ mmol/L, MeIQx alan grubun $0,4 \pm 0,02$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $0,4 \pm 0,01$ mmol/L olarak bulunmuştur ($p = 0,440$).
50. Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma Apo B düzeyi $0,4 \pm 0,02$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,4 \pm 0,01$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,3 \pm 0,00$ mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin $0,3 \pm 0,01$ mmol/L olduğu görülmüştür ($p = 0,076$).
51. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,3 \pm 0,02$ mmol/L iken uzun süreli alan farelerde $0,4 \pm 0,02$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$), PhIP türü $0,3 \pm 0,03$ mmol/L ve $0,4 \pm 0,01$ mmol/L, MeIQx türü $0,4 \pm 0,02$ mmol/L ve $0,3 \pm 0,00$ mmol/L, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde kısa süre ile maruz kalanlarda plazma Apo B düzeyi $0,4 \pm 0,01$ mmol/L iken uzun süreli maruz kalanlarda $0,3 \pm 0,01$ mmol/L olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$).
52. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin karaciğer Apo B düzeyi $0,01 \pm 0,000$ mmol/g protein olarak bulunurken PhIP alan grubun $0,02 \pm 0,001$ mmol/g protein, MeIQx alan grubun $0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein, hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun karaciğer Apo B düzeyi ortalaması $0,01 \pm 0,001$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p = 0,191$).
53. Gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama karaciğer Apo B düzeyi $0,02 \pm 0,006$ mmol/g protein iken, uzun süre PhIP alan farelerin $0,01 \pm 0,000$

- mmol/g protein, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin $0,01\pm 0,001$ mmol/g protein, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama karaciğer Apo B düzeyinin $0,01\pm 0,001$ mmol/g protein olduğu görülmüştür ($p=0,823$).
54. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde $0,01\pm 0,000$ mmol/g protein iken uzun süreli alan farelerde $0,02\pm 0,006$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$), PhIP türü kısa $0,02\pm 0,001$ mmol/g protein ve $0,01\pm 0,000$ mmol/g protein, MeIQx türü $0,01\pm 0,001$ mmol/g protein ve $0,01\pm 0,001$ mmol/g protein, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde $0,01\pm 0,001$ mmol/g protein ve $0,01\pm 0,001$ mmol/g protein olduğu bulunmuştur ($p>0,05$).
55. Elde edilen veriler incelendiğinde plazma non-HDL düzeyinin ve total kolesterol-HDL oranının maruz kalınan heterosiklik amin türünden ve alım süresinden etkilenmediği görülmüştür ($p>0,05$).
56. LDL- HDL oranı ve Apo B-Apo A1 oranı hem kısa hem de uzun süre heterosiklik amin alan gruplarda kontrol grubuna benzerdir ve aynı tür heterosiklik amin alan farelerde de bu parametrelerin oranlarının farklı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$),
57. Diyetin aterosjenik indeksi kısa süre heterosiklik amin alan gruplarda kontrol grubuna benzerdir ($p>0,05$). Ancak uzun süre heterosiklik amin alan gruplardan sadece MeIQx türü heterosiklik amin alımının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur ($p=0,020$).
58. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma VCAM-1 düzeyi $13,8\pm 0,42$ mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun $15,5\pm 0,50$ mmol/L, MeIQx alan grubun $14,9\pm 0,40$ mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması $15,2\pm 0,11$ mmol/L olarak bulunmuştur ($p=0,067$).
59. Uzun süreli heterosiklik amin alan gruplar incelendiğinde kontrol grubunun ortalama plazma VCAM-1 düzeyi $14,0\pm 0,34$ mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin $13,2\pm 0,26$ mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin

- 12,4±0,38 mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin 12,3±0,45 mmol/L olduğu görülmüştür(p=0,054).
60. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde 13,8±0,42 mmol/L iken uzun süreli alan farelerde 14,0±0,34 mmol/L olduğu bulunmuştur (p>0,05). PhIP türü kısa ve uzun süre için sırasıyla; 15,5±0,50 mmol/L ve 13,2±0,26 mmol/L, MeIQx türü 14,9±0,40 mmol/L ve 12,4±0,38 mmol/L, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde 15,2±0,11 mmol/L ve 12,3±0,45 mmol/L olduğu bulunmuştur (p>0,05).
61. Diyetle kısa süre heterosiklik amine maruz kalan farelerden kontrol grubundakilerin plazma ICAM-1 düzeyi 20,4±0,35 mmol/L olarak bulunurken PhIP alan grubun 22,6±0,74 mmol/L, MeIQx alan grubun 21,4±0,55 mmol/L ve son olarak hem PhIP hem MeIQx türü heterosiklik aminleri birlikte alan grubun ortalaması 22,5±0,09 mmol/L olarak bulunmuştur (p=0,061).
62. Kontrol grubunun ortalama plazma ICAM-1 düzeyi 20,8±0,60 mmol/L iken, uzun süre PhIP alan farelerin 18,8±0,32 mmol/L, MeIQx türü heterosiklik amine maruz kalan farelerin 19,0±0,50 mmol/L, hem PhIP hem de MeIQx türünü birlikte alan farelerin ortalama düzeyinin 18,0±0,81 mmol/L olduğu görülmüştür(p=0,118).
63. Aynı tür heterosiklik aminlere maruziyet süresinin etkileri incelendiğinde kısa süreli kontrol diyeti alan farelerde 20,4±0,35 mmol/L iken uzun süreli alan farelerde 20,8±0,60 mmol/L olduğu bulunmuştur (p>0,05). PhIP türü için kısa ve uzun süre için sırasıyla; 22,6±0,74 mmol/L ve 18,8±0,32 mmol/L, MeIQx türü 21,4±0,55 mmol/L ve 19,0±0,50 mmol/L, her iki tür heterosiklik amini birlikte alan farelerde 22,5±0,09 mmol/L ve 18,0±0,81 mmol/L olduğu bulunmuştur (p>0,05).
64. Yapılan Western Blot analizleri sonucunda farklı sürelerde ve farklı antikorlarla çeşitli denemeler yapılmasına rağmen ICAM-1 için bant oluşumu görüntülenememiştir.
65. VCAM-1 için bantlardan elde edilen ortalama protein miktarlarının kısa süreli heterosiklik amin alan fareler farklı olduğu görülmüştür (p=0,023). Ancak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı değildir (p>0,05).

66. Uzun süreli heterosiklik amin alan fareler için elde edilen protein miktarlarında gruplar arasında farklılık bulunduğu görülmüştür ($p=0,027$). Ancak kontrol grubuna göre anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).
67. Aort dokusundaki VCAM-1 için her grubun ekspresyon düzeyi en düşük ekspresyona sahip olan gruba göre (PMu) relatif olarak hesaplanmıştır. Kısa süreli heterosiklik amin alan gruplarda mRNA ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p=0,022$). Ancak kontrol grubu ($98,7\pm 1,82$) ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda PhIP ($91,0\pm 5,99$), MeIQx ($204,6\pm 2,51$) grupları ile PhIP ve MeIQx ($161,3\pm 3,24$) grubu için istatistiksel fark bulunmamıştır ($p>0,05$).
68. Uzun süreli heterosiklik amin alan grupların VCAM-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin de farklı olduğu bulunmuştur ($p=0,015$). Fakat PhIP ($167,6\pm 2,73$), MeIQx ($114,2\pm 1,21$), PhIP ve MeIQx ($1,0\pm 0,10$) gruplarının ekspresyon düzeyi kontrol grubu ($143,3\pm 0,88$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).
69. Aort dokusundaki ICAM-1 için her grubun ekspresyon düzeyi en düşük ekspresyona sahip olan gruba (PMu) göre relatif olarak hesaplanmıştır. Kısa süreli heterosiklik amin alan gruplarda mRNA ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p=0,032$). Ancak kontrol grubu ($6,4\pm 0,64$) ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda PhIP ($2,6\pm 0,29$), MeIQx ($2,0\pm 0,44$) grupları ile PhIP ve MeIQx ($16,2\pm 0,58$) grubu için istatistiksel fark bulunmamıştır ($p>0,05$).
70. Uzun süreli heterosiklik amin alan grupların ICAM-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin farklı olduğu bulunmuştur ($p=0,025$). Fakat PhIP ($18,5\pm 0,20$), MeIQx ($11,5\pm 1,79$), PhIP ve MeIQx ($1,0\pm 0,12$) gruplarının ekspresyon düzeyi kontrol grubu ($11,1\pm 1,43$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).
71. Uzun süreli yüksek yağlı ve kolesterole ek olarak kısa süreli heterosiklik amin alan farelerde aortta aterosklerotik plak veya aterom oluşmadığı görülmüştür.
72. Kısa süre ile PhIP türü heterosiklik amin alan farelerde diğer gruplardan farklı olarak aort duvarındaki bazı düz kas hücrelerinde farklılaşmayı işaret eden birtakım değişiklikler olduğu bulunmuştur. Bu hücresel düzeydeki değişikliklerin hücre çekirdeklerinde büyüme ve nükleollerde belirginleşme şeklinde olduğu gözlenmiştir.

73. Uzun süreli yüksek yağlı ve kolesterole ek olarak uzun süreli heterosiklik amin alan farelerde aortta aterosklerotik plak veya aterom oluşmadığı görülmüştür.
74. Kısa süre ile PhIP türü heterosiklik amin alan grupta görülen hücresel farklılaşma durumu uzun süre PhIP türü heterosiklik amin alan fareler de dahil olmak üzere hiçbir grupta görülmemiştir.

6.2. Öneriler

Çalışmadan elde edilen sonuçlar ile laboratuvar hayvanlarında (kemirgenler) diyetle yüksek miktarda heterosiklik aminlerin uzun süreli tüketiminin kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasında olası etkileri ve altında yatan mekanizmalara dair bilgi sağlanmıştır.

Bu çalışmada farelerin bir kısmı yüksek yağlı ve kolesterollü diyetle (20 w/w doymuş yağ asitleri, 0,2 w/w kolesterol) ek olarak heterosiklik amin türleri (10 mg/kg -PhIP ve/veya MeIQx) almıştır. Diyetle doymuş yağ asitleri alımının artması özellikle kardiyometabolik hastalıkların riskini arttırmaktadır. Bu nedenle diyetle alınan yağ miktarının toplam enerjinin %25-30'undan gelmesi, alınan doymuş yağ asitlerinin %5-6'nın altında olması (uygulanamadığı durumlarda <%10 kabul edilebilir) ve diyetin kolesterol içeriğinin sağlıklı bireyler için 300 mg/gün düzeyinin altında olması gerekmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre artmış heterosiklik amin tüketiminin dislipidemi, endotel disfonksiyon ve ateroskleroz ile ilgili parametrelerden bazılarını olumlu etkileyebileceği saptanmıştır. Ancak diyetle uzun süre alınan heterosiklik aminlerin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki olası azaltıcı etkilerinin yanında bu diyet bileşeninin vücutta meydana getirdiği diğer etkilerin (DNA katımı, karsinojenik/mutajenik etkileri, inflamasyon artışı... vb) de göz önüne alınarak diyetle alımının sınırlandırılmasının uygun olduğu düşünülmektedir. Diyetle en çok protein içeriği yüksek besinlerde kuru ısıda pişirme yöntemleriyle oluştuğu bilinen heterosiklik aromatik aminlerin alımının azaltılması için heterosiklik oluşumu açısından riskli besinlerin pişirilirken kavurma, kızartma, ızgara gibi yöntemler yerine haşlama, buğulama yöntemlerinin tercih edilmesi, besinlerin çok uzun sürelerde yüksek ısı ile muamele edilmemesi ve yanmış besinlerin tüketilmemesi sağlığın geliştirilmesi için önem arz etmektedir.

İnsanlar ve fareler arasında bulunan fizyolojik farklılıklardan dolayı bu çalışmanın sonuçlarına göre insanlar için heterosiklik alım miktarına özel bir öneri geliştirilmesi mümkün değildir. Ayrıca insanlar için öneri geliştirilirken diyetin yalnızca besin ögeleri içeriği değil; heterosiklik aminlerin metabolizmasını veya kardiyovasküler hastalık risk faktörlerini etkileyebilecek posa, fitokimyasallar gibi diğer diyet bileşenleri de değerlendirilmelidir. Fakat yapılacak yeni hayvan veya insan çalışmaları için altyapı niteliği taşıyan bu çalışma, yeni çalışmaların planlanması için veri sunmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma ile bir diyet bileşeni olan heterosiklik aminlerin kardiyovasküler risk faktörleri üzerindeki akut ve kronik etkilerinin farklı olabileceği gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında; örneklem sayısının daha fazla, maruziyet süresinin daha uzun olduğu, farelerin kan parametrelerinin çalışma boyunca incelendiği, nutrigenetik kodlanmaların analiz edildiği kapsamlı çalışmalar yapılması önerisi getirilebileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. World Health Organisation. Global status report on noncommunicable diseases. 2014.
2. Ritchie SA, Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2007;17(4):319-26.
3. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36.
4. Lundberg JO, Gladwin MT, Weitzberg E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(9):623-41.
5. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*. 2001;276(18):14533-6.
6. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;196(2):193-222.
7. Barthelmes J, Nagele MP, Ludovici V, Ruschitzka F, Sudano I, Flammer AJ. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease and Flammer syndrome-similarities and differences. *EPMA J*. 2017;8(2):99-109.
8. Paudel KR, Panth N, Kim DW. Circulating endothelial microparticles: a key hallmark of atherosclerosis progression. *Scientifica (Cairo)*. 2016;2016:8514056.
9. Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C. Atherosclerosis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Med Sci Monit*. 2004;10(11):RA255-60.
10. Guerrini V, Gennaro ML. Foam cells: one size doesn't fit all. *Trends Immunol*. 2019;40(12):1163-79.
11. Sanz Alaejos M, Ayala JH, Gonzalez V, Afonso AM. Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;862(1-2):15-42.
12. Skog K. Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(8):1197-203.
13. Sinha R, Rothman N, Salmon CP, Knize MG, Brown ED, Swanson CA, et al. Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings. *Food Chem Toxicol*. 1998;36(4):279-87.
14. Alaejos MS, Afonso AM. Factors That affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2011;10(2):52-108.
15. Keating GA, Bogen KT. Estimates of heterocyclic amine intake in the US population. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;802(1):127-33.
16. Bogen KT, Keating GA. U.S. dietary exposures to heterocyclic amines. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2001;11(3):155-68.

17. Nakai Y, Nelson WG, De Marzo AM. The dietary charred meat carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine acts as both a tumor initiator and promoter in the rat ventral prostate. *Cancer Res.* 2007;67(3):1378-84.
18. Ferguson LR, Philpott M. Nutrition and mutagenesis. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:313-29.
19. Yun CH, Jung U, Son CG, Ju HR, Han SH. 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1), a food-born carcinogenic heterocyclic amine, promotes nitric oxide production in murine macrophages. *Toxicol Lett.* 2006;161(1):18-26.
20. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2019;140(11):e596-e646.
21. Kim K, Vance TM, Chun OK. Greater Total antioxidant capacity from diet and supplements is associated with a less atherogenic blood profile in U.S. adults. *Nutrients.* 2016;8(1).
22. Moinuddin A, Gupta R, Saxena Y. Assessment of Anthropometric Indices, Salt Intake and Physical Activity in the Aetiology of Prehypertension. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(2):CC11-4.
23. Burstyn I, Kromhout H, Partanen T, Svane O, Langard S, Ahrens W, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and fatal ischemic heart disease. *Epidemiology.* 2005;16(6):744-50.
24. Ramos KS, Moorthy B. Bioactivation of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens within the vascular wall: implications for human atherogenesis. *Drug Metab Rev.* 2005;37(4):595-610.
25. Bylsma LC, Alexander DD. A review and meta-analysis of prospective studies of red and processed meat, meat cooking methods, heme iron, heterocyclic amines and prostate cancer. *Nutr J.* 2015;14:125.
26. Rohrmann S, Zoller D, Hermann S, Linseisen J. Intake of heterocyclic aromatic amines from meat in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heidelberg cohort. *Br J Nutr.* 2007;98(6):1112-5.
27. Takahashi S, Imaida K, Shirai T, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T, et al. Chronic administration of the mutagenic heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine induces cardiac damage with characteristic mitochondrial changes in Fischer rats. *Toxicol Pathol.* 1996;24(3):273-7.
28. Turesky RJ, Le Marchand L. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(8):1169-214.
29. Lopez-Mendez C, Bermudez-Fajardo A, Ioannides C, Oviedo-Orta E. Effect of 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AαC), a carcinogenic heterocyclic amine present in food, on atherosclerotic plaque development in apoE deficient mice. *Toxicol Lett.* 2009;185(2):73-8.

30. Davis CD, Farb A, Thorgeirsson SS, Virmani R, Snyderwine EG. Cardiotoxicity of heterocyclic amine food mutagens in cultured myocytes and in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1994;124(2):201-11.
31. Isimura Y, Watanabe H, Kato N, Yanagita T, Wakabayashi K. Hypertriglyceridemia in rats induced by consumption of a food-derived carcinogen, 2-amino-1-methylphenylimidazo[4,5b]pyridine (PhIP). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1999;63(9):1634-6.
32. World Health Organization. *Noncommunicable Diseases Progress Monitor*. Geneva; 2017.
33. World Health Organisation. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2017. [Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))].
34. Değer O. *Lipidlerin Taşınması ve Depolanması*. 2. basım. Taner Onat KE, Eser Y. Sönmez, Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
35. Lippincott. *Biyokimya*. 3. basım. Harvey R, Champe, P., Nobel Tıp Kitabevi; 2007.
36. Grundy SM. Small LDL, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Circulation*. 1997;95(1):1-4.
37. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):168-75.
38. Mahdi A, Kovamees O, Pernow J. Improvement in endothelial function in cardiovascular disease - Is arginase the target? *International Journal of Cardiology*. 2019.
39. Speer T, Rohrer L, Blyszczuk P, Shroff R, Kuschnerus K, Krankel N, et al. Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of Toll-like receptor-2. *Immunity*. 2013;38(4):754-68.
40. Seravalle G, Grassi G. Obesity and hypertension. *Pharmacol Res*. 2017;122:1-7.
41. Niu C, Wang X, Zhao M, Cai T, Liu P, Li J, et al. Macrophage foam cell-derived extracellular vesicles promote vascular smooth muscle cell migration and adhesion. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(10).
42. Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J Biomed Sci*. 2012;19:22.
43. Abu-Saleh N, Aviram M, Hayek T. Aqueous or lipid components of atherosclerotic lesion increase macrophage oxidation and lipid accumulation. *Life Sciences*. 2016.
44. Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res*. 2012;111(2):245-59.
45. Aaron KJ, Sanders PW. Role of dietary salt and potassium intake in cardiovascular health and disease: a review of the evidence. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(9):987-95.

46. Mozaffarian D, Fahimi S, Singh GM, Micha R, Khatibzadeh S, Engell RE, et al. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2014;371(7):624-34.
47. Filippini T, Violi F, D'Amico R, Vinceti M. The effect of potassium supplementation on blood pressure in hypertensive subjects: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cardiology*. 2017;230:127-35.
48. Riphagen IJ, Gijsbers L, van Gastel MD, Kema IP, Gansevoort RT, Navis G, et al. Effects of potassium supplementation on markers of osmoregulation and volume regulation: results of a fully controlled dietary intervention study. *J Hypertens*. 2016;34(2):215-20.
49. Zhu Y, Bo Y, Liu Y. Dietary total fat, fatty acids intake, and risk of cardiovascular disease: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *Lipids in Health and Disease*. 2019;18(1):91.
50. Erickson J, Sadeghirad B, Lytvyn L, Slavin J, Johnston BC. The Scientific Basis of Guideline Recommendations on Sugar Intake: A Systematic Review. *Ann Intern Med*. 2017;166(4):257-67.
51. He FJ, Li J, Macgregor GA. Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ (Clinical research ed)*. 2013;346:f1325.
52. O'Donnell M, Mente A, Rangarajan S, McQueen MJ, Wang X, Liu L, et al. Urinary sodium and potassium excretion, mortality, and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2014;371(7):612-23.
53. Mente A, O'Donnell M, Rangarajan S, Dagenais G, Lear S, McQueen M, et al. Associations of urinary sodium excretion with cardiovascular events in individuals with and without hypertension: a pooled analysis of data from four studies. *Lancet*. 2016;388(10043):465-75.
54. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107(3):499-511.
55. Volk BM, Kunces LJ, Freidenreich DJ, Kupchak BR, Saenz C, Artistizabal JC, et al. Effects of step-wise increases in dietary carbohydrate on circulating saturated Fatty acids and palmitoleic Acid in adults with metabolic syndrome. *PloS One*. 2014;9(11):e113605.
56. Chan HT, Chan YH, Yiu KH, Li SW, Tam S, Lau CP, et al. Worsened arterial stiffness in high-risk cardiovascular patients with high habitual carbohydrate intake: a cross-sectional vascular function study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14:24.
57. Sasakabe T, Haimoto H, Umegaki H, Wakai K. Association of decrease in carbohydrate intake with reduction in abdominal fat during 3-month moderate low-carbohydrate

- diet among non-obese Japanese patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2015;64(5):618-25.
58. Pastore RL, Brooks JT, Carbone JW. Paleolithic nutrition improves plasma lipid concentrations of hypercholesterolemic adults to a greater extent than traditional heart-healthy dietary recommendations. *Nutrition Research* (New York, NY). 2015;35(6):474-9.
 59. Gower BA, Chandler-Laney PC, Ovalle F, Goree LL, Azziz R, Desmond RA, et al. Favourable metabolic effects of a eucaloric lower-carbohydrate diet in women with PCOS. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(4):550-7.
 60. Tay J, Luscombe-Marsh ND, Thompson CH, Noakes M, Buckley JD, Wittert GA, et al. Response to comment on Tay et al. A very low-carbohydrate, low-saturated fat diet for type 2 diabetes management: a randomized trial. *Diabetes Care* 2014;37:2909-2918. *Diabetes Care*. 2015;38(4):e65-6.
 61. Due A, Toubro S, Skov AR, Astrup A. Effect of normal-fat diets, either medium or high in protein, on body weight in overweight subjects: a randomised 1-year trial. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28(10):1283-90.
 62. Bazzano LA, Hu T, Reynolds K, Yao L, Bunol C, Liu Y, et al. Effects of low-carbohydrate and low-fat diets: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2014;161(5):309-18.
 63. Hu T, Bazzano LA. The low-carbohydrate diet and cardiovascular risk factors: evidence from epidemiologic studies. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2014;24(4):337-43.
 64. Zazpe I, Santiago S, Gea A, Ruiz-Canela M, Carlos S, Bes-Rastrollo M, et al. Association between a dietary carbohydrate index and cardiovascular disease in the SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) Project. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2016;26(11):1048-56.
 65. Seidelmann SB, Claggett B, Cheng S, Henglin M, Shah A, Steffen LM, et al. Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. *Lancet Public Health*. 2018;3(9):e419-e28.
 66. Keys A, Anderson JT, Grande F. Prediction of serum-cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. *Lancet*. 1957;273(7003):959-66.
 67. Longhi R, Almeida RF, Pettenuzzo LF, Souza DG, Machado L, Quincozes-Santos A, et al. Effect of a trans fatty acid-enriched diet on mitochondrial, inflammatory, and oxidative stress parameters in the cortex and hippocampus of Wistar rats. *European Journal of Nutrition*. 2018;57(5):1913-24.
 68. Sverdlov AL, Elezaby A, Qin F, Behring JB, Luptak I, Calamaras TD, et al. Mitochondrial reactive oxygen species mediate cardiac structural, functional, and mitochondrial consequences of diet-induced metabolic heart disease. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(1).
 69. Ruparelia N, Chai JT, Fisher EA, Choudhury RP. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(5):314.

70. Guasch-Ferre M, Babio N, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Ros E, Martin-Pelaez S, et al. Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(6):1563-73.
71. Dow CA, Stauffer BL, Greiner JJ, DeSouza CA. Influence of habitual high dietary fat intake on endothelium-dependent vasodilation. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2015;40(7):711-5.
72. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res.* 2005;97(5):e53-9.
73. Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, Halwachs-Baumann G, Boehm BO, Winkelmann BR, et al. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem.* 2007;53(2):273-83.
74. Willett WC. Dietary fats and coronary heart disease. *J Intern Med.* 2012;272(1):13-24.
75. Temple NJ. Fat, sugar, whole grains and heart disease: 50 years of confusion. *Nutrients.* 2018;10(1).
76. Dehghan M, Mente A, Zhang X, Swaminathan S, Li W, Mohan V, et al. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet.* 2017;390(10107):2050-62.
77. Clifton PM, Bastiaans K, Keogh JB. High protein diets decrease total and abdominal fat and improve CVD risk profile in overweight and obese men and women with elevated triacylglycerol. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases.* 2009;19(8):548-54.
78. Haring B, Gronroos N, Nettleton JA, von Ballmoos MC, Selvin E, Alonso A. Dietary protein intake and coronary heart disease in a large community based cohort: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study [corrected]. *PloS One.* 2014;9(10):e109552.
79. Budhathoki S, Sawada N, Iwasaki M, Yamaji T, Goto A, Kotemori A, et al. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality in a Japanese cohort. *Jama Intern Med.* 2019;179(11):1509-18.
80. Martinez-Gonzalez MA, Sanchez-Tainta A, Corella D, Salas-Salvado J, Ros E, Aros F, et al. A provegetarian food pattern and reduction in total mortality in the Prevencion con Dieta Mediterranea (PREDIMED) study. *Am J Clin Nutr.* 2014;100 Suppl 1:320S-8S.
81. Tharrey M, Mariotti F, Mashchak A, Barbillon P, Delattre M, Fraser GE. Patterns of plant and animal protein intake are strongly associated with cardiovascular mortality: the Adventist Health Study-2 cohort. *Int J Epidemiol.* 2018;47(5):1603-12.

82. Song M, Fung TT, Hu FB, Willett WC, Longo VD, Chan AT, et al. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality. *JAMA Intern Med.* 2016;176(10):1453-63.
83. Rice BH, Cifelli CJ, Pikosky MA, Miller GD. Dairy components and risk factors for cardiometabolic syndrome: recent evidence and opportunities for future research. *Adv Nutr.* 2011;2(5):396-407.
84. Tahavorgar A, Vafa M, Shidfar F, Gohari M, Heydari I. Beneficial effects of whey protein preloads on some cardiovascular diseases risk factors of overweight and obese men are stronger than soy protein preloads – A randomized clinical trial. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism.* 2015;2(3):69-75.
85. Pal S, Radavelli-Bagatini S. The effects of whey protein on cardiometabolic risk factors. *Obes Rev.* 2013;14(4):324-43.
86. Zambrowicz A, Dabrowska A, Bobak L, Szoltysik M. Egg yolk proteins and peptides with biological activity. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2014;68:1524-9.
87. Ryan JT, Ross RP, Bolton D, Fitzgerald GF, Stanton C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients.* 2011;3(9):765-91.
88. Malaguti M, Dinelli G, Leoncini E, Bregola V, Bosi S, Cicero AF, et al. Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014;15(11):21120-35.
89. Lule VK, Garg S, Pophaly SD, Hitesh, Tomar SK. "Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide". *J Food Sci.* 2015;80(3):R485-94.
90. EFSA Panel on Dietetic Products N, Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to bonito protein peptide and maintenance of normal blood pressure (ID 1716) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal.* 2010;8(10):1730.
91. Food and Drug Administration. A food labeling guide: guidance for industry. College Park: FDA. 2013.
92. Dahl WJ, Foster LM, Tyler RT. Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *Br J Nutr.* 2012;108 Suppl 1:S3-10.
93. Ruiz Ruiz JC, Betancur Ancona DA, Segura Campos MR. Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential. *Nutr Hosp.* 2014;29(4):776-84.
94. Glier MB, Green TJ, Devlin AM. Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(1):172-82.
95. Baggott JE, Tamura T. Homocysteine, iron and cardiovascular disease: a hypothesis. *Nutrients.* 2015;7(2):1108-18.
96. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J.* 2015;14:6.

97. EFSA Panel on Dietetic Products N, Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to taurine and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 612, 1658, 1959), energy-yielding metabolism (ID 614), and delay in the onset of fatigue and enhancement of physical performance (ID 1660) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*. 2009;7(10):1260.
98. Murakami S. Taurine and atherosclerosis. *Amino Acids*. 2014;46(1):73-80.
99. Zulli A. Taurine in cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(1):57-60.
100. Yang Y, Wu Z, Meininger CJ, Wu G. L-Leucine and NO-mediated cardiovascular function. *Amino Acids*. 2015;47(3):435-47.
101. Krzysciak W. Activity of selected aromatic amino acids in biological systems. *Acta Biochim Pol*. 2011;58(4):461-6.
102. Goshima Y, Nakamura F, Masukawa D, Chen S, Koga M. Cardiovascular actions of DOPA mediated by the gene product of ocular albinism 1. *J Pharmacol Sci*. 2014;126(1):14-20.
103. van Tienhoven-Wind LJ, Dullaart RP. Low-normal thyroid function and novel cardiometabolic biomarkers. *Nutrients*. 2015;7(2):1352-77.
104. Lubrano V, Balzan S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J Exp Med*. 2015;5(4):218-24.
105. Wilson A, McLean C, Kim RB. Trimethylamine-N-oxide: a link between the gut microbiome, bile acid metabolism, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(2):148-54.
106. Turesky RJ. Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis. *Drug Metab Rev*. 2002;34(3):625-50.
107. Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*. 2004;95(4):290-9.
108. N AL, Carbonero F. Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: Current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(3):474-87.
109. Godfray HCJ, Aveyard P, Garnett T, Hall JW, Key TJ, Lorimer J, et al. Meat consumption, health, and the environment. *Science*. 2018;361(6399).
110. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous update project expert report: Meat, fish and dairy products and the risk of cancer. 2018.
111. Alisson-Silva F, Kawanishi K, Varki A. Human risk of diseases associated with red meat intake: Analysis of current theories and proposed role for metabolic incorporation of a non-human sialic acid. *Molecular Aspects of Medicine*. 2016;51:16-30.

112. Dellavalle CT, Xiao Q, Yang G, Shu XO, Aschebrook-Kilfoy B, Zheng W, et al. Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai Women's Health Study. *Int J Cancer*. 2014;134(12):2917-26.
113. Catsburg CE, Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castela JE, Cortessis VK, Pike MC, et al. Dietary sources of N-nitroso compounds and bladder cancer risk: findings from the Los Angeles bladder cancer study. *Int J Cancer*. 2014;134(1):125-35.
114. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem*. 2002;50(17):4998-5006.
115. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472(7341):57-63.
116. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(5):576-85.
117. Richter CK, Skulas-Ray AC, Champagne CM, Kris-Etherton PM. Plant protein and animal proteins: do they differentially affect cardiovascular disease risk? *Adv Nutr*. 2015;6(6):712-28.
118. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, et al. Gut microbial metabolite tmao enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell*. 2016;165(1):111-24.
119. Seldin MM, Meng Y, Qi H, Zhu W, Wang Z, Hazen SL, et al. Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor-kappaB. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(2).
120. Wick AF, Haus NW, Sukkariyah BF, Haering KC, Daniels WL. Remediation of PAH-contaminated soils and sediments: A literature review. CSES Department, Internal Research Document. 2011;102.
121. Wild SR, Jones KC. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ Pollut*. 1995;88(1):91-108.
122. Leníček J, Sekyra M, Pandey P, Čitková M, Beneš I, Novotná J, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons at 'program Teplice' sites in the Czech Republic. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 1997;58(1-4):25-32.
123. Prabhu Y, Phale P. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;61(4):342-51.
124. Lundstedt S, White PA, Lemieux CL, Lynes KD, Lambert IB, Öberg L, et al. Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. 2007;36(6):475-86.

125. Fismes J, Perrin-Ganier C, Empereur-Bissonnet P, Morel JL. Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *J Environ Qual*. 2002;31(5):1649-56.
126. Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final. 2002.
127. Caballero B, Trugo LC, Finglas PM. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*: Academic; 2003.
128. Holme JA, Brinchmann BC, Refsnes M, Lag M, Ovrevik J. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons as mediators of cardiovascular effects from combustion particles. *Environ Health*. 2019;18(1):74.
129. Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian soil quality guidelines for carcinogenic and other polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs): Environmental and human health effects: Scientific Supporting Document:2008.
130. United States Department of Health Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry-ATSDR. 1999.
131. Kim KH, Jahan SA, Kabir E, Brown RJ. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int*. 2013;60:71-80.
132. World Health Organisation. International programme on chemical safety. 2009.
133. Srogi K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environ Chem Lett*. 2007;5(4):169-95.
134. Dubuisson JG, Murph WS, Griffin SR, Gaubatz JW. Cytosolic enzymes from rat tissues that activate the cooked meat mutagen metabolite N-Hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (N-OH-PhIP). *J Nutr Biochem*. 2001;12(9):518-28.
135. Nagao M, Honda M, Seino Y, Yahagi T, Sugimura T. Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Letters*. 1977;2(4-5):221-6.
136. Kim D, Guengerich FP. Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:27-49.
137. Shimada T, Murayama N, Yamazaki H, Tanaka K, Takenaka S, Komori M, et al. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aryl and heterocyclic amines by human cytochromes P450 2A13 and 2A6. *Chem Res Toxicol*. 2013;26(4):529-37.
138. Costa S, Pinto D, Morais A, Vasconcelos A, Oliveira J, Lopes C, et al. Acetylation genotype and the genetic susceptibility to prostate cancer in a southern European population. *Prostate*. 2005;64(3):246-52.
139. Krul C, Luiten-Schuite A, Baandagter R, Verhagen H, Mohn G, Feron V, et al. Application of a dynamic in vitro gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(9):783-92.

140. Rumney CJ, Rowland IR, O'Neill IK. Conversion of IQ to 7-OHIQ by gut microflora. *Nutr Cancer*. 1993;19(1):67-76.
141. Knasmuller S, Steinkellner H, Hirschl AM, Rabot S, Nobis EC, Kassie F. Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutation Research*. 2001;480-481:129-38.
142. Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson JA, Nord CE, Rafter J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutation Research*. 1994;311(2):239-48.
143. Zhang J, Empl MT, Schwab C, Fekry MI, Engels C, Schneider M, et al. Gut microbial transformation of the dietary imidazoquinoline mutagen melqx reduces its cytotoxic and mutagenic potency. *Toxicol Sci*. 2017;159(1):266-76.
144. Zhang J, Empl MT, Schneider M, Schroder B, Stadnicka-Michalak J, Breves G, et al. Gut microbial transformation of the dietary mutagen MelQx may reduce exposure levels without altering intestinal transport. *Toxicol In Vitro*. 2019;59:238-45.
145. Vanhaecke L, Vercruyse F, Boon N, Verstraete W, Cleenwerck I, De Wachter M, et al. Isolation and characterization of human intestinal bacteria capable of transforming the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(5):1469-77.
146. Fekry MI, Engels C, Zhang J, Schwab C, Lacroix C, Sturla SJ, et al. The strict anaerobic gut microbe *Eubacterium hallii* transforms the carcinogenic dietary heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Environ Microbiol Rep*. 2016;8(2):201-9.
147. Vanhaecke L, Knize MG, Noppe H, De Brabander H, Verstraete W, Van de Wiele T. Intestinal bacteria metabolize the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine following consumption of a single cooked chicken meal in humans. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(1):140-8.
148. Kaderlik KR, Mulder GJ, Turesky RJ, Lang NP, Teitel CH, Chiarelli MP, et al. Glucuronidation of N-hydroxy heterocyclic amines by human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*. 1994;15(8):1695-701.
149. Kassie F, Rabot S, Kundi M, Chabicovsky M, Qin HM, Knasmuller S. Intestinal microflora plays a crucial role in the genotoxicity of the cooked food mutagen 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis*. 2001;22(10):1721-5.
150. Humblot C, Combourieu B, Vaisanen ML, Furet JP, Delort AM, Rabot S. 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy-based studies of the metabolism of food-borne carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline by human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(9):5116-23.
151. Beer F, Ubat F, Steck J, Huch M, Bunzel D, Bunzel M, et al. Metabolism of foodborne heterocyclic aromatic amines by *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. *J Agric Food Chem*. 2017;65(32):6797-811.

152. Beer F, Urbat F, Franz C, Huch M, Kulling SE, Bunzel M, et al. The human fecal microbiota metabolizes foodborne heterocyclic aromatic amines by reuterin conjugation and further transformations. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(10):e1801177.
153. Turesky RJ, Vouros P. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts in vitro and in vivo. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;802(1):155-66.
154. Bessette EE, Goodenough AK, Langouet S, Yasa I, Kozekov ID, Spivack SD, et al. Screening for DNA adducts by data-dependent constant neutral loss-triple stage mass spectrometry with a linear quadrupole ion trap mass spectrometer. *Anal Chem*. 2009;81(2):809-19.
155. Pezdirc M, Zegura B, Filipic M. Genotoxicity and induction of DNA damage responsive genes by food-borne heterocyclic aromatic amines in human hepatoma HepG2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2013;59:386-94.
156. Dumont J, Josse R, Lambert C, Antherieu S, Le Hegarat L, Aninat C, et al. Differential toxicity of heterocyclic aromatic amines and their mixture in metabolically competent HepaRG cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;245(2):256-63.
157. Cruz-Hernandez A, Agim ZS, Montenegro PC, McCabe GP, Rochet JC, Cannon JR. Selective dopaminergic neurotoxicity of three heterocyclic amine subclasses in primary rat midbrain neurons. *Neurotoxicology*. 2018;65:68-84.
158. Song D, Guo R, Huang H, Zheng P, Huang H, Oyang Q, et al. 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline alters autophagosome maturation, cellular lipidomic profiles, and expression of core pluripotent factors. *J Agric Food Chem*. 2019;67(28):7977-85.
159. Enokizono J, Kusahara H, Ose A, Schinkel AH, Sugiyama Y. Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(6):995-1002.
160. Louis ED, Factor-Litvak P, Liu X, Vonsattel JP, Galecki M, Jiang W, et al. Elevated brain harmane (1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole) in essential tremor cases vs. controls. *Neurotoxicology*. 2013;38:131-5.
161. Teunissen SF, Vlaming ML, Rosing H, Schellens JH, Schinkel AH, Beijnen JH. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the analysis of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and its metabolite 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (N-OH-PhIP) in plasma, urine, bile, intestinal contents, faeces and eight selected tissues from mice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(25):2353-62.
162. Griggs AM, Agim ZS, Mishra VR, Tambe MA, Director-Myska AE, Turteltaub KW, et al. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) is selectively toxic to primary dopaminergic neurons in vitro. *Toxicol Sci*. 2014;140(1):179-89.
163. World Health Organisation. International Agency for Research on Cancer. 2016 [Available from: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php].

164. Skog K, Augustsson K, Steineck G, Stenberg M, Jagerstad M. Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. *Food Chem Toxicol.* 1997;35(6):555-65.
165. Tengilimoglu-Metin MM, Hamzalioglu A, Gokmen V, Kizil M. Inhibitory effect of hawthorn extract on heterocyclic aromatic amine formation in beef and chicken breast meat. *Food Res Int.* 2017;99(Pt 1):586-95.
166. Chen J, He Z, Qin F, Chen J, Zeng M. Formation of free and protein-bound heterocyclic amines in roast beef patties assessed by UPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 2017;65(22):4493-9.
167. Gross GA, Turesky RJ, Fay LB, Stillwell WG, Skipper PL, Tannenbaum SR. Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings. *Carcinogenesis.* 1993;14(11):2313-8.
168. Boskovic M, Baltic M. Association between red meat consumption and cancer risk. *Scientific Journal" Meat Technology"*. 2016;57(2):81-8.
169. Vichapong J, Burakham R, Srijaranai S. Air-agitated cloud-point extraction coupled with high-performance liquid chromatography for determination of heterocyclic aromatic amines in smoked sausages. *Food Analytical Methods.* 2017;10(6):1645-52.
170. Shin HS, Strasburg GM, Gray JI. A model system study of the inhibition of heterocyclic aromatic amine formation by organosulfur compounds. *J Agric Food Chem.* 2002;50(26):7684-90.
171. Augustsson K, Skog K, Jägerstad M, Steineck G. Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis.* 1997;18(10):1931-5.
172. Quelhas I, Petisca C, Viegas O, Melo A, Pinho O, Ferreira I. Effect of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef. *Food Chemistry.* 2010;122(1):98-104.
173. Gibis M. Effect of oil marinades with garlic, onion, and lemon juice on the formation of heterocyclic aromatic amines in fried beef patties. *J Agric Food Chem.* 2007;55(25):10240-7.
174. Naccari C, Galceran MT, Moyano E, Cristani M, Siracusa L, Trombetta D. Presence of heterocyclic aromatic amines (HAS) in smoked "Provola" cheese from Calabria (Italy). *Food Chem Toxicol.* 2009;47(2):321-7.
175. Gonzalo-Lumbreras R, Rosales-Conrado N, Leon-Gonzalez ME, Perez-Arribas LV, Polo-Diez LM. Capillary liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection for heterocyclic aromatic amine determination in ready-to-eat food treated with electron-beam irradiation. *J Chromatogr A.* 2010;1217(43):6778-84.
176. Raza A, Shabbir MA, Khan MI, Suleria HAR, Sultan S. Effect of thermal treatments on the formation of heterocyclic aromatic amines in various meats. *Journal of Food Processing and Preservation.* 2015;39(4):376-83.

177. Balogh Z, Gray JI, Gomaa EA, Booren AM. Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food Chem Toxicol.* 2000;38(5):395-401.
178. Szterk A. Heterocyclic aromatic amines in grilled beef: The influence of free amino acids, nitrogenous bases, nucleosides, protein and glucose on HAAs content. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2015;40:39-46.
179. Unal K, Karakaya M, Oz F. The effects of different spices and fat types on the formation of heterocyclic aromatic amines in barbecued sucuk. *J Sci Food Agric.* 2018;98(2):719-25.
180. Oz F. Quantitation of heterocyclic aromatic amines in ready to eat meatballs by ultra fast liquid chromatography. *Food Chem.* 2011;126(4):2010-6.
181. Kizil M, Oz F, Dikmen D, Uyar MF, Besler HT. Determination of heterocyclic aromatic amine content in Turkish meatball dishes. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2013;12(6):705-11.
182. Manabe S, Suzuki H, Wada O, Ueki A. Detection of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in beer and wine. *Carcinogenesis.* 1993;14(5):899-901.
183. Herraiz T. Identification and occurrence of the bioactive β -carbolines norharman and harman in coffee brews. *Food Additives & Contaminants.* 2002;19(8):748-54.
184. Karpavičiūtė D, Murkovic M, Vinauskienė R, Venskutonis R. Determination of non-polar heterocyclic aromatic amines in roasted coffee by SPE-HPLC-FLD. *Chemical Papers.* 2017;71(1):67-70.
185. Krach C, Sontag G. Determination of some heterocyclic aromatic amines in soup cubes by ion-pair chromatography with coulometric electrode array detection. *Analytica Chimica Acta.* 2000;417(1):77-83.
186. Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Johnson VM, Felton JS. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis.* 1995;16(1):39-52.
187. Adamson RH, editor Sixth international conference on carcinogenic/mutagenic N-substituted aryl compounds: conclusions and perspectives. *Mutation Research Forum;* 1997.
188. Carrizo D, Brennan SF, Chevallier OP, Woodside J, Cooper KM, Cantwell MM, et al. Distribution of serum levels of persistent organic pollutants, heterocyclic aromatic amine theoretical intake and nutritional cofactors in a semi-rural island population. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017;24(28):22393-401.
189. Gibis M. Heterocyclic aromatic amines in cooked meat products: Causes, formation, occurrence, and risk assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2016;15(2):269-302.
190. Sinha R, Rothman N, Brown ED, Salmon CP, Knize MG, Swanson CA, et al. High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo- [4,5-

- b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. *Cancer Res.* 1995;55(20):4516-9.
191. Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF. Dietary polyunsaturated fatty acids and composition of human aortic plaques. *Lancet.* 1994;344(8931):1195-6.
 192. Steck SE, Hebert JR. GST polymorphism and excretion of heterocyclic aromatic amine and isothiocyanate metabolites after Brassica consumption. *Environ Mol Mutagen.* 2009;50(3):238-46.
 193. Ferguson LR, Harris PJ. Studies on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer. *Mutation Research.* 1996;350(1):173-84.
 194. Liu G, Zong G, Wu K, Hu Y, Li Y, Willett WC, et al. Meat cooking methods and risk of type 2 diabetes: results from three prospective cohort studies. *Diabetes Care.* 2018;41(5):1049-60.
 195. Rogers LJ, Basnakian AG, Orloff MS, Ning B, Yao-Borengasser A, Raj V, et al. 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b) pyridine (PhIP) induces gene expression changes in JAK/STAT and MAPK pathways related to inflammation, diabetes and cancer. *Nutrition & Metabolism.* 2016;13:54.
 196. Khalil A, Villard PH, Dao MA, Burcelin R, Champion S, Fouchier F, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons potentiate high-fat diet effects on intestinal inflammation. *Toxicol Lett.* 2010;196(3):161-7.
 197. Louis ED, Factor-Litvak P, Gerbin M, Slavkovich V, Graziano JH, Jiang W, et al. Blood harmane, blood lead, and severity of hand tremor: evidence of additive effects. *Neurotoxicology.* 2011;32(2):227-32.
 198. Louis ED, Michalec M, Jiang W, Factor-Litvak P, Zheng W. Elevated blood harmane (1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole) concentrations in Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2014;40:52-6.
 199. Bellamri M, Le Hegarat L, Vernhet L, Baffet G, Turesky RJ, Langouet S. Human T lymphocytes bioactivate heterocyclic aromatic amines by forming DNA adducts. *Environ Mol Mutagen.* 2016;57(9):656-67.
 200. Felton JS, Knize MG, Hatch FT, Tanga MJ, Colvin ME. Heterocyclic amine formation and the impact of structure on their mutagenicity. *Cancer Letters.* 1999;143(2):127-34.
 201. Li R, Tian J, Li W, Xie J. Effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) on histopathology, oxidative stress, and expression of c-fos, c-jun and p16 in rat stomachs. *Food Chem Toxicol.* 2013;55:182-91.
 202. Overvik E, Ochiai M, Hirose M, Sugimura T, Nagao M. The formation of heart DNA adducts in F344 rat following dietary administration of heterocyclic amines. *Mutation Research.* 1991;256(1):37-43.
 203. Snyderwine EG, Schut HA, Sugimura T, Nagao M, Adamson RH. DNA adduct levels of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) in tissues of cynomolgus monkeys after single or multiple dosing. *Carcinogenesis.* 1994;15(12):2757-61.

204. Adamson RH, Thorgeirsson UP. Carcinogens in foods: heterocyclic amines and cancer and heart disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1995;369:211-20.
205. Baranczewski P, Gustafsson JA, Moller L. DNA adduct formation of 14 heterocyclic aromatic amines in mouse tissue after oral administration and characterization of the DNA adduct formed by 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (A α C), analysed by 32P_HPLC. *Biomarkers*. 2004;9(3):243-57.
206. Davis CD, Snyderwine EG. Protective effect of N-acetylcysteine against heterocyclic amine-induced cardiotoxicity in cultured myocytes and in rats. *Food Chem Toxicol*. 1995;33(8):641-51.
207. Yuruk AA, Nergiz-Unal R. Maternal dietary free or bound fructose diversely influence developmental programming of lipogenesis. *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):226.
208. van der Meijden PE, Feijge MA, Swieringa F, Gilio K, Nergiz-Unal R, Hamulyak K, et al. Key role of integrin α (IIb) β (3) signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(20):3481-92.
209. Nergiz-Unal R, Kuijpers MJ, de Witt SM, Heeneman S, Feijge MA, Garcia Caraballo SC, et al. Atheroprotective effect of dietary walnut intake in ApoE-deficient mice: involvement of lipids and coagulation factors. *Thrombosis Research*. 2013;131(5):411-7.
210. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
211. Türk Standartları Enstitüsü. Laboratuvar Hayvanı Yemleri 1991 [Available from: <https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx?>].
212. Kuijpers MJ, Gilio K, Reitsma S, Nergiz-Unal R, Prinzen L, Heeneman S, et al. Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*. 2009;7(1):152-61.
213. Millan J, Pinto X, Munoz A, Zuniga M, Rubies-Prat J, Pallardo LF, et al. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:757-65.
214. Castelli WP, Abbott RD, McNamara PM. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation*. 1983;67(4):730-4.
215. Acay A, Ulu MS, Ahsen A, Ozkececi G, Demir K, Ozuguz U, et al. Atherogenic index as a predictor of atherosclerosis in subjects with familial Mediterranean fever. *Medicina (Kaunas)*. 2014;50(6):329-33.
216. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. *Methods*. 2001;25(4):430-42.

217. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86.
218. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
219. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-5.
220. IBM Corp. SPSS Statistics for Windows. Version 23.0 Armonk, NY: IBM Corp. 2015.
221. GraphPad Prism Software version 8.2.0 for Windows. La Jolla California USA. 2019.
222. Kaviani S, Cooper JA. Appetite responses to high-fat meals or diets of varying fatty acid composition: a comprehensive review. *Eur J Clin Nutr.* 2017;71(10):1154-65.
223. Cong H, Zhong W, Wang Y, Ikuyama S, Fan B, Gu J. Pycnogenol(r) induces browning of white adipose tissue through the pka signaling pathway in apolipoprotein e-deficient mice. *J Diabetes Res.* 2018;2018:9713259.
224. Lee HS, Nam Y, Chung YH, Kim HR, Park ES, Chung SJ, et al. Beneficial effects of phosphatidylcholine on high-fat diet-induced obesity, hyperlipidemia and fatty liver in mice. *Life Sciences.* 2014;118(1):7-14.
225. Paalvast Y, Gerding A, Wang Y, Bloks VW, van Dijk TH, Havinga R, et al. Male apoE*3-Leiden.CETP mice on high-fat high-cholesterol diet exhibit a biphasic dyslipidemic response, mimicking the changes in plasma lipids observed through life in men. *Physiol Rep.* 2017;5(19).
226. Tamer F, Ulug E, Akyol A, Nergiz-Unal R. The potential efficacy of dietary fatty acids and fructose induced inflammation and oxidative stress on the insulin signaling and fat accumulation in mice. *Food Chem Toxicol.* 2019:110914.
227. Dalvi PS, Chalmers JA, Luo V, Han DY, Wellhauser L, Liu Y, et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF-alpha on appetite-regulating NPY neurons. *Int J Obes (Lond).* 2017;41(1):149-58.
228. Shon SM, Jang HJ, Schellingerhout D, Kim JY, Ryu WS, Lee SK, et al. Cytokine response to diet and exercise affects atheromatous matrix metalloproteinase-2/9 activity in mice. *Circ J.* 2017;81(10):1528-36.
229. Huang R, Shi Z, Chen L, Zhang Y, Li J, An Y. Rutin alleviates diabetic cardiomyopathy and improves cardiac function in diabetic ApoEknockout mice. *Eur J Pharmacol.* 2017;814:151-60.
230. Han H, Qiu F, Zhao H, Tang H, Li X, Shi D. Dietary flaxseed oil prevents western-type diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in apolipoprotein-e knockout mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017;2017:3256241.
231. Yan J, Li M, Wang XD, Lu ZY, Ni XL. Peperomin E (PepE) protects against high fat diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (ApoE(-/-)) mice through

- reducing inflammation via the suppression of NLRP3 signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 2018;105:862-9.
232. Park SH, Sung YY, Nho KJ, Kim HK. Protective activity ethanol extract of the fruits of *Illicium verum* against atherogenesis in apolipoprotein E knockout mice. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:232.
 233. Sugie S, Ohnishi M, Ushida J, Yamamoto T, Hara A, Koide A, et al. Effect of alpha-naphthyl isothiocyanate on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in rats. *Int J Cancer*. 2005;115(3):346-50.
 234. Ghoshal A, Preisegger KH, Takayama S, Thorgeirsson SS, Snyderwine EG. Induction of mammary tumors in female Sprague-Dawley rats by the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and effect of dietary fat. *Carcinogenesis*. 1994;15(11):2429-33.
 235. Keys A. Coronary heart disease in seven countries. 1970. *Nutrition*. 1997;13(3):250-2; discussion 49, 3.
 236. Verschuren WM, Jacobs DR, Bloemberg BP, Kromhout D, Menotti A, Aravanis C, et al. Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of the seven countries study. *JAMA*. 1995;274(2):131-6.
 237. Demer LL. Lipid hypothesis of cardiovascular calcification. *Circulation*. 1997;95(2):297-8.
 238. Davignon J. The lipid hypothesis. Pathophysiological basis. *Arch Surg*. 1978;113(1):28-34.
 239. Stipanuk M C, M. Biochemical, physiological and molecular aspects of human nutrition. 3rd ed. New York, ABD: Elsevier; 2013.
 240. Nigro D, Menotti F, Cento AS, Serpe L, Chiazza F, Dal Bello F, et al. Chronic administration of saturated fats and fructose differently affect SREBP activity resulting in different modulation of Nrf2 and Nlrp3 inflammasome pathways in mice liver. *J Nutr Biochem*. 2017;42:160-71.
 241. Zhang H, Temel RE, Martel C. Cholesterol and lipoprotein metabolism: Early Career Committee contribution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(9):1791-4.
 242. Kien CL, Bunn JY, Stevens R, Bain J, Ikayeva O, Crain K, et al. Dietary intake of palmitate and oleate has broad impact on systemic and tissue lipid profiles in humans. *Am J Clin Nutr*. 2014;99(3):436-45.
 243. Tanasescu M, Cho E, Manson JE, Hu FB. Dietary fat and cholesterol and the risk of cardiovascular disease among women with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(6):999-1005.
 244. Zhuang P, Zhang Y, He W, Chen X, Chen J, He L, et al. Dietary fats in relation to total and cause-specific mortality in a prospective cohort of 521 120 individuals with 16 years of follow-up. *Circ Res*. 2019;124(5):757-68.

245. de Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, Kishibe T, et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2015;351:h3978.
246. O'Neil A, Itsiopoulos C. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk. *Ann Intern Med*. 2014;161(6):458.
247. El-Sisi AE, Sokar SS, El-Sayad ME, Moussa EA, Salim EI. Anticancer effect of metformin against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine-induced rat mammary carcinogenesis is through AMPK pathway and modulation of oxidative stress markers. *Hum Exp Toxicol*. 2019;38(6):703-12.
248. Alphonse PA, Ramprasath V, Jones PJ. Effect of dietary cholesterol and plant sterol consumption on plasma lipid responsiveness and cholesterol trafficking in healthy individuals. *Br J Nutr*. 2017;117(1):56-66.
249. Weggemans RM, Zock PL, Katan MB. Dietary cholesterol from eggs increases the ratio of total cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol in humans: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(5):885-91.
250. Howard BV, Van Horn L, Hsia J, Manson JE, Stefanick ML, Wassertheil-Smoller S, et al. Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA*. 2006;295(6):655-66.
251. Berger S, Raman G, Vishwanathan R, Jacques PF, Johnson EJ. Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2015;102(2):276-94.
252. Triglyceride Coronary Disease Genetics C, Emerging Risk Factors C, Sarwar N, Sandhu MS, Ricketts SL, Butterworth AS, et al. Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet*. 2010;375(9726):1634-9.
253. Castelli WP. Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am J Cardiol*. 1992;70(19):3H-9H.
254. Cholesterol Treatment Trialists C, Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*. 2012;380(9841):581-90.
255. RP. M. Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a systematic review and regression analysis. 2016.
256. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Ascherio A, Colditz GA, Speizer FE, et al. Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *Am J Clin Nutr*. 1999;70(6):1001-8.
257. Kelly FD, Sinclair AJ, Mann NJ, Turner AH, Abedin L, Li D. A stearic acid-rich diet improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *Eur J Clin Nutr*. 2001;55(2):88-96.

258. Khaw KT, Sharp SJ, Finikarides L, Afzal I, Lentjes M, Luben R, et al. Randomised trial of coconut oil, olive oil or butter on blood lipids and other cardiovascular risk factors in healthy men and women. *BMJ Open*. 2018;8(3):e020167.
259. Dobiasova M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clin Biochem*. 2001;34(7):583-8.
260. Gershuni VM. Saturated fat: part of a healthy diet. *Current Nutrition Reports*. 2018.
261. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol*. 1997;79(3):350-4.
262. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, et al. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2001;154(2):475-83.
263. Yasue H, Matsuyama K, Matsuyama K, Okumura K, Morikami Y, Ogawa H. Responses of angiographically normal human coronary arteries to intracoronary injection of acetylcholine by age and segment. Possible role of early coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1990;81(2):482-90.
264. Kim F, Pham M, Maloney E, Rizzo NO, Morton GJ, Wisse BE, et al. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(11):1982-8.
265. Handa P, Tateya S, Rizzo NO, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Han CY, et al. Reduced vascular nitric oxide-cGMP signaling contributes to adipose tissue inflammation during high-fat feeding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(12):2827-35.
266. Haliga RE, Iancu RI, Butcovan D, Mocanu V. Flaxseed prevents leukocyte and platelet adhesion to endothelial cells in experimental atherosclerosis by reducing sVCAM-1 and vWF. *Scientific World Journal*. 2013;2013:303950.
267. Chai Y, Yin Z, Fan Q, Zhang Z, Ye K, Xu Y, et al. Protective effects of angong niuhuang pill on early atherosclerosis in apoe(-/-) mice by reducing the inflammatory response. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;2019:9747212.
268. Dietel B, Muench R, Kuehn C, Kerek F, Steinkasserer A, Achenbach S, et al. MCS-18, a natural product isolated from *Helleborus purpurascens*, inhibits maturation of dendritic cells in ApoE-deficient mice and prevents early atherosclerosis progression. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):263-72.