

T.C.

GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TIBBİ BİYOKİMYA SERVİSİ

SERUM FORMAT DÜZEYİNİN SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜM YÖNTEMİNİN
OPTİMİZASYONU VE PARKİNSON HASTALARININ TEK KARBON
METABOLİZMASININ DEĞERLENDİRİLMESİNDE SERUM FORMAT
KONSANTRASYONUNUN YERİNİN İNCELENMESİ

Ali Serdal UYUMAZ
J. Tbp.Kd.Ütğm.

TIBBİ BİYOKİMYA
TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL

2016

T.C.

GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TIBBİ BİYOKİMYA SERVİSİ

SERUM FORMAT DÜZEYİNİN SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜM YÖNTEMİNİN
OPTİMİZASYONU VE PARKİNSON HASTALARININ TEK KARBON
METABOLİZMASININ DEĞERLENDİRİLMESİNDE SERUM FORMAT
KONSANTRASYONUNUN YERİNİN İNCELENMESİ

Ali serdal UYUMAZ

J. Tbp. Kd.Ütğm.

TIBBİ BİYOKİMYA

TIPTA UZMANLIK TEZİ

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi

Tıbbi Biyokimya Servisi İçin Öngördüğü

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI:

Doç. Tbp. Alb. Ömer ÖZCAN

İSTANBUL

2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

TÜRKÇE ÖZET

İNGİLİZCE ÖZET(ABSTRACT)

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

ŞEKİLLER

TABLolar

GİRİŞ

1. Sitoplazmik Folat Araclı Tek Karbon Metabolizması

1.1. Serin-Glisin Dönüşümü

1.2. Histidin Katabolizması

1.3. Timidin Sentezi

1.4. Pürin Sentezi

1.5. Homosistein Remetilasyonu

1.6. Remetilasyon ve Transsülfürasyon Yolaklarının Düzenlenmesi

2. Mitokondriyal Tek Karbon Metabolizması

2.1. Folat Bağımlı Format Üretimi için Kaynaklar

2.1.1. Serin

2.1.2. Kolin

2.1.3. Glisin

2.1.4. Metiyonin

2.2. Folattan Bağımsız Format Metabolizması

2.2.1. Metanol

2.2.2. Triptofan

2.2.3. Kolesterol

2.2.4. Dallı Zincirli Yağ Asitleri

2.2.5. Metiyonin Yolağı

2.2.6. Format Katabolizması

2.2.7.Formatın Toksisitesi

3.Mitokondriyal Tek Karbon Metabolizması ile Parkinson Hastalığının İlişkisi

4.Gereç ve Yöntem

4.2.Biyokimyasal Yöntemler

4.2.1. Serum Folat ve B 12 vitamin Düzeylerinin Ölçümü

4.2.2.Plazma Total Homosistein Düzeyinin Ölçümü

4.2.3.İdrar MMA Düzeyinin Ölçümü

4.2.4.Eritrosit içi Total Folik Asit Ölçümü

4.2.5.Eritrosit içi Ferritin Ölçümü

4.2.6.Serum Demir ve TDBK Ölçümü

4.2.7.Serum Ferritin Ölçümü

4.2.8.Serum Format Analizi

4.2.9.Grady ve ark.larının Yöntemi

4.2.10.Blomne ve ark.larının Format Ölçüm Yöntemi

4.2.11. Optimize Serum Format Ölçüm Yöntemimiz

4.2.12.MTHFR C677T ve MTHFR A1298C Mutasyon Tespiti

4.2.13.İstatistiksel Yöntemler

5.Format Ölçüm Metodunun Optimizasyon Çalışma Sonuçları

5.1.Doğrusallık

5.2.Geri Kazanım

5.3.Örnek Hacminin Optimizasyonu

5.4.Ön işlem Basamağının Optimizasyonu

5.5.NAD ve FDH Final Konsantrasyon Optimizasyonu

5.6.En Düşük Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti

5.7.Tekrarlanabilirlik

TARTIŞMA

KAYNAKLAR

SİMGELER VE KISALTMALAR

N⁵,N¹⁰-MIn-THF: N⁵,N¹⁰ Metilen Tetrahidrofolat

N⁵,N¹⁰-Mni-THF: N⁵,N¹⁰ Metenil Tetrahidrofolat

N⁵-M-THF: N⁵-Metil Tetrahidrofolat

N⁵-F-THF: N⁵-Formil Tetrahidrofolat

N¹⁰-F-THF: N¹⁰-Formil Tetrahidrofolat

BHMT: Betain Homosistein Metil Transferaz Enzimi

CBS: Sstatyonin Beta Sentaz

DHFR: Dihidrofolat Redüktaz

DNA: Deoksiribonükleik Asit

dUMP: Deoksiüridin Monofosfat

dTMP: Deoksi timidin Monofosfat

FiGLU: Formimino Glutamat

GNMT: Glisin-N-Metil Transferaz

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı
Sıvı Kromatografisi)

Hcy: Homosistein

MT: Metiyonin Transferaz

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotid

FDH: Format Dehidrojenaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Stoplazmik Tek karbon Metabolizması

Şekil 2. THF aracılı Serin-Glisin Dönüşümü

Şekil 3. Histidin Katabolizması

Şekil 4. Timidin Sentezi

Şekil 5. Pürin Sentezinin 3. ve 9. Basamakları

Şekil 6. Homosistein Remetilasyonu

Şekil 7. Mitokondriyal Tek Karbon Metabolizması

Şekil 8. Format

Şekil 9. Format Ölçüm Yöntemi Doğrusallık Çalışması

Şekil 10. Format Ölçüm Yöntemi Örnek Hacminin Optimizasyonu

TABL OLAR DİZİNİ

Tablo 1. Format Ölçüm Yöntemi Recovery Çalışması

Tablo 2.Hasta ve Kontrol Grubu Ortalamaları

Tablo 3. Hasta Grubundaki Ölçüm Parametreleri Arasındaki Korelasyonlar

Tablo 4. Kontrol Grubu Korelasyonları Ölçüm Parametreleri Arasındaki Korelasyonlar

Tablo 5. Recovery Çalışması

Tablo 6.Ön İşlem Basamağının Optimizasyonu



TEŞEKKÜR

Biyokimya Servisi Klinik Şefim Prof.Dz Tb.Kd.Alb. Erdinç ÇAKIR Hocam'a insan kazanma için gösterdiği özveri ve tezim konusundaki destek ve teşviklerinden ötürü saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetli öğretim üyesi ağabeyim Doç.Tbp.Alb. Osman Metin İPÇİOĞLU 'na hayata hep pozitif bakışı ve pozitif duruşu sebebiyle yolumu aydınlattığı için teşekkür ederim.

Tez hocam,ağabeyim Doç.Tbp.Alb. Ömer ÖZCAN'a uzmanlık eğitimim süresince gösterdikleri mesleki örnek duruşları, bilimsel rehberlikleri ve tez sürecindeki sonsuz emekleri için saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetli emektar annem Binnaz UYUMAZa, babam Mehmet UYUMAZ a,eşim Nagehan UYUMAZa ve biricik oğlumuz Ömer Berk UYUMAZa hayatımı kolaylaştırıp bugünlere gelmemdeki katkılarından dolayı teşekkürü borç biliyorum.

Kendisini tanıdığımdan ötürü şanslı hissettiren; kişiliği ve metodolojik bakışı ile kendisini takdir ettiğim kıymetli abim Dr.Recep Soner YEŞİLBAŞ'a ve karşılaştığım zorlukları kolaylaştırdığı ve hiçbir zaman iç huzurunu bozmayıp hep örnek olduğu için Dr. Barış BAHAR'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimde beraber çalışma fırsatı bulduğum ve desteklerini unutmayacağım Dr. Tuba MÜFTÜOĞLU' na, çalışkanlığı ve mükemmel kişiliği ile Serdar HIRA'ya,desteğini hiç esirgemeyen Rıza Aşkın GÜRKAN abime ve donanımı ve yardımseverliği ile Doç.Dr.Erdim SERTOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında destek gördüğüm Biy.Lâle ÖZOĞUL, Biy.Meryem GENÇ, Lab.Zerrin KAVAKLIOĞLU,Lab.Pervin BULDAN ve Biyokimya servisinde görevli tüm personele teşekkür ederim.

ÖZET

Tek karbon metabolizması protein translasyonu, hücre membran akışkanlığı, amino asit sentezi, pürin-pirimidin sentezi, metilasyon gibi hücre için çok önemli reaksiyonları içerir. Folat aracılı aktarılan tek karbonlarla ilerleyen bu reaksiyonların kusursuz biçimde meydana gelmesi hücrelerimiz için kritiktir. Tek karbon metabolizması stoplazmik, mitokondriyal ve nükleer kompartmanlarda ayrı şekillerde gerçekleşmektedir.

Mitokondride tek karbon metabolizmasının amaçlarının biri format üretimidir. Format molekülünün mitokondrideki serin amino asidinin karbon ünitelerini stoplazmaya aktardığı tespit edilmiştir. Format molekülü mitokondriden stoplazmaya aktarılan tek karbon birimlerinin kaynağı konumundadır. Dolayısıyla serum format düzeyleri mitokondriyal tek karbon metabolizması için bir belirteç olarak kabul edilebilir. Serum format ölçüm yöntemlerinden fotometrik olanlar, formatın düşmesinden daha çok yükselmesini tespit edecek şekilde oluşturulmuştur. GC gibi hassas yöntemleri kullanmak ise her laboratuvarında mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla, mitokondriyal tek karbon metabolizmasını değerlendirmede kullanmak için serum format düzeyini ölçmek amacıyla hassas ve her laboratuvarında kullanılabilecek fotometrik esasa dayanan bir yöntem gerekmektedir.

Çalışmamızda fotometrik serum format ölçüm metodunu optimize etmeyi ve bu yöntemi kullanarak Parkinson hastalarındaki tek karbon metabolizmasının değerlendirilmesinde mitokondriyal tek karbon metabolizmasının ürünü olan formatın kan düzeylerini ölçmeyi amaçladık.

60 Parkinson hastalığı teşhisi konmuş ve 60 sağlıklı bireylerden alınan örneklerde tek karbon metabolizması belirteçlerinden serum folat , B12 vitamini, eritrosit içi ferritin, idrar MMA, serum ferritin, TDBK, serum demir, RBC folat, homosistein, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyon testleri ve serum format konsantrasyonları ölçüldü. Serum format ölçümü için optimize edilmiş fotometrik format ölçüm yöntemi kullanıldı.

Fotometrik yöntemin örnek hazırlaması ve reaktif kompozisyonu optimize edilmiş olup, yeni optimize fotometrik format ölçüm yöntemimiz 0-1mM aralığında doğrusal, tekrarlanabilirliği %13,9 ile %20 arasında, geri kazanımı % 84 ile % 92 arasında gerçekleşmiştir. Yöntemimiz 0,05 mM serum format konsantrasyonunu ölçecek kadar hassas bulunmuştur.

Hasta ve kontrol grubundaki yaş ve format konsantrasyonu hariç bütün tek karbon metabolizma belirteçlerinin konsantrasyonlarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışmamızda Parkinson hastalarında serum format düzeyleri ilk kez ölçüldü ve hastalardaki format konsantrasyonu sağlıklı bireylerden oldukça düşük bulundu.(Hasta grubu format konsantrasyon ortalaması $0,414 \pm 0,314$ mM , kontrol grubu format konsantrasyon ortalaması $0,615 \pm 0,267$ mM , $p=0,000$).

Çalışmamızda ilk kez gösterilen Parkinson hastalığındaki belirgin düşük serum format düzeyleri, hastalığın oluşumunda önemli rolü olduğu bildirilen mitokondriyal disfonksiyonun bir sonucu veya sebebi olabilecek mitokondriyal tek karbon metabolizması bozukluğunun göstergesi olabilir. Ayrıca yeni optimize format ölçüm yöntemimiz

kullanılarak mitokondriyal disfonksiyonla suçlanan diğer hastalıklarda da format molekülünün konsantrasyonunun ölçülmesi, bu hastalıkların farklı evrelerindeki format düzeylerinin karşılaştırılması ve diğer tek karbon metabolizmasının aksadığı düşünülen hastalıklarda format ölçümü, bu konudaki bilgilerimize katkıda bulunacaktır.

Anahtar Kelimeler : Format, Tek-karbon metabolizması, Parkinson.

Destekleyen Kurumlar : GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi.

Yazar Adı :Ali Serdal UYUMAZ

Danışman Adı : Ömer ÖZCAN



SUMMARY

One-carbon metabolism involves important cellular reactions such as methylation, protein translation, cell membrane fluidity, amino acid synthesis, purine-pyrimidine synthesis. Proper functioning of folate-mediated one-carbon transfers for these reactions is critical to our cells. One-carbon metabolism is occurred in different ways in cytoplasmic, mitochondrial, and nuclear compartments.

One of the objectives of one-carbon metabolism in mitochondria is the production of formate. Formate has been found to transfer one carbon units from serine amino acid in mitochondria to the cytoplasm. Therefore formate molecule is a source of single carbon units transferred to cytoplasm from mitochondria. Practically serum formate levels were accepted as a marker for the mitochondrial one carbon metabolism. Among serum formate measurement methods, photometric measurement methods have been designed to detect its increases rather than decreases. The usage of sensitive techniques such as GC is not possible in every laboratory. Thus a sensitive and photometric serum formate measurement technique is required for the assessment of mitochondrial one carbon metabolism.

In our study, we aimed to optimize photometric serum formate determination method and by using this technique to measure blood formate levels which are the end product of mitochondrial one carbon metabolism in order to assess one carbon metabolism in patients with Parkinson's disease.

In 60 samples from patients diagnosed as Parkinson's disease and 60 samples from healthy individuals, folate, vitamin B12, erythrocyte ferritin, urinary MMA, serum ferritin, TIBC, serum iron, RBC folate, homocysteine, MTHFR C677T and MTHFR A1298C mutation tests and serum formate concentrations were measured. Optimized photometric measurement method for serum formate was used.

We optimized the sample preparation step and reagent compositions of photometric formate determination method. Our new optimized photometric formate measurement method was linear between 0-1mM formate ranges, reproducibility was between 13.9% and 20%, and recovery was between 84% and 92%. It has enough sensitivity for the low formate concentrations (detection limit; 0,05 mM).

Apart from age and formate concentrations in the patient and control groups the concentrations of all single-carbon metabolism markers were not statistically significantly different. In our study, we measured serum formate levels for the first time in Parkinson's patients and formate concentrations in patients were found significantly lower than in healthy individuals. (patient group formate concentration mean; 0.414 ± 0.314 mM, control group formate concentration mean: 0.615 ± 0.267 mM, $p = 0.000$). In our study, the significantly lower serum formate levels in Parkinson's disease shown for the first time may be a result or cause of the formation of mitochondrial dysfunction reported to play an important role in this disease and also may be an indicator of improper functioning of mitochondrial single carbon metabolism. In addition, by using our new optimized formate measuring method, the measurement of the concentration of the formate molecules in other diseases containing mitochondrial dysfunction, comparing their levels in the different

stages of those diseases and also in other diseases having defective single carbon metabolism might give us important information about the functioning of mitochondrial one carbon metabolism.

Key Words: Formate, One-carbon metabolism, Parkinson.

Supported By : GATA Haydarpasa Training Hospital

Author :Ali Serdal UYUMAZ

Counsellor :Ömer ÖZCAN



GİRİŞ

Çalışmaya, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 29.01.2016 tarihindeki, 149-2-16/1539 sayılı yazılı izne ile başlandı.

Tek karbon metabolizması tek karbon birimlerinin aktarılması ile yüzlerce hayati molekülün sentezini içeren önemli bir metabolizmadır. SAM sentezi ve metilasyon, myelin sentezi, pürin-pirimidin sentezi, hücre membran akışkanlığı gibi önemli reaksiyonları etkileyen tek karbon metabolizması stoplazmada olduğu kadar mitokondride de önemli reaksiyonlar içermektedir.

Mitokondrinin görevlerinden bazıları; formillenmiş metyonil tRNA sentezi, pürin, kolin, histidin katabolizması, ayrıca serin ve glisin birbirine çevrimi olarak sayılabilir. Tek karbon birimlerinin aktarılması ile bu reaksiyonlar meydana gelebilmektedir. Oksidasyon yönünde gelişen reaksiyonlar sonucu mitokondri format üretmektedir ve bu molekül stoplazmadaki tek karbon metabolizması için de hayati bir moleküldür. Üretilen format molekülünün çoğunlukla mitokondri kaynaklı olması ve stoplazmadaki reaksiyonlar içinde formatın önemli bir molekül olması formatı hücre için anahtar bir molekül haline getirmektedir.

Parkinson hastalığının etyolojisi ile ilgili hipotezler arasında mitokondriyal disfonksiyon artık yükses sesle dillendirilmektedir. Mitokondriyal genetik materyalde daha kolay mutasyon oluşabilmesi, çevresel toksinlere duyarlı olması, oksidatif stres mitokondrinin fonksiyonlarını bozmada etken olabilir.

Mitokondrinin temel görevlerinden biri olan format üretimi tek karbon birimlerinin sağlıklı bir şekilde aktarılabilmesi için optimum düzeyde olmalıdır. Mitokondriyal format aynı zamanda stoplazmik tek karbon metabolizmasının sorunsuz çalışması için önemlidir. Etiyolojisinde mitokondriyal disfonksiyonun da etkili olduğu düşünülen Parkinson Hastalığında format üretiminin de etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

GENEL BİLGİLER

Tek karbon metabolizması tek karbon birimlerinin aktarılmasıdır ve bu süreçler insan organizması için hayati öneme sahiptir. Tek karbon aktarım reaksiyonları incelemeden önce onları daha iyi tanımak için keşfedilme süreçlerini incelemek gerekir.

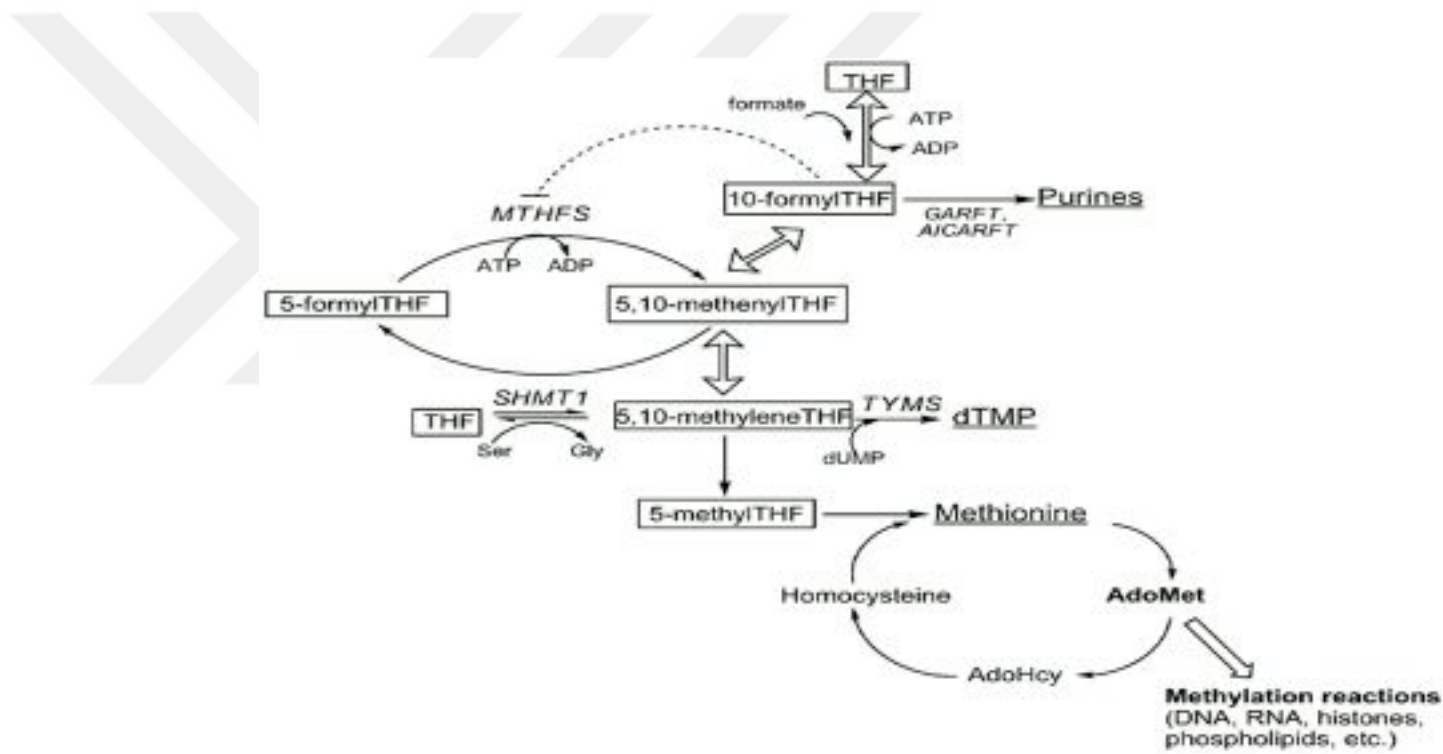
Metilasyon ile ilişkili olan bilgiler moleküllere metil gruplarının eklenebildiğinin gösterilmesi ile başlamıştır. 1890 yılında Wilhelm His piridin verilen kopeklerinin idrarında n-metilpiridin tespit etmiştir(1) . 1930'larda Vincent du Vigneaud, metiyonin aminoasitindeki sülfür atomunun "sülfür aktarımı yolağı" ile sisteine aktarıldığı bu aktarımın metiyonin, kolin, betain ve kreatin kullanılarak gerçekleştiğini belirtmiştir (2). Folat Lucy Wills tarafından 1931 yılında keşfedilmiş ve adı folium(lif)'dan türemiştir. Lifli gıdalarda keşfedilen folat ilkin 1941 yılında ıspanaktan izole edilip 1946 yılında sentezlenmiştir(3). 1972 yılında R.B.Woodward ile A.Eschenmoser tarafından laboratuvar ortamında sentez edilmesi başarılan B12 vitamininin folat kadar tek karbon metabolizmasında önemli olduğu ve tek karbon metabolizmasının özellikle çeşitli nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkisi bulunmuştur.

THF tarafından taşınan tek-karbon grupları ya azot N^5 veya N^{10} 'a bağlanır veya N^5 ile N^{10} arasında bir köprü yapar. THF'ye bağlı olarak taşınan tek-karbon grupları tek-karbon havuzu olarak adlandırılır. Bu tek-karbonlu birimler THF'ye bağlı halde iken yükseltgenip indirgenebilir. Özellikle yükseltgenme halindeki bir karbona gereksinim duyan tepkimeler tek-karbon havuzundan farklı bir yükseltgenme düzeyinden gelen karbonu kullanabilir.

En fazla yükseltgenmiş bulunan biçim N^{10} -F-THF'dir. Bu form aynı zamanda en labil formdur. En indirgenmiş biçim ise N^5 -M-THF'dir. Metil grubu birkez oluştuğunda kolayca tekrar N^5 , N^{10} -Mln-THF'a geri yükseltgenmez. N^5 -M-THF hücre içinde birikme eğilimi gösterir. En yükseltgenmiş molekül olan N^{10} -F-THF pürin sentezinin 3. ve 9. basamaklarında kullanılmaktadır. Diyetle direk alınabilen form olan N^{10} -F-THF, format ve THF oluşumuna kaynak olup tek karbon gruplarının mitokondriden stoplazmaya aktarılmasını sağlamaktadır. Bununla beraber mitokondride N^{10} -F-THF metyonil tRNA formiltransferaz enzimi ile formil metyonil

tRNA sentezlenir ve bu reaksiyon sadece mitokondride gerçekleşir. THF'den N^{10} -F-THF sentaz enzimi ile sentezlenen N^{10} -F THF siklohidrolaz enziminin etkisiyle ya da histidin katabolizması sonucu N^5 - N^{10} -MnI-THF oluşturur. Spontan veya siklohidrolaz enzimiyle N^5 -F-THF formuna dönüşen N^5 - N^{10} MnI THF siklodeaminaz enzimiyle N5-formimino-THF oluşturur. THF, SHMT enziminin etkisiyle serin aminoasitinin metil grubunu üzerine alır ve N^5 , N^{10} -MnI-THF oluşur, bu molekül aynı zamanda N^5 - N^{10} metilen THF dehidrojenaz enziminin etkisiyle N^5 - N^{10} -MnI-THF haline dönüşebilir. N^5 , N^{10} metilen THF, MTHFR enzimiyle N^5 -M-THF formuna dönüşür ve bu form en redükte folat alt grubudur. B12 vitamin eksikliğinin eşlik ettiği folat eksikliğinde, sadece folik asit verildiğinde meydana gelen folat tuzağında biriken N^5 metil THF formu birikmeye meyillidir ve tekrar okside formdaki folat alt gruplarına dönemez.

1. STOPLAZMİK FOLAT ARACILI TEK KARBON METABOLİZMASI

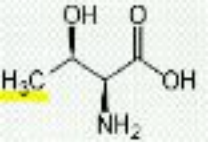


ŞEKİL:1 STOPLAZMİK TEK KARBON METABOLİZMASI

Folik asit ($C_{19}H_{19}N_7O_6$); B grubundan suda çözünen bir vitamindir (Vitamin B9). Folik asit ismi Latince 'folium(lif)'dan türetilmiştir ve lifli besinlerde bulunmaktadır. Kimyasal adı; Pteroilmonoglutamik asittir. Folik asit terimi; multivitamin, tablet ve takviye edilmiş gıdalarda bulunan sentetik formu için kullanılır. Sentetik folik asit;

hızlıca emilen ve daha stabil olan tek glutamat formundadır. Doğal olarak bulunan, folat yada folasin denilen formu ise çoklu glutamat formudur. Çoklu glutamatlar, gama karboksil peptid bağları ile bağlıdırlar. Folat içeriği zengin olan besinler; özellikle yeşil yapraklılar ıspanak gibi, patates, portakal, fasulye, mantar gibi sebze ve meyveler ve karaciğer, böbrek gibi hayvansal gıdalardır. Doğal olarak bulunan folat formları daha çok kolayca okside olabilen, 5-MTHF ve 10-formil-THF'in çoklu glutamat formlarıdır. Oksidasyonu kolaylaştıran faktörler; ısı, oksijenli ortam, ışık, alkali ortam, bakır ve demir iyonlarıdır. Bu nedenle yiyeceklerdeki folatın önemli bir kısmı pişirme, saklama ve işlenme aşamalarında tahrip edilebilmektedir .Bu durum toplumda folat eksikliğinin sık görülmesinin sebeplerinden biri olabilir (3).

Bütün folatların ortak yapısı; p-aminobenzoik asitin N terminal kısmına bağlı pteridin halkası ve karboksil ucuna gama amido azotundan bağlı farklı sayıda eklenmiş glutamik asitten oluşur. Serumda bulunan folatlar, tek glutamatlı iken hücre içi folatlar 5-8 glutamatlıdırlar. Hücre içinde çok glutamat eki bulunmasının sebebi kolayca hücre dışına çıkmasını engellemek ve folata enzim afinitesini arttırmaktır(4). Besinlerle aldığımız folatlar deudonumdan geçerken lümende bulunan folat konjugazlar, folatın tek glutamatlı formunu oluşturmak için folatı glutamat eklerinden kurtarırlar. Böylece emilmesi kolaylaşan folatlar serumda daha rahat dolaşabilir. Bağırsak hücrelerinde 5.karbonuna metil eklenen folat N^5 -M-THF'ye çevrilir, bu da portal vene geçip karaciğere gider. Folatın daha az miktarda bulunan diğer formları da bu yolu izler. Karaciğer vücut folatının yarısını, portal dolaşımdaki folatın ise hemen hemen tamamını yakalar.Yakalarken aktif transport ya da reseptör aracılı endositoz yolunu kullanılır. Karaciğer hücresi içerisinde THF kullanılmadan önce tekrar çoklu glutamat formlarına konjuge olur. Az miktarda folat yıkılır ve bileşenleri, para-aminobenzoilglutamat(pABG) ve asetil-pABG şekillerinde idrara geçer. Folatın büyük bölümü safraya geçer ve daha sonra geri emilir. Folatın kandaki temel formu olan N^5 -M-THF, plazma proteinlerine ve özellikle albumine gevşek şekilde bağlanır. Gevşek bağlanmasının sayesinde kolayca hücre içerisine girip reaksiyona girmesi gerçekleşir. Birçok metilasyon reaksiyonunda folat; SAM üzerinden dolaylı olarak metil kaynağıdır. SAM, metilasyonda anahtar bir moleküldür ancak folatın hücre fonksiyonları, bölünmesi ve farklılaşmasında çok daha önemli rolleri vardır. Tek karbon metabolizmasının ve dolayısıyla folatın önemi bu hayati hücre fonksiyonlarındaki fonksiyonlarından dolayı çok fazladır. Dolayısıyla folat alımı, sürekli

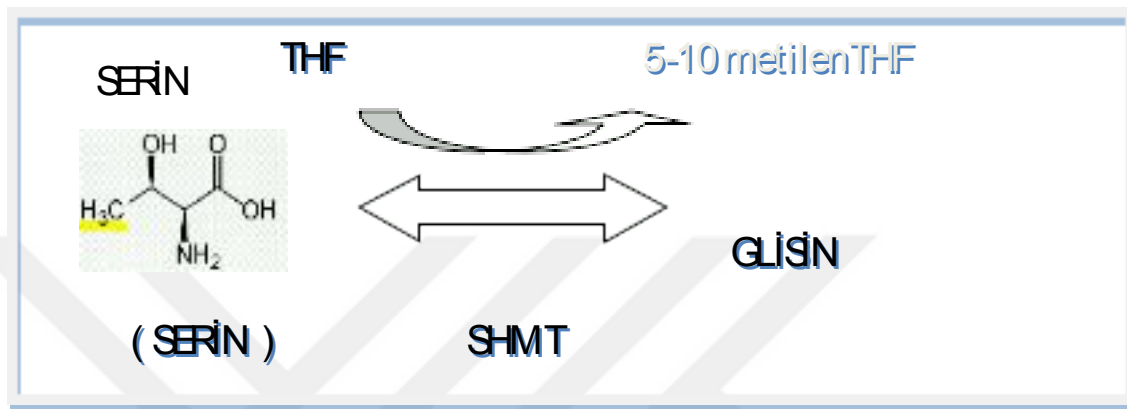


çoğalan hücreler için kritik öneme sahiptir. Folat eksikliğine bağlı DNA sentezi ve SAM sentezinin azalması, hücrelerin uygun şekilde gelişmesini engelleyip değişik düzeyde nörolojik hastalıklara hatta gebelerde düşüklere de yol açabilir. Ökaryotik hücreler, folatı sentezleyemedikleri için, folat dışarıdan alınması gerekli vitaminlerdendir. Tek karbon metabolizmasındaki folatın rolü tek karbon gruplarını transfer etmektir. Tek karbon birimleri için başlıca kaynak olarak serin, histidin ve glisin, metil, dimetilglisin ve format kullanılır (5). Bu tek karbon grupları, nükleik asit sentezi, protein sentezi, aminoasit metabolizması ve metil gruplarının sentezi gibi THF aracılı reaksiyonlarda üretilir (6).

THF, tek karbon ünitelerini alarak, en okside hali olan format veya en redükte şekli olan metil formuna dönüşür.

Folat alt grupları, birçok metabolik döngüde substrat olarak kullanılırlar:

1.1 SERİN-GLİSİN DÖNÜŞÜMÜ



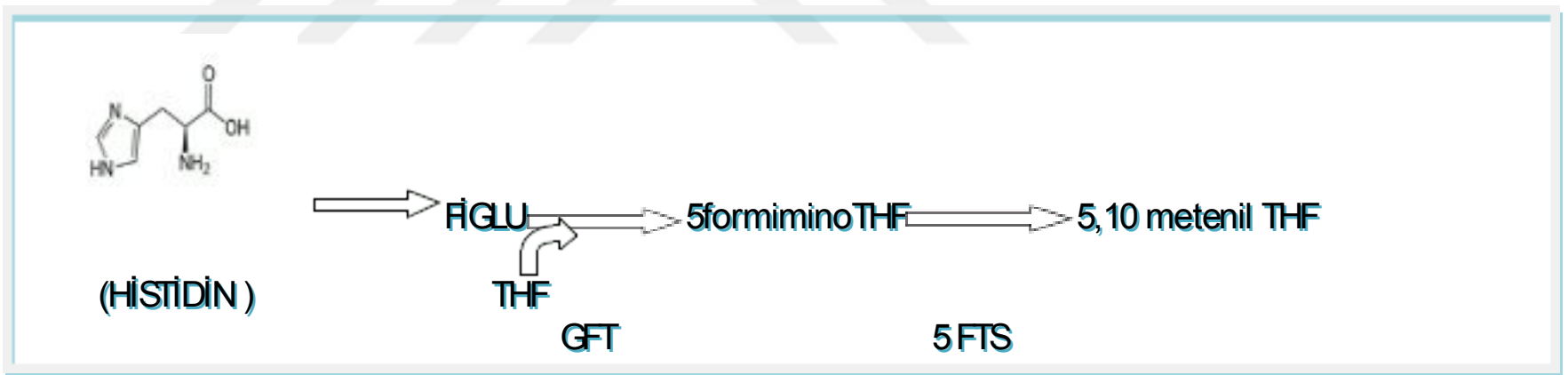
Şekil 2. THF aracılı Serin-glisin dönüşümü. SHMT: Serin hidroksi metil transferaz, THF: Tetrahidrofolat,

Serin amino asitinin 3. karbonundaki tek karbon grubu, THF'ye Serinhidroksimetiltransferaz (SHMT) enziminin katalizlediği reaksiyonla transfer edilir. Bu reaksiyonda ayrıca 5,10-MetilenTHF (MeTHF) ve glisin oluşur. Serin hem stoplazmada hem de mitokondride folat aracılı tek gruplarını aktarılmasını sağladığı için önemli bir aminoasittir. SHMT enziminin karbon kofaktörü pridoksin (B6) vitaminidir. Dolayısıyla tek karbon metabolizmasının düzgün çalışması için görev yapan kofaktörlerin de yeterli düzeyde olması önemlidir. İşaretili izotoplarla yapılan hücre kültürü çalışmalarında SHMT katalizörlüğünde meydana gelen 5,10-MeTHF'in homosisteinin remetilasyonunda kullanılmasından ziyade timidilat sentezinde kullanıldığı anlaşılmıştır (4). Timidilat yapısındaki karbonların kaynağı çoğunlukla serin

aminoasitinin 3. karbonu olduğu anlaşılmıştır. SHMT çok önemli bir enzimdir çünkü işlevini hem stoplazma, mitokondri ve çekirdek içerisinde sürdürmektedir . SHMT üç kompartmanda da timidilat sentezi için çok kritik reaksiyonda görev yaparken, 5-MTHF'ye bağlanarak da remetilasyonu sınırlandırma işlevini de sürdürür. Kompartmanlar arası geçişi serin, glisin ve format sağlamaktadır (8). Serin mitokondride 5,10-MeTHF ve 10-formilTHF oluşturur. Bunlar ürün mitokondrideki protein sentezi için kritik moleküllerdendir. Aynı zamanda formatta bu 10-formil-THF'den sonra meydana gelmektedir. Oluşan format tek karbon birimlerini stoplazmaya taşıyan önemli bir taşıyıcıdır. Mitokondrinin en önemli görevlerinden biriside glisin sentezlemektir. Çünkü glisin aminoasitinin yaklaşık %40'ı glisin yıkım sistemi ile 5,10-MeTHF oluşturmak için harcanmaktadır. Bir anlamda glisin, 5,10-MeTHF kaynağı olarak görev yapmaktadır. Mitokondri içerisinde 10-F- THF metiyonil-tRNA formiltransferaz enzimi katalizörlüğünde formil metiyonil tRNA sentezlenir. Bu reaksiyon protein sentezi için gereklidir ve sadece mitokondride gerçekleşir (9). Format ATP bağımlı formil sentetaz ile 10-formil THF'a dönüşür. 5,10-metenilTHF ve 10formilTHF pürin sentezi için;5,10 MeTHF ise timidilat sentezi için kullanılır.

Metiyonil-tRNA formiltransfereaz enzimi ile formil metiyonil tRNA sentezlenir. Protein sentezi için gerekli olan bu reaksiyon sadece mitokondriyal kompartmanda gerçekleştirilir Hücrenin hayati fonksiyonlarını idame etmesi için bu mekanizmalar sorunsuz çalışmalıdır.

1.2.HİSTİDİN KATABOLİZMASI

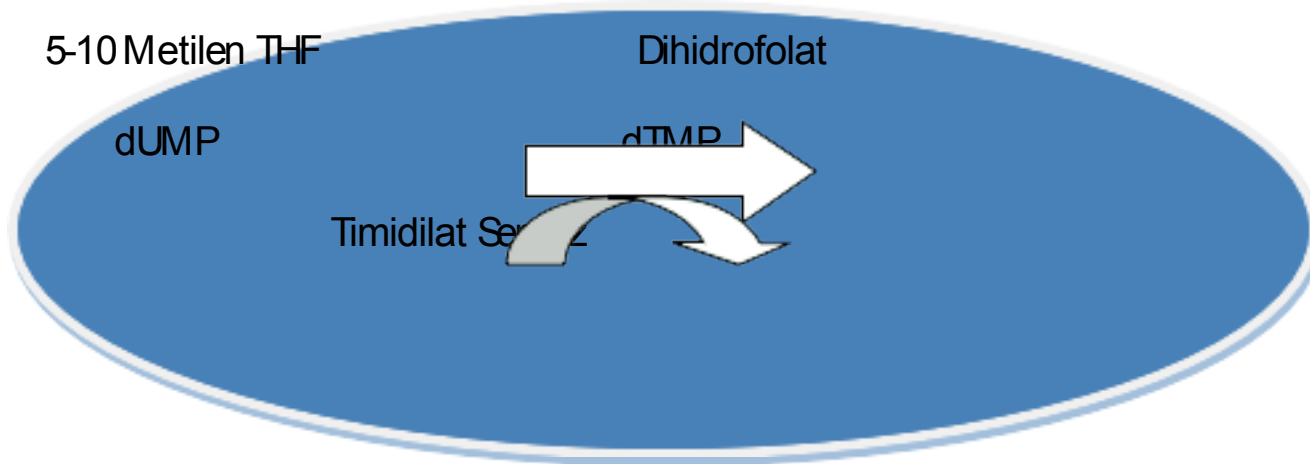


Şekil 3.Histidin katabolizması.THF:tetra hidro folat,GFT:Glutamat Formimino Transferaz,5 FTS:5 formimino tetrahidrofolat,FiGLU:Formimino glutamat

Histidin yıkımından oluşan formimino glutamat (FiGLU) bir diğer önemli tek karbon kaynağıdır. THF'ye formimino grubu glutamat formiminotransferaz enzimi

katalizörlüğünde aktarılarak formiminoTHF oluşur. Sonraki basamakta formiminoTHF siklodeaminaz enzimi ile 5 formiminoTHF-5,10-metenilTHF'ye dönüşür. Sadece karaciğerde ve böbrekte meydana gelen bu reaksiyonun tek karbon sağlama gücü zayıftır. Oluşan 5,10 metenilTHF 5,10metenil siklohidrolaz enzimi ile 10 formil THF'ye dönüşür. 10 formil THF, formata dönüşüp tek karbon ünitelerini taşıyan bir forma girerken, aynı zamanda THF'ye de dönüşüp hücre içi folat havuzuna katılır. Format ihtiyacının olmadığı durumlarda ise 10 formil THF,10 formil THF dehidrojenaz enziminin katalizörlüğünde CO₂ ve THF'ye dönüşür. Bu enzim sadece karaciğerde fonksiyon görmektedir (3). Histidin az da olsa format üretimine katkıda bulunmaktadır.

1.3.TİMİDİN SENTEZİ

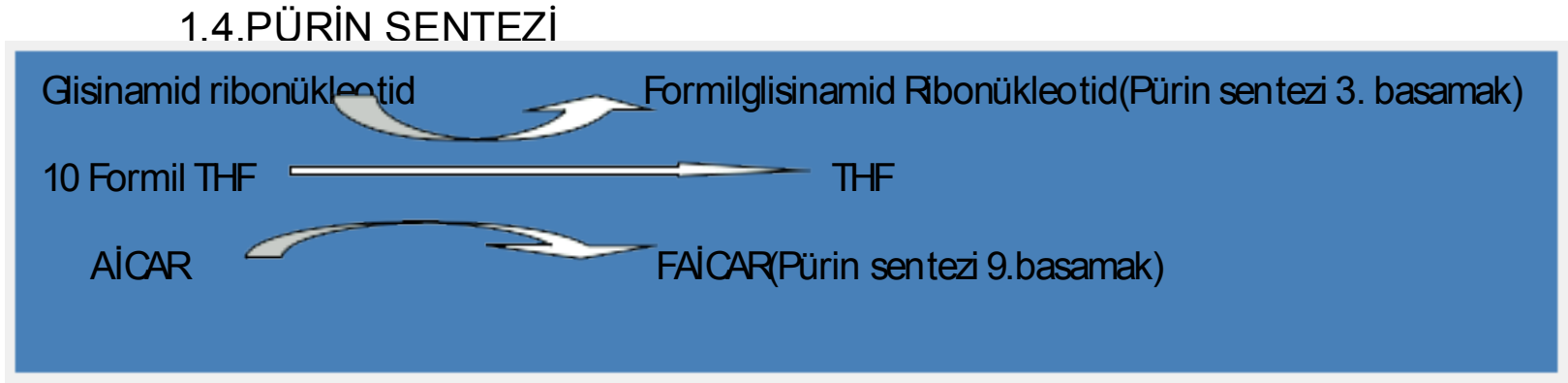


Şekil 4.Timidin sentezi.dUMP:deoksiüridin monofosfat, dTMP:deoksitimidin monofosfat

Folat, timidilat sentezi için gereklidir. Deoksiüridilatın 5. pozisyonuna formaldehit grubu eklendiğinde timidilat meydana gelir. Formaldehit format prekürsörü olduğu için timidin sentezi ve format arasında dolaylı da olsa bir ilişki vardır. 5,10-MetilenTHF'in tek karbon grubu, deoksiüridin monofosfata (dUMP) transfer edilir. Timidilat sentaz tarafından katalizlenen bu reaksiyonda ayrıca deoksitimidin monofosfat (dTMP) ve dihidrofolat oluşur .

Dihidrofolatın hücre içinde kullanılması için THF'ye indirgenmesi gereklidir. Besinlerle aldığımız folat, 10 formil THF veya 5 metil THF formundadır. Sentetik folik asitin önce dihidrofolat redüktaz ile dihidrofolata, sonra yine aynı enzim ile THF'ye dönüştürülmesi gerekmektedir. Dihidrofolat redüktazın en önemli görevi, timidilat sentaz reaksiyonunda oluşan dihidrofolatın tekrar indirgenmesidir. Hücrenin replikasyon durumuna göre timidilat sentazın sentezi regüle edilir. Hücre döngüsünün

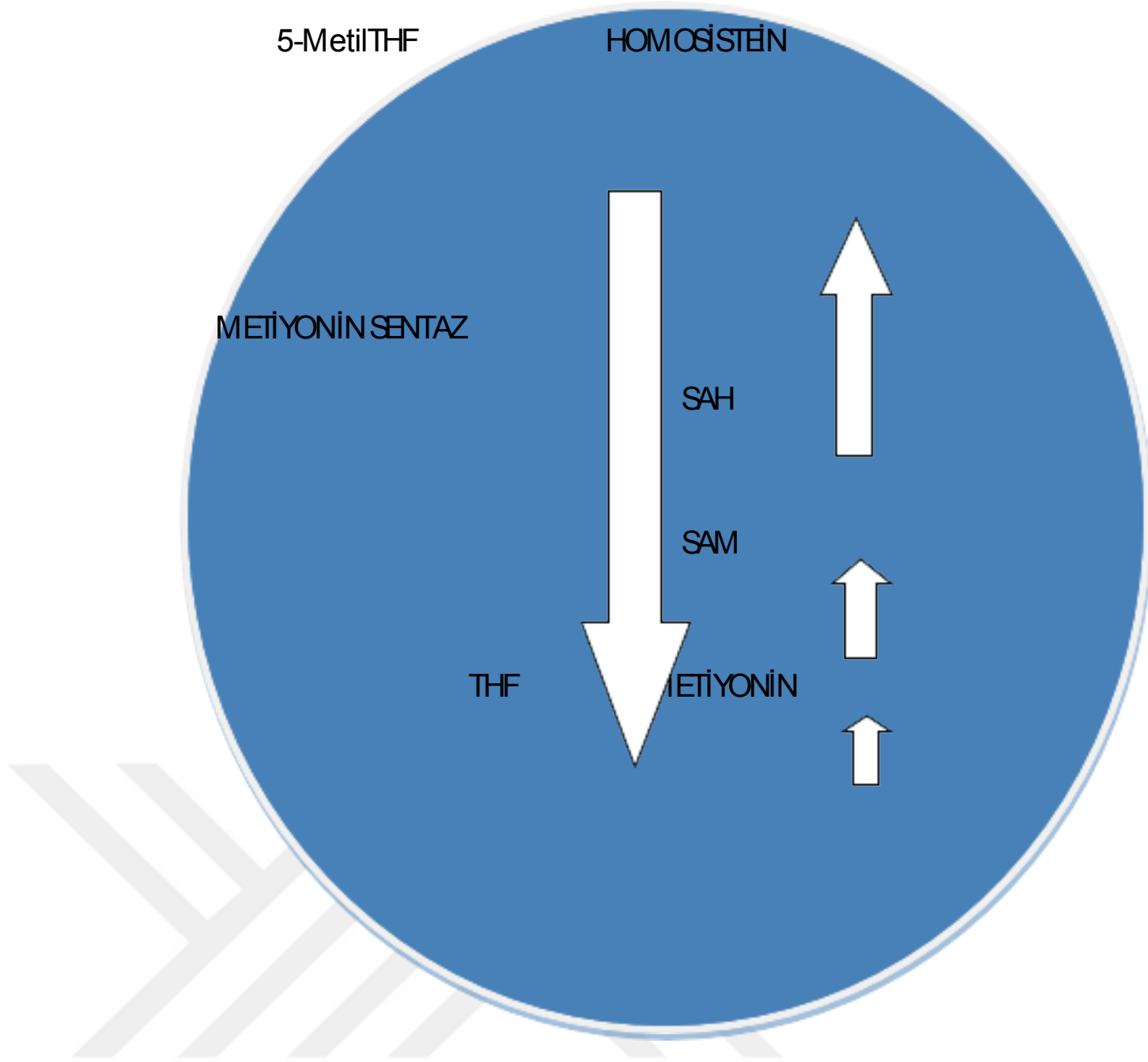
S fazında olan hücrelerde daha aktifir. Çünkü bu fazda DNA sentezi artmaktadır ve hücrelerimiz mitoz hazırlanmaktadır.



Şekil 5. Pürin sentezinin 3. ve 9. basamakları. AİCAR:Aminoimidazol karboksamid ribonükleotit, FAİCAR:Formaminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotit

Pürin sentezi format ile direk ilişkilidir çünkü format prekürsörü olan 10 formil THF pürin oluşumu için kritik bir moleküldür. Pürin halkasının C3 ve C8 grupları 10-formil THF'nin Glisinamid Ribonükleotid Transformilazla ve 5-amino 4-imidazolkarboksiamid, ribonükleotid transformilazla THF'ye dönüşümü sırasında oluşur. Pürin sentezi için gerekli olan 10-formilTHF; 10-formilTHF sentazın katalizlediği reaksiyonla direkt olarak THF'den ya da 5,10-MeTHF'den NADP-bağımlı Metilentetrahidrofolat Dehidrogenaz ve MetenilTHF Siklohidrolaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarda oluşturulur (10).

1. 5. HOMOSİSTEİN REMETİLASYONU



Şekil 6.Homosisteinin remetilasyonu.THF:tetrahidrofolat,SAH:S adenozil homosistein,SAM:S adenozil metiyonin

Tekrar metilasyon döngüsü, folattan gelen tek karbon birimlerinin, homosisteinden metiyonin sentezlenmesinde kullanıldığı bir döngüdür. MS (metyonil sentaz) tarafından folat alt grubu 5-MTHF'nin metil grubu homosisteine aktarılır. MS enziminin kofaktörü, metilkobalamindir. B12 vitamini bu açıdan önemli bir vitamindir. B12 vitamini hemin porfirin halkasına benzeyen bir korrin halkası taşır. Bu korrin halkası kobalt atomu içerir. Kobalt atomu karbon atomu ile rahatça metil kobalamin yada 5'adenozil kobalamin şeklinde bağ kurabilmektedir. Vitamin preperatlarında ise siyanokobalamin şeklinde kobalt atomuna siyano grubu " $C \equiv N$ " bağlı halde bulunur.

B12 vitamini bakteriler tarafından sentez edilmesine rağmen, bitkiler ve hayvanlar tarafından sentez edilememektedir. Ana kaynağı et, yumurta, süt ürünleri, kümes hayvanlarının etleri ve deniz ürünleridir. Bu besinlerdeki B12 vitamini esas olarak hayvanların yemindeki bakteriler tarafından sentezlenir. Gıdalarla aldığımız B12 vitamini ya serbest haldedir ya da proteinlere bağlı halde bulunurlar. Serbest B12 vitamini, transkobalamin 1 ile bağlı proteinler proteazlarla serbest hale getirildikten sonra transkobalamin 1 ile birleşir. Midede serbestleşen B12 vitamini pariyatal hücrelerce salınan intrinsik faktörle birleşir ve ileumdan intrinsik faktör-B12 kompleksi şeklinde emilir. İleumda transkobalamin 2 ile birleşen B12 vitamini, dokulara kendi reseptörü ile alınır. Suda eriyen vitaminlerden sadece B12 vitamini karaciğerde depo edilebilir ve diyetsel eksikliğe bağlı bir semptom oluşması için 3-6 yıl geçmesi gerekir. Emilen B12 vitamininin yaklaşık yarısı karaciğer tarafından alınırken gerisi diğer dokulara gönderilir. Tek karbon metabolizması açısından B12 vitamini iki önemli reaksiyona katılır. Birincisi; toksik bir molekül olan homosisteinden 5-metilTHF ile metiyonin sentaz enzimi katalizörlüğünde ve metilkobalamin kofaktör olarak kullanıldığı metiyonin ile THF'nin olduğu reaksiyondur. Son derece önemli bir reaksiyon olan homosistein remetilasyonunda B12 vitamininin kofaktör olarak rol alması ne kadar önemli bir molekül olduğunu bize göstermektedir. Meydana gelen THF histidin katabolizması, pürin ve pirimidin sentezlenmesi reaksiyonlarına katılır. Oluşan metiyonin ise, hücrenin metilasyon reaksiyonları için önemli bir molekül olan SAM sentezine kayar. B12 vitamininin katıldığı diğer önemli reaksiyon ise, 5'-deoksiadenozilkobalaminin kofaktör olduğu, L-metilmalonil KoA'nın L-metilmalonil KoA mutaz enzimi katalizörlüğünde süksinil KoA'ya dönüşmesidir (7). Dolayısıyla B12 vitamininin eksikliği MMA miktarının artmasına yol açar ve MMA seruma göre idrarda çok daha fazla bulunduğu için idrarla ölçümü daha kolaydır.

İntrinsik faktör eksikliği, diyet ya da başka bir sebebe bağlı B12 vitamininin eksikliğinde 5-metilTHF birikimi olmaktadır. 5-metil THF başka bir reaksiyon yoluna giremediği için birikmekte ve folat serumda yeterli düzeyde olsa bile işlevsel olarak folat eksikliği meydana gelmektedir. İşlevsel veya gerçek folat eksikliği, kan hücresi öncüllerinin DNA sentez etmesinde bozulmaya ve bu nedenle mitoz yoluyla genç hücre oluşamamasından dolayı meydana gelen megaloblastik anemiye yol açacaktır. Bu olay, ölen hücrelerin yerini almak üzere kana büyük ve kısmen replikasyona

uğramış yaşlı hücrelerin salınmasına yol açar (makrosit). B12 ve folat eksikliğinde görülen makrositik aneminin mekanizması budur.

Tek karbon metabolizmasında aksaklık olmaması çok önemlidir. Aksi halde tek karbon metabolizma bozukluğu bir çok sistemik hastalığın oluşmasına (nörolojik, KVS, psikiyatrik, solunum sistemi...) neden olabilir.

Transsülfürasyon yolağı ise, homosisteinin yıkılması olayıdır ve bu yıkım sonucunda sistatyonin, sistein ve glutatyon oluşur. Homosistein transsülfürasyonu, sistatyonin- β -sentaz (CBS) tarafından katalizlenen B6 vitamini bağımlı bir basamak olup sistatyonin sentezlenir. Bu molekül homosisteinin artık metiyonine dönüşemeyeceği noktadır. B6 vitamini kofaktörlüğündeki sistatyonin liyaz enzimi ile sistatyonin sisteine dönüşür. Sistein, glutatyon sentezinde kullanılır. Hücrenin en önemli redoks düzenleyici proteini olan glutatyon sentezi, sisteine bağımlıdır ve transsülfürasyon sonucu oluşur. Sisteinin fazlası ise taurin ve daha sonra inorganik sülfata dönüşür. Homosisteinin diğer bir eliminasyon yolu ise BHMT enzimi ile betain ile birleşerek metiyonin oluşturma reaksiyonudur. Bu enzim beyin dokusunda bulunmaz; sadece karaciğer, lens ve böbrek dokusunda bulunur. Kolinin yıkılması sonucu oluşan betain, metil vericisi olarak metiyonin sentezlenmesinde rol oynar.

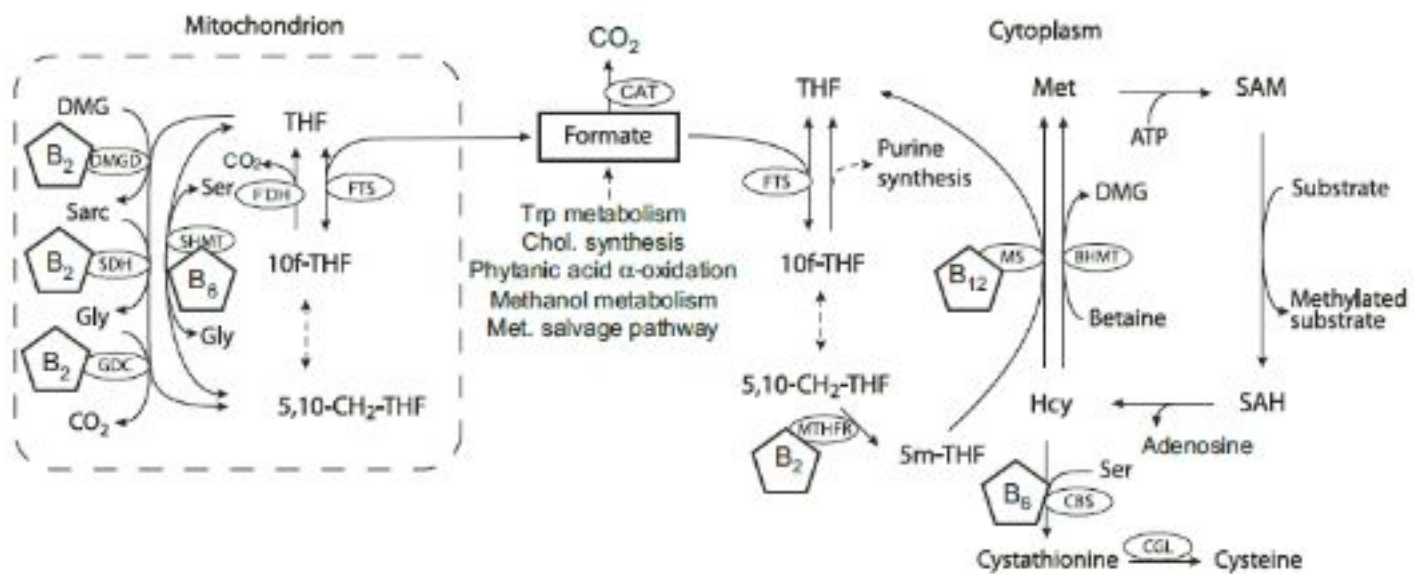
1.6. REMETİLASYON VE TRANSSÜLFÜRASYON YOLAKLARININ DÜZENLENMESİ

SAM, hücredeki metilasyon reaksiyonlarında ve regülasyonlarında önemli bir role sahiptir (8). Remetilasyon ve transsülfürasyon yolunun düzenlenmesi, SAM'ın MTHFR enzimini inhibe edip, CBS enzimini aktive etmesiyle sağlanır. MTHFR enzimi inhibe olduğunda 5-metilTHF oluşumu azalır ve homosistein remetilasyona giremeyip, CBS enziminin aktivitesinin artması ile transsülfürasyon yolağına girer. Bu şekilde sistatyonin oluşumu artar. SAM miktarı azalınca MTHFR enzimidaki inhibisyon azalacağı için remetilasyon sisteminin aktivitesi artıp metiyonin sentezi artar. Böylece SAM üretimi tekrar artar çünkü SAM miktarının yeterli olması hücrenin metilasyon kapasitesi için çok önemlidir. Bütün dokularda remetilasyon döngüsü çalışırken transsülfürasyon yolağı sadece karaciğer, böbrek, bağırsak, pankreas ve beyinde vardır. SAM'dan SAH sentezi tek yönlü iken SAH 'den homosistein oluşumu çift yönlüdür ve transsülfürasyon yolağının olmadığı dokularda homosistein SAH oluşumuna kaymaktadır. SAM sentezleyen enzimin üç adet MAT(metiyonin adenozil

transferaz) tipi vardır (MAT 1, MAT 2, MAT 3 enzimleri). MAT 1 ve MAT 3 enzimleri sadece karaciğerde bulunup, Km değeri yüksektir (7). Bundan dolayı karaciğerdeki metiyonin miktarının artması daha fazla SAM üretimi ile sonuçlanmaktadır. Karaciğer dışındaki dokularda metiyonin miktarındaki artma daha az miktarda SAM oluşumuna sebep olur ve SAM miktarı daha azalır. SAM konsantrasyonu, MAT enzimini kontrol eder. SAM miktarı arttığında MAT enzim aktivitesi azalır ve bu şekilde SAM oluşumu sınırlandırılmış olur. SAM miktarı azaldığında ise, MTHFR enzim inhibisyonu azalır CBS enzim aktivitesi azalır. 5metilTHF üretimi artar ve metiyonin üzerinden SAM üretimi artar. SAH, MTHFR enzim regülasyonunda SAM ile yarışmalı antagonist olup MTHFR enzim aktivitesini artırır ve SAM kullanılan metiltransferazları inhibe edip kendi sentezini azaltarak SAM miktarının artmasını sağlar. Artmış SAH miktarı homosistein miktarının artmasını sağlasa bile CBS enzimini aktive ederek transülfürasyon yoluyla homosisteinden organizmamız temizlenmiş olur. SAH düzeyinin artması MS ve BHMT enzimlerini inhibe edeceği için homosisteini artırmaktadır ama transülfürasyon yolağı bir anlamda sistemin kendini kurtarmasını sağlamaktadır. CBS enziminin olmadığı dokularda fazla SAH ve homosisteini hücre dışına atıp idrarla atılması sağlanmaktadır.

SAM molekülünün önemli kullanım yerlerinden birisi de Glisin-N-metil transferaz (GNMT) enzimi, glisinin sarkozine metilasyonunu sağladığı reaksiyondur. SAM, GNMT enzim aktivitesini artırırken 5metil THF ise GNMT aktivitesini azaltmaktadır. SAM miktarı arttığında GNMT aktive olup glisin sarkozine dönüşürken SAM, SAH haline gelir. SAM miktarı azaldığında ise MTHFR enzim aktive olup 5 metilTHF seviyesi artıp GNMT enzim inhibe olunca SAM kullanımı azalmış olmaktadır. SAM gereksiniminde en önemli payı kreatin üretimi yapmaktadır. Guanidoasetat metiltransferaz aracılığıyla guanidoasetata metil grubu transferi ile kreatin sentezlenirken SAM önce SAH'a daha sonra da homosisteine dönüşür. Vücutta toplam oluşan homosisteinin %75'inin bu reaksiyon sonucu oluştuğu tespit edilmiştir. SAM üretimine alternatif yol betain ile metiyonin sentezlenmesidir. SAM, SAH ve metiyonin düzeyi BHMT enzim aktivitesini kontrol ederler.

2. MİTOKONDRIYAL TEK KARBON METABOLİZMASI



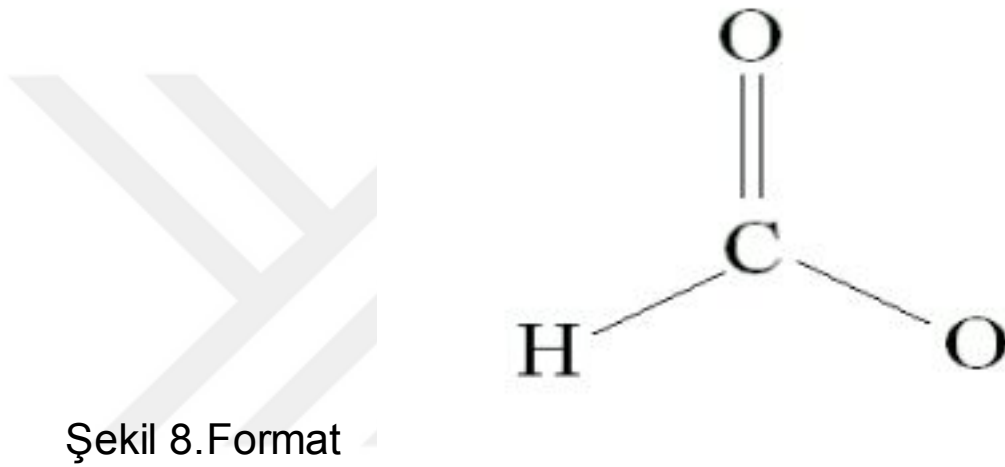
Şekil 7:Mitokondriyal tek karbon metabolizması

Hücrelerimizin enerji üretiminden sorumlu olan mitokondrinin şekli küremsi ve ya uzun silindirikdir. Eritrosit hariç bütün hücrelerimizde yer alan mitokondri değişken sayıda bulunur(1-2000). Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile enerji üreten mitokondri matriksdeki protonları membranlar arası boşluğa gönderir. Burada proton gradiyenti oluşur. Membranlar arası boşlukta toplanan protonlar ile beşinci protein kompleksi olan ATP sentaz ADP'den ATP sentezler. Mitokondrinin ayrı bir DNA 'sı bulunmaktadır ve 37 adet genom içerir. Bu genler 2 rRNA geni ,22 tRNA geni ve 13 adet de elektron transportu ve oksidatif fosforilasyonla ilgili proteinlerin subunitlerini kodlayan genlerdir. Mitokondriyal gen sirkülerdir ve aktarımı maternal kaynaklıdır. Serbesttir ve birkaç kopyası bulunur. Oksidatif fosforilasyondan sorumlu olan 87 proteinin 13 tanesi mitokondriyal DNA tarafından üretilir. Zigottaki mitokondriyal DNA'nın sadece 1/10000'i sperm kaynaklıdır. Kalıtım maternal kaynaklıdır. Mitokondriyal tamir mekanizmaları zayıftır. Bu yüzden mutasyon oranı nükleer genomdan 10 kat daha yüksektir. Tek karbon metabolizmasının mitokondride meydana getirebileceği problemler, birçok mitokondriyal disfonksiyonla suçlanan hastalıkta rol alıyor olabilir. Ayrıca mitokondriyal tek karbon metabolizmasında meydana gelebilecek problemler patogenezinde mitokondriyal hasar suçlanan hastalıklar için önemli olabilir.

Mitokondride formillenmiş metyonil tRNA sentezi, pürin, kolin, histidin katabolizması ayrıca serin - glisin çevrimi için tek karbon metabolizması önemlidir. Burada en önemli husus hücre içinde tek karbon metabolizmasının esas kaynağının

mitokondri olması ve bu birimlerin stoplazmaya aktarılmasında formatın önemidir. Mitokondride reaksiyonlar oksidasyon yönünde ilerler ve format oluşturur, stoplazmadaki format miktarının da önemli bir miktarı mitokondri kanalıyla gelmektedir. Mitokondride ve stoplazmada folatlar hücre dışına çıkmaması için glutamat halkalarıyla bağlıdır. Bu glutamat halkaları, hem hücreden çıkmalarını önlerken hem de enzimlerin afinitesini arttırıp reaksiyonların daha kolay gerçekleşmelerini sağlarlar. Hücre içinde folat ve alt birimlerinin havuzları vardır ve folat poliglutamatlarının %40'ı mitokondride bulunur(11). Burada meydana gelen reaksiyonlarda oksidatif yönde olup format sentezlenmektedir. Mitokondriyal tek karbon metabolizmasının esas amacı format formunda tek karbon ünitelerini üreterek stoplazmik tek karbon metabolizmasına katkıda bulunmaktır. Ayrıca glisin üretmek, Formilmetiyonin-tRNA sentezleyerek protein sentezi için kullanıma vermektir.

Mitokondri ile stoplazma arasındaki ilişki, tek karbon birimleri donör substratlarının (serin, glisin ve format) değişimi yoluyla olmaktadır. En önemli tek karbon aktarıcı birim olarakta format karşımıza çıkmaktadır.



Hemen hemen yaşayan bütün organizmalarda önemli bir endojen tek karbon metabolitidir. Serumda formik asit olarak bulunur. Metanoik asit olarak da isimlendirilen formik asitin HCOOH olan bir kimyasal formülü vardır ve basit karboksilik asitler içerisinde yer alır. Karıncaların mavi renkli çiçekleri kırmızı renge dönüştürdüğü saptayan Hulse ve Fisher formatı ilk kez elde etmişlerdir (12). Belli bir süre asetik asit, malik asit ya da karışımı olarak kabul edilen formik asitin daha sonra farklı bir molekül olduğu anlaşılmıştır (13). Formik asit pKa'sı 3.77 olduğu için vücudumuzda format tuzu şeklinde bulunmaktadır. 60 yıl önce formatın karbonunun nükleik asit ve glukojenik aminoasitlerden serin ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir(14,15). Formatın nükleik asit ve serin ile ilişkisi THF ile bağımlı olduğu için

folat ile format arasında sıkı bir ilişki vardır (16). Son bilgiler ışığında hücresel folat metabolizmasında mitokondriyal ve stoplazmik iki adet havuz olduğu bilinmektedir. Bu iki havuzda da glisin, serin ve format gibi tek karbon donörleri içerir. Serinin mitokondri içine taşındıktan sonra 3 karbonunun ikisini formata aktarması sonrasında formatın stoplazmaya tekrar atılmasıyla metilasyon reaksiyonları ve nükleotid sentezine formatın katılması bilinmektedir (17). Bu bilgiler formatın aminoasit, nükleik asit ve tek karbon metabolizması için merkezi bir rol oynadığını göstermektedir.

2.1.FOLAT BAĞIMLI FORMAT ÜRETİMİ İÇİN KAYNAKLAR

Tek karbon metabolizmasında hem stoplazmada hem de mitokondride tek karbon birimlerini aktaran aminoasit olan serin, dört karbon verebilen kolin, sarkozin ve 5-10 metilen THF'a dönüşerek format metabolizmasına rol oynayan glisin ve metiyonin, format kaynakları olarak gösterilebilir.

2.1.1.SERİN

Diyetle aldığımız serin iki adet tek karbon birimini aktarma potansiyeline sahiptir. Serin ve THF SHMT enzimi aracılığı ile 5,10-metilen THF ve glisin oluşur. Glisinin mitokondriyal metabolizması ikinci tek karbon grubunu aktarma potansiyelini taşımaktadır. Çekirdekte SHMT'nin iki adet formu vardır. SHMT1 stoplazmada SHMT2 ise mitokondride görev yapmaktadır (18,19). Davis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada stoplazmadaki metilasyona en önemli katkısı serin katabolizmasının verdiği belirtilmiştir (20). Beaudin ve arkadaşları farelerin stoplazmik SHMT enziminin etkisiz hale getirildiği bir çalışmada ise timidilat sentezi incelenmiştir (21). SHMT enziminin homozigot mutasyon defektlerinde ve folattan eksik diyetle beslendiği zaman farelerde timidilat sentezinin zarar gördüğü ve fare embriyolarında nöral tüp defektleri olduğu gözlenmiştir. Bu bize tek karbon birimlerinin serin aracılı aktarılmasının önemini göstermektedir.

2.1.2.KOLİN

Kolin tek karbon vericileri arasında tek dört karbon verebilen metabolittir. Kolin önce kolin dehidrojenaz ile betain aldehite o da betain aldehit dehidrojenaz ile betain'e dönüşür (22). Bu dönüşüm mitokondride olur. Betain buradan stoplazmaya geçip BHMT ile metil gruplarının homosisteini metiyonine çevirirken kullanılır ve dimetilglisine dönüşür. Oluşan metiyonin SAM sentezi ve

protein sentezi şeklinde değerlendirilir. DMG ise mitokondriye gönderilip DMG dehidrojenaz ile sarkozine, sarkozin sarkozin dehidrojenaz ile glisine, glisin ise glisin enzim kompleksiyle amonyak ve CO₂'ye dönüşür. Bu üç enzim kofaktör olarak THF kullanır ve sonuçta 5,10-metilen THF oluşur. Folat yokluğunda sarkozin dehidrojenaz sarkozini glisin ve formaldehite çevirir. Formaldehitin formata dönüşümü önemli bir format üretim yoludur.

2.1.3.GLİSİN

Glisin metabolizmasından sorumlu enzim kompleksi sadece mitokondride üretilmektedir. Bu kompleks dört subüniteden oluşmaktadır. Bunlar; Glisin dehidrojenaz, aminometiltransferaz (AMT), GCS protein H ve dihidrolipoamid dehidrojenazdır. Bu enzim kompleksi kolinin son katabolik reaksiyonlarını içermektedir. Narisawa ve arkadaşları AMT enzimini kodlayan genin devre dışı bırakılan fare embriyolarında nöral tüp defektleri bulmuşlardır (23). Glisin ile bağlantılı tek karbon birimlerinin tek karbon havuzuna katılması bu reaksiyonların önemini göstermektedir.

2.1.4.METİYONİN

Metiyonin metiyonin adenozil transferaz enzimi ile SAM oluşumunu sağlayarak stoplazmik tek karbon havuzunu indirek olarak desteklemektedir. SAM molekülünün metil gruplarını nükleofilik substratlara aktarmasını SAH ve çeşitli metillenmiş ürünlerle görmekteyiz. GNMT (Glisin N-metiltransferaz) enzimi fazla miktarda SAM üretildiği zaman glisinden sarkozin üretimini sağlamaktadır. Sarkozin de kolin yıkım ürünü olduğu için 5,10-metilen THF havuzuna katkıda bulunmaktadır. SAH metiltransferaz reaksiyonları ile üretilmiş olup homosistein ve adenezine hidrolize olmaktadır. Homosisteinin remetilasyonu ya 5-metil THF ya da betain ile olmaktadır. Metiyonin tüm vucutta sentezlenirken, BHMT ise yalnızca göz, böbrek ve karaciğerde vardır. Buradaki homosisteinin metiyonine dönüşümü tek karbon birimlerini gerektirir.

2.2 FOLATTAN BAĞIMSIZ FORMAT ÜRETİLMESİ

Format üretimi her zaman folat gerektiren bir olay değildir. Metanol metabolizması en çok gözlenen format oluşum yolağıdır. Bunun yanında format triptofan metabolizması, fitanik asit metabolizması ve kolesterol sentezinde de üretilir. Formatın folat bağımlı olarak ve folattan bağımsız olarak üretilmesine rağmen iki grup arasındaki ilişkide halen birçok bilinmeyen vardır.

2.2.1.METANOL

Metanol toksisitesi 1890 lı yıllara kadar bilinen bir durum değildi fakat sonraki yıllarda pahalı olmayan saf metanol üretilmiştir. Metanol toksisitesi birkaç saatlik latent periyodu takiben akut metabolik asidoz ve görme problemleri gözlenen bir tablodur. Metanol alkol dehidrojenaz enzimi ile formaldehite formaldehit ise aldehit dehidrojenaz ile formik asite dönüşmektedir. Kemirgenlerde metanol metabolizmasındaki ilk basamak olan alkol dehidrojenaz yerine katalaz-peroksidaz sistem bulunmaktadır. Formik asit metanol zehirlenmesinde uzun bir süre şüphelenilse de Martin-Amat ve arkadaşları yayınlarında formatın yanında asidoz ve oküler toksisite de suçlanmış (24). Format birikmesinin sebebi hepatik THF ve 10-formil THF dehidrojenaz aktivitesinin düşük olmasındandır. Pektin içeren besinlerin gastrointestinal yoldan emilimi ile az miktarda kanımızda metanol bulunmaktadır. Bununla beraber alkollü içecekler de etanolün yanında metanol de bulunmaktadır. Bu metanol kaynakları şüphesiz format düzeyi ile ilişkilidir. Memelilerde ara metabolizma sonucu üretildiği yayınlarda belirtilen methanol, SAM tarafından da üretilmektedir. SAM tarafından üretilen metanolün format oluşumuna katkısı net değildir.

2.2.2.TRIPTOFAN

Triptofan katabolizması triptofanın triptofan dioksijenaz ile oksidasyonu ile başlamaktadır. Oluşan N-formil kinureine, kinurenin ve format haline kinurenin formamidaz enzimi ile dönüşür (25). Bu yolak format oluşum yollarından biridir, ancak sınırlı bir format üretim potansiyeli vardır.

2.2.3.KOLESTEROL

Lanosterol ve metaboliti olan kolesterol 3 adet demetilasyon reaksiyonu ile meydana gelmektedir (26). Bu reaksiyonların birinde lanosterolden lanosterol 14 demetilaz enzimi ile format oluşmaktadır (27).

2.2.4.DALLI ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİ

Dallı zincirli yağ asitlerinin peroksizomlarda meydana gelen α -oksidasyonunda format oluşmaktadır (28). Fitinik asit fitol tarafından üretilen dallı zincirli yağ asitidir. Bu bir tetrametildir ve kloroplast membranında bulunur. İnsan plazmasında az miktarda bulunan fitinik asit fibroblastlara işaretlenip verildiğinde işaretli format miktarının arttığı gözlenmiştir. Bulunan işaretli CO_2 , formik asitin folat havuzunda okside olduğunu göstermiştir (29). İn vivo çalışmalarda hidroksile edilmiş yağ asitlerinin fibroblastlarda ve glial hücrelerde α -oksidasyon yoluyla format oluşturduğu gözlenmiştir (30).

2.2.5.METİYONİN YOLAĞI

SAM üretim hızı biyolojik metilasyon için kullanılır ve dekarboksile SAM poliamin sentezinde aminopropil gruplarını transfer edebilir. SAM'den metiyonin yolağı ile metiyonin de oluşabilir. Bu yolaktaki bir enzim olan α -redüktan dioksijenaz format üretiminde kullanılır (31).

2.2.6.FORMAT KATABOLİZMASI

Metabolik format eliminasyonu formatın okside olup CO_2 oluşturduğu bir reaksiyondur. Katalaz formatı okside etmek için hidrojen peroksit kullanmakta ve CO_2 reaksiyon sonucunda oluşmaktadır. Bu reaksiyonda hangi katalazın kullanıldığı tam olarak bilinmemektedir. Bir katalaz inhibitörü olan 3-aminotriazol kullanıldığında düşük format konsantrasyonunda %95 olarak etkisiz bulunmasına rağmen, yüksek format düzeylerinde yeterli miktarda format oksidasyonunu engellemiştir (32). Bu durum bize düşük format konsantrasyonlarında katalaza ihtiyaç olmadığını fakat metanol toksisitesi gibi durumlarda katalazın kullanıldığını göstermektedir. Bununla beraber 3-aminotriazol kısmen folat eksikliği olan ratlarda bu etkisini göstermekte ve bu bize format oksidasyonunda folat bağımlı mekanizmalar kullanıldığını düşündürmektedir(33). Örneğin formatın THF ile reaksiyona girip 10-formil tetrahidrofolat sentaz enzimi ile 10-formiltetrahidrofolat oluşturması ve 10-formiltetrahidrofolat dehidrojenaz enzimi ile tekrar THF oluşturması

formatın eliminasyonunda folatın kullanıldığını bize göstermektedir. Bu enzimlerin mitokondriyal ve sitozolik izoformları vardır. Cook ve arkadaşları sitozolik 10-formil tetrahidrofolat dehidrojenaz enzim eksikliği oluşturulan fareleri incelemiş ve düşük dozda formatın CO₂'ye eliminasyonu normal farelere göre yarı yarıya azalmış olarak bildirmiştir (32). Bununla beraber 3-aminotriazol verilmesi ile kalan formatın oksidasyonuna herhangi bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

B vitamini folat aracılı tek karbon metabolizmasında kofaktör olarak kullanılmaktadır. Bu anahtar vitaminin eksikliği yolağa zarar vermekte ve kendini homosistein yüksekliği olarak göstermektedir. Folat bağımlı reaksiyonlar folat eksikliğinde format miktarının artmasına sebep olmaktadır ve folat havuzu azaldığında stoplazmada format artmaktadır.

B12 vitamin eksikliği olduğunda plazma homosistein, plazma ve idrar format düzeyleri de artmaktadır. 5-metil kobalamin, metiyonin sentaz enziminin kofaktörü olduğundan eksikliğinde homosistein birikimi gözlenmektedir. B12 vitamini eksikliği fonksiyonel olarak hücre içi folat eksikliği meydana getirmektedir ve bu duruma metil folat tuzağı denmektedir. Stoplazmadaki folat koenzimleri 5 metil THF birikmesine sebep olmakta ve THF konsantrasyonunda azalmaya yol açmaktadır. Folat havuzundaki bu azalma format birikimine neden olmaktadır.

B6 vitamini sistatyonin beta sentaz enziminin kofaktörüdür ve eksikliğinde homosistein katabolizması azalacağından homosistein düzeyleri artmaktadır. Ratlarda B6 vitamin eksikliğinin format düzeyine bir etkisinin olmadığı düşünülmektedir. FAD B2 (riboflavin) vitamininin bir koenzimidir ve folat bağımlı tek karbon metabolizmasında değişik yollarda kullanılır. FAD, MTHFR enziminin bir komponentidir ve metiyonin sentazın okside formunun aktivasyonunu sağlayan metiyonin sentaz redüktazın koenzimidir. B2 vitamini eksikliğinde homosistein miktarının artması beklenen bir durumdur. Ayrıca FAD glisin cleavage sistemin komponentidir. B2 vitamin eksikliği olan ratlarda format düzeyi daha düşük bulunmuştur. Bu sonucun glisin cleavage sistemin enzim aktivitesinin düşmesi ve mitokondriyal format üretiminin azalması sebebiyle ortaya çıkıyor olabilir.

2.2.7.FORMATIN TOKSİSİTESİ

Formik asit toksisitesinde bir çok yayın metanol toksisitesinden bahsetmektedir ve hızlı format birikimi, unkompanse asidoz, koma ve sonunda ölüme giden bir kliniği vardır. Fizyolojik düzeylerde tek karbon metabolizmasına zarar veriyor mu tam olarak bilinmemektedir. Format düzeylerinin artmasının patolojik etkileri görülebilir mi? 1975 yılında Nicholls göstermiştir ki format sitokrom c oksidaz enziminin inhibitörüdür bununla beraber Ki değeri milimolar aralıktadır (34,35). 2007 yılında Kapur ve arkadaşlarının çalışmasında 1mM düzeyinde olan format konsantrasyonunda ratların hipokampusünde nörotoksisite olduğunu rapor etmiştir(36).

3. MİTOKONDRIAL TEK KARBON METABOLİZMASI İLE PARKİNSON HASTALIĞI İLİŞKİSİ

En sık görülen nörodejeneratif hastalıkların ikincisi olan parkinson 1839 yılında James Parkinson tarafından tanımlanmıştır. Duruş bozukluğu, kaslarda rijidite, istirahat tremoru ve bradikinezi ile seyreden parkinson hastalığının etkileri esas itibarı ile substansiya nigradaki dopamin üreten hücrelerin kaybıyla gerçekleşir. Parkinson hastalığında dopamin kaybıyla ilişkili olmayan demans, uyku bozukluğu ve depresyon gibi bulgular da görülür. Bulgular dopamin üreten hücrelerin % 60 kaybı ile başlar ve bu süre ortalama 4-6 yıldır. Nöronlardaki kaybın yanında kalan nöronlarda intrastoplazmik eozinofilik Lewy cisimciklerinin birikmesi hastalık için karakteristiktir. Parkinson hastalığında apoptozis, protein aggregasyonu, inflamasyon, ekzitoksisite, demir birikimi, oksidatif stres ve kompleks I eksikliği ayrı ayrı suçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda platelet, kas, substansiya nigra ve frontal korteks mitokondrilerinde %25 ile 35 arasında kompleks I eksikliği tespit edilmiş(38,39,40). Bu sistemik durumdan genetik ve çevresel etmenler suçlanmıştır. Yaşlanma ile beraber artan mtDNA delesyonlarının parkinson hastalarında kompleks eksikliği ile beraber görülmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalar kompleks inhibisyonu ile mitokondriyal disfonksiyonun Parkinson Hastalığında özellikle suçlandığı belirtilmektedir. Kompleks I'i inhibe eden moleküllerin Parkinson Hastalığı benzeri bulgular göstermesi ve PH(Parkinson Hastalığı) olan hastalarda %37 oranında kompleks I eksikliği tespit edilmesi, aradaki ilişkiyi güçlendirmektedir. Yapılan çalışmalarda MMA metaboliti olan metilsitrat ve malonatın komplekslerin aktivitelerini anlamlı şekilde azaltması tek karbon metabolizması ile arasında ilişki olduğunu göstermektedir (41). Parkinson deneysel

modelinde kullanılan MPTP modelinde aktif madde olan MPP ve rotenonun kompleks inhibisyonu ile Parkinson Hastalığına sebep olduğu bilinmektedir (42). Tek karbon metabolizmasının mitokondride bozulmasının Parkinson Hastalığında bir etkisi varmı ya da mitokondriyal disfonksiyon gösteren Parkinson Hastalığında tek karbon metabolizmasında bir değişiklik varmı sorusuna cevap aramaktayız. Bundan dolayı mitokondriyal tek karbon metabolizmasının başlıca görevlerinden olan format üretiminin Parkinson Hastalarında incelemenin faydalı olacağını düşünmekteyiz.



GEREÇ VE YÖNTEM

4. Gereçler

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçimi

Çalışmaya, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 29.01.2016 tarihindeki, 149-2-16/1539 sayılı yazılı izne ile başlandı.

Çalışmaya, Kasım 2015- Haziran 2016 tarihleri arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Nöroloji Servisi'ne başvuran, Parkinson Hastalığı tanısı alan ve çalışmayı kabul eden 60 kişi dahil edildi. Yapılan anket çalışması sonrası kendisinde ve ailesinde herhangi bir nörolojik problemi ve bilinen herhangi bir hastalığı olmayan benzer yaş grubundan 60 gönüllü kontrol grubu olarak seçildi.

Tüm hasta ve sağlıklı kişilere çalışmayla ilgi açıklamalar yapılarak 'aydınlatılmış onam formu' imzalatıldı.

4.1.2. Çalışmadan Dışlama Kriterleri

Tüm hasta ve kontrol grupları için, çalışmanın sonuçlarını etkileyebilecek metabolik, nörolojik ve psikiyatrik başka bir hastalığa sahip olanlar ve çalışmaya katılmak istemeyenler çalışma dışı bırakıldı.

4.1.3. Örneklerin Toplanması

Tüm hasta ve sağlıklı gönüllülerden 12 saatlik açlığı takiben, saat 08.00 - 11.00 arasında, rutin tahlilleri için istenen serum, plazma, tam kan ve idrar örneklerinden artan kısımlar ayrıldı. Tam kan sayımı, serum vitamin B12, serum folik asit, eritrosit içi folik asit alt grupları, plazma total homosistein (tHcy) ölçümleri ile Metil Malonik Asit (MMA) ölçümleri aynı gün içinde çalışıldı. Total eritrosit içi folik asit ve DNA izolasyonu için örnekler çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

4.1.4. Kullanılan Cihazlar

Otoanalizör: Architect C8000, Architect C16000, Architect SI200

Tam kan sayımı cihazı: Abbott Cell-Dyn Sapphire,

HPLC Cihazı: HP Agilent 1100 ve Agilent Technologies 1200 Series

Spektrofotometre: Beckman Coulter DU 800 UV/Visible spectrophotometer,

Real Time PCR: Stratgene MX300P

Abbott AxSYM System

Derin dondurucu: Sanyo Ultra Low,

pH-metre: WTW microprocessor,

Hassas terazi: Precisa 205ASCS,

Distile su sistemi: Millipore, Milli-RO, Milli-Q

4.2. Biyokimyasal Yöntemler

4.2.1. Serum Folik Asit ve Vitamin B12 Düzeylerinin Ölçümü

Serum folat ve vitamin B12, kemilüminesan mikropartikül immünoassay tekniği ile, kendi kitleri kullanılarak Architect İ2000SR cihazında ölçüldü. Folat için referans aralık 4,5 – 20,5 ng/mL, vitamin B12 için 187-883 pg/mL' dir.

4.2.2. Plazma Total Homosistein Düzeyinin Ölçümü

Plazma total homosistein düzeyi, Abbott homosistein kiti kullanılarak kemiluminesan mikropartikül immünoassey tekniği ile Abbott Architect i2000SR cihazında ölçüldü. Ölçülen plazma total homosistein, $\mu\text{mol/L}$ birim cinsinden ifade edildi. Referans aralık 6 – 12 $\mu\text{mol/L}$ idi.

4.2.3. İdrar MMA Düzeylerinin Ölçümü

İdrar metil malonik asit ölçümü, Gültepe ve ark.(37)'nin tanımladığı metoda göre, diazotize p-nitroanilinin metil malonik asitle verdiği reaksiyonun fotometrik olarak ölçümü ile yapılmıştır.

4.2.3.1. MMA Ölçüm Yöntemi:

Hastalardan alınan sabah açlık ilk idrarlarının pH' ları, 3M NaOH ve 6M HCl kullanılarak 6,5'a ayarlandı ve sonra santrifüj edildi. İdrarın bir kısmı ayrılıp, idrar kreatinin düzeyi Jaffe reaksiyonu esasına dayalı kreatinin ölçüm yöntemi ile otoanalizörde ölçüldü. Diğer yandan 1 ml idrar örneği daha önceden 1x 2 cm kuvvetli

bazik anyon değiştirici reğine dőřenmiř, 1x10 cm ebatlarındaki kromatografik kolona uygulandı. Daha sonra kolon 30 ml distile su ile yıkandı. Elüsyon çözeltisi olarak kullandığımız 0,1 M HCl' dan 10 ml kolona uygulandı ve elüat temiz bir tüpte toplandı. Bu elüattan 1 ml alınıp test tüplerine konuldu. Reaktif körü olarak kullanılmak üzere 0,1 M HCl çözeltisinden 1 ml alındı. 0,02 ve 0,04 mM' lık standartlardan 1'er ml alınıp tüplere konuldu. Daha sonra her bir tüpe 1,5 ml asetat tampon eklenip girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Üzerine 1,5 ml soğuk diazo reaktifi eklenip girdap karıştırıcı da karıştırılan tüpler kapakları sıkıca kapatılarak daha önceden ısı 37°C' ye getirilmiş olan su banyosunda 30 dakika süreyle inkübe edildi. Su banyosundan çıkarılan tüpler musluk suyu ile 5 dakika içerisinde oda ısısına getirildi. Oda ısısına gelen tüplerin her birine 1ml 3M NaOH çözeltisi eklenerek girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra tekrar su banyosuna konularak 30 dakika süreyle inkübasyona devam edildi. Inkübasyon sonunda tüpler su banyosundan alınarak 1 dakika içinde oda ısısına getirildi. Örnekler ve standartlar reaktif körüne karşı taramalı spektrofotometrede okundu. Okuma işlemi, 1,5 saat içinde yapılmalıdır. Spektrofotometrede 500-750 nm dalga boyları arasında tarama yapıldı.

620 nm' deki pik absorbans (A₆₂₀), 570 nm (A₅₇₀) ve 670 nm (A₆₇₀)' deki absorbanslar kullanılarak Allen düzeltmesi yapılarak absorbanslar (A) hesaplandı.

$$A = A_{620} - \frac{A_{570} + A_{670}}{2}$$

Bu şekilde hesaplanan absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre İMMA konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{İMMA (mmol L)} = \frac{A_{\text{numune}}}{A_{\text{standart}}} \times 0.04 \times 10$$

Formüldeki 10 sayısı, hacim düzeltme faktörüdür. Yine formüldeki 0,04 sayısı kullanılan standardın konsantrasyonudur. Bu formülle mmol/L olarak bulunan

MMA değerleri, idrar örneklerinin kreatinin değerlerine oranlanarak normalize edildi. Sonuç değer, mmol MMA/ mol kreatinin olarak ifade edildi.

4.2.4 Eritrosit İçi Total Folik Asit Ölçümü

Eritrosit içi total folik asit, K₃EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri ile Architect marka kit ile Architect İ2000SR cihazında ölçüldü. Kit prospektüsüne uygun olarak, kan örnekleri -20 °C'de toplandı, bekleme süresi bir ayı geçmeden çalışıldı. 100 µL tam kan numunesine 1mL folat lizis reaktifi eklendi, oda ısında 1,5 saat ışıktan koruyarak bekletildi. Daha sonra bu karışımdan 100 µL alarak üzerine 100 µL folat RBC lizis diluenti eklendi. Karışım vortekslenerek ölçüm için cihaza verildi. Çıkan sonuçlar hematokrite oranlandı. Sonuç değer ng/mL olarak ifade edildi. Referans aralık 126- 651 ng/mL idi.

4.2.5.Eritrosit İçi Ferritin Ölçümü

Novembrino ve ark'larının tarif ettiği şekilde yapıldı (56). Tam kan örnekleri 1500g kuvvetiyle 5 dakika santrifüj edilerek plazma uzaklaştırıldı. Serum fizyolojik eklenerek üç kez hücreler santrifüj edilip yıkandı.Serum fizyolojik eklenip -80 C⁰ derin dondurucuya numuneler kaldırılıp 30 dakika bekletildi. Numuneler derin dondurucudan alınıp 90 dakikada çözündürüldü ve 1/21 oranında askorbik asit ile sulandırılıp ferritin ölçümü kemilüminesan mikropartikül immünolojik yöntem ile yapıldı.

4.2.6.Serum Demir ve TDBK Ölçümü

Kendi laboratuvarımızda üretilen Haydarpaşa kitleri kullanılarak spektrofotometrik olarak Architech C8000 cihazda ölçümler yapılmıştır. Demir için referans aralık 50-150 mg/dl, TDBK için referans aralık 200-390 mcg/dl olarak belirlenmiştir.

4.2.7.Serum Ferritin Ölçümü

Serum ferritin ölçümü kemilüminesan mikropartikül immünolojik yöntem kullanılarak Abbott marka kit ile Abbott Architech İ2000SR cihazında gerçekleştirilmiştir. Ferritin için referans aralık 21.81-274.6 ng/ml idi.

4.2.8. Serum Format Analizi

Serum format ölçümü için fotometrik, fluorometrik ve gaz kromatografik yöntemler mevcuttur (43,44,45). Ancak bu yöntemlerden fluorometrik yöntemler klinik

laboratuvarlar için daha ucuz ve uygulaması kolay olduğu için tercih edilmektedir. Ancak fotometrik yöntemlerin ölçüm hassasiyeti GC ve fluorometrik yöntemler kadar iyi olmayıp sadece metanol toksisitesi gibi formatın çok yükseldiği durumlarda kullanılmaktadır. Çalışmamızda fotometrik yöntemler irdelenerek formatın çok yükselmediği normal sınırlar içerisinde kaldığı durumlarını değerlendirebilecek optimize edilmiş fotometrik bir yöntem oluşturuldu.

4.2.9. Grady ve ark. Format Ölçüm Yöntemi

Birinci reaktif

100 mmol/l KH_2PO_4 ile 100mmol/l Na_2HPO_4 beşe bir (5:1) oranında karıştırılarak (pH=6) fosfat tampon hazırlanmıştır. 1 gr/l NAD ve 800u/l diaforaz eklenerek tamponlanmış NAD-diaforaz elde edilmiştir. 150 ml tampon kullanılarak 150 mg NAD ve 120 unite diaforaz kullanılarak tamponlanmış NAD-diaforaz hazırlanmıştır.

İkinci reaktif

140ml tamponlanmış NAD-diaforaza 140 mg INT ekleyerek tamponlanmış NAD-diaforaz-INT hazırlanmıştır. Tamponlanmış NAD-diaforaz ile 5 mg/ml olacak şekilde FDH hazırlanmıştır. 5 ile 15 mg arasında FDH stokları hazırlanıp 1,5 ml'lik viallere konulup -80 °C'de saklanmıştır.

Yöntemin yapılışı

100 µL serum ile 100 µL asetonitril karıştırıldı. 14000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Oluşan üst fazdan 100 µL alınıp 3 ml tamponlanmış NAD-diaforaz-INT karışımını ile karıştırılıp vortekslendi. 60 µL FDH ekleyip 10 dakika oda ısısında beklettiğimiz numunemizin 500 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü.

4.2.10. Blomne ve ark. Format Ölçüm Yöntemi

Reaktiflerin hazırlanışı

Birinci reaktif

2 ml distile su içerisinde 80 ünite FDH hazırlandı. 200 µLlik porsiyonlar hazırlayıp – 20 °C’de stabil halde saklandı.

İkinci reaktif

22 ml pH=7,5 potasyum fosfat tampona 420 mg NAD ekleyerek hazırlanan solusyon 28 ml distile su ile karıştırıldı.

Yöntemin yapılışı

6 µL numune, standart yada distile suyu 64 µL su ve 410 µL NAD reaktifi ile karıştırıp 5 dakika 37°C’de inkübe edildi. 5 dakika sonra 15 µL FDH eklenip 340 nm dalga boyunda 25 saniye aralıklarla absorbanı ölçüldü.

4.2.11.Optimize Serum Format Ölçüm Yöntemimiz

Reaktiflerin hazırlanışı

Birinci reaktif

Na₂H₂PO₄ kullanılarak pH FDH enziminin en ideal çalıştığı yer olan 7,4 seviyesine getirilmiştir. Hazırlanan tampondan 50 ml alınıp içine 5 mM konsantrasyonda olacak şekilde NAD eklendi. Serum matriks etkisini minimize etmek için 9,05 mM PEG (polietilen glikol) ve 58 mM EG (etilen glikol) eklenip birinci reaktifimiz oluşturuldu.

İkinci reaktif

Hazırlanan birinci reaktife konsantrasyonu 1 gr/l olacak şekilde FDH ekleyip ikinci reaktif hazırlandı.

Yöntemin yapılışı

1 ml serum ile 150 ml %7,5’luk ZnSO₄.7H₂O ve 75 ml 0,4N NaOH eklenip vortekslendi. 14100 g kuvvetiyle 20 dakika santrifüj edilip süpernatant elde edildi. 37°C ve 340 nm dalda boyuna ayarladığımız spektrofotometremiz ile birinci reaktiften 200 µL ve ön işleme numuneden elde edilen süpernatanttan 100 µL alıp vortekslendi. İkinci reaktiften 200 µL ekleyip vorteksleyip absorbanı ölçümü yapıldı.

Standartların hazırlanması

0,3125 mmol/l ile 10 mmol/l arasında standartlar hazırlanarak çalışmalar yapılmıştır

Metod optimizasyon çalışmaları

Örneklerin ön işlem basamağının optimizasyonu

Serumda bulunan çok sayıda molekülün matriks etkisiyle ölçümü etkilediği bilinmektedir. Grady ve ark. yaptığı gibi 100 µL serumla 100 µL ACN karıştırıp 14000 g kuvvetiyle 2 dakika santrifüj edildi. %10 konsantrasyonda TCA kullanıldı. 100 µL TCA ile 100 µL TCA karıştırıp 14000 g kuvvetinde 2 dakika santrifüj yapıldı. Protein deporoteinizasyonu için TCA'dan sonra $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ denendi. 1 ml serum ile 150 mililitre %7,5 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 0,4N 75 µL NaOH karıştırıp 14100 g de 20 dakika santrifüj edildi.

Reaktif kompozisyonunun optimizasyonu

NAD ve FDH konsantrasyonu optimizasyonu

NAD final konsantrasyonunun optimizasyonu için 1mM ile 10 mM arasında NAD konsantrasyonları kullanılarak denemeler yapılmıştır. FDH'nin final konsantrasyonun optimizasyonu için 18 U/l ile 800 U/l arasındaki konsantrasyonlarda FDH ile denemeler yapılmıştır.

Matriks etkisini kaldırmak için reaktif içeriğinin optimizasyonu

Etilen glikol ve polietilen glikol karışımı olan ve olmayan reaktif kompozisyonları ile denemeler yapıldı.

Total hacim/serum hacim oranının optimizasyonu

Total hacim/serum hacim oranı 82 ile 5 arasında değişen yöntem denemeleri yapıldı. Yöntemin hassasiyetinin artması için total volüm/serum volüm oranı azaltılarak en düşük seviyeye getirme çalışmaları yapıldı.

Tekrarlanabilirlik

Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda standartlar 10 kez ölçülüp çalışma içi ve çalışmalar arası değişkenlik katsayısı değerleri hesaplandı.

Geri kazanım (Recovery) Çalışmaları

Numune volümü	Eklenen 10 mM standart volümü	Numuneye ilave edilen format miktarı
900 µL	100 µL	1 mM
950 µL	50 µL	0,5 mM
975 µL	25 µL	0,25 Mm

Tablo 1:Geri kazanım (Recovery) çalışması

Hasta serumlarına tabloda belirtilen oranlarda format standardı ilave edilerek ilave edilen ve edilmeyen numunelerden format ölçümü yapıp % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Doğrusallık çalışması

0-10 mM aralığında format konsantrasyonlarına sahip sulu standartlar hazırlanarak, yöntemimiz ile ölçülmüş, absorbans konsantrasyon grafiği ile değerlendirilerek doğrusal olduğu aralık belirlenmiştir.

En düşük tespit limiti

10 mM format standardı seri dilüsyon yapıp, kör ölçümünden ayırt edilebilen en düşük absorbans değeri elde edilmiştir. Ayrıca kan örnekleri ile örnek köründen ayırt edilebilecek en düşük absorbans değerini veren konsantrasyon hesaplanmıştır.

4.2.12. MTHFR C677T ve MTHFR A1298C Mutasyon Tespiti

Hasta ve kontrol gruplarının tam kan örneklerinden 200 µL alınarak -20°C 'ye kaldırıldı. Macherey-Nagel marka kit kullanılarak prosedürüne uygun şekilde DNA ayrımı yapıldı. MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonları, Dr. Zeydanlı marka çözeltiler kullanılarak real-time PCR tekniği ile Stratagene MX3000P marka cihazda ölçüldü.

4.2.13. İstatistiksel Yöntemler

Tüm istatistik işlemleri SPSS Windows (Versiyon 15.0) programı ile yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm gruplardan elde edilen biyokimyasal verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile

incelendi. Normal dağılıma uyan ve parametrik özellikleri taşıyan verilerin incelenmesi için Student-t testi kullanıldı. Benzer olarak veriler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde ise parametrik özellikleri taşıyan veriler için Pearson ilişki katsayısı, parametrik özellikleri karşılamayan veriler için ise Spearman ilişki katsayısı kullanıldı. Gruplar arası farklılığın değerlendirilmesinde ANOVA-Oneway testi kullanıldı.

	Hasta n=75	Kontrol n=53	P değeri
Yaş	68,4±10,9	63,5±10,3	0,017*
Cinsiyet (E/K)	42/33	29/24	
İMMA(μmol/L)	4,49±3,02	4,33±3,11	0,792
Hcy	13,6±9	14,9±4,3	0,368
B12 vitamini	443±394	397±320	0,477
Folat	6,8±2,9	7,3±2,7	0,429
Serum ferritin	65,1±64,7	72,3±67,6	0,616
Eritrosit içi ferritin	30,6±15,7	28,6±13,1	0,544
RBC folat	226±178	188±73	0,170
TDBK	310±46	328±40	0,060
Fe	71±34	76±31	0,517
Format	0,414±0,314	0,615±0,267	0,000**

Tablo 2:Hasta ve kontrol grubu ortalamaları

Hasta grubu Korelasyon analizi(r;p)

	Yas	Eferritin	Ferritin	Demir	Tdbk	Folat	B12	Hcy	Mma	Rbc folat	Format
Yas	1										
Eferritin	-0,043;	1									

	0,719										
Ferritin	-0,078; 0,515	0,515*; 0,000	1								
Demir	-0,101; 0,399	0,006; 0,960	0,186; 0,112	1							
Tdbk	0,019 ;0,871	-0,128 ;0,281	-0,505*; 0,000	-0,117; 0,321	1						
Folat	0,217 ;0,067	-0,313*; 0,007	-0,093; 0,436	-0,40; 0,740	0,003; 0,978	1					
B12	0,142; 0,230	-0,293*; 0,012	-0,046; 0,699	-0,025; 0,834	-0,056; 0,635	-0,305*; 0,008	1				
Hcy	0,155; 0,210	0,186; 0,133	-0,028; 0,819	-0,043; 0,730	0,160; 0,196	0,091; 0,466	-0,189; 0,123	1			
Mma	0,153; 0,198	0,194; 0,103	0,038; 0,752	-0,001; 0,992	-0,061; 0,611	-0,12; 0,919	-0,362*; 0,002	0,042; 0,733	1		
Rbc folat	0,235; 0,055	-0,285*; 0,019	-0,106; 0,395	-0,237; 0,054	-0,004; 0,976	0,583*; 0,000	0,446*; 0,000	-0,105; 0,403	-0,097; 0,436	1	
Format	-0,101; 0,394	-0,064; 0,589	0,032; 0,787	-0,057; 0,628	-0,112; 0,344	0,142; 0,229	-0,028; 0,812	-0,195; 0,110	-0,064; 0,585	0,002; 0,989	1

Tablo 3:Hasta grubu korelasyonları



Kontrol grubu korelasyon analizi(r;p)

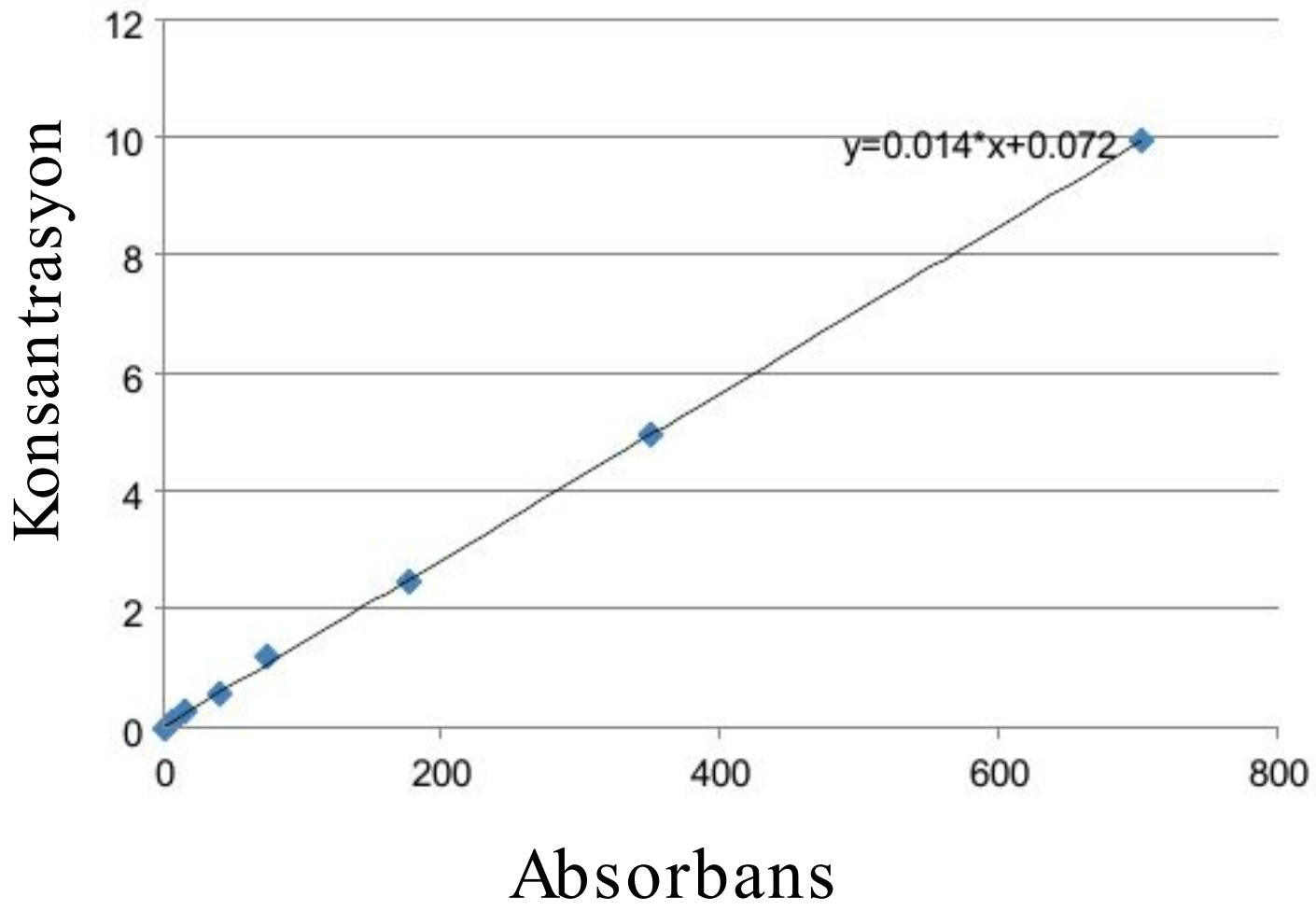
	Yas	Eferritin	Ferritin	Demir	Tdbk	folat	B12	Hcy	Mma	RBC folat	Format
--	-----	-----------	----------	-------	------	-------	-----	-----	-----	-----------	--------

Yas	1										
Eferritin	-0,030; 0,886	1									
Ferritin	0,221; 0,287	0,210; 0,274	1								
Demir	-0,268; 0,196	0,319; 0,091	0,149; 0,439	1							
Tdbk	-0,349; 0,087	-0,083; 0,668	-0,265; 0,165	0,123; 0,524	1						
Folat	-0,310*; 0,038	-0,023; 0,904	-0,002; 0,990	0,182; 0,345	0,253; 0,185	1					
B12	0,449*; 0002	-0,210; 0,272	-0,180; 0,349	-0,263; 0,168	-0,186; 0,334	-0,208; 0,134	1				
Hcy	0,066; 0,665	0,193; 0,315	0,094; 0,628	0,239; 0,211	0,141; 0,465	-0,114; 0,415	-0,194; 0,163	1			
Mma	0,061; 0,739	0,267; 0,207	-0,162; 0,451	-0,217; 0,309	-0,062; 0,774	0,012; 0,943	-0,199; 0,244	0,018; 0,919	1		
RBC folat	0,244; 0,124	-0,149; 0,469	0,064; 0,755	-0,186; 0,363	-0,013; 0,950	0,499*; 0,000	0,130; 0,372	-0,104; 0,476	0,031; 0,868	1	
Format	-0,088; 0,567	0,131; 0,499	0,333; 0,078	-0,012; 0,962	-0,001; 0,996	0,065; 0,645	-0,126; 0,368	0,037; 0,790	-0,099; 0,564	0,026; 0,859	1

Tablo 4:Kontrol grubu korelasyonları

Format Ölçüm Metodunun Optimizasyon Çalışma Sonuçları

5.1. Doğrusallık



Şekil 9: Doğrusallık Çalışması

10 mM sulu standart sulandırılarak 0,039 mM konsantrasyona kadar lineer olarak ölçüm yapılabilmektedir.

5.2. Geri kazanım (Recovery)

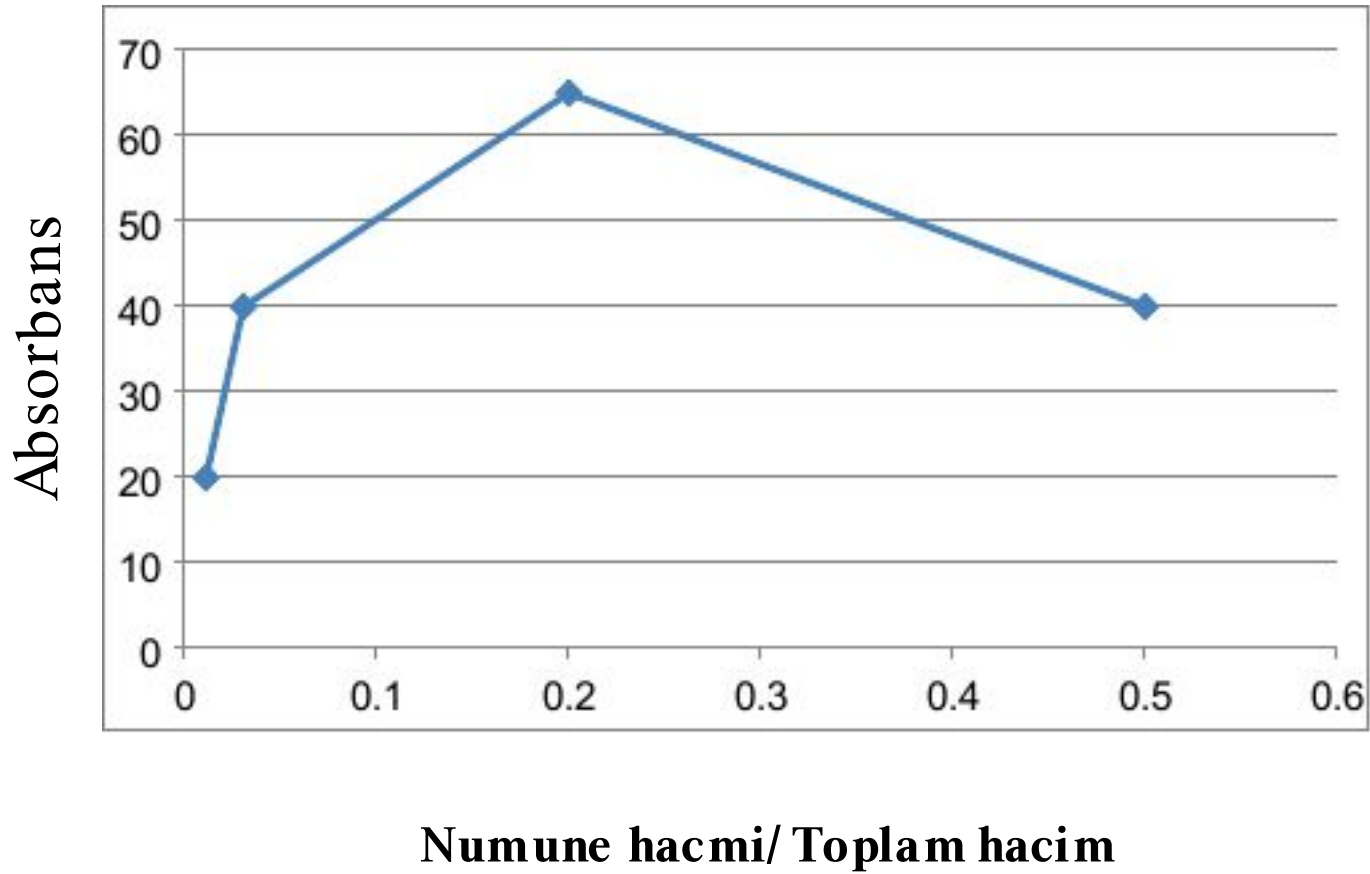
Örnek Konsantrasyonu (mM)	İlave Edilen (mM)	Elde Edilen (mM)	Yüzde (%)
0,352	1	0,854	85
0,203	1	0,845	84
0,496	1	0,874	87
0,352	0,5	0,439	87
0,203	0,5	0,482	92
0,496	0,5	0,444	88
0,352	0,25	0,221	88
0,203	0,25	0,230	92
0,496	0,25	0,225	90

Tablo 5: Geri Kazanım (Recovery) Çalışması

Üç farklı serum örneğine eklenen 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM format standardının % ne kadarının ölçülebildiğini gözlemledik. Geri kazanım farklı serumlarda ve farklı

miktarda ilave edilen format konsantrasyonlarında %84 ile %92 arasında elde edilmiştir.

5.3.Örnek Hacminin optimizasyonu



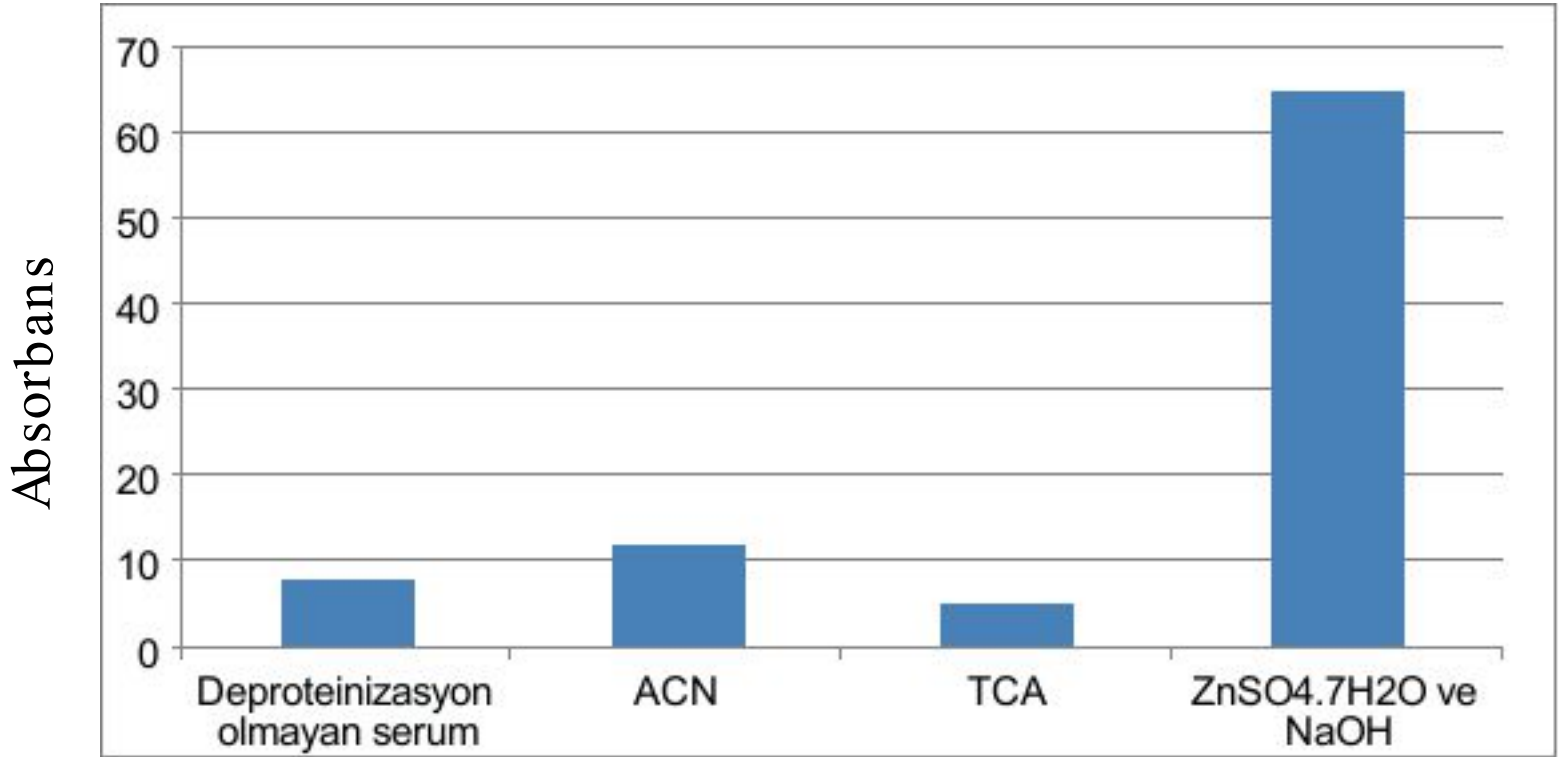
Şekil 10:Örnek Hacmini Optimizasyonu

Metodun hassasiyetini artırabilmek için numune hacminin total hacme oranı artırıldığında elde ettiğimiz absorbans miktarının arttığını gözlemledik. Numune hacminin total hacme oranı daha da arttırdığımızda çok yüksek miktarda örnek hacmine bağlı reaksiyon kinetiği değiştiği için, total hacmin % 20 kadarına kadar numune hacmimizi arttırdık. Numune hacmini arttırmak beraberinde ortamdaki matriks etkisinin artışı da getirmektedir. Bu etkiyi azaltmak için reaktif kompozisyonunda değişikli yaparak numuneden gelen proteinler ve büyük moleküllerin etkisini azaltabilen EG ve PEG ilave edildi.

5.4.Ön işlem basamağının optimizasyonu

10 adet numuneyi ACN,TCA, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve NaOH ile üç farklı deproteinizasyon işlemine tabi tuttuğumuzda ACN ile deproteinizasyon işlemi ölçüm hassasiyetine yetecek düzeyde absorbans artışı yapmadı. TCA ile deproteinizasyon işlemi örnek pH'sında çok büyük düşüşe yol açarak reaksiyon ortamındaki final pH'yı düşürüp reaksiyonun olmasını engelledi. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve NaOH kullanılarak

yaptığımız deproteinizasyon işlemi ise pH'da değişim yapmaksızın reaksiyon absorbanslarında ölçüm hassasiyetini artıracak şekilde sonuç verdi. 1 mM format konsantrasyonundan ACN ile çöktürme sonucu 12 miliabsorbans, TCA ile çöktürme sonucu 5 miliabsorbans, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve NaOH ile çöktürme sonucu 65 miliabsorbans elde ettik.



Tablo 6:Ön işlem basamağının optimizasyonu

5.5.NAD ve FDH final konsantrasyon optimizasyonu

1-10 mM konsantrasyon aralığında NAD konsantrasyonu 18 u/l ile 800 u/l konsantrasyonları arasında FDH enzim kullanılarak denemeler yapıldı. Konsantrasyon olarak 4 mM NAD ve 400u/l FDH enzimi kullanılınca yöntemin optimize olduğu gözlemlendi. Daha yüksek NAD ve FDH enzim konsantrasyonlarında elde edilen absorbans değişmedi.

5.6. En düşük tespit limiti ve ölçüm limiti

En düşük tespit limiti 0,039 mM olarak ve en düşük ölçüm limiti 0,077 mM olarak tespit edilmiştir.

5.7.Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik değerlendirilmesi için  seviye serum kullanılmış. Yüksek seviye serumda ortalama $1,37\pm0,19$ mM olarak ve CV değeri %13,9 olarak hesaplanmıştır. Orta seviye serumda ortalama $0,77\pm0,11$ mM olarak ve CV değeri %14,4 olarak hesap edilmiştir. Düşük seviye serumda ortalama $0,21\pm0,04$ mM ve CV değeri %20 olarak hesaplanmıştır.



TARTIşMA

Günümüze kadar yayınlanan literatürlerde kan format düzeyi ölçümü için florometrik,gaz kromotografik ve fotometrik metotlar bildirilmiştir. Shahangian ve ark.larının yayınladığı fluorometrik format metodunu incelediğimizde yüksek konsantrasyonlarda format ölçümleri için planlandığı ve normal insanlardaki format konsantrasyon aralığı için hassas olmadığı bildirilmiştir (54). Normal insanlardaki format konsantrasyonunu daha iyi yansıttığı için GC ve fotometrik format yöntemleri incelendi (43,44,45). GC cihazının her hastanede bulunmaması ve diğer yöntemlere göre pahalı bir metod olup, yöntemin personel desteğine fotometrik yöntemle göre daha fazla ihtiyaç duyması bizi fotometrik yöntemleri incelemeye yöneltti.

Buttery ve ark.larının fotometrik yöntemi (43),Blomme ve ark.larının fotometrik yöntemi (44) ve Grady ve ark.larının fotometrik yöntemini incelendi (45). Buttery ve ark.larının format metodunu kurmaya çalışıldı ama yeterli absorbans elde edilemedi. FDH enziminin yetersiz olduğu, yöntemin içindeki kimyasallar olan INT ve phenazine methosulfate (PMS) çıkarıldığında hem daha ucuz hem daha duyarlı bir yöntem haline gelebileceği düşünüldü. Format miktarının artmasını sağlamak için kullanılan serum miktarının artırılması gerektiği düşünüldü. Blomme ve ark.larının format metodunu incelediğimizde yeterli absorbans tespit edilmedi ve FDH konsantrasyonu düşüktü. Buttery ve ark.larının metoduna göre ucuz olan bu yöntemin geliştirilmesi gerektiği düşünüldü. Grady ve ark.larının metodunda yer alan INT kimyasalını metodun içinden çıkarılıp denemeler yapıldı. Metodun pH değeri 6,0 olduğundan FDH enziminin optimum çalışma aralığında olmadığı tespit edildi ve yeterli absorbans alınamadı.

Kendi optimize yöntemimizi kurarken diğer metodlarda kullanılan INT ve diaforaz kimyasalları kullanılmadı. Böylece daha ucuz daha hassas bir metot kurulması hedeflendi. FDH enziminin optimum çalışabilmesi için pH=7,4 olarak ayarlanıp FDH 400 U/L konsantrasyonunda kullanıldı. FDH miktarı 800 U/L konsantrasyona kadar çıkarıldı ama reaksiyonun gücünde değişiklik olmadığı gözlenip 400 U/l konsantrasyonunda kalması kararlaştırıldı. NAD konsantrasyonu FDH enzimi konsantrasyonu ile uyumlu olacak şekilde optimize edildi. Literatürde NAD konsantrasyonu olarak 1-10 mM kullanılmıştır. Bizde yöntemimizde bu aralıktaki NAD konsantrasyonlarını çalıştık ve optimum NAD konsantrasyonu 4 mM olarak belirledik. Serum hacmi/total hacim artırılıp daha yüksek absorbans alınması

hedeflendi. İncelediğimiz literatürlerde 0,012 ve 0,31 olan total hacim/numune hacmi oranı 0,2 seviyesine kadar çıkarıp denemeler yapıldı. Arttırılan serum miktarı matriks etkisinde artmasına neden oldu. Bundan dolayı etkin bir deproteinizasyon yapılması gerekti. Serumda deproteinizasyon için kullanılan ACN etkin olarak matriks etkisini azaltmadığı tespit edildi. Kullanılan TCA asidik tabiatı dolayısı ile en etkin deproteinizasyonu sağlaması beklenirken ortam pH'sını düşürüp FDH enziminin optimum olarak çalıştığı pH'ı değiştirdi. Bir başka deproteinizasyon ajanı olan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ve NaOH kullanarak başarılı olundu. 1 ml serum örneği ile 150 μL %7,5 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ karıştırılıp kuvvetli bir şekilde karıştırıldı ve ortamın pH değeri değişmemesi için 75 mililitre 0,4 N NaOH eklendi. 1mM konsantrasyonda olan format standartı ACN ile deproteinizasyona tabi tutulduğunda 12 miliabsorbans, TCA ile deproteinize edildiğinde 6 miliabsorbans, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ve NaOH ile deproteinize edildiğinde ise 65 miliabsorbans elde edildi. Serumun içindeki format ile daha iyi bir reaksiyon vermesi için reaktiflerimize EG ve PEG eklenmiş böylece format daha homojen bir ortamda FDH ile reaksiyona girebildi. EG ve PEG bulunan reaktiflerimizle serum karıştırıldığında vorteks yapıp homojen ortam sağlanması için katkıda bulunuldu.

Optimize edilen yöntemimizin tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Üç farklı seviye serum kullanıldı. Her bir serumdan 10 kez absorbans ölçümü yapıp ortalama ve CV hesaplamaları yapıldı. Yüksek seviye serumdaki ortalama $1,37 \pm 0,19$ mM ,orta seviye serumdaki ortalama $0,77 \pm 0,11$ mM, yüksek seviye serumdaki ortalama $0,77 \pm 0,11$ mM olarak hesaplandı ve bu üç farklı seviye serumun CV değerleri %13,9 ile % 20 arasında gerçekleşti.

Optimize yöntemimizin doğrusallık çalışmaları yapıldı. 10 mM format konsantrasyonu seri dilüsyonla lineer absorbans alabildiğimiz konsantrasyona kadar sulandırıldı. Normal insanların kullanımı için kurulan optimize yöntemimiz (0-1 mM) olan normal populasyon format konsantrasyonunun üzerindeki format konsantrasyonlarını da lineer ölçebilecek hassasiyettedir. Seri dilüsyonla 10 mM konsantrasyondaki format standartı 0,039 mM konsantrasyondaki format düzeyini bile $R^2=0,99$ olacak şekilde lineer olarak ölçebildi.

Optimize yöntemimizin recovery(geri kazanım) çalışmaları yapıldı. Üç farklı serum düzeyine üç farklı konsantrasyonda format standartı ekleyip eklenen standartın

ne ölçüde ölçülebildiği tespit edildi. 0,203 mM konsantrasyonda olan hasta serumuna 1mM konsantrasyonda format standart eklendi. Eklenen haliyle deproteinizasyona tabi tutulan numuneyi ölçtüğümüzdeki absorbansa karşılık gelen konsantrasyondan 0,203 mM konsantrasyonu çıkardığımızda elde ettiğimiz konsantrasyonu 1mM konsantrasyona böldüğümüzde %84 oranında geri kazanım sağlandı. Aynı serum 0,5mM konsantrasyonda format standartı ekleyip deproteinizasyon işlemine tabi tutuldu. Elde edilen geri kazanım %92 olarak hesaplandı. Aynı serum 0,25 mM konsantrasyonda format standartı eklenip deproteinizasyon işlemine tabi tutuldu. Elde edilen geri kazanım %92 olarak hesaplandı. 0,352 mM konsantrasyonunda farklı bir serum için de 1mM konsantrasyonunda format standartı eklenip deproteinizasyon işlemine tabi tutulup absorbansı ölçüldü. Elde edilen geri kazanım %85 olarak hesaplandı. 0,352 mM konsantrasyonda serum 0,5 mM konsantrasyonda format standartı eklendiğinde elde edilen geri kazanım %87 olarak hesaplandı. 0,352 mM konsantrasyonunda olan serum 0,25 mM konsantrasyonda format standartı eklendiğinde geri kazanım % 88 olarak hesaplandı. Diğer bir seviye olan 0,496 mM konsantrasyonda olan serum 1mM konsantrasyonda format standartı eklenip deproteinizasyon işlemine tabi tutularak absorbansı ölçüldü. Elde edilen geri kazanım %87 olarak hesaplandı. 0,496 mM olan serum 0,5 mM konsantrasyonda format standartı eklendi. Elde edilen geri kazanım %88 olarak hesaplandı. 0,496 mM konsantrasyonda olan serum 0,25 mM konsantrasyonda format standartı eklendi. Elde edilen geri kazanım %90 olarak hesaplandı. 1mM format standartı eklenmesi 100 µL 10mM format standartı ile 0,203; 0,352; 0,496 mM seviyelerindeki üç farklı serum örneğinden 900 µL karıştırılarak elde edilen serum deproteinizasyona tabi tutularak gerçekleştirilmiştir. 0,5 mM format standartı eklenmesi 50 µL 10 mM format standartı ile 0,203; 0,352; 0,496 mM seviyelerindeki üç farklı serum örneğinden 950 µL karıştırılarak elde edilen serum deproteinizasyona tabi tutularak gerçekleştirilmiştir. 0,25 Mm format standartı eklenmesi 25 µL 10 mM format standartı ile 0,203; 0,352; 0,496 mM seviyelerindeki üç farklı serum örneğinden 975 µL karıştırılarak elde edilen serum deproteinizasyona tabi tutularak gerçekleştirilmiştir. Serum matriks etkisinin ortadan kaldırmayacak miktarda standartla serumumuzu karıştırarak ölçümümüzün etkilenmemesi hedeflendi. Bu şekilde serumun matriksi korunmuş ve geri kazanım çalışmasının güvenliği sağlanmış oldu.

Parkinson Hastalığı bradikinezi, rijidite, istirahat tremoru ve postural

denge bozukluğu semptomlarıyla seyreden dünyada ikinci sıklıkta görülen nörodejeneratif hastalıktır. Substansia nigradaki dopamin üreten hücrelerde kayıp ile seyreden bir hastalık olan parkinsonda etyogenez olarak oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, eksitoksisite, nörotrofik faktör yetersizliği, nöroinflamasyon gibi sebepler suçlanmaktadır. Çevresel faktörlerle ve çeşitli toksinlerle mitokondrideki kompleks I eksikliği ile Parkinson Hastalığı arasında ilişki bilinmektedir. Parkinson Hastalığında mitokondriyal patoloji ile ilgili kanıtlar artarken mitokondri içindeki moleküller seviyede de bazı ilişkilerin ortaya konmasına ihtiyaç vardır.

Tek karbon metabolizması tek karbon birimlerinin aktarılması ile yüzlerce hayati molekülün sentezini içeren önemli bir konudur. SAM sentezi ve metilasyon, myelin sentezi, pürin-pirimidin sentezi, hücre membran akışkanlığı gibi önemli reaksiyonları meydana getiren tek karbon metabolizmasının stoplazmada olduğu kadar mitokondrideki reaksiyonlarda da önemli roller vardır.

Mitokondrinin görevleri formillenmiş metyonil t-RNA sentezi, pürin , kolin, histidin katabolizması ayrıca serin ve glisin birbirine çevrimi olarak sayılabilir. Tek karbon birimlerinin aktarılması ile bu reaksiyonlar meydana gelebilmektedir. Oksidasyon yönünde gelişen reaksiyonlar sonucu mitokondri format üretmektedir ve bu molekül stoplazmadaki tek karbon metabolizması içinde hayati bir moleküldür. Üretilen formatın çoğunlukla mitokondri kaynaklı olması ve stoplazmadaki reaksiyonlar için de çok önemli olması formatı hücre için anahtar bir molekül hale getirmektedir.

Hasta grubunda belirgin olarak azalmış serum format düzeyleri hiçbir tek karbon meabolizması parametresi ile korelasyon göstermemiştir. Bu durum sağlıklı bireylerdeki format düzeyleri için de aynı şekilde tespit edilmiştir. Dolayısıyla Parkinson Hastalarında azalan format düzeyinin, stoplazmik veya hücre dışı tek karbon metabolizması belirteçlerinden ziyade kaynağını aldığı mitokondriyal tek karbon metabolizması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız tek karbon birimlerini stoplazmadan mitokondriye taşıyan format molekülünün Parkinson Hastalarında azalmış olması mitokondriyal bir patolojiyi destekleyebileceğini ortaya koymuştur. Format molekülü mitokondrideki tek karbon birimlerinin stoplazmaya aktarıcısı konumunda bulunmaktadır. Yaptığımız çalışmada serum format

konsantrasyonu parkinson hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyinde düşük bulunmuştur. Bu durum mitokondriyal tek karbon metabolizmasının parkinson hastalarında bozulduğu anlamına gelebilir. Parkinson Hastalığında sıklıkla suçlanan mitokondriyal disfonksiyon, format üretiminin azalması şeklinde karşımıza çıkıyor olabilir. Mitokondriyal disfonksiyonda suçlanan kompleks I aktivite düşüklüğü Parkinson Hastalığında enerji üretiminde düşüşe neden olabilir. Mitokondrideki ATP bağımlı reaksiyonlar etkileneceğinden format üretimini bu durum da etkiliyor olabilir. Tek karbon metabolizmasının etkilenmesi nedeniyle format üretiminin azalması 5-10 metilen THF konsantrasyonunda da azalmaya sebep olabilir. Bu durumda mitokondri içinde pirimidin sentezi azalacağından mitokondri içindeki DNA onarımı da bozulabilir. 5-10 metilen THF, format oluşumunda ara basamak olan 10 formil THF oluşumunu sağlayan bir moleküldür. Format miktarını azaltan mitokondriyal tek karbon metabolizması defektleri 10 formil THF oluşumunu da azaltabilir. Bu durumda pürin sentezi etkileneceğinden mitokondriyal DNA onarımı bu durumdan olumsuz şekilde etkilenebilir (21).

Parkinson hasta grubunda eritrosit içi ferritin ile serum ferritin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon tespit edilirken ($p=0,0^{**}$) kontrol grubunda ise bu ilişki tespit edilemedi ($p=0,274$) . Bununla beraber hasta ve kontrol grubunda eritrosit içi ferritin konsantrasyonlarının ortalamaları arasında fark tespit edilememesi hasta grubunda eritrosit içi ferritin ile serum ferritin arasında metabolik bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Parkinson hastalarında eritrosit içi ferritin ve serum ferritin arasındaki bu pozitif korelasyon bu hastalığın hücre membranında patolojiye sebep olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Hücre membranındaki muhtemel patoloji ile serumdan hücre içine geçmemesini beklediğimiz ferritin molekülünün geçmesine sebep olabilir. Bu durumda hücre içi ile hücre dışı arasında metabolik bir ilişki beklenebilir. De Groot ve ark.larının çalışmasında da belirtildiği gibi parkinson hastalarında diğer nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi hücre membranında hasar meydana gelebilmektedir (46).

Hasta serum ferritin konsantrasyonu ile total demir bağlama kapasitesi arasında istatistiksel anlamlılık düzeyinde negatif korelasyon saptanmışken ($p=0,000^{**}$), kontrol grubunda saptanmaması Parkinson Hastalığının serum demir ve total demir bağlama kapasitesi ölçümü üzerinde etkisi olabileceğini

düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda hasta grubu ile kontrol grubunda ferritin ve total demir bağlama kapasitesi ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu. Madenci ve ark.larının (47) çalışmasındaki parkinson grubunda kontrol grubuna göre serum ferritin, serum demir, total demir bağlama kapasitesi, eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonları arasında bir fark bulunmamıştır. Bu bizim çalışmamızdaki verileri desteklemektedir. Parkinson Hastalığında suçlanan inflamasyonda bu negatif korelasyonun sebebi olabilir. İnflamasyonda negatif akut faz reaktanı olan transferrin konsantrasyonu azalarak total demir bağlama kapasitesi azalıyor, inflamasyonda artan serum ferritin ile de metabolik ilişkiye giriyor olabilir. Hu ve ark.larının yaptığı çalışmada parkinson hastalarında akut faz reaktanı olan transferrin düşük konsantrasyonda bulunmuştur (48). Bu durum aralarındaki negatif korelasyonu açıklayabilir.

Kontrol grubunda yaş ile serum folat konsantrasyonu arasında istatistiksel anlamlılık düzeyinde negatif korelasyon saptanmışken ($p=0,038$)* hasta grubunda korelasyon saptanmamasının sebebi ($p=0,067$) parkinson hastalığının metabolik etkisi nedeniyle olabilir. Kontrol grubunda ilerleyen yaş ile emilim problemlerinin olması ve serum folat konsantrasyonunun azalması beklenir. Wong ve ark.larının sağlıklı bireylerde yaptığı çalışmada yaş ile folat düzeyinde negatif korelasyon tespit edilmiş ve bu bulgu bizim çalışmamızla da uyumludur (49). Parkinson Hastalığında bu negatif korelasyonun görülmemesinin nedeni hücre membranındaki patolojiler ile folatın serumdaki hücreye geçişinin azalması olabilir. Bu durumda serum folat ortalamaları değişmemesine rağmen kontrol grubundaki yaş ile serum folat konsantrasyonu arasındaki negatif ilişkinin hasta grubunda olmamasını açıklayabilir.

Kontrol grubunda eritrosit içi ferritin konsantrasyonu ile serum folat konsantrasyonu arasında istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptanmamışken ($p=0,904$) hasta grubunda negatif korelasyon saptanmasının nedeni Parkinson Hastalığının folat metabolizması etkisi nedeniyle meydana gelmiş olabilir ($p=0,007$)*. Parkinson hastalarında muhtemel artmış folat yıkımına rağmen hasta ve kontrol grubunda eritrosit içi ferritin konsantrasyonu ve serum folat konsantrasyonu ortalamaları arasında fark bulunamamıştır. Eritrosit içi ferritin folat katabolizmasında rol almaktadır. Suh ve ark.larının yayınında eritrosit içi ferritin

molekölünün folat katabolizmasında rol aldığını bildirmişlerdir (50). Parkinson hastalarında artmış folat yıkımının hasta grubundaki eritrosit içi ferritin ile serum folat konsantrasyonu arasındaki negatif korelasyonu açıklayabileceğini düşünüyoruz.

Kontrol grubunda yaş ile serum B 12 vitamini konsantrasyonu arasında istatistiksel anlamlılık düzeyinde pozitif korelasyon saptanmışken ($p=0,002$) hasta grubunda korelasyon saptanmamasının nedeni Parkinson Hastalığının B 12 vitamini emilimi üzerine etkisi nedeniyle olabilir ($p=0,230$). Hasta ve kontrol grubundaki B 12 vitamin konsantrasyonlarının ortalamaları arasında bir fark tespit edilmemiştir. Kontrol grubunda yaş ile beraber B 12 vitamini ihtiyacı artacağından emilim de artacaktır. Kontrol grubundaki pozitif korelasyon buna işaret etmektedir. Hasta grubunda kontrol grubundaki pozitif korelasyonun olmamasının sebebi parkinson hastalığının B 12 vitamininin emiliminin engellemesi olabilir. Parkinson hastalarının kullandığı levadopa tedavisinin de etkisi olabilir. Levadopa metilasyonla dopamine dönüşür ve metilasyon da B 12 vitamininin kullanılmasını gerektirir. Müller ve ark.larının yaptığı çalışmada levadopa metilasyonunun metil grubu sağlayan vitaminlerle olduğu bildirilmiştir(51). Hasta grubundaki tedavinin B 12 vitamini kullanımını arttırması nedeniyle kontrol grubundaki pozitif korelasyon hasta grubunda görülmemiş olabilir.

Kontrol grubunda eritrosit içi ferritin konsantrasyonu ile B 12 vitamini arasında istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptanmamışken ($p=0,272$) hasta grubunda negatif korelasyon saptanmasının nedeni Parkinson Hastalığının folat metabolizmasına etkisi nedeniyle olabilir ($p=0,012$). Hasta ve kontrol grubunda B 12 vitamini ve eritrosit içi ferritin konsantrasyon ortalamaları arasında bir fark bulunamadı. Eritrosit içi ferritin folat katabolizmasında rol aldığından serum folat konsantrasyonu ile ters ilişkide olması beklenir. Suh ve ark.ları eritrosit içi ferritin molekülünün folat katabolizmasında rol aldığından bahsetmektedir (50). Bu bulgulara uyumlu olarak bizim çalışmamızda da eritrosit içi ferritin ile serum folat konsantrasyonu arasında negatif korelasyon tespit edildi. Parkinson hastalarında serum folat konsantrasyonunu ile eritrosit içi ferritin konsantrasyonu arasındaki negatif korelasyon bulunması B 12 vitamininin katabolizmasını arttırmış olabileceğini düşündürmektedir.

Kontrol grubunda folat ile B 12 vitamini konsantrasyonu arasında istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptanmamışken ($p=0,134$) hasta grubunda negatif korelasyon saptanmasının Parkinson Hastalığını oluşturan mekanizmaların folat ve B

12 vitamininin serum konsantrasyonlarına etki etmesi nedeniyle olabilir ($p=0,008$). Hasta ve kontrol grupları arasında folat ve B 12 vitamini ortalamaları arasında bir fark bulunamamıştır. Bununla beraber metiyonin sentaz enzimi için kofaktör görevi gören B 12 vitamininin metil kobalamin formunun üretilmesinde bir aksaklık olması durumunda fonksiyonel olarak B12 vitamini eksikliği olarak karşımıza çıkabilmektedir. Parkinson Hastalığında olabilecek metilasyon kapasitesindeki azalma B12 vitamininin metil kobalamin formuna dönüşümünü engellemiş olabilir. Folat tuzağında metiyonin sentaz enziminin substratlarından 5-metil THF'nin metil kobalamin miktarının azalmış üretiminin sonucu olarak artması serum folat ve serum B 12 vitamini arasındaki negatif korelasyonun bir sebebi olabilir. Mahajan ve ark.ları yaptıkları çalışmada vejeteryan bayanlarda görülen B12 vitamini eksikliğinde folat tuzağı olabileceğinden bahsetmiştir ve bu bizim çalışmamızda folat ile B 12 vitamininin arasındaki negatif korelasyonu açıklayabilir. Bu durumu açıklayacak diğer bir ihtimal de metiyonin sentaz enzimi üzerinde hasta grubunda olması muhtemel inhibisyonudur. Muhtemel bir inhibisyonda serum folat ve B 12 vitamini konsantrasyonlarının ortalamaları değişmemesine rağmen folat tüketilip, B12 vitamininin kullanılamaması nedeniyle hasta grubunda negatif korelasyon karşımıza çıkabilir. Li ve ark.larının yaptığı çalışmada metiyonin sentaz enzim poliformizmi bulunan hastalarda folat metabolizması etkilenmiştir ve bu bulgu bizim çalışmamızla uyumludur (52). Dorszewska ve ark.ları Parkinson Hastalığında metiyonin sentaz enzimi polimorfizmi bulunduğunu bildirmiştir (55).

Hasta grubunda B12 vitamini ile idrar MMA konsantrasyonu arasında negatif korelasyon saptandı ($p=0,002$). Ancak kontrol grubunda bu parametreler arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı ($p=0,244$). Ayrıca kontrol grubu ve hasta grubu arasında B12 vitamini ortalamaları açısından bir fark bulunmamıştır. Hasta grubundaki B12 vitamininin deoksi adenzil kobalamin formunun üretiminde azalma olabilir. MMA, Metil Malonil KoA Mutaz enzimi ile deoksi adenzil kobalamin koenzimi kofaktörlüğünde süksinil KoA'ya dönüşmektedir. Harrington yaptığı çalışmada B12 vitamininin konsantrasyonunu ölçmenin yanında fonksiyonel olarak B12 vitamininin ölçümünde önemli olduğunu bildirmiştir (53). Yani B12 vitamini yeterli düzeyde olsa bile fonksiyonel olarak eksik olacağından MMA birikimine yol açabilir.

Eritrosit içi ferritin ile RBC folat konsantrasyonu arasında kontrol grubunda korelasyon saptanmamasına ($p=0,469$) rağmen hasta grubunda negatif korelasyon saptandı ($p=0,019$). RBC folat ve eritrosit içi ferritin konsantrasyonlarının ortalamaları arasında hasta ve kontrol grubunda bir fark tespit edilmedi. Folat katabolizmasında eritrosit içi ferritin rol almasından dolayı, serum folat konsantrasyonu ile RBC folat arasında negatif korelasyon olması beklenebilir. Suh ve ark.larının yaptığı çalışmada eritrosit içi ferritin folat katabolizmasında rol aldığı bildirilmiştir (50). Parkinson hasta grubundaki muhtemel artmış folat yıkımı kontrol grubunda görülmeyen negatif korelasyonu açıklayabilir.

Hasta ve kontrol grubunda serum folat konsantrasyonu ile RBC folat konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p=0,000$). Kontrol grubundaki kişilerin hiçbir hastalığı olmadığı için serum folat konsantrasyonunun RBC folat konsantrasyonuna direk etki etmesi beklenir. Hasta grubunda da serum folat artışının RBC folat konsantrasyonunu artırması Parkinson Hastalığının eritrositlerde reseptör düzeyinde bir patolojiye sebep olmadığını bize düşündürmektedir.

Kontrol grubunda serum B12 vitamini ile RBC folat konsantrasyonu arasında istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptanmamışken ($p=0,372$), hasta grubunda pozitif korelasyon saptandı ($p=0,0$). Bunun sebebi Parkinson Hastalığında B12 vitamininin metil kobalamin formunun üretiminde azalma meydana gelebileceğinden RBC folat miktarının artması B12 vitamininin kullanımı azalacağından B12 vitamini konsantrasyonu da artacaktır. Ayrıca Parkinson Hastalığında metiyonin sentaz enziminde inhibisyon meydana geliyor olabilir (52). Bu durumda bu enzimin kofaktörleri olan folat ve B 12 vitamini de artabilecektir.

Parkinson hastalarında ve kontrol grubunda MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyon tespitler yapılmıştır. Heterozigot, homozigot ve normal genetik özellik gösterme yüzdeleri açısından hasta grubu ve kontrol grubu arasında fark tespit edilememiştir.

Çalışmamızda, laboratuvarlar için kullanımı kolay, ucuz, fazla iş gücü kaybına neden olmayan, lineer yeni bir format yöntemi kuruldu. Serum matriks etkisini giderilip yöntem stabil hale getirildi. Yalnızca referans değerler arasındaki format konsantrasyonu için değil, aynı zamanda metanol zehirlenmesi gibi format konsantrasyonunun çok yükseldiği durumlarda kullanım için yöntemimiz uygundur.

Çalışmamızda literatürde ilk kez Parkinson hastalarının serum format konsantrasyonları ölçülmüş ve format konsantrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu konuda ek çalışmalar yapıp mitokondri içindeki tek karbon belirteçlerinin ölçümü değerli bilgiler sağlayabilir. Başka mitokondriyal patolojiler suçlanan hastalıklarla format arasında ilişki olup olmadığı araştırılıp format molekülünün mitokondriyal patolojileri değerlendirmede ne derece önemli bir molekül olduğu ortaya konulmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Finkelstein JD.Homocysteine:a history in progress.Nutr Rev 58:193-204,2000
2. Mato JM,Lu SC.Role of S-Adenosyl-L-Methioninein Liver Health and Injury.Hepatology 45:1306-12,2007.
- 3 Natalie M.J. van der Put, Henny W.M. van Straaten, Frans J.M:Trijbels and Henk J. Blom. Folate, Homocystine and Neural Tube Defects: An Overview. Exp. Biol. Med. 2001, 226: 243-270.
4. Fox Jennifer, Stover J. Patrick. Folate-mediated one-carbon metabolism. Vitamins and Hormones. Volume 79 Chapter 1
5. Jae Rin Suh, Oppenheim, E. W., Girgis, S. & Stover, P. J. Purification and properties of a folate-catabolizing enzyme. *J. Biol. Chem.* 275, 35646–35655, 2000.
6. Banerjee, R. V & Matthews, R. G. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J.* 4, 1450–1459, 1990.
7. Finkelstein, J. D. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, 1694–1699, 2007.
8. Mark Lucock. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. Molecular Genetics and Metabolism 71; 121–138, 2000.
9. Reed, M. C. *ve diğ*. A mathematical model gives insights into nutritional and genetic aspects of folate-mediated one-carbon metabolism. *J. Nutr.* 136, 2653–2661, 2006.
10. Tan LU, Drury EJ, Mackenzie RE. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase methenyl- tetrahydrofolate cyclohydrolase formyltetrahydrofolate synthetase: A multifunctional protein from porcine liver. *J Biol Chem* 252:1117–1122, 1977.
11. Appling ,D.R.Compartmentation of folate-mediated one-cabon metabolism in eukaryotes.The FASEB Journal Vol.5 September 1991.2645-2651
12. Wray J. Extract of a letter, written by Mr. John Wray to the publisher January13. 1670. concerning some un-common observations and experiments made with an acid

juice to be found in ants. *Philos Trans R Soc Lond* 1670;5:2063 – 6.

13. Good JM, Gregory OG, Bosworth N. *Pantologia. A new cyclop a dia*. London: Kearsley, 1813.

14. Sakami W. The conversion of formate and glycine to serine and glycogen in the intact rat. *J Biol Chem* 1948;176:995.

15. Hartman SC, Buchanan JM. Nucleic acids, purines, pyrimidines(nucleotide synthesis). *Ann Rev Biochem* 1959;28:365 – 410.

16. Huennekens FM, Whiteley HR, Osborn MJ. Mechanisms of formylation and hydroxymethylation reactions. *J Cell Comp Physiol* 1959;54:109– 25.

17. Tibbetts AS, Appling DR. Compartmentalization of mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Ann Rev Nutr* 2010;30:57 – 81.

18. Anderson DD, Eom JY, Stover PJ. Competition between sumoylation and ubiquitination of serine hydroxymethyltransferase 1 determines its nuclear localization and its accumulation in the nucleus. *J Biol Chem* 2012;287:4790 – 9.

19. Stover PJ, Chen LH, Suh JR, Stover DM, Keyomarsi K, Shane B. Molecular cloning, characterization, and regulation of the human mitochondrial serine hydroxymethyltransferase gene. *J Biol Chem* 1997;272:1842 – 8.

20. Davis SR, Stacpoole PW, Williamson J, Kick Lilia S, Quinlivan Eoin P, Coats Bonnie S, et al. Tracer-derived total and folatedependent homocysteine remethylation and synthesis rates in humans indicate that serine is the main one-carbon donor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E272 – 9.

21. Beaudin AE, Abarinov EV, Noden DM, Perry CA, Chu S, Stabler SP, et al. Shmt1 and de novo thymidylate biosynthesis underlie folate-responsive neural tube defects in mice. *Am J Clin Nutr* 2011;93:789 – 98.

22. Slow S, Garrow TA. Liver choline dehydrogenase and kidney betaine-homocysteine methyltransferase expression are not affected by methionine or choline intake in growing rats. *J Nutr* 2006;136:2279 – 83.

23. Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, et al.

Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet* 2012;21:1496 – 503.

24. Martin-Amat G, McMartin KE, Hayreh SS, Hayreh MS, Tephly TR. Methanol poisoning: ocular toxicity produced by formate. *Toxicol Appl Pharm* 1978;45:201 – 8.

25. Gal EM, Sherman AD. L-Kynurenine its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochem Res* 1980;5:223 – 39.

26. Waterham HR. Defects of cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 2006;580:5442 – 9.

27. Aoyama Y, Yoshida Y. Different substrate specificities of lanosterol 14 α -demethylase (P-450 14α DM) of *Saccharomyces cerevisiae* and rat liver for 24-methylene-24,25-dihydrolanosterol and 24,25-dihydrolanosterol. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;178:1064 – 71.

28. Mihalik SJ, Rainville AM, Watkins PA. Phytanic acid α -oxidation in rat liver peroxisomes. *Eur J Biochem* 1995;232:545 – 51.

29. Poulos A, Sharp P, Singh H, Johnson DW, Carey WF, Easton C. Formic acid is a product of the α -oxidation of fatty acids by human skin fibroblasts: deficiency of formic acid production in peroxisome-deficient fibroblasts. *Biochem J* 1993;292:457 – 61.

30. Foulon V, Sniekers M, Huysmans E, Asselberghs S, Mahieu V, Mannaerts GP, et al. Breakdown of 2-hydroxylated straight chain fatty acids via peroxisomal 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase: a revised pathway for the α -oxidation of straight chain fatty acids. *J Biol Chem* 2005;280:9802 – 12.

31. Wray JW, Abeles RH. The methionine salvage pathway in *Klebsiella pneumoniae* and rat liver. Identification and characterization of two novel dioxygenases. *J Biol Chem* 1995;270:3147 – 53.

32. Cook RJ, Champion KM, Giometti CS. Methanol toxicity and formate oxidation in NEUT2 mice. *Arch Biochem Biophys* 2001;393:192 – 8.

33. Palese M, Tephly TR. Metabolism of formate in the rat. *J Toxicol Environ Health* 1975;1:13– 24.

34. Nicholls P. Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;67:610 – 6.
35. Nicholls P. The effect of formate on cytochrome aa3 and on electron transport in the intact respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1976;430:13– 29.
36. Kapur BM, Vandenbroucke AC, Adamchik Y, Lehotay DC, Carlen PL. Formic acid, a novel metabolite of chronic ethanol abuse, causes neurotoxicity, which is prevented by folic acid. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:2114 – 20.
37. Gültepe, M., Ozcan, Ö., Avşar, K., Çetin M., Özdemir A. S., Gök M. Urine Methylmalonic Acid Measurements For The Assessment Of Cobalamin Deficiency Related to Neuropsychiatric Disorders, *Clin.Biochem*, 36(4), 275-282, 2003.
38. Shapira AHV. Etiology of Parkinson's disease *Neurology* 2006;66:10-23
39. Shapira AHV. Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008;7:97-109
40. Shapira AHV. Mitochondria in the etiology of Parkinson's disease. In: Koller WC, Melamed E. Editors. *Handbook of Clinical Neurology Vol.83(part 1) Parkinson's disease and related disorders* Amsterdam, Elsevier:2007. p.481-491.
41. Wajner, M., and Coelho, J.C. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production, *J. Inher. Metab. Dis.* 20, 761-768, 1997.
42. Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W., Irwin I., Chronic Parkinsonism in Humans due to a product of meperidine analog synthesis, *Science*, 219, 979-980, 1983.
43. Buttery JE. A simple enzymatic method for the measurement of abnormal levels of formate in plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol.12, September/October 1988. 292-294.
44. Blomme B. ve diğer. Cobas Mira S Endpoint Enzymatic Assay for Plasma Formate. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol.25, March 2001. 77-80.
45. Grady S ve diğer. Improved enzymic assay for serum formate with colorimetric endpoint. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol.10, January/February 1986. 1-5.

46. De Groot NS ve diğer.Is membrane homeostasis the missing link between inflammation and neurodegenerative diseases?Cell.Mol.Life Sci.(2015)72:4795-4805
47. Madenci G ve diğer.Serum iron,vitamin B 12 and folic acid levels in Parkinson's disease.Neurochem Res.2012 Jul;37(7):1436-41
48. Hu Y, ve diğer.Investigation on abnormal iron metabolism and related inflammation in Parkinson disease with probable RBD.Plos One.2015 Oct 2;10(10):e0138997
49. Wong C.W.,ve diğer.Vitamin B12 deficiency in the institutionalized elderly:A region study.Experimental Gerontology 69(2015)221-225
50. Suh J.R.ve diğer.Purification and Properties of a folate-catabolizing enzyme.The Journal of Biological Chemistry Vol 275,No 45,Issue of November 10,pp.35646-35655,2000
51. Müller T.ve diğer.Methyl group-donating vitamins elevate 3-o-methyldopa in patients with Parkinson.Clin Neuropharmacol.2013 Mar-Apr;36(29):52-4
52. Li WX ve diğer.Homocysteine Metabolism Gene Polymorphisms(MTHFR C677T,MTHFR A1298C,MTR A2756G and MTRR A66G)Jointly Elevate the Risk of Folate Deficiency
53. Harrington DJ.Laboratory assesment of vitamin B 12 status.J.Clin.Pathol.2016 May 11.pii:jclinpath-2015-203502
54. Shahangian ve diğer.An Enzymatic Method for the Analysis of Formate in Human Plasma.Journal of Analytical Toxicology,Vol 8,November/December 1984.273-276.
55. Dorszewska J. ve diğer.Oxidative DNA damage and level of thiols as a related to polymorphisms of MTHFR,MTR,MTHFD1 in Alzheimer's and Parkinson's diseases.Acta Neurobiol Exp(Wars).2007;67(2):113-29.
56. Novembrino C. ve diğer.Erythrocyte ferritin concentration:analytical performance of the immunoenzymatic IMx-Ferritin(Abbott) assay .Clin.Chem Lab Med 2005;43(4):449-453

