

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TİBBİ BİYOKİMYA SERVİSİ

ASTİM HASTALIĞININ METABOLİK TEMELİNDEKİ OLASI
BİYOKİMYASAL DEĞİŞİMLER İÇERİSİNDE TEK KARBON METABOLİZMASININ
YERİNİN İNCELENMESİ

R. Soner YEŞİLBAŞ
Hv. Tbp. Yzb.

TİBBİ BİYOKİMYA
TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL

2014

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TİBBİ BİYOKİMYA SERVİSİ

ASTİM HASTALIĞININ METABOLİK TEMELİNDEKİ OLASI
BİYOKİMYASAL DEĞİŞİMLER İÇERİSİNDE TEK KARBON METABOLİZMASININ
YERİNİN İNCELENMESİ

R. Soner YEŞİLBAŞ
Hv. Tbp. Yzb.

TİBBİ BİYOKİMYA
TIPTA UZMANLIK TEZİ

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi
Tıbbi Biyokimya Servisi İçin Öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıőtır.

TEZ DANIŐMANI:
Prof. Ecz. Kd. Alb. Mustafa GÜLTEPE

İSTANBUL

2014

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığına;

“Astım Hastalığının Metabolik Temelindeki Olası Biyokimyasal Değişimler İçerisinde Tek Karbon Metabolizmasının Yerinin İncelenmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Bu tez konusu Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Biyokimya Servisi’ nin 21 Nisan 2013 tarih ve 4014-138-13 sayılı yazısıyla verilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Ecz.Kd.Alb. Mustafa GÜLTEPE

 ye : Prof. Tbp. Alb. Taner  ZG RTAş

 ye : Doç. Tbp. Alb. Osman Metin İPçİOğLU

Yedek  ye : Prof. Dr. Ferhan KARADEMİR

Hv. Tbp. Yzb. R. Soner YEşİLBAş’ ın 15/12/2014 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri  yeleri tarafından uygun görülmüştür ve kabul edilmiştir.

Hayati BİLGİ 

Profesör Deniz Tabip Tümamiral

GATA Komutan Bilimsel Yardımcısı,

Askeri Tıp Fakültesi Dekanı ve

Eğitim Hastanesi Baştabibi

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

TÜRKÇE ÖZET

İNGİLİZCE ÖZET(ABSTRACT)

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

ŞEKİLLER

TABLolar

1.GİRİŞ

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Metillenme Reaksiyonlarının Moleküllerdeki Etki Mekanizma Modelleri

2.2. Tek Karbon Meta

bolizması

2.2.1. Tetrahidrofolat, B12 vitamini ve S-Adenozilmetiyonin

2.2.2. Tetrahidrofolat' daki Tek-Karbon Gruplarının Yükseltgenmesi ve İndirgenmesi

2.2.3. THF Tarafından Taşınan Tek-Karbon Gruplarının Kaynakları

2.2.4. Tek-Karbon Gruplarının Alıcıları

2.2.5. B12 vitamini'nin Yapısı Ve Bulunma Biçimleri

2.2.6. B12 vitamini'nin Emilim Ve Taşınması

2.2.7. B12 vitamini'nin İşlevleri

2.2.8. S-Adenozilmetiyonin

2.2.9. Folat, B12 Vitamini ve SAM Arasındaki İlişkiler

2.3. Tek Karbon Metabolizması Ve Amino Asit İlişkisi

2.3.1. Hiperhomosisteinemi

2.4. Fosfolipitlerin Metilasyonu

2.5. Enflamatuvar Bir Hastalık Olarak Astım Hastalığına Moleküler Yaklaşım

2.5.1. Havayolu Enflamasyon Mekanizmaları

2.5.2. Astımda Klinik Tabloya Etki Eden Ana İmmün Bileşenler

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçimi

3.1.2. Çalışmadan Dışlama Kriterleri

3.1.3. Örneklerin Toplanması

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

3.2. Biyokimyasal Yöntemler

3.2.1. Serum Folik Asit ve B12 vit. Düzeylerinin Ölçümü

3.2.2. Plazma Total Homosistein Düzeyinin Ölçümü

3.2.3. İdrar MMA Düzeylerinin Ölçümü

3.2.4. Serum Aminoasit Analizleri

3.2.5. Eritrosit İçi Total Folik Asit Ölçümü

3.2.6. Eritrosit İçi Folik Asit Alt Gruplarının Ölçümü

3.2.7. İstatistiksel Yöntemler

BULGULAR

TARTIŞMA

KAYNAKLAR

SİMGELER VE KISALTMALAR

N^5, N^{10} -MIn-THF : N^5, N^{10} Metilen Tetrahydrofolat

N^5, N^{10} -MnI-THF : N^5, N^{10} Metenil Tetrahydrofolat

N^5 -M-THF : N^5 -Metil Tetrahydrofolat

N^5 -F-THF : N^5 -Formil Tetrahydrofolat

N^{10} -F-THF: N^{10} -Formil Tetrahydrofolat

BHMT : Betain Homosistein Metil Transferaz Enzimi

CBS : Sistasyonin Beta Sentaz

DHFR : Dihydrofolat Redüktaz

DNA : Deoksiribonükleik Asit

dUMP : Deoksiüridin Monofosfat

dTMP : Deoksitimidin Monofosfat

FiGLU : Formimino glutamat

GNMT : Glisin-N-Metil Transferaz

HPLC : High Performance Liquid Cromotography(Yüksek Performanslı

Sıvı Kromatografisi)

Hcy : Homosistein

MT : Metiyonin Transferaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tek karbon kaynakları ile genetik materyal sentez ve metilasyonu ilişkisi

Şekil 2.2. Okside tek karbon olan karboksil grubu aktaran biyotin kofaktörünün yapısı

Şekil 2.3. Potent bir tek-karbon aktarıcı molekül olan SAM'ın yapısı

Şekil 2.4. Genel metil depolayıcı molekül olan tetrahidrofolatın yapısı

Şekil 2.5. THF ile SAM-SAH dönüşüm ilişkisi

Şekil 2.6. Folat alt gruplarının pürin ve pirimidin sentezi açısından incelenmesi

Şekil 2.7. Tek karbon alt grupları ve bunların aktarımından sorumlu folat alt grupları

Şekil 2.8. Tek karbon kaynağı olan diğer aminoasitlerin metabolizmaları

Şekil 2.9. Astımda rol alan enflamasyon elemanları

Şekil 3.1. Folik asit alt gruplarına ait kromatogram örneği

TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Ana Tek Karbon Parametre Düzeylerinin Standart Sapma ve p Değerleri(aradaki farkların önemliliği testi)

Tablo 4.2. Ana Tek Karbon Parametre Düzeylerinin Grup İçi Kıyaslamalarının, Gruplar Arasında(Hasta ve Kontrol) Farklılık Gösterenleri

Tablo 4.3. Hasta Grubunda, Ana Tek Karbon Parametre Düzeyleri ile Aminoasit Düzeylerinin Karşılaştırması Sonucu Anlamlı İlişki Tespit Edilenler

Tablo 4.4. Hasta Grubunda Eritrosit İçi Folat Alt Gruplarının Kendi İçlerinde ve Ana Tek Karbon Parametreleri ile Karşılaştırılması Sonucu Anlamlı İlişki Tespit Edilenler

Tablo 4.5. Aminoasit Düzeylerinin Grup İçi Kıyaslamalarının, Gruplar Arasında(Hasta ve Kontrol) Farklılık Gösterenleri

Tablo 4.6. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Ana Tek Karbon Parametreleri ve Amino Asit Konsantrasyonlarının Karşılaştırması

TEŞEKKÜR

Bir Türk Bilim İnsanı olarak, hem ülkesinin Silahlı Kuvvetler'ine bilimsel, stratejik, ekonomik düzeyde hizmet edip, hem içinde yaşadığı toplumdaki insanların sağlığına ve maddi koşullarına, devlet bütçesine, hem uluslararası bilimsel platformda milli itibara, ve de tüm dünya insanlığına bilimsel anlamda katkılar yapabilmek ve bunların hepsini birbiriyle barışık ve uyumlu kılabilmek için Atatürk Milliyetçiliği'ni özümsemiş olmak gerekmektedir.

Bunları bizzat hayatında yaşayarak örnek oluşturan, şahsi enerjisini milletin ve insanlığın menfaatine sarfetmeyi yüce değer sayan, ve tüm insanlığa faydanın somut anlamda en yakınımızdakilerden başlaması gerektiğini kendisinden öğrendiğim Sayın Hocam Prof.Ecz.Kd.Alb. Mustafa GÜLTEPE' ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

GATA Komutan Bilimsel Yardımcısı Askeri Tıp Fakültesi Dekanı ve Eğitim Hastanesi Baştabibi Profesör Deniz Tabip Tümamiral Hayati BİLGİÇ'e gerek fakültedeki öğrenciliğim gerekse mezuniyet sonrasındaki sergilediği bilimsel duruşuyla bir hoca ilgisi ve insani yönüyle de baba şefkati için ve meslektaş onurunun gereklerini öğrencilerine bizzat yaşayarak öğrettiği için saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kliniğimize kısa süre önce atanmış bulunan Biyokimya Servisi Klinik Şefim Prof.Dz.Tb.Kd.Alb. Erdinç ÇAKIR Hocam'a tezim konusundaki destek ve teşviklerinden ötürü saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetli öğretim üyesi ağabeylerim ve amirlerim, Doç.Tbp.Alb. Osman Metin İPÇİOĞLU ve Doç.Tbp.Yb. Ömer ÖZCAN'a uzmanlık eğitimim süresince gösterdikleri mesleki örnek duruşları ve bilimsel rehberlikleri için saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kendisini tanıdığımdan ötürü daima şanslı hissettiren; dostluğu, kişiliği ve analitik bakışı ile kendisine gıpta ettiğim kıymetli arkadaşım Dr. Barış BAHAR'a karşılaştığım zorlukları kolaylaştırdığı için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımnda özellikle istatistik konusundaki desteklerini unutmuyacağım ve uzmanlık eğitimime birlikte başladığım yol arkadaşım Dr. Tuba MÜFTÜOĞLU' na, hasta ve kontrol gruplarını oluştururken yardımlarını gördüğüm Dr. Ali Serdal UYUMAZ' a teşekkür ederim.

Kıymetlim, emektar annem Aysel YEŞİLBAŞ' a teşekkürü borç biliyorum; ve babam Fahri YEŞİLBAŞ' a teşekkür ederim.

Bugünlerimde önemli payı bulunan ağabeyim ve ilk hocam Yük.Mimar Sadettin YEŞİLBAŞ'a teşekkür ederim.

Mekanizmalara duyduğum ilgiye elektrik mühendisi bakışıyla katkılar sağlayan ağabeyim Metin YEŞİLBAŞ'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutlu olduğum, ve değerli dostlar kazanmaktan onur duymama vesile olan kıymetli meslektaşlarım olan başta Dr. Serdar HİRA ve Dr. Rıza Aşkın GÜRKAN olmak üzere, Dr. Nurbahar YARAŞAN, Dr. Alpaslan Coşar, Dr. Berkay Çataoğlu, Dr. Ömer Uğur Yanar, Dr. Hüseyin Erdoğan, Dr. Serkan Ahioğlu' na teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında her türlü desteği sağlayan Biy.Lâle ÖZOĞUL, Biy.Meryem GENÇ, Lab.Zerrin KAVAKLIOĞLU ve Biyokimya servisinde görevli tüm personele teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında desteği için Yük.Hem.Gizem Yağmur Ayvataş'a teşekkür ederim.

Meslektaşım ve arkadaşım Dr. Gülşen Mutluoğlu'na destekleri için teşekkür ederim.

Dostluğu yanında; düşünsel ve insani yönleriyle örnek kıymetli arkadaşım iktisatçı ve sosyolog Korhan KASAP' a teşekkür ederim.

Tez dönemimde kaybettiğim ve anıları ile hep yaşayacak ağabeyim Tacettin YEŞİLBAŞ'a, dünyadaki sıkıntılarının, insanlara faydalarının, dürüst ve fedakâr aile babası oluşunun, ebedi hayatında karşılık bulması için Allah'tan rahmet diliyorum.

ÖZET

Astım, halen tanısı klinik gözleme dayanarak konan ve eskiden beri bilinen bir hastalık olması itibariyle altta yatan moleküler mekanizmalarının henüz aydınlatılamadığını itiraf ettirir niteliktedir. Bu sorun, hekimlere, hastalık tablosu açıkça oturmuş hastaları tanımaktan başka çare bırakmamaktadır. Bu ise gecikmiş tanı, ve buna bağlı ciddi yan etkiler taşıyan antienflamatuvar palyatif tedavilere; ve astımın kronik hastalık sınıfına dahil edilmesine yolaçmıştır. Biyokimyasal yaklaşım ile astımdaki nihai klinik değişiklikler arasındaki irtibatın sağlanması gerekmektedir.

Deneysel çalışmalar ve hayvan modellerinden elde edilen farklı farklı bulgular, astımda, değişken folik asit ve diğer tek-karbon metabolizma belirteç düzeylerine bağlı olarak birbirinden farklı değerlendirmelere yolaçmıştır. Bizim çalışmamız ise bütünsel tek karbon metabolizması ile astım arasındaki ilişkiye dair ilk kapsamlı çalışma niteliğindedir. İnternetteki indeks literatür taramalarımızda, bu konuyu detaylı araştıran çalışmaya rastlamadık. Bu konudaki çalışmalar, bütünsel tek-karbon metabolizmasından ziyade, özellikle serum folat durumu ve astım arasındaki ilişkiye odaklıydı. Zira iyi bilindiği üzere, sadece serum folat seviyeleri, karmaşık bir bulmaca olan tek-karbon metabolizmasının sadece bir parçasıdır. Bu bağlamda sadece serum folatın araştırılmış olmasını da önemli ancak yetersiz bulmaktayız. Bu yüzden tek karbon metabolizmasından ayrı görülemeyecek serum folatını tek başına ölçmek yerine, bir çeşit enflamatuvar hastalık olan astım ile birliktelik gösterebilecek tanı ve takipte kullanılabilecek belirteç adayları ve tedavide kullanılabilecek preparatlar olarak işlevsel tek-karbon metabolitlerini inceleyen bir çalışma yapmayı uygun gördük.

Bu nedenle tek-karbon metabolizmasının birer bileşenleri olarak, eritrosit içi total folik asit düzeylerini, eritrosit içi folat alt gruplarının yüzde oranlarını, serum B12 vit. düzeylerini, idrar L-metilmalonik asit düzeylerini, plazma homositein düzeylerini ve serum amino asit düzeylerini ölçüp değerlendirmeyi uygun gördük. Çalışmamızın sonuçlarını tartışma bölümünde detaylı şekilde irdeledik.

Metilasyon reaksiyonlarının aksadığını görmemiz hipotezimizi doğrulayan başlı başına bir bulgu oldu. Formil formdaki folatlar birikti ve yolak pürin sentezine kaydı, metiyonin sentezi aksadı ve düzeyi düşmüş oldu. Katabolizmada düşüş oluştu. Eritrosit içi folat azaldı, plazma homosisteinde de hafif artış gözlemlendi. Yani, gönüllü astım hasta grubunda, gönüllü kontrol grubu bireylerine kıyasla, aktif işlevsel tek-karbon parametrelerinde anlamlılık düzeyinde önemli değişimler saptadık.

Bütün bunlar astım hastalarındaki folat metabolizmasının çok önemli düzeyde bozulduğunu gösteriyor, bu değişimin nedensel mi sonuçsal mı olduğunu ileri çalışmalar gösterecektir.

Anahtar Kelimeler : Astım, Tek-karbon metabolizması, Folate, Amino asitler.

Destekleyen Kurumlar : GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi.

Yazar Adı : R. Soner YEŞİLBAŞ

Danışman Adı : Mustafa GÜLTEPE

ABSTRACT

Asthma is still clinically diagnosed and an anciently known disease which compels scientists to confess to inadequately elucidate underlying molecular mechanisms. This challenge make physicians just recognize the patients with aarently established picture of the disease, inevitably. That means late diagnose which cause palliative anti-inflammatory therapies with serious risk of side effects and let disease fall into chronical classification. The bridge between biochemical aroach and the final clinical changes of asthma needs to be built.

Miscellaneous findings from experimental studies and animal models led to different assessments depend on findings about variable folic acid and other one-carbon metabolism markers in asthma. This study provides the first contemporary examination between integrated one-carbon metabolism and asthma. We have not met with studies investigated detailed in this topic on internet index literature search. However, these studies especially focused on serum folat status and asthma relationship, and departed from integral one-carbon metabolism. But it's well known that just serum levels of folat is just one part of the one-carbon metabolism which is a complex puzzle. So it seems important but deficient to investigate serum folat merely in this matter. So we preferred a study to research functionally active one-carbon metabolites as a candidate markers for the reflection of causality of the asthma which is a model of inflammatory disease, instead unique folate which can not be considered apart from one-carbon metabolism.

So we studied red blood cell total folates, red blood cell folate subgroups and catabolites, serum folate levels, serum B12 vit. levels, urine L-methylmalonic acid levels, plasma homocysteine levels and serum amino acid levels as one-carbon metabolism components. We evaluated the results under discussion part of the study.

It was a dominantly important observation to verify our hypothesis that methylation reactions were disturbed in patient group. Formyl-folates were accumulated and folate consumption pathway has shifted towards purine synthesis. Methionine synthesis was disturbed and serum levels were

reduced. Folate catabolism was reduced due to malproduction. Intraerythrocytic total folate levels were reduced and plasma homocysteine levels were slightly increased.

In brief, we found statistically significant changes about active one-carbon metabolites of unteer asthmatic patient group when compared to unteer healthy control group. All our findings suggest that folate-mediated one-carbon metabolism were disordered significantly in asthmatic patients. However, further studies are also required to elucidate causal relations between eachother.

Key Words : Asthma, One-carbon metabolism, Folate, Amino acids.

Suorted By : GATA Haydarpasa Training Hospital

Author : R. Soner Yeşilbaş

Counsellor : Mustafa GÜLTEPE

GİRİŞ

Tek karbon metabolizması, diğer adı ile metil metabolizması tek karbonlu(metil, metilen, formil gibi) grupların bir bileşikten diğerine aktarımını sağlayan, folik asit ve B12 vit. kofaktörlerinin de aracılık ettiği biyokimyasal reaksiyonları kapsamaktadır. Metilasyon reaksiyonları, S-adenozilmetyonin(SAM) sentezi ile başlamakta ve nörotransmitter sentezi/yıkımı(asetilkolin, epinefrin, dopamin), membran akışkanlığı(fosfolipit metilasyonu, fosfatidilkolin ve lesitin sentezi), pürin-pirimidin sentezi, myelin sentezi ve DNA metilasyonunda önemli rol oynamaktadır(1). Bu metabolizma için metil kaynağı moleküllerin yanısıra aktif folatlar olan metil-folatlar ve formil-folatların ikmal ve döngüleri yeterli olmak zorundadır (2). Çünkü folat kofaktörü, alt gruplarıyla, hem kendi tek karbon transferini yapar hem de B12 vit. ile biyolojik sistemin en önemli metil grubu verici olan SAM yapısındaki metiyoninin sentezlenmesini sağlar. Homosisteine, N⁵-M-THF'in metil grubunu vermesiyle metiyonin sentezlenir (3).

Hücrede aktif folatların katabolizmasının regülasyonu da karmaşıktır; folat katabolizması arttığında sistemik veya lokal hücre içi folat yetersizliğine ait sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Metil kaynağı aminoasitlerin metabolizması da bu dengede rol oynamaktadır.³ Arjininden, NOS enzimi ile NO üretimi için gerekli olan tetrahidrobiopterin(BH4) sentezinin yapılabilmesi için önce, pürin sentezinin vazgeçilmez karbon vericisi olan 10-formiltetrahidrofolatın kullanıldığı guanozin sentezine ihtiyaç bulunmaktadır (5). Diğer taraftan poliaminlerin(putresin, spermidin, spermin) sentezi doğrudan metilasyon bağımlıdır(6,7). L-ornitin üzerinden prolin sentezi ve dolayısıyla kollajen sentezi ise NOS ile arjinaz arasındaki denge ile sürdürülür.(8)

Diğer taraftan, enflamasyonun mekanizmasının aydınlatılmasında ve tedavisinde çok yoğun bilimsel kanıtlar, adenozin molekülü üzerinde yapılan araştırmalardan elde edilmektedir.(9) Adenozin, güçlü fizyolojik ve farmakolojik etkilere sahiptir ve enflamasyonun temelinde bulunan vasküler dilatasyon ve akıntının(sekresyon) oluşumu ile ilişkilidir. Adenozin reseptörleri yaygındır. Önemli bazı antienflamatuvar ajanlar etkilerini adenozinin

hücreden salınımı üzerinden göstermektedir(örn. metotreksat). Dolayısıyla kronik enflamasyon ile adenosin sentezi ve metilasyon ilişkilidir.(10)

Erken veya geç astmatik reaksiyonlar ile karakterize allerjik astım, havayolları aşırı duyarlılığı, havayolu enflamasyonu ve havayolu remodellingini(yeniden yapım) içermektedir. Arjinin homeostazındaki değişiklikler, NO üretimini azaltarak; peroksinitrit, poliamin ve prolin oluşumunu arttırmaktadır.

Hipotezimiz ise astımın, folat-aktive tek karbon metabolizmasının doğrudan işe karıştığı kronik enflamatuvar bir hastalık olduğu yönündedir. Tek karbon metabolizmasındaki değişiklikler; örneğin hücrel metilasyon yetmezliğinin(tükenmişliği), hastalığın başlamasından sonra mı ortaya çıktığı, yoksa hastalığın başlangıcında yer alan bir etken mi olduğu soru işaretidir. Herşeye rağmen, bu metabolizmanın astımda ne boyutta değiştiğinin bilimsel kanıtlarının araştırılması, literatüre ve hastalığın tedavisine önemli ve yeni katkılar sağlayabilecektir.

GENEL BILGILER

2.1. Metillenme Reaksiyonlarının Moleküllerdeki Etki Mekanizma Modellemesi

Metilasyon bir çeşit alkilasyon reaksiyonu sınıfından olup bağlandığı molekül veya makromolekül içindeki atomlararası bağlardaki elektronlarda elektriksel etkiyle elektrostatik potansiyel değişiklikleri yaratarak işlev değişikliğine yolaçabilir. Bunun için uygun modellemeler arasında, pozitif indüktif etki(+I) kavramının yer almasının önemine vurgu yapmak isteriz (11,12).

İndüktif etki(I); molekül içi atomlarda zincirleme elektiksel yük aktarımı ile molekül içindeki reaktif kimyasal grup bağı içinde kutupsal yük dağılımı oluşturan ve deneylerle gözlenebilen bir etkidir.(12)

Yan grup şeklinde bağlanan moleküldeki elektron doygunluğu(indirgenmişlik), “konjuge sistem” denen yapıya katılınca makromolekölü daha stabil kılmaktadır. Konjuge sistem, delokalize(dolaşan) elektronların p orbitali düzeyinde birbirine kovalent bağ ile bağlandığı atomlardan oluşan makromolekölün içindeki elektron dağılımını ifade ediyor(10). Bu yapıda az elektron çok yeri doyurduğu için(δ sigma bağı), moleküler enerji düşük kalıyor ve bu da molekülün stabil olmasını sağlıyor.

Elektron tokluğu, +I etki(*positive inductive effect*, +I) şeklinde; elektron açlığı(elektronegativite) ise -I olarak adlandırılır. Metil, en küçük hidrokarbon bileşik olarak en dar moleküler koridorlardan geçebilecek oranda küçük olması sebebiyle pozitif indüktif etki oluşturmak için biyolojik sistemlerde en etkin rol alan molekül olduğu düşünülüyor(9).

Asitlik ve/veya bazlık özelliğinin belirlenmesinde de bu etki önemlidir. Yani bağlandığı makromoleküldeki konjuge sistemde atom başına düşen ortalama elektrondan daha yoğunluklu elektron içeriğine sahip olan bir yan grup(örn. metil), bağlandığı bu makromolekölün merkezinde ve dolayısıyla reaktif grubunda dolaşan elektron yoğunluğunu artırır. Bu yoğunluk, molekülün konjuge sisteminin parçası olan oksijen-hidrojen atomları arasındaki kovalent bağda, birim zamandaki elektron bulunma süresini

arttırarak, H^+ serbestlenmesini azaltır, yani makromolekölün asitliğini azaltır(9). Bir moleküle ne kadar çok -I etkili grup bağlıysa, elektronlar o nispette molekülün periferindeki -I etkili bu gruplara çekileceğinden dolayı molekülün reaktif niteliğini belirleyen aktif gruplardaki elektron bulutu seyreltik kalacağı için hidrojeni tutacak potansiyel azalır. Hidrojeni tutamayıp, proton şeklinde serbestleştirir, yani asidite artar; tersi şekilde bir makromoleküle ne kadar çok elektron istemeyen grup bağlıysa elektronlar belirli bölgelere kaçıp orada yoğunlaşır ve polarite artar ve bir araya yoğunlaşmış(*dense*) elektronlar makromolekülde odak oluşturarak makromoleküle bazik özellik kazandırır ve H^+ iyonlarının bağlanması için hedef teşkil eder.

Örnek olarak karboksilik asitlere bakarsak:

Bir karboksilik asit çözeltisinin gücü, iyonize haldeki karboksilik asit moleküllerinin yaygınlığına bağlıdır. Ne kadar çok iyonize oluyorsa o kadar güçlüdür. Zira asit güçlü oldukça pK_a 'sı düşer. Yani ortam asit pH 'da iken bile H^+ bağlanmak yerine serbestlenmeyi tercih eder.

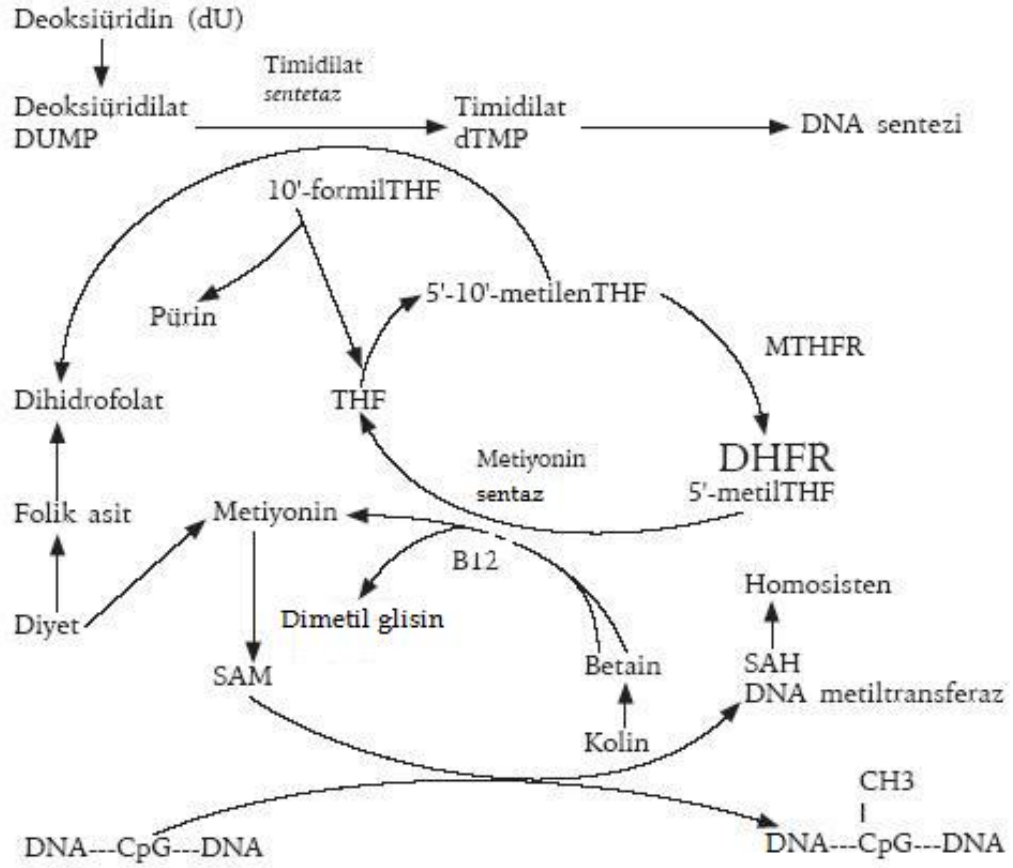
Asitlerde, +I etkili olan alkil gruplarının varlığı oksijen atomu çevresinde dolaşan elektron yoğunluğunu arttırır ve böylece oksijene bağlı $H(O-H)$ bağının kırılması engellenir ve iyonizasyonu azalır, asitlik azalır. Örneğin formik asitin, asetik asite göre daha güçlü iyonizasyon ve asitlik olmasının sebebi budur(sırasıyla pK_a 'ları 3,79 ve 4,76). Çünkü asetik asitte, formik asitten farklı olarak bulunan ilave +I indüktif etkili metil grubu, moleküldeki elektronların reaktif grupta bulunma olasılıklarını arttırdığı için molekülü daha kararlı kılarak iyonizasyonunu azaltır ve pK_a 'sını yükseltir. Monokloroasetik asit($pK_a=2,82$), formik asitten güçlüdür. Çünkü Cl(klor)'un elektronegativitesi oksijendeki elektronegativiteyi zayıflatıp elektron yoğunluğunu bir derece Cl atomuna yaklaştırır. Oksijenin hidrojenle paylaştığı elektron O-H bağı merkezinden uzaklaşınca O-H bağı zayıflar. H atomu da, zayıflamış kovalent bağı daha kolay terkedip H^+ şeklinde iyonlaşır.

Benzoik asit, sikloheksankarboksilik asitten daha asidiktir; çünkü karbonları çift bağ yaptığı için az elektronla idame eden bir yapıdadır. Az elektron barındıran stabil çift bağları olan benzoik asitin halka yapısında yer alan karbonlar oksijendeki elektronları da konjuge sistemlerine dahil edip

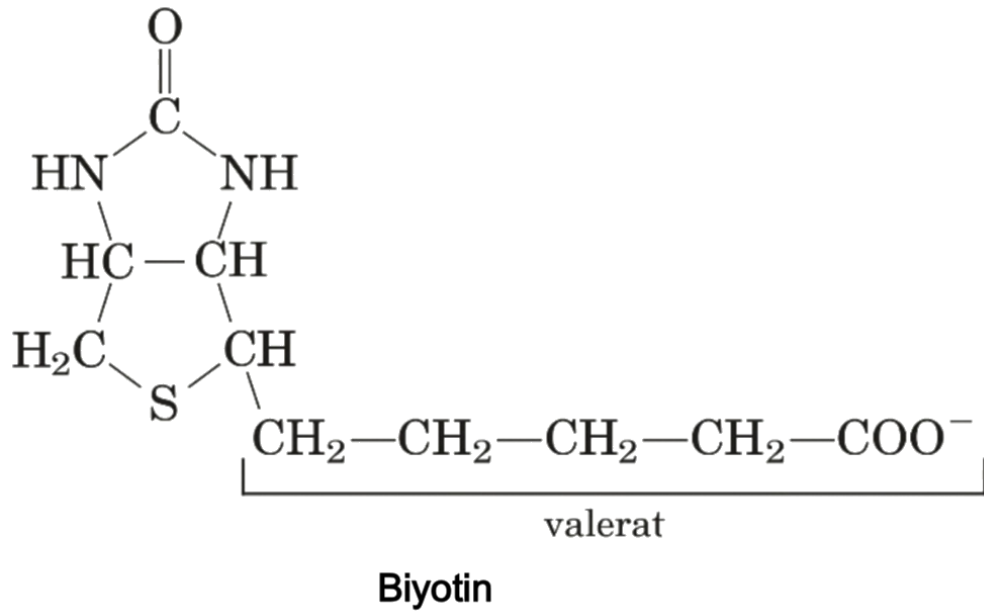
oksijenin H^+ 'i tutmasını zayıflatarak iyonlaşmayı artırır. Çift bağ demek, indirgenebilecek –elektronla doyurulabilecek- atomlar taşımak demektir.

Aromatik karboksilik asitlerde, elektronla azami düzeyde doyurulmuş gruplar(metil gibi) bağlandığı molekülün elektron yönünden yoğunluk merkezini kendisinden uzağa iterek moleküldeki reaktif grubun üzerindeki elektron yoğunluğunu güçlendirirler. Bu nedenle de molekülün reaktif grubunun bağ gücü artınca da iyonlaşma oranı ve dolayısıyla asitlik gücü azalır. Bu da molekülün stabil, kararlı, non-reaktif ve bir anlamda işlevsiz yapıya bürünmesine yolaçar. Ancak bu, fonksiyon kaybıyla da sonuçlanabileceği için molekülü işlevsizleştirerek metabolik ve sistemik aksaklıklara da yolaçabilir. DNA molekülündeki metilasyonun, ilgili gen bölgesinin epigenetik anlamda ifadesini(ekspresyonunu) engelleyerek susturması(*silencing*) da bu yolla açıklanabilir(11).

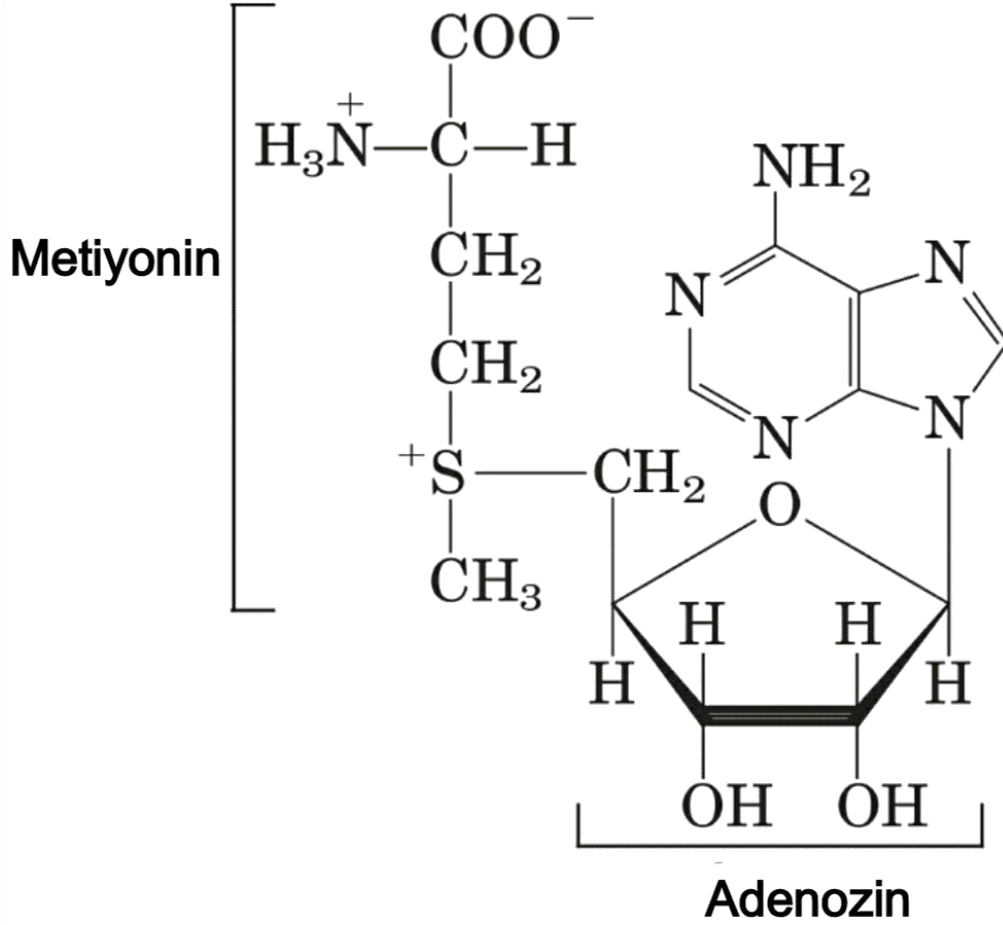
Tek karbon(metil) metabolizması deyimi, temel olarak üç ayrı metabolizmanın bütününe ifade etmek için kullanılır; folat aracılı metil aktarım reaksiyonları, homosisteinin metiyonine metillenme döngüsü, sülfür aktarım yolağı. Folat metabolizması, endojen ve eksojen tek karbon birimlerinin tetrahidrofolat(THF)'a aktarıldığı biyokimyasal reaksiyonları içerir. Tek bir karbon atomu içeren gruplar bir bileşikten diğerine aktarılırken birbirlerinden çok farklı oksidasyon düzeylerinden birinde bulunuyor olabilir. Yükseltgenmiş biçim olan CO_2 biyotin tarafından aktarılırken, CO_2 den daha indirgenmiş düzeylerde bulunan tek karbonlu gruplar, THF, B12 vitamini(B12 vit.), ve S-adenozilmetiyoninin(SAM) işe karıştığı tepkimelerle aktarılır(Şekil 2.7).



Şekil 2.1. Tek karbon kaynakları ile genetik materyal sentez ve metilasyonu ilişkisi



Şekil 2.2. En Okside Tek Karbon Olan Karboksil Grubunu Aktaran Biyotin Kofaktörünün Yapısı



S-Adenozilmetiyonin (SAM)

Şekil 2.3. Potent bir tek-karbon aktarıcı molekül olan SAM'ın yapısı

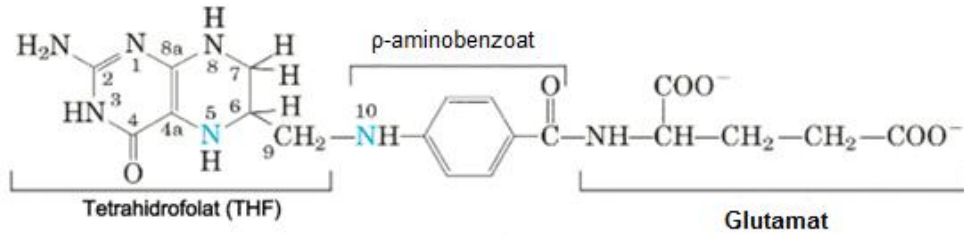
2.2. Tek Karbon Metabolizması

2.2.1. Tetrahidrofolat, B12 vitamini ve S-Adenozilmetiyonin

Bir vitamin olan folattan üretilen THF, vücutta ana tek karbon taşıyıcısıdır. Bu vitamin tek karbon birimlerini serin, glisin, histidin, formaldehit ve formik asitten alır.(13) Bu karbonlar THF'a bağlı halde iken yükseltgenmiş veya indirgenmiş halde olabilir. Bu nedenle, folat çeşitli biyokimyasal formlarda bulunabilir. Öte yandan tek karbon, metil düzeyine indirgendiğinde(5-metil-THF), artık tekrar yükseltgenemez.(1) Kendilerini taşıyan THF' a bağlanmış bu tek karbonlu birimlere topluca tek karbon havuzu adı verilir (2). Folat terimi, çeşitli yükseltgenme düzeylerinde bulunan tek karbon gruplarını aktarak işlev gören, suda çözünür bir B grubu vitamini

ifade etmek için kullanılır (14). THF tarafından taşınan tek karbon grupları bir çok biyosentetik tepkimede kullanılır.

Örneğin tek karbonlu birimler, deoksitimidin monofosfat(dTMP) oluşturmak üzere deoksiüridin monofosfatın(dUMP) pirimidin bazına, serin oluşturmak üzere glisine, pürin halkasının C2 ve C8 karbonlarını oluşturmak üzere pürin bazlarının öncüllerine, B12 vitamini'ne, biyojenik amin dönüşümlerine, fosfolipit metilasyonuna, epigenetik DNA metilasyon reaksiyonlarına, ve birçok ara metabolizma yollarında aktarılır (15).



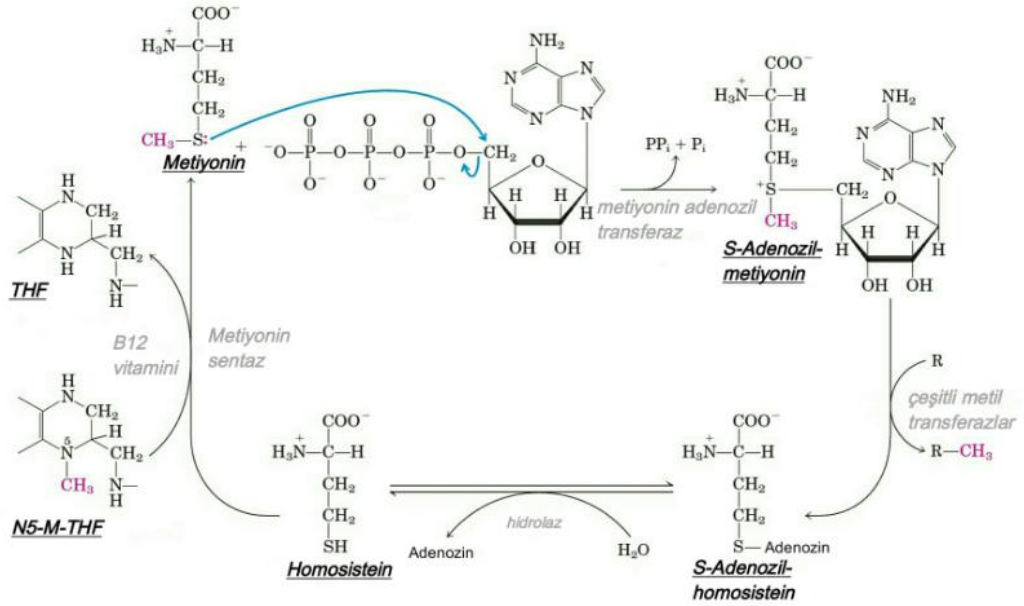
Şekil 2.4. Genel metil depolayıcı molekül olan tetrahidrofolatın yapısı

Metiyonin metabolizması hem THF, hem B12 vit. metabolizmasına ileri derecede bağımlıdır. Homosistein, metiyonin metabolizması sonucu oluşur ve hem N⁵-M-THF hem B12 vit. kullanılarak tekrar metiyonine geri döndürülebilir. Bu tepkime, metil grubunun sadece N⁵-M-THF-monoglutamat(N⁵-M-THF-Glu1) tarafından sağlanabildiği tek tepkimedir(15). Metiyonin sentaz reaksiyonunda B12 vit. kofaktör rolü oynar(metilkobalamin formunda) (16). Bu reaksiyonun önemi; MS tarafından, folat alt grubu olan N⁵-M-THF'in metil grubu homosisteine aktarılırken, N⁵-M-THF'tan da THF oluşumudur ki, bu da folatın organizmada aktif şeklidir. Bu nedenledir ki MS enzim aktivitesinin indirekt izlenmesinde kullanılan bir indeksin türetilmesi mümkün olmuştur: N⁵-M-THF-G1 / THF (17).

MS reaksiyonu DNA yapımı için gerekli olan timidilatın sentezi, purin ve pirimidin bazlarının sentezi ve serinden glisin oluşumu reaksiyonlarına kenetlenmiş bir şekilde sürdürülür. (18,19, 20) Bu tepkimeyi katalize eden MS eksik ise veya B12 vit. veya N⁵-M-THF-Glu1 düzeyleri yetersiz ise homosistein birikime uğrayacaktır. Artmış homosistein düzeylerinin ise kardiyovasküler, nörolojik, inflamatuvar ve kollajen doku hastalıklarıyla bağlantıları günümüze dek gösterilmiş etkileri arasındadır (21).

Kobalaminler(B12 vitamini), merkezinde kobalt atomu bulunan korin halka yapısına sahip bileşiklerdir. Kobalaminler, kobalt atomuna bağlı yan gruplara göre isimlendirilirler. Metil grubunun bağlanması ile metilkobalamin oluşur(15). Metilkobalamin-MS bileşiği; bahsi geçtiği gibi N⁵-M-THF'ı THF'a çevirirken, yani homosisteinden metiyonin oluşurken meydana gelen THF, formil-folat formlarına dönüşerek pürin ve pirimidin sentezlenmesi reaksiyonlarına katılır. Metiyonin ise, daha sonra ATP ve metiyonin adenozil transferaz(MAT) ile aktiflenerek SAM'e dönüşür.(22, 23)

S-Adenozilmetiyonin(SAM) kullanılan remetilasyon döngüsü, folattan gelen tek karbon birimlerinin, homosisteinden metiyonin sentezlenmesinde kullanıldığı bir döngüdür. Metiyonin ve adenozin trifosfattan(ATP) MAT aracılığıyla üretilen SAM, metil grubunu, aralarında kreatin, fosfatidilkolin, adrenalin, melatonin, metilenmiş nükleotidler ve metillenmiş DNA da bulunan bir dizi bileşikler yapmak üzere bu bileşiklerin öncüllerine aktarır (24). SAM, DNA sentezinde, metilasyon yolu ile stabilizasyon sağlar, bu yolla enzimatik ve kimyasal reaksiyonlara yatkınlığını ve ekspresyonunu değiştirebilir. SAM; myelin sentezi, kreatin, fosfatidilkolin, noradrenalin, melatonin, koenzim Q, karnitin ve hatta metilkobalamin sentezlenmesinde metil vericisi olarak rol oynar. Daha sonra SAM, S-adenozilhomosistein(SAH)'e ve o da homosisteine dönüşerek döngü tamamlanır(Şekil 2.5). Metiyonin/homosistein ile SAM/SAH iki paralel işleyen ancak sıkı sıkıya bağımlı iki reaksiyon çiftidir(Şekil 2.5). SAH, fizyolojik koşullarda hidrolize olarak adenozil grubunu kaybeder ve homosisteine dönüşür. Geri dönüşümlü olan bu reaksiyonda, SAH sentezine eğilim daha fazladır. Bu nedenle bu döngünün devam edebilmesi için homosisteinin ortamdan uzaklaştırılması gereklidir.



Şekil 2.5. THF ile SAM-SAH dönüşüm ilişkisi

B12 vit., vücuttaki iki tepkimeye katılır. Süksinil-KoA vermek üzere L-metilmalonil-KoA'nın metil grubunun yeniden düzenlenmesine ve N⁵-M-THF'dan aldığı bir metil grubunu metiyonin yapmak üzere homosisteine aktarılmasına katılmaktadır (25). B12 vit. eksikliği diyetteki B12'nin emilmesi için gereken gastrik bir protein olan intrinsik faktör eksikliğine bağlı olabilir. B12 vit. eksikliğinde görülen bir sonuç N⁵-M-THF'ın birikmesi ve diğer folat türevlerinde azalma olmasıdır. Bu olay, metil- kapalı(tuzağı) varsayımı olarak bilinmekte olup, bu olayda B12 eksikliği nedeniyle THF havuzundaki karbonların çoğu en kararlı durum olan N⁵-M-THF halinde birikmektedir. N⁵-M-THF'a bağlı haldeki aktif tek karbonlar, katıldıkları tek tepkimenin, B12 eksikliğine bağlı yürütülememesinden ötürü, N⁵-M-THF'ı terk edememektedir. Dolayısıyla bu da , total folat düzeyinin normal olması halinde dahi işlevsel bir folat eksikliğine yol açacaktır. Bu konuya, en indirgenmiş tek-karbon birimi olan metil grubunun +I' si açısından da bakarsak, N⁵-M-THF' ın neden diğer oksidasyon düzeyindeki THF alt gruplarına kıyasla daha kısıtlı reaksiyon kapasitesinde olup birikmeye en müsait form olduğunu anlayabiliriz. Folat eksikliği(işlevsel veya gerçek), kan hücresi öncüllerinin DNA sentez edememe ve bu nedenle mitoz yoluyla genç hücre oluşturmamalarından ötürü meydana gelen megaloblastik anemiye yol açacaktır. Bu olay, ölen

hücrelerin yerini almak üzere kana büyük, kısmen replikasyona uğramış yaşlı hücrelerin salınmasına yol açar(makrosit). Folat eksikliği, gebelikleri sırasında folat eksikliğine maruz kalmış annelerden doğan bebeklerde spina bifida gibi nöral tüp kusurlarının insidansında bir artış olmasıyla da bağlantılıdır.

Tek karbon gruplarının barındırılmasında koenzim olarak işlev gören THF, poliglutamat halde bulunup bu moleküle klasik kaynaklarda genellikle sadece THF denmektedir. Bunun bir bisiklik pterin halkası, bir para-aminobenzoik asit ve birbirlerine amid bağı ile bağlanmış çok sayıda glutamat kalıntısından oluşan poliglutamat zinciri olmak üzere üç ana yapısal bileşeni bulunmaktadır(Şekil 2.4). Koenzim tarafından kabul edilen ve daha sonra bir diğer bileşiğe aktarılan tek-karbon grubu N^5 'e(metil veya formil gruplarını bağlayabilir), N^{10} 'a(sadece formil grubunu bağlar) veya her ikisine(metilen-THF, metenil-THF şeklinde) bağlanmaktadır. Folatın farklı biçimleri; birbirlerinden, tek karbon grubunun yükseltgenme durumu, bağlı glutamat birimlerinin sayısı veya pteridin halkasının yükseltgeme derecesi ile farklılaşabilir. Özgül bir kimyasal biçim için "folat veya folik asit" adı kullanıldığında bu pteridin halkasının en çok yükseltgenmiş hali kastedilir. Folat, dihidrofolata ve daha sonra hücreler içindeki dihidrofolat redüktaz enzimi tarafından tetrahidrofolata indirgenir. İndirgenme tepkimenin tercih ettiği yöndür; dolayısı ile, vücutta bulunan folatın çoğu indirgenmiş koenzim biçimi olan THF halindedir.

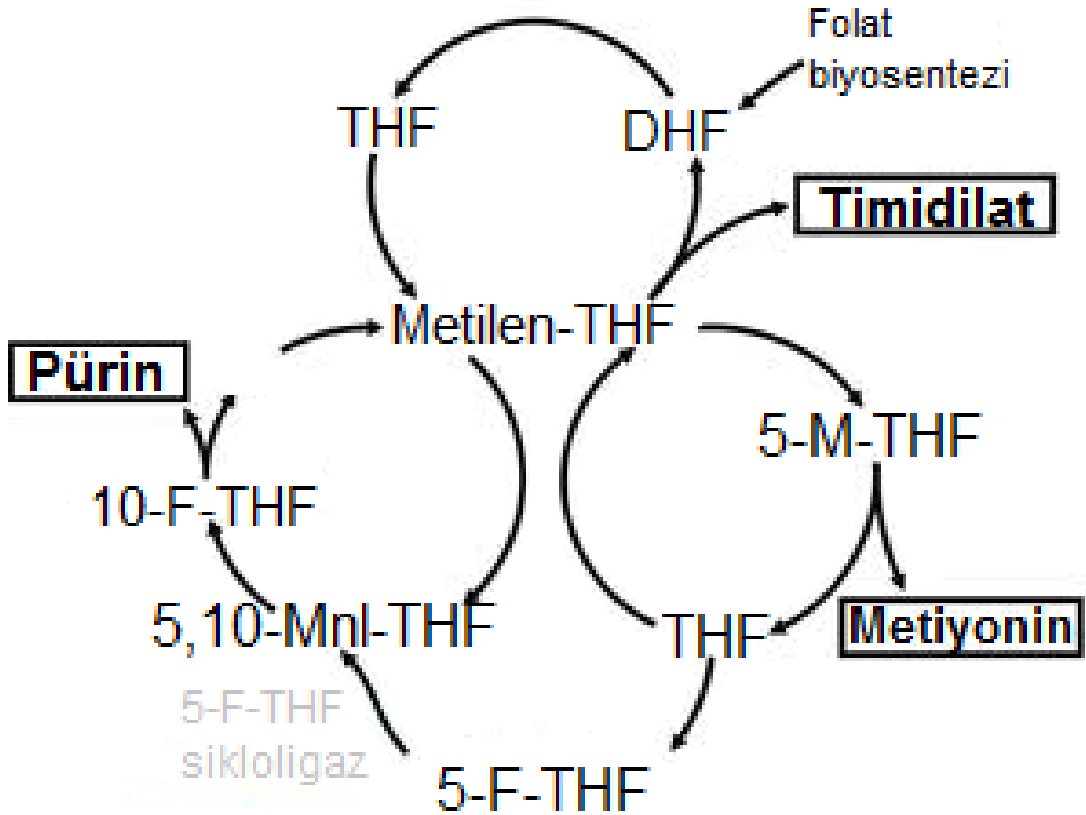
Folatlar bakteriler ve yüksek bitkiler tarafından sentez edilir ve diyetimizdeki yeşil yapraklı sebzeler, meyveler ve baklagillerle vücudumuza girer. Yeşil yapraklı bitkilerde bulunması nedeniyle vitamine bu ad verilmiştir. Doğal besin kaynaklarından türetilen diyetteki folatın büyük kısmı indirgenmiş koenzim biçimindedir. Öte yandan, vitamin hapları ve desteklenmiş gıdalar esas olarak pteridin halkasının yükseltgenmiş şeklini içerir. Diyetteki folatlar ince barsağın ilk üçte birinden geçerken lümenin fırçası kenarındaki folat konjugazlar, folatın monoglutamat şeklini oluşturmak üzere glutamat birimlerini koparır ve bu daha sonra emilir. Barsak hücrelerinde folat, esas olarak N^5 -M-THF'a çevrilir, bu da portal vene geçip karaciğere gider. Folatın

küçük miktarda bulunan diğer formları da bu yolu izler. Vücut folatının yarısını depolayan karaciğer, portal dolaşımdaki folatın çoğunu yakalar. Bu yakalama, aktif transport veya reseptör aracılı endositoz yoluyla olabilir. Karaciğerde THF tepkimelerde kullanılmadan önce tekrar poliglutamat formlarına konjuge edilir. Az miktarda folat kısmen yıkılır ve bileşenleri para-aminobenzoilglutamat(pABG) ve asetil-pABG şekillerinde idrara geçer. Folatın görece büyük bölümü safraya geçer ve daha sonra geri emilir(safra tuzlarının enterohepatik dolaşımdaki kinetiğine çok benzer). Folatın kandaki ana biçimi olan N^5 -M-THF, plazma proteinlerine ve özellikle albumine gevşek şekilde bağlanır.

Folat-bağımlı tek karbon reaksiyonlarının büyük bir kısmı mitokondri ve sitoplazmada gerçekleşir. Folat kofaktörleri, büyük moleküller oldukları için kompartmanlar arasındaki geçişleri yavaşdır. Daha küçük moleküller olan serin, glisin ve formik asit kompartmanlar arasında daha hızlı geçiş yaparlar ve organeller arasındaki dengeyi sağlarlar(26). Bu reaksiyon tek karbon grubunun folat bağımlı reaksiyonlar döngüsüne giriş noktasıdır Serin, hem sitoplazmadaki hem de mitokondrideki tek karbon reaksiyonları için başlıca tek karbon grubu kaynağıdır. Serin, mitokondri içine girer, glisine dönüşür ve N^5, N^{10} -metilentetrahidrofolat(N^5, N^{10} -MIn-THF) oluşturur. N^5, N^{10} -MIn-THF'dan mitokondriyal protein sentezinde kullanılan N^{10} -formiltetrahidrofolat(N^{10} -F-THF) oluşur. N^{10} -F-THF, formik asite dönüşür. Fazla formik asit sitoplazmaya geçer ve primer karbon vericisi olur. Glisinin 2. karbonunun glisin-yıkım sistemi yoluyla transferi ile de N^5, N^{10} -MIn-THF oluşur(Şekil 2.8). Glisinin %40'ı bu enzim sistemi ile yıkılmaktadır ve buda N^5, N^{10} -MIn-THF oluşumunda önemli bir kaynaktır. ATP-bağımlı enzim formil sentetaz ile fazla formik asit, tekrar N^{10} -F-THF'a dönüşür.

Tek karbon grupları N^5, N^{10} -MIn-THF ve N^{10} -F-THF olarak havuzlanırlar. N^5, N^{10} -MIn-THF ve N^{10} -F-THF, pürin sentezi için; N^5, N^{10} -MIn-THF, timidilat sentezi için gerekli substrattırlar. N^{10} -F-THF, mitokondride farklı bir reaksiyonda daha kullanılır. Metiyonil-tRNA formiltransfereaz enzimi ile formil metiyonil tRNA sentezlenir. Protein sentezi için gerekli olan bu reaksiyon sadece mitokondriyal kompartmanda gerçekleştirilir(1).

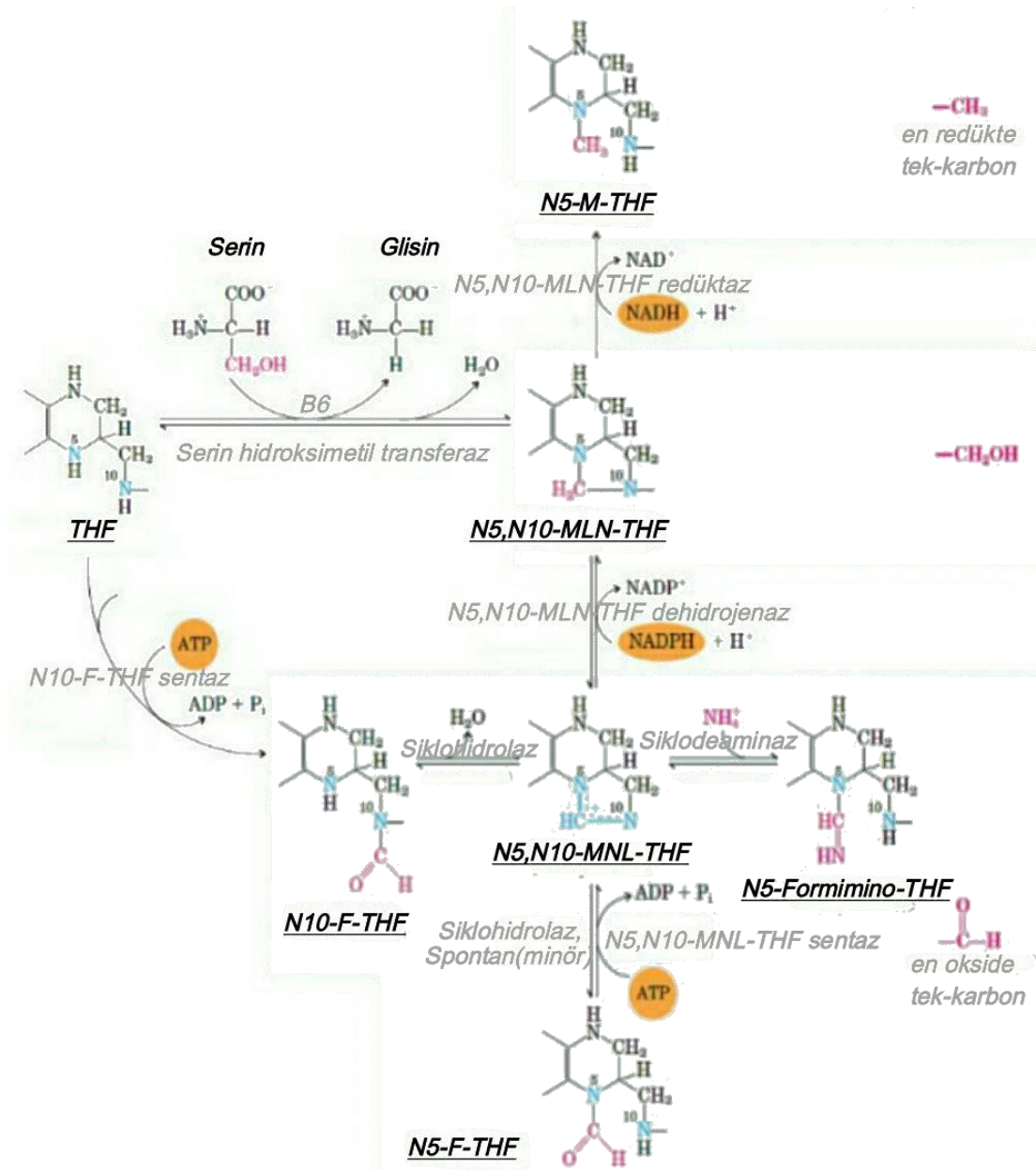
Bir başka tek karbon kaynağı ise histidin katabolizması ile oluşan formimino glutamat(FiGlu)'dır. Glutamat formimino transferaz enzimi ile THF'a formimino grubu transfer edilir ve 5-formiminoTHF oluşur. Daha sonra formiminoTHF, siklodeaminaz enzimi aracılığıyla 5-formiminoTHF, devamında da N^5,N^{10} -meteniltetrahidrofolata(N^5,N^{10} -Mnl-THF) dönüşür. Bu reaksiyonla tek karbon sağlanması sadece karaciğer ve böbrekte olur.



Şekil 2.6. Folat alt gruplarının pürin ve pirimidin sentezi açısından incelenmesi

Folat, daha önce de kısaca bahsedildiği gibi, timidilat sentezi için gereklidir(Şekil 2.6). Deoksiüridilatın 5. pozisyonuna formaldehit grubu eklendiğinde timidilat oluşur. N^5,N^{10} -Mnl-THF'in tek karbon grubu, deoksiüridin monofosfata(dUMP) transfer edilir ve deoksitimidin monofosfat(dTMP) ve dihidrofolat oluşur. Reaksiyon Timidilat sentaz tarafından katalizlenir. Tek karbon ünitelerinin format düzeyinde okside formları, de novo pürin sentezi için kullanılır. Pürin halkasının C3 ve C8 grupları N^{10} -F-THF'in glisinamid ribonükleotid transformilazla ve 5-amino,4-

imidazolkarboksiamid ribonükleotid transformilazla THF'a dönüşümü sırasında oluşur. Pürin sentezi için gerekli olan N^{10} -F-THF; N^{10} -F-THF sentazın katalizlediği reaksiyonla direkt olarak THF'tan ya da N^5,N^{10} -Mln-THF'in NADP-bağımlı metilentetrahidrofolat dehidrogenaz ve meteniltetrahidrofolat siklohidrolaz enzimlerinin sağladığı oksidasyon ile elde edilir. N^5 -F-THF, meteniltetrahidrofolat sentaz ile N^5,N^{10} -Mnl-THF'a dönüşür. Dehidrogenaz, siklohidrolaz ve sentetaz enzimleri metilentetrahidrofolat dehidrogenaz denilen 3 fonksiyonlu enzim kompleksi olarak bulunur(Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Tek karbon alt grupları ve bunların aktarımından sorumlu folat alt grupları.

Dihidrofolatın hücre içinde kullanılması için THF'a indirgenmesi gereklidir. Dihidrofolat redüktaz; dihidrofolatı THF'a indirger. Ayrıca folik asitin dihidrofolata indirgenmesini de sağlar(Şekil 2.6). Normalde folik asit, sentetik form olduğu için yiyeceklerle alınmaz. Bu yüzden dihidrofolat redüktazın en önemli görevi, timidilat sentaz reaksiyonunda oluşan dihidrofolatın tekrar indirgenmesidir. Hücrenin replikasyon ve proliferasyon durumuna göre timidilat sentazın sentezi artar. Hücre döngüsünün S fazında olan hücrelerde daha aktiftir.

2.2.2. Tetrahidrofolat'daki Tek-Karbon Gruplarının

Yükseltgenmesi ve İndirgenmesi

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

En fazla yükseltgenmiş bulunan biçim N^{10} -F-THF dır, ve bu form aynı zamanda en labil formdur. En indirgenmiş biçim ise N^5 -M-THF dır. Metil grubu birkez oluştuğunda kolayca tekrar N^5, N^{10} -MIn-THF'a geri yükseltgenmez. Daha önce bahsi geçtiği gibi, N^5 -M-THF hücre içinde birikme eğilimi gösterecektir.

2.2.3. THF Tarafından Taşınan Tek-Karbon Gruplarının Kaynakları

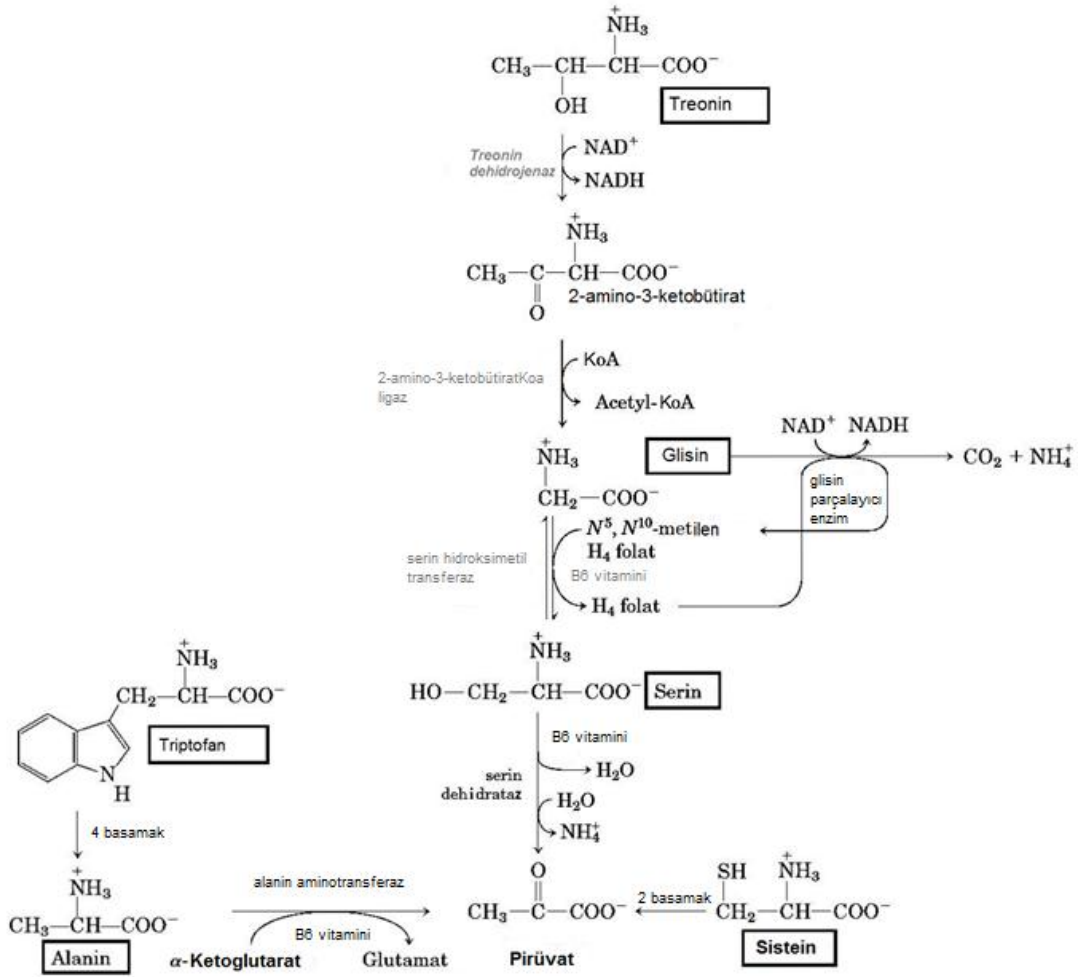
Tek karbon gruplarının kaynağı başlıca, serin amino asitinin β -karbonu, glisin, metil ve dimetilglisin, formik asit, formaldehid ve histidindir. Tek karbon grupları, nükleik asit biyosentezi, protein sentezi, amino asit metabolizması, metil grup sentezi ve vitamin metabolizması gibi THF-bağımlı reaksiyonlarda da üretilir.

Serin amino asitinin 3. karbonundaki tek karbon grubu, THF'a serin hidroksimetil transferaz(SHMT) enziminin katalizlediği reaksiyonla transfer

edilir ve N^5, N^{10} -MIn-THF ve glisin oluşur. Bu vericiler karbonları folata farklı yükseltgenme düzeylerinde aktarır. Bu tepkime glisin ve N^5, N^{10} -MIn-THF üretir. Serinin, glikolizin bir ara ürünü olan 3-fosfogliserrattan sentez edilebilmesi nedeniyle diyetdeki karbonhidrat tek-karbon havuzu için karbon kaynağı olarak hizmet edebilir. Bu yolla üretilen glisin, folata bir karbon daha vererek ileri yıkıma uğrayabilir. Tek karbon gruplarının serin, histidin, glisin gibi amino asitlerden ve formattan alınarak homosisteine metil grubu oluşturarak aktarılması MTHFR enzimi sayesinde olmaktadır. MTHFR enzimi, tek karbon metabolizmasında metiyonin ve folat döngülerini birbirine bağlayan çok önemli bir enzimdir.

Histidin ve format farklı yükseltgenme düzeylerinde tek-karbon veren bileşiklere örnek oluşturur. Histidinin yıkılması FiGlu vermekte olup, bu da bir karbon ve azot vermek üzere THF ile tepkimeye girer(N^5 -formimino-THF üretir) ve bu yolla glutamat serbest kalır. Triptofanın yükseltgenmesi ile oluşan format THF ile tepkimeye girebilir ve en fazla yükseltgenmiş folat türevi olan N^{10} -formil-THF üretir.

SHMT enzimi özellikle karaciğer, böbrek, bağırsak ve beyin hücrelerinde, başlıca tek karbon grubu kaynağıdır. Pridoksal fosfat enzimin kofaktörüdür. Hücre kültürlerinde işaretli izotoplarla yapılan çalışmalarda, SHMT kaynaklı N^5, N^{10} -MIn-THF'ın homosistein remetilasyon yolağına oranla daha çok timidilat biyosentezinde kullanıldığı gösterilmiştir(3, 26). Timidilat yapısındaki tek karbon grubunun kaynağı çoğunlukla serin aminoasitinin 3. karbonudur. SHMT enzimi hücre çekirdeğinde de bulunur ve aktif olarak N^5, N^{10} -MIn-THF oluşturur ve timidilat sentezi gerçekleşir. Ayrıca SHMT enzimi N^5 -M-THF'a bağlanarak homosistein remetilasyonuna sınırlama getirir ve bu sayede düzenleyici bir rol oynar.



Şekil 2.8. Tek karbon kaynağı olan diğer aminoasitlerin metabolizmaları

2.2.4. Tek-Karbon Gruplarının Alıcıları

THF üzerindeki tek-karbon grupları yükseltgenip indirgenebilir ve daha sonra diğer bileşiklere aktarılır. Bu tür bir aktarma serinden glisin sentez edilmesine, DNA sentezi için gereken timin bazının sentezine, hem DNA hem RNA sentezi için gereken pürin bazlarının sentezlerine ve metil gruplarının B12 vitaminine aktarılması olaylarına katılır.

Serinin glisine çevrimi kolayca geri dönebildiğinden, glisin tek karbon havuzundan karbon alarak serine geri dönüştürülebilir. Nükleotid deoksitimidin monofosfat(dTMP), deoksiüridin monofosfatın(dUMP), TMP oluşturmak üzere metillendiği bir tepkime ile üretilir. Buradaki karbon kaynağı N⁵,N¹⁰-MIn-THF'dır. Aktarılan karbonu metil düzeyine indirmek için

THF'dan gelen iki hidrojen atomu kullanılır. Bunun sonucunda dihidrofolat(DHF) oluşur. DHF'ın, dihidrofolat redüktaz(DHFR) enzimi tarafından katalize edilen bir tepkimeye NADPH tarafından indirgenmesi ile THF oluşur. Bu tepkime, tek karbon grubunun alıcıya aktarılması sırasında folat grubunun yükseltgendiği THF'ın işe karıştığı yegane tepkimedir. DHFR'nin diyetle alınan vitaminin yükseltgenmiş biçiminin indirgenmesi için de gerektiği hatırlanmalıdır) Yani DHFR hem dokularda, hem diyetten gelen DHF'ın üretilmesi için vazgeçilmez önemdedir. Bu tepkimeler, dTMP'nin sadece DNA sentezi için gerekmesi nedeniyle folat eksikliğinin DNA sentezi üzerine olan etkilerine katkıda bulunur. Purin bazlarının sentezi sırasında 2. ve 8. karbonlar tek karbon havuzundan karşılanırlar. N¹⁰-Formil-THF her iki karbonu sağlar. Folat eksikliği bu tepkimeleri de zorlaştırır ve DNA'nın öncüllerinin eksikliği nedeniyle DNA replikasyonunu bozucu etki gösterir. THF tarafından taşınan karbon grubunun metil düzeyine indirgemesinden sonra bu B12 vitamini'ye aktarılır. Bu tepkime, metil grubunun THF'ı terk edebildiği tek tepkimedir. Burada, N⁵-M-THF üreten tepkimenin geri dönüşümsüz olduğunun hatırlanmasında yarar görmekteyiz.

2.2.5. B12 Vitamini'nin Yapısı ve Bulunma Biçimleri

B12 vit.(kobalamin olarak da bilinir), karmaşık yapıda moleküler bileşime sahiptir. Hem'de bulunan porfirin halkasına benzeyen bir korrin halkası taşır. Öte yandan korrin halkası, dört pirrol halkasından iki tanesinin bir metilen köprüsü yerine doğrudan doğruya birbirlerine bağlı olmasıyla Hem'den farklılık gösterir. Bu molekülün en alışılmadık niteliği korrin halkası ile koordine olmuş kobalt atomunun varlığıdır(porfirin halkası ile koordine olmuş demire benzer). Bu kobalt, bir karbon atomu ile bağ kurabilir. Vücutta bu, metil-kobalamin vermek üzere bir metil grubunun karbonu ile veya 5'-deoksiadenozilkobalamin yapmak üzere 5'-deoksiadenozinin 5'karbonu ile tepkimeye girer(ikinci durumda deoksi sözcüğünün, DNA'da bulunan şekerlerde kullanılan 2'karbonu değil 5'karbonu kastettiğine dikkat ediniz). Vitamin preparatlarında bulunan B12 biçimi, siyanokobalamin olup burada kobalt atomuna bir siyano grubu "C≡N" bağlanmıştır.

2.2.6. B12 Vitamini'nin Emilim Ve Taşınması

B12 vit. bakteriler tarafından üretilmesine karşın yüksek bitki ve hayvanlar tarafından sentez edilemez. Diyetteki B12 vit. 'nin ana kaynakları et, yumurta, süt ürünleri, kümes hayvanı etleri ve deniz ürünleridir. Bu besinlere kaynak görevi yapan hayvanlar B12'yi esas olarak yemlerindeki bakterilerden elde ederler. B12'nin diyetten emilmesi karmaşık bir olaydır.

Besinle alınan B12, ya serbest ya da diyetteki proteinlere bağlı halde olmak üzere iki şekilde bulunabilir. Serbest halde bulunan B12, tükürük bezleri ve mide mukozası tarafından tükürük veya mideye salgılanan ve R-bağlayıcılar(transkobalamin 1 olarak da bilinen haptokorrinler) denilen proteinlere bağlanır. Besinle alınan B12, proteinlere bağlı halde ise bunun hem mide hem de ince barsakta sindirici proteazlar ile proteinlerden serbest kalması zorunludur. B12 birkez bağlandığı proteinlerden serbest kaldığında artık haptokorrinlere bağlanacaktır. Ince barsakta, pankreatik proteazlar haptokorrinleri sindirir ve serbst kalan B12 vitamini, besinin mideye girmesi sırasında midenin parietal hücreleri tarafından salgılanan bir glikoprotein olan intrinsic faktöre bağlanır. Intrinsic faktör-B12 karma molekülü, ince barsağın son kısmı olan ileumdaki özgül reseptörlere bağlanır ve bundan sonra bu karma molekül emilir.

Enterosit içindeki B12, transkobalamin 2 ile bileşik yapar ve sonar dolaşıma geçer. Transkobalamin2-B12 vit. karma molekülü, kendine özgül reseptörler taşıyan dokulara B12 vitamini'yi teslim eder. Karaciğer B12 vitamini'nin yaklaşık yarısını alırken, geri kalanı diğer dokulara götürülür. Karaciğerde depo edilebilen tek suda eriyen vitamin olan B12 vitamini'nin depolanan miktarı, gıdasal bir eksikliğe ait semptomların belirmesi için 3-6 yıl geçmesini gerektirecek kadar büyüktür.

2.2.7. B12 Vitamini'nin İşlevleri

B12 vit. vücutta iki tepkimeye katılır. Bunlar, bir metil grubunun metiyonin yapmak üzere N⁵-M-THF'dan homosisteine taşınması ve L-metilmalonil KoA'nın metil grubunun süksinil KoA yapmak üzere yeniden düzenlenmesidir.

THF bir tek-karbon grubunu serinden veya diğer kaynaklardan alır. Bu karbon metil düzeyine indirgenir ve B12 vitamini'ye aktarılarak metil-B12 vit.(metilkobalamin) meydana getirilir. Metilkobalamin metil grubunu homosisteine aktarır ve bu da metiyonin sentaz enzimi tarafından metiyonine çevrilir. Metiyonin daha sonra, metil grubunu diğer bileşiklere aktarması için SAM haline etkinleştirilebilir

B12 vitamini, L-metilmalonil KoA'nın süksinil KoA'ya çevrimine de katılır. Bu durumda, koenzimin etkin biçimi 5'-deoksiadenozilkobalamindir. Bu tepkime, herbirinin katabolizmaları sonunda propiyonil KoA oluşturan valin, izolösin, treonin, timin ve tek sayıda zincirli yağ asitlerinin son üç karbonundan gelen karbonları TKA döngüsünün ara ürünü olan süksinil KoA'ya çeviren metabolik yolun bir bölümünü oluşturur.

2.2.8. S-Adenozilmetiyonin

S-Adenozilmetiyonin(SAM), metil grupları içeren birçok bileşiğin sentezine katılır. Bu madde, alıcı moleküllerdeki oksijen veya azot atomlarına metil gruplarının eklendiği tepkimelerde kullanılır(bu olay, kükürt veya karbona tek karbon grupları ekleyebilen folat türevlerindeki durumun aksinedir). Örnek olarak fosfatidiletanolaminin fosfatidilkoline, guanidinoasetatın kreatine, nöradrenalinin adrenaline, asetilserotoninin melatonine ve nukleotidlerin metilenmiş nükleotidlere çevrimi için SAM gerekmektedir. Bu madde katekolaminlerin ve serotoninin etkisizleştirilmesi için de gerekir. İnsanlarda 35'den fazla tepkime SAM'den yapılacak metil bağışını gerektirmektedir. SAM, metiyonin ve ATP'den sentez edilir. B12 vitamini'nin etkinleşmesindeki gibi, metiyoninin etkinleşmesinde de adenozini ATP sağlar. Metil grubunun aktarılması ile SAM S-adenozilhomosisteini yapar ve bu da daha sonra homosistein ve adenozin vermek üzere hidrolize olur. SAM sentezi için gereken metiyonin diyetten sağlanır veya B12 vitamini'den bir metil grubu alan homosisteinden türetilir. Yani metiyoninin metil grubu tekrar üretilmiş olur. Metiyoninin diyetteki vazgeçilmez kaynağı ise homosisteindir.

Metiyoninden SAM sentezleyen MAT enziminin 3 tipi vardır. MAT 1 ve 3 sadece karaciğerde bulunurken MAT 2 bütün dokularda bulunur. MAT 1

ve 3 izoenzimlerinin Km değerleri yüksektir(12). Bu yüzden karaciğer, metiyoninin fazlalığında daha fazla SAM sentezleyebilmektedir. MAT 2 izoenziminin Km değeri düşüktür, metiyonin fazlalığında dahi SAM sentezi sınırlıdır ve metiyonin seviyesindeki değişikliklerden çabuk etkilenir. Bu yüzden karaciğer dışı dokularda hücre içi metiyonin konsantrasyonu azaldığında SAM seviyeleri de azalır

Homosistein için yeterli diyet kaynağının varlığı halinde metiyoninin diyetle bulunması gerekmeyecektir. Öte yandan, diyetle metiyonin bol miktarda bulunurken homosistein için kayda değer bir gıdasal kaynak bulunmamaktadır. Homosistein, sistein sentezi için kükürt atomu sağlar. Bu olayda homosistein, sistatyon yapmak üzere serinle tepkileşir, bu ise parçalanarak sistein ve α -ketobütirat verir. Bu dizgideki ilk tepkime sistein tarafından inhibe edilir. Yani, vucuttaki sistein miktarı buna ait metabolik işlevler için gereksinilenden daha az olmadığı sürece sistein sentezi için homosistein yoluyla metiyonin kullanılmaz. Dolayısı ile, diyetle yeterli miktarda sistein bulunması diyetteki metiyonin gereksinimini azaltacaktır.

2.2.9. Folat, B12 Vitamini ve SAM Arasındaki İlişkiler

2.2.9.1. Metil Tuzağı Varsayımı

Folat döngüsü üzerinde karbonun akışını çözümleyecek olarak denge N^5 -M-THF oluşumu yönündedir. Bu biçim sanki vitamene bağlı karbonun en kararlı halidir. Öte yandan, sadece bir tepkimede metil grubu N^5 -M-THF'den çıkartılabilmekte olup bu da B12 vit. gereksinen metiyonin sentaz tepkimesidir. Yani, B12 vit. eksikliği bulunacak olursa veya metiyonin sentaz enzimi kusurlu ise N^5 -M-THF birikime uğrayacaktır. En sonunda, vucuttaki folat biçimlerinin en büyük bölümü N^5 -M-THF içinde "kapana kısıtlanmış" veya "tuzaklanmış" hale gelecektir. Burada karbonların çıkartılmaması nedeni ile işlevsel bir eksikliğin belirmesi "metil-kapanı" varsayımı olarak bilinir ve bunun klinik karşılıklarına aşağıdaki bölümlerde ve tartışma bölümünde tekrar değinilecektir.

Tek karbon metabolizmasına katılan diğer bileşikler kolinin yıkım ürünlerinden türetilir. Bazı fosfolipitlerin vazgeçilmez bir bileşeni olan kolin betain aldehidi yapmak üzere yükseltgenir ve bu da betaine(trimetilglisin) yükseltgenir. Karaciğerde betain, metiyonin ve dimetilglisin vermek üzere bir metil grubunu homosisteine aktarabilir. Bu da karaciğere homosisteini metiyonine çevirmek için iki yol sağlar. SAM'ın birikime uğradığı koşullarda glisin, sarkozin(N-metil glisin) vermek üzere metilenebilir. Metiyonin düzeylerinin yüksek olduğu ve metiyonin fazlasının metabolize edilmesine gerek duyulduğu zaman bu yol kullanılır.

2.3. Tek Karbon Metabolizması ve Amino Asit İlişkisi

Amino asit katabolizması için iki tip reaksiyon rol alır. İlki piridoksal fosfat kullanan transaminasyon reaksiyonudur. Transaminasyon reaksiyonları dışında amino asit katabolizması reaksiyonlarının diğer yaygın tipi tek karbon transferidir. Bu transfer üç kofaktörden birini içerir; biyotin, tetrahidrofolat, S-adenozil metiyonin.

Bu kofaktörler farklı oksidasyon seviyesindeki tek karbon gruplarını transfer ederler. Biyotin en okside haldeki karbonu transfer eder, karbondioksit. Tetrahidrofolat ara oksidasyon düzeyindeki karbon gruplarını transfer eder ve bazen metil gruplarını da transfer eder. S-adenozil metiyonin ise metil gruplarını transfer eder ki, bu karbonun en indirgenmiş halidir ve tersinir şekilde okside olmaz. Tetrahidrofolat ve S-adenozil metiyonin, amino asit ve nükleotid metabolizmasında özellikle önemli olan 2 kofaktördür. Tetrahidrofolat, bakterilerde sentezlenir ve pterin halkası (6 metilpterin), para amino benzoat ve glutamat kalıntılarından oluşur. Okside form olan folat, memelilerde bir vitamindir. Dihidrofolat redüktaz enzimi aracılığıyla iki basamakta tetrahidrofolata dönüştürülür. Dihidrofolat redüktaz enzimi aracılığıyla. her üç oksidasyon seviyelerindeki tek karbon grupları tetrahidrofolata N⁵, N¹⁰ veya her ikisi üzerinden bağlanır. Kofaktörün indirgenmiş formu, metil grubu taşır daha okside formu metilen grubu taşır, en okside formu metenil, Formil veya formimino grubu taşır. Çoğu tetrahidrofolat formları birbirine dönüşebilir ve çeşitli metabolik reaksiyonlarda tek karbon ünitesi vericisi olarak çalışır. Hidrofolat için tek karbon biriminin

primer kaynağı serin-glisin dönüşümünde ayrılan karbondur ve bu yolla N^5, N^{10} -MIn-THF oluşur. Tetrahidrofolat N^5 üzerinde metil grubu taşıyabilir, fakat bu metil grubunun transfer potansiyeli çoğu biyosentez reaksiyonları için yetersizdir. S-adenozil metiyonin biyolojik metil grubu transferlerinde tercih edilen moleküldür. ATP ve metiyoninden, metiyonin adenozil transferaz aktivitesi ile sentezlenir. Bu reaksiyonu sıradışı yapan, methionine ait nükleofilik sülfür atomunun atp'deki fosfor atomları yerine riboz kalıntısının 5'karbonuna bağlanmasıdır.. Trifosfat, salınarak fosfat ve pirofosfat şeklinde enzim içinde ayrılır, Pirofosfat, inorganik pirofosfataz ile parçalanır. Böylelikle bu reaksiyonda ikisi yüksek enerjili fosfat gruplarından olmak üzere toplamda 3 bağ parçalanır. Trifosfat'ın ATP'den ayrıldığı diğer bilinen tek reaksiyon koenzim B12 sentezi sırasında oluşur. S-adenozil metiyonin, destabilize edici sülfonilüre faaliyeti aracılığıyla potent bir alkali edici ajandır. Metil grubu nükleofillerin atağına maruz kalır ve N^5 metil tetrahidrofolatdaki metil grubuna göre 1000 kat daha reaktiftir. S-adenozil metiyonin deki metil grubunun bir alıcıya transferi ile ortaya S-adenozihomosistein çıkar ve devamında homosistein ve adenosine ayrışır. Metiyonin sentazın katalizlediği reaksiyon ile homosisteine metil grubu transferinden metiyonin oluşur; ve metiyonin aktive metil döngüsünü tamamlamak üzere adenozil methionine tekrar dönüşür. Metiyonin sentazın insanlardaki formu N^5 metil tetrahidrofolat kullanır. Fakat metil grubu ilk olarak koenzim B12 den türeyen kobalamine aktarılarak, metiyonin oluşumunda ki metil vericisi olan metil kobalamin oluşturulur. Bu reaksiyon ve metilmalonil KoA'nın süksinil KoA ya dönüşümü memelilerdeki sadece iki koenzim B12 bağımlı reaksiyonlardır. Organizmadaki belirli bazı hücrelerin fizyolojik veya patolojik sebeplerle artmış veya azalmış mitoz hızı ile tek karbon metabolizmasının önemli elemanları olan B12 vit. ve folat yakın bağ ve ilişki içindedir. .Zira genetik materyalin sentez ve düzenlenmesinde tek karbon taşıyıcılarının ve transfer edicilerinin; neoplazi ve enflamasyon gibi durumlarda ilgili dokularda ve immün sistemde biraradaki hem artmış hem azalmış mitotik aktivite ve apoptotik değişiklikler taşıyan hücrelerin metabolizmalarında önemli yer işgal ederler. Bu etkiler, mitotik aktivitesi, fizyolojik olarak hızlı hücreleri barındıran kemik iliği, deri ve deri ekleri, hepatik, renal ve intestinal epitel gibi dokular

için de geçerlidir. Bizim çalışmamızda ilgi alanımızı oluşturan hastalık olan astımın kapsamında ve ilişkisinde olduğu bilinen enflamatuar hücreler, ve kollajen sentezleyen fibroblastları kapsamaktadır. Her enflamasyon ve remodelling süreçleri, artmış apoptotik hücreler ile azalmış apoptotik aktivite içindeki mitoz hızı artmış hücreleri barındıran süreçlerdir. Metil grubu taşıyıcıları ve transfer edicileri, pürin sentezi kadar genetik materyalin bazı gen bölgeleri üzerinde metilasyon demetilasyon reaksiyonları ile düzenleyici işlevler de barındırır. Zira bu etkiler epigenetik konu başlığı altında günümüzde ilgi odağıdır.

Ancak tek karbon metabolizmasını ilgilendiren diğer bir konu ise fosfolipit sentez ve metilasyonudur. Zira genetik materyalde regülatör etkiler taşıyabilen tek karbon birimleri membran fosfolipitlerinin de akışkanlıklarında ve metabolizmalarında değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler hem membran stabilitesi yönünden ele alınabileceği gibi hemde enflamatuar süreçlerde kavşak noktada rol alan lipid mediyatörlerdeki değişim ve düzenlenmeler açısından da düşünülebilir. Metil kaynağı aminoasitlerin metabolizması da bu dengede önemli rol oynamaktadır. Özellikle arjinin, metiyonin, serin, glisin, histidin, ornitin amino asitleri bu metabolizmada değerli roller üstlenmektedir. Zira hem astım hemde enflamasyon açısından önemi gün geçtikçe artan bir mediyatör olan NO üretimi açısından arjinin amino asidi kaynak görevi görmektedir. Bu reaksiyonda rol alan önemli bir tek karbon taşıyıcısı daha devreye girmektedir, bu tetrahidrobiopterindir(THB). THB sentezinin öncül molekülü olan guanozin sentezi için yine formiltetrahidrofolatın(F-THF) yer aldığı reaksiyonlar bulunmaktadır. Artmış aktivite gösteren kollajen sentezleyen fibroblast hücreleri açısından da tek karbon metabolizması ele alındığında ornitin amino asidi üzerinden prolin hidroksiprolin ve dolayısıyla kollajen sentezi, nitrik oksit sentaz ile arjinaz arasındaki denge ile düzenlenir. Dolayısı ile hem ornitin/prolin dengesi ile kollajen üzerinden *remodellingin* düzenlenmesi, hem de yine ornitin-arjinin dengesi ile NO sentezi üzerinden de bronkodilatasyon ve bronşiyal enflamasyonun düzenlenmesi sözkonusudur.

Fazla olan tek karbon gruplarının tek karbon havuzundan uzaklaştırılmasında F-THF dehidrogenaz enzimi rol alır. Enzim, CO₂'e

oksidasyon sağlar. Aynı enzim ayrıca N¹⁰-F-THF'ın THF ve formata hidrolize olmasını sağlar. F-THF dehidrogenaz enziminin aktivitesi karaciğer ile sınırlıdır. Enzimin hidrolaz aktivitesi tam olarak anlaşılmasa da muhtemelen THF ihtiyacını karşılamada sorun olduğu zaman bu açığı kapatan ek bir mekanizmadır.

2.3.1. Hiperhomosisteinemi

Transsülfürasyon yolağı, homosisteinden sistatyonin, sistein, glutatyon gibi diğer amino asitlerin ve polipeptidlerin elde edildiğı ve homosisteinin bir anlamda detoksifiye edildiğı biyokimyasal yoldur. Homosistein, iki önemli yolağın kavşak noktasında bulunur. Homosisteinin, bir kısmı remetilasyon ile metiyonine çevrilerek, metiyonin döngüsüne katılırken bir kısmı, geri dönüşümsüz olarak transsülfürasyon yolağına girer.(26) Metiyonin biyosentezi ve sistatyonine transsülfürasyon yolları arasında homosisteinin ayrılması esas olarak SAM tarafından düzenlenir. SAM, MTHFR enzimini inhibe ederken sistatyonin-β-sentaz(CBS) enzimini aktive ederek bu düzenlemeyi sağlar.

Homosistein transsülfürasyonu, bu tiyolün sistatyonini meydana getirmek üzere serin ile kondensasyonunu içerir, sistatyonin-β-sentaz(CBS) tarafından katalizlenen B6 vitamini bağımlı bir basamaktır. Bu sınırı geçtikten sonra, homosistein artık metiyonin için bir daha prekürsör olamaz. Sistatyonin, daha sonra B6 vitamini bağımlı diğer bir enzim, sistatyonin liyaz ile sisteine ve α-ketobütirata hidroliz olur. Sistein, glutatyon sentezinde kullanılır. Hücrenin en önemli redoks düzenleyici proteini olan glutatyon sentezi, transsülfürasyon yolağı sonucu oluşan sisteine bağımlıdır. Sisteinin fazlası ise taurin ve daha sonra inorganik sülfata dönüşür.

Remetilasyon döngüsünün diğer bir alternatif yolu ise; homosisteinin, betain-homosistein metiltransferaz(BHMT) enzimi ile B12 vitamininden bağımsız bir şekilde de metiyonine çevrilmesidir. BHMT enzimi, özellikle karaciğer, böbrek ve lens dokusunda bulunmaktadır. Bu dokularda kolinin yıkılmasıyla oluşan betaini, metil grubu vericisi olarak kullanarak, homosisteinin tekrar metilasyonunu sağlar. Artmış homosistein düzeylerinin kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklarla bağlantısı vardır. Homosistein

düzeyleri, hem folik asit hem B12 vitaminimetabolizması ile ilgili çeşitli yollardan birikime uğrayabilir. Homosistein,SAM bir metil grubu bağışladığı zaman ortaya çıkan S-adenozil homosisteinden türetilir. SAM'in metil gruplarını sıkça bağışlaması nedeniyle S-adenozil homosistein sabit hızda sürekli üretilmekte ve bu da homosisteinin sabit bir hızda üretilmesine yol açmaktadır. Üretilmiş olan homosistein ya metiyonin vermek üzere tekrar metillenmekte veya sistatyonin vermek için serinle kondanase olmaktadır. Metiyonin üretimi için iki yol bulunmaktadır. Ana yol, B12 vit. gereksinen, N⁵-M-THF tarafından metillenmektedir. Karaciğerde ikinci bir yol daha bulunmakta olup burada betain(kolinin bir yıkım ürünüdür) metiyonin yapmak üzere homosisteine bir metil grubu verebilmekte ise de bu yol daha onemsizdir. Homosisteinin sistatyonine çevrimi piridoksal fosfat gereksinir. Yani, B12 vit. eksikigi bulunan bir kişide homosisteinin ana yol üzerinden metiyonine çevrilmesi inhibe olur. Bu da homosisteini sistatyonin üretmeye doğru yönlendirir ve sonunda sistein üretilir. Sistein birikime uğrarken sistatyonin üreten enzim geri bildirimli inhibisyona uğrar ve bu yol böylece de inhibe edilir . Bu ise tümüyle homosistein birikmesine yol açar ve biriken homosistein kana salınır.

Hücre içi SAM/SAH oranı, homosistein konsantrasyonu, spesifik diyetel faktörler, folat ve metiyonin, aynı zamanda B12 ve B6 vitaminlerinin hepsi tek karbon metabolizmasının ve tekrar metilasyon - transsülfürasyon yolları arasındaki metabolik balansın önemli belirleyicileridirler N⁵, N10-metil THF'ü N⁵-metil THF'e çeviren enzimde bir mutasyon varsa gene kanda homosistein birikir. Böyle bir durumda N⁵-metil THF düzeyi homosisteinin metiyonine çevrilmesine izin vermeyecek kadar düşüktür. Bu yolun kaybı ve buna kenetlenmiş olarak sistatyon oluşumu üzerine sisteinin yaptığı geri bildirimli inhibisyon da kandaki homosistein düzeylerinde bir artısa yol açacaktır.

Serum homosisten düzeylerini yükselten üçüncü bir yol mutasyona uğramis sistatyon-β-sentaz veya bu enzimin kofaktör olarak gereksindiği vitamin B6 nin eksik oluşudur. Bu kusurlar homosisteinin sistationine

döndürülmesini bloke eder ve birikime uğramış homosistein tümüyle metiyonine çevrilerek tüketilemez yani sonuçta homosistein birikir.

SAM, MTHFR enzimini inhibe ettiğinde N^5 -M-THF oluşumu azalır. Metil grubu kaynağı azaldığında homosistein remetilasyon döngüsüne giremez. SAM, CBS enzimini aktive eder, homosistein transsülfürasyon yolağına sapar ve sistatyonine dönüşür. SAM seviyeleri azaldığında ise MTHFR enziminin inhibisyonu azalacağı için N^5 -M-THF oluşumu artar ve CBS enzim aktivasyonu azalacağı için sistatyonin oluşumu azalır. Bu durumda homosistein metiyonin üretimine yönlendirilmiş olur.

Bütün dokularda, N^5 -M-THF'in metil grubu kaynağı olduğu metiyonin remetilasyon döngüsü bulunmaktadır fakat transsülfürasyon yolağı, sadece karaciğer, böbrek, pankreas, bağırsak ve beyinde vardır.(27) SAM ve SAH sentez reaksiyonları tek yönlü iken SAH'den homosistein hidrolizi reaksiyonu çift yönlüdür. Homosistein seviyesi arttığında transsülfürasyon yolağı bulunmayan dokularda homosistein tekrar SAH'a dönüşür. Bu yüzden sınırlı SAM konsantrasyonu olan karaciğer dışı dokularda SAH seviyeleri daha önemli regülatör role sahiptir

SAM, MAT izoenzimlerini regüle eder. MAT 2 aktivitesini inhibe eder ve MAT 2 gen ekspresyonunu da azaltır. Düşük SAM seviyelerinde de ters olarak gen ekspresyonu artar. Öte yandan SAM, MAT 1 ve 3 izoenzimlerinin aktivitesini artırır.

SAH, MTHFR enzim regülasyonunda SAM ile yarışmalı antagonisttir. SAM'ın yaptığı MTHFR inhibisyonunu inhibe eder. Aynı zamanda SAM-bağımlı metiltransferazları inhibe ederek kendi sentezini sınırlar. SAH seviyelerinin artması remetilasyon ve transsülfürasyon yolaklarını etkiler. SAH, MS ve BHMT enzimlerini inhibe ederek homosistein seviyelerinin artmasına sebep olsa da CBS enzimini aktive ederek transsülfürasyon yolağını artırır. CBS enzimi olmayan dokularda ise fazla SAH ve homosistein böbrekle atılmak üzere hücre dışına çıkarılır. CBS enzimi homosistein detoksifikasyonunda çok önemlidir. Eksikliğinde, idrar ve plazmada homosistein seviyeleri çok artar. Homosistinüri olarak adlandırılan otomozal

resesif kalıtım gösteren bu genetik hastalıkta tromboembolik komplikasyonlar ve ateroskleroz ve enflamatuvar hadiseler sık görülür.(28)

MS enzimi, SAH ve metiyonin tarafından inhibe edilir. SAM ise enzimi dolaylı olarak aktive eder. MS, metiyonin sentezini, kofaktörü olan metilkobalaminin yapısındaki kobalt atomunu pozitif1 durumundan pozitif3 durumuna getirerek gerçekleştirir. Oksidatif stres gibi bazı durumlarda, bu kobalamin-MS içerisindeki kobalt atomu elektron kaybederek, kobalt pozitif2 durumuna okside olabilir. Bu durumda MS enzimi inaktif duruma geçer. Metiyonin sentaz redüktaz enzimi, SAM varlığında kobalt +2'i, +3 durumuna yükseltgeyerek aktif hale getirir.

Glisin-N-metil transferaz(GNMT) enzimi, glisinin sarkozine metilasyonunu sağlar. Metil kaynağı olarak SAM'ı kullanır. Bu reaksiyon hücre içi SAM/SAH oranını dengeleme de ve diğer metilasyon reaksiyonları için SAM tasarrufunda çok önemlidir(29). SAM, GNMT enzimini aktive eder, N⁵-M-THF ise inhibe eder. SAM, GNMT enzimini N⁵-M-THF üzerinden dolaylı olarak da etkiler. SAM seviyeleri arttığında enzim aktive olur ve fazla olan SAM, SAH'e dönüşür. SAM, MTHFR enzimini inhibe edeceği için N⁵-M-THF oluşumu ve GNMT enzim inhibisyonu azalır. Böylece fazla olan SAM tüketilir. Ters durumda ise, SAM seviyeleri azaldığında hem enzim SAM tarafından aktive edilemeyeceği için hemde sentezi artan N⁵-M-THF tarafından GNMT inhibisyonu olacağından, SAM kullanımı durur. Bu mekanizma ile önemli metilasyon reaksiyonları için SAM tasarrufu sağlanmış olur.

İnsanlar diyetssel metiyoninden elde ettiklerinden daha fazla metil grubu kullanırlar. Aradaki bu açık, N⁵-M-THF ve betain ile telafi edilir. SAM gereksinimindeki sürekliliğin nedeni büyük oranda diğer transmetilasyon reaksiyonlarına kıyasla daha fazla SAM harcayan kreatin sentezidir. 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(30)

Remetilasyon döngüsünün alternatif yolu olan BHMT enzimi ile betainden metiyonin sentezi reaksiyonu da SAM tarafından düzenlenir. SAM, SAH ve metiyonin; BHMT aktivitesini ve gen ekspresyonunu inhibe ederek betainden metiyonin sentezini kontrol ederler

2.4. Fosfolipitlerin Metilasyonu

Fosfatidilkolin memeli hücrelerinde en fazla bulunan majör membran fosfolipitidir. Memelilerde fosfatidilkolin ayrıca, lipoproteinlerin, akciğer sürfaktanının ve safranın önemli bir bileşenidir. Fosfolipitin yapısı, gliserol molekülünün üçüncü karbonundaki hidroksil grubuyla esterleşmiş haldeki fosfat grubuna bağlı kolin barındırır. Diğer iki karbon da çeşitli doymuş ve doymamış yağ asitleriyle ester bağı ile bağlanır. Memeli akciğer fosfatidilkolini çoğunlukla iki palmitik asit içerir; dipalmitoilfosfatidilkolin veya lesitin olarak adlandırılır. Kilit enflamatuvar aracı yağ asidi olan araşidonik asit de hücre membranında fosfolipitlerin içinde barınır. Araşidonik asit, özellikle beyin, kas, karaciğer dokularında yoğun bulunan 4 adet doymamış bağ içeren 20 karbonlu bir yağ asididir; terim olarak all-cis-5,8,11,14-eikozatetraenoik asit denir. Araşidonik asit, her hücrede ihtiyaca göre değişen oranlarda membran yapısında fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin, fosfatidilinosit makromolekülleri içinde yer alır. Hücre içi enflamatuvar mediyatörlerin ve ikinci mesajcılarının sentezindeki kaynak moleküldür. Araşidonik asidin fosfatidilkolinden serbestlenmesini sağlayan iki enzim vardır: fosfolipaz A2 ve diaçilgliserol lipaz. Ağırlıklı olarak fosfolipaz A2 enzimiyle, fosfolipitlerdeki gliserolün 2nci karbonunda bağlı yağ asidiyken hidroliz edilip serbestlenir. Sinyalizasyonda görev alacak araşidonik asit fosfatidilkolin-spesifik sitozolik fosfolipaz A2(cPLA2) enzimiyle serbestlenirken, enflamatuvar araşidonik asit düşük molekül ağırlıklı fosfolipaz A2(sPLA2) enzimiyle serbestlenir. Serbestlenen araşidonik asit eikosanoidlerin sentezi için iki enzimatik yoldan birine girerek enflamatuvar mediyatörlerin sentezi için prekürsör işlev görür. Siklooksijenaz enzim yolağıyla prostaglandin H2 ve devamında prostaglandinler, prostasiklin ve tromboksanları oluşturur. 5-lipooksijenaz enzim yolağıyla 5-HPETE ve devamında oluşacak lökotrienler, 5-HETE ve daha potenti olan 5-okso-ETE'nin prekürsörü olur.

Lökotrien antagonistlerinin gerek alerjik gerekse alerjik olmayan astım hastalarında yaygın şekilde kullanılması ve semptomlarda düzelme sağlanması, bu yolağın düzenlenmesinde bir bozukluk olabileceğini göstermektedir ve daha yolağın başında yer alan araziidonik asit kaynağı fosfolipitlerdeki metilasyon reaksiyonlarının bu düzenlenmede de rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

2.5. Enflamatuvar Bir Hastalık Olarak Astım Hastalığına Moleküler Yaklaşım

Astım üç niteliğe sahip bir akciğer hastalığıdır: geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonu, solunan uyarana karşı bronşiyal aşırı duyarlılık ve inflamasyon. Hastalık erişkinlerin %5-7'sini ve çocuklarda yaklaşık %20'sini etkileyen genelde kronik bir durumdur. Ancak, astım tanısı çocuklarda çoğunlukla zordur çünkü astım yokluğunda virüsle indüklenen hışıltının(wheezing) prevalansı oldukça yüksektir.

Astımın herhangi bir birey üzerindeki etkisi, tetikleyen faktörlerin giderilmesi ve ilaç tedavisinin etkili kullanımı ile altta yatan hastalık sürecinin kontrol edilebilme düzeyine bağlıdır.

Kronik astımın kaynağını ve ilerlemesinin temelini oluşturan çevresel faktörlerin daha iyi anlaşılmasına ve tedavi için daha etkili ilaçların bulunmasına rağmen hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde hastalığın prevalansı ve bu hastalığa bağlı hospitalize edilen ve ölenlerin sayısı gittikçe artmaktadır. Bu yükselmekte olan eğilimlerin en azından bir kaçı uygun bir tanıdan yoksundur ve özellikle uzun dönem antiinflamatuvar ilaçların zayıf kullanımına bağlıdır. Yine de, astımın sıklığı ve şiddetindeki belirgin artış hastalığın moleküler temelini daha iyi anlama ihtiyacına vurgu yapmaktadır.

Belki de astım moleküler mekanizmalarını tanımlamada tek en önemli kavramsal "ilerleme", inflamatuvar bir hastalık olarak tanınmasıdır. İnflamasyon kanıtı astımın önemli bir bileşenidir ve hastalığın erken evrelerinde bile sitopatolojik ve histopatolojik olarak belirgindir. Örneğin, balgam ve havayolu dokusu örneklerinin analizi, epitelyal deskuamasyon ve havayolu eozinofilisi

akut ataklar esnasında değişmez. Ancak, anormal fizyolojinin bir nedeni olan inflamasyonun kritik rolü sadece patofizyolojisi inflamatuvar cevap gelişimiyle yakından ilişkili nonallerjik ve alerjik uyaranlarla indüklenen deneysel hastalık modelleri ile astım hastalarının bazal koşullarında ve yine inflamatuvar hücre ve mediatörlerle yakından ilişkili olan deneysel olarak provake edilmiş veya spontane alevlenme esnasında alınan bronkiyal biyopsi ve bronkoalveoler lavajda(BAL) kesin bir şekilde gösterilmiştir.

Hava yolu obstrüksiyonu, bronşiyal aşırı duyarlılık ve inflamasyon bağlamında astımın morfolojik çalışmaları kesin olarak hepsinde gösterilemese de özellikle kortikosteroidlere refrakter hastalarda hastalık ekspresyonu ile ilişkili bozulan hava yolu fonksiyonu aşırı inflamasyon cevabı üzerine kuruludur. Havayolu yapısındaki değişim de(bazen remodeling(yeniden yapılanma)olarak ifade edilir) artmış düz kas, matriks birikimi ve artmış vasküler ve nöral ağlar yoluyla önemlidir. Ayrıca, mukus aşırı salgınımı şiddetli kronik hastalık ve alevlenmelerde önemli bir özelliktir.

Şu anda araştırmacıların ve klinisyenlerin karşılaştığı zorluklar:(1) astmatik havayolu inflamasyonunda sorumlu olan biyokimyasal mekanizmaları tanımlamak ve(2) inflamatuvar yolları etkin bir şekilde inhibe eden veya antiinflamatuvar olanları potansiyalize eden çevresel ve farmakolojik faktörleri saptamak. Bu bölüm havayolu bağışıklığı ve inflamasyonunda görevli belirgin hücresel ve biyokimyasal yolları derlemektedir. Bu yolları tanımlamak astmatik hastalıkta aktive olan genlerin kimliği için ilk ipuçlarını sağlamaktadır.

2.5.1. Havayolu Enflamasyon Mekanizmaları

Havayolu inflamasyonu gelişimde adı geçen hücre türleri bağışıklık(immün) hücreleri(mast hücreleri, bazofil, eozinofil, lenfosit, nötrofil ve makrofajları içerir) ayrıca gözcü(sentinel) yapısal hücreleri(havayolu

epitelyal hücreler, vasküler endotelyal hücreler ve havayolu düz kas hücreleri) içermektedir. Hücre-hücre etkileşimleri lipid, proteaz, peptit, sitokin ve kemokin içeren mediatör sınıflarına atfedilmektedir. Henüz tüm bu bilgileri astmatik havayolu inflamasyon gelişimi için tek bir modelde birleştirilememektedir. Ancak, allejik antikor IgE ve havayoluna solunan allerjik ve nonallerjik uyaranlara karşı oluşan T hücre cevaplarının birbiriyle ilişkilendirilmesi ile kullanışlı bir taslak sağlamıştır. İmmün cevabın mürin modellerinde ilk defa bir şemanın kullanılmasıyla beraber, T hücre bağımlı inflamasyon genel olarak T helper 1(Th1) ve Th2 tiplerine sınıflandırılabilir. Th1 sitokinleri karakteristik olarak gecikmiş tip hipersensitiviteye neden olur ve interlökin(IL)-2, IL-12, interferon(IFN)- γ ve tümör nekrozis faktörü(TNF)- α 'yı içermektedir; bunun yanında Th2 cevabı B-hücresi kaynaklı hümmoral immünite ile kromozom 5q 32-34'te kodlanan sitokin gen kümesinin koordineli upregölasyonu ile IL-3, -4, -5, -6, -9, -13, ve granölösit/makrofaj koloni-stimulan faktör(GM-CSF) sekresyonudur. B ve T hücrelerinin etkileşimi astım oluşumunda kritik öneme sahiptir.

2.5.2. Astımda Klinik Tabloya Etki Eden Ana İmmün Bileşenler

2.5.2.1. Allerjik Enflamasyon

B lenfositleri, immünoglobulin kaynakları olarak, herhangi bir immün reaksiyonda çok kritik öneme sahiptir. Astım hastalığı süreci temelli allerjik reaksiyon durumunda, IgE sekrete eden plazma hücrelerine dönüşen allerjen-spesifik B hücrelerinin merkezi önemi bulunmaktadır.

2.5.2.2 İmmünglobulin E

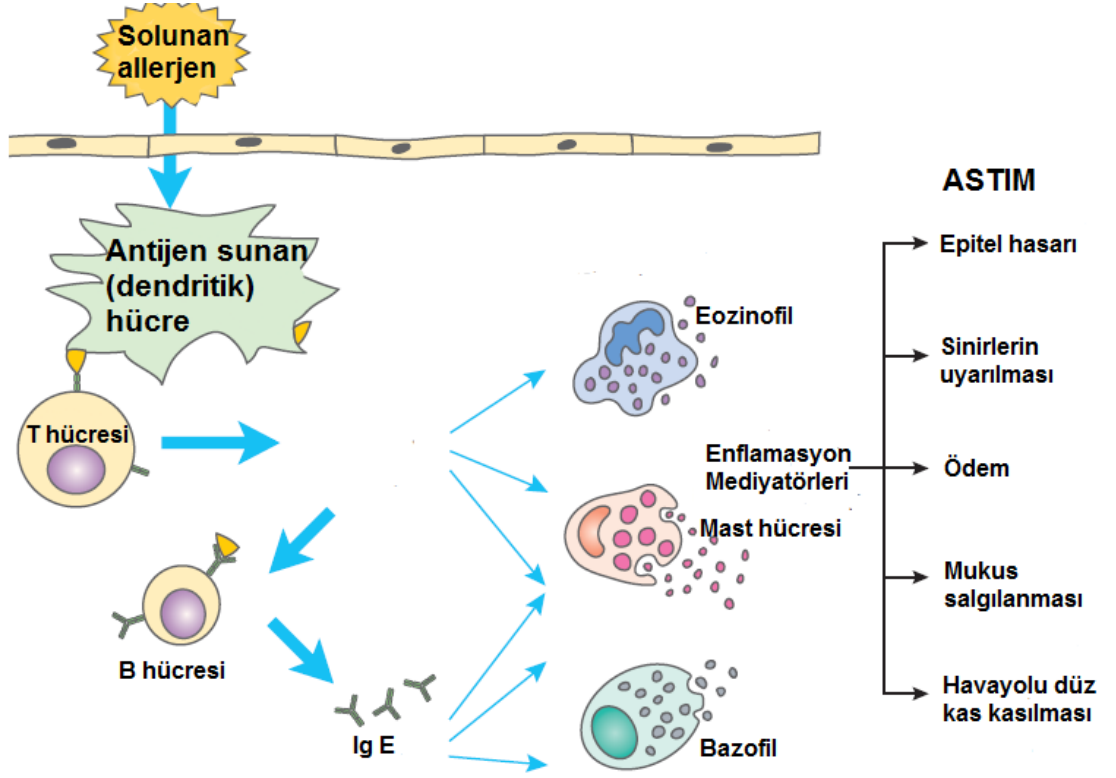
İmmünglobulin E antikorları parazitik enfastasyonlara cevap olarak ve alerjik hastalık seyrinde salınır. İmmünglobulin havuzunun sadece %0.02'sini oluşturmalarına rağmen, biyolojik aktiviteleri kayda değerdir, çünkü mast hücreleri ve bazofillerin hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak sensitize etme yetenekleri vardır. Bireyin fazla miktarlarda IgE üretebilme eğilimi olan atopik alerjik rinit, atopik dermatit ve astım gibi allerjik hastalık gelişim riski ile ilişkilidir. Ancak, bilinmelidir ki, astım hastalarının az bir kısmında belirgin hastalıkla beraber allerjen duyarlılığını göstermek oldukça

zordur. Plazma hücreleri IgE sekrete eder ve bu antikorların sentezi birçok sitokin tarafından düzenlenmektedir. IL-6 B hücrelerinin dönüşümü ile IgE sınıfı antikor sekresyonunu sağlar ve IgE sentezi IL-4 ve IL-13 ve alerjik hastalıkla ilişkili Th2 hücrelerinin ürünleri ile uyarılır.

IgE reseptörleri iki ana gruba ayrılır: yüksek afiniteli ve düşük afiniteli olanlar. Mast hücre ve bazofil yüzeyindeki yüksek afiniteli reseptörler (FcεRI) tip I hipersensitivite reaksiyonlarındaki IgE'nin klasik fonksiyonlarına aracılık eder. Multivalan antijen tarafından reseptör dimerizasyonunda, α alt ünitesinin intrasellüler kısmı fosforile olur ve sinyal kaskadının diğer bileşenleri ile etkileşimde olur. Mast hücreleri ve bazofillerdeki yüksek afiniteli IgE reseptörü ekspresyonu antijen tarafından reseptör çapraz bağlanmasına gerek kalmadan IgE bağlanması ile upregüle olur. Bu yüzden; artmış IgE üretimi ile karakterize alerjik ortam bağlamında, mast hücreleri ve bazofillerin IgE'yi bağlama kapasitesi yani alerjene cevap oldukça artmıştır.

Mast hücreleri veya bazofil yüzeyinde bulunan FcεRI reseptörünün multivalan antijen tarafından dimerizasyonu β ve γ subünitelerindeki immünoresseptör tirozin bazlı aktivasyon motiflerinde tirozin artıklarının fosforilasyonuna neden olur. Bunlar tirozin kinaz syk proteini gibi sitoplazmik sinyal molekülleriyle kompleksin oluşabilmesi için iskelet görevi görürler. Birçok sinyal olayı devamında inositol 1,4,5 trifosfatı ve intrasellüler kalsiyum iyon konsantrasyonunu artarak granül içeriklerin salınımı ve arakidonik asit metabolitlerinin oluşumu ile sonuçlanır. Histamin, lökotrienler, IL-4, ve IL-13'ü içeren bu birçok mediatör astım patolojisine önemli katkıda bulunmaktadır.

CD23 ya intakt, membran bağlı molekül halinde (iCD23) ya da solüblü fragmanlar halinde bulunur. Fragmanlar iCD23'ün iyi anlaşılammış bir dizi proteolitik oay sonucu ayrılma ürünleridir. Membran bağımlı iCD23, lokal yüksek IgE artışına cevap olarak B hücre IgE sentezinde downregülasyona yol açmasını da içeren birkaç tane fonksiyonu vardır. Aksine, CD23 fragmanları, IgE'ye bağlandıklarında sitokin benzeri etki göstererek B hücrelerinden IgE sekresyon artışına ve monositlerden TNF-α sekresyonuna neden olur.



Şekil 2.9. Astımda rol alan enflamasyon elemanları

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçimi

Çalışmaya, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 21 Nisan 2013 tarih ve 4014-138-13 sayılı yazılı izni ile başlandı.

Çalışmaya Şubat,2014-Haziran,2014 tarihleri arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Göğüs Hastalıkları Servisi'ne başvurup, "Astım" tanısı ile kliniğe yatırılmış veya ayaktan takip edilen ve çalışmaya katılmayı kabul eden 78 hasta dahil edildi. Kontrol grubu olarak, cinsiyet dağılımını sağlayacak şekilde astım ya da majör hastalığı bulunmayan 46 hasta seçildi.

Çalışmaya katılan tüm hastalara çalışmanın amacı anlatıldı ve 'aydınlatılmış onam formu' imzalatıldı.

3.1.2. Çalışmadan Dışlama Kriterleri

Hasta ve kontrol gruplarında çalışmanın sonuçlarını etkileyebilecek metabolik başka bir hastalığı hastalığı olanlar, metotreksat ve/veya folat, B12 vit. içerikli multivitamin preparat ve gıda takviyeleri kullananlar, ilk ve tek atakla yeni astım tanısı alanlar, çalışmaya katılmak istemeyenler çalışmaya dahil edilmedi.

3.1.3. Örneklerin Toplanması

Tüm hasta ve kontrol grubundaki bireylerin rutin tetkikler için 12 saat açlık sonrası kan, idrar numunelerinden arta kalanlar ayrıldı. Eritrosit içi total folat ölçümlerinde kullanılmak üzere tam kan sayımı aynı gün çalışılarak hematokrit değerleri elde edildi. Serum vit-B12, serum folat, plazma total homosistein, total eritrosit içi folat ölçümleri için örnekler -20°C'de; idrarda metilmalonik asit ölçümleri için örnekler -20°C'de; total eritrosit içi folat alt gruplarının ölçümleri için ise örnekler, tam kandan eritrosit paketi ayrıştırılıp

muameleleri tamamlandıktan sonra -80°C'de, serum amino asitlerinin gaz kromatografik ölçümleri için örnekler -80°C'de, çalışma gününe kadar saklandı.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Otoanalizör: Architect C8000, Architect C16000, Architect SI200

Tam kan sayımı cihazı: Abbott Cell-Dyn Sahire,

HPLC Cihazı: HP Agilent 1100 ve Agilent Technologies 1200 Series

Gaz Kromatografi cihazı: Thermo Electron Corp. Finnigan Focus GC,

Abbott Axsym System

Manyetik karıştırıcı: Yellow line,

Derin dondurucu: Sanyo Ultra Low,

pH-metre: WTW microprocessor,

Hassas terazi: Precisa 205ASCS,

Girdap karıştırıcı: IKA MS minishaker,

Bidistile su cihazı: GFL 2102,

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

3.2. Biyokimyasal Yöntemler

3.2.1. Serum Folik Asit ve B12 Vitamini Düzeylerinin Ölçümü

Serum folat ve B12 vitamini, kemilüminesans mikropartikül immünoassay tekniği ile kendi kitleri kullanılarak Architect İ2000SR cihazında ölçüldü. Folat için referans aralığı 4,5–20,5 ng/ml, B12 vit. için 187–883 pg/ml'dir.

3.2.2. Plazma Total Homosistein Düzeyinin Ölçümü

Plazma total homosistein düzeyi, Abbott AxSYM cihazında kendi kiti kullanılarak floresan polarizasyon immünoloji tekniği ile ölçüldü. Ölçülen plazma total homosistein için µmol/L birimi kullanıldı. Referans aralık olarak 6–12 µmol/L belirlendi.

3.2.3. İdrar MMA Düzeylerinin Ölçümü

İdrarda metilmalonik asit ölçümü, Gültepe ve diğ.(46) tarafından tanımlanan, diazotize p-nitroanilin metil malonik asitle verdiği reaksiyonun fotometrik olarak ölçümü ile yapılmıştır(46).

3.2.4. Serum Aminoasit Analizleri

Serum ve idrar aminoasitlerinden metiyonin, glisin, serin, sistein, sistatyonin, prolin, hidroksprolin, alanin, valin, lösin, izolösin, treonin, asparjin, aspartat, glutamat, glutamin, fenilalanin, ornitin, lizin, histidin, tirozin, triptofan ölçümleri yapıldı. Bu amaçla, EZ: faast ticari kiti ile Thermo Focus GNC gaz kromatografisi cihazı kullanıldı. Ölçülen aminoasitlerin birimleri, serum için $\mu\text{mol/L}$ cinsinden idrar için $\mu\text{mol/gr}$ kreatinin cinsinden ifade edildi.

3.2.5. Eritrosit İçi Total Folik Asit Ölçümü

Eritrosit içi total folik asit, K_3EDTA 'lı tüpe alınan kan örneklerinden Architect marka kit ile Architect İ2000SR cihazında ölçüldü. Kit prospektüsüne uygun olarak, kan örnekleri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de toplandı, bekleme süresi bir ayı geçmeden çalışıldı. $100\text{ }\mu\text{L}$ tam kan numunesine 1 mL folat lizis reaktifi eklendi, oda ısında $1,5$ saat ışıktan korunarak bekletildi. Sonra bu karışımdan $100\text{ }\mu\text{L}$ alınarak üzerine $100\text{ }\mu\text{L}$ folat RBC lizis diluenti eklendi. Vortekslenerek ölçüm için cihaza verildi. Çıkan sonuçlar hematokrit değerlerine bölündü. Sonuç değeri ng/mL olarak ifade edildi. Referans aralık değerleri $126\text{-}651\text{ ng/mL}$ olarak belirlendi.

3.2.6. Eritrosit İçi Folik Asit Alt Gruplarının Ölçümü

3.2.6.2. Eritrosit Paketlerinin Eldesi

Gönüllülerden K_3EDTA 'lı tüplere alınan bir tüp kan örneği, hem eritrosit içi folik asit alt grupları, hem de plazma homosistein tayininde kullanıldı. Kanlar alındıktan hemen sonra, Hettich Universal 320R santrifüj cihazında $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2000 g 'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma ayrıştırıldıktan sonra, alt kısımda kalan eritrosit sedimenti salin solüsyonuyla (

9 g/L NaCl) yıkanarak aynı şartlarda tekrar santrifüj edildi. Yıkama işlemi her örnekte iki kere tekrarlandı. Süpernatant kısımları örnekten uzaklaştırılırken, lökositlerden zengin *buffy coat* kısımları da temizlendi. Tüplerde kalan eritrosit paketlerinden 200 mikrolitrelik kısımları ayrı eppendorfa alındı. Eppendorf içine %2'lik 1000 mikrolitre askorbik asit çözeltisi eklenerek 15 saniye vortekslendikten sonra örnekler 1 dakika dinlendirildi. Ardından 11 M'lık perklorik asitten 100 mikrolitre eklendi ve 15 saniye şiddetli şekilde vortekslendi. Ardından pH nötralizasyonu için 11 M'lık KOH çözeltisinden yine 100 mikrolitre eklenerek 15 saniye vortekslendi. Son olarak, 13000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek üstte kalan süpernatant kromatografik işleme tabi tutuldu.

3.2.6.2. Eritrosit İçi Folik Asit Alt Grupları Tayini

Eritrosit içi folat alt grupları, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tespit edildi. Örneklerin elde edilmesi, yukarıda "Eritrosit İçi Total Folik Asit Konsantrasyonlarının Ölçümü"nde anlatıldığı gibi yapıldı. Tek fark en son basamaktaki 13.000 g' de 4 dakikalık santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, %2'lik askorbik asit çözeltisi ile dilüsyon işlemine tabi tutulmadan direkt olarak kromatografik işleme tabi tutulur.

3.2.6.3. Mobil fazın hazırlanması

HPLC grade distile su ile 0,06 M fosfat(KH_2PO_4) tampon hazırlandı. %15(v/v) olacak şekilde $\geq 99,9$ saflıkta metanol(Sigma Chromasolv), fosfat tampon üzerine eklendi. Bunun üzerine 0,5 ml/L trietilamin eklendi. Çözeltinin pH'sı ortofosforik asit ile 3,4'e ayarlandı. Daha sonra bu mobil faz, 0,45 μm por çapı olan selülöz filtreden(Sartorius Stedim) geçirildi.

3.2.6.4. Kromatografik Şartlar

3 mikron partikül çapı olan 250 X 4,6 mm fenil kolon(ACE 3) kullanılarak ters(reversed) faz izokratik ayırım yapıldı. Uygulanan örnek injeksiyon hacmi 35 mikrolitre, mobil faz akış hızı 0,5 mililitre/dakika ve kolon termostat sıcaklığı 23 °C olarak belirlendi. Floresans dedektör;

$\lambda_{\text{ksitasyon}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisyon}} = 354 \text{ nm}$ olacak şekilde ayarlandı. Her örnek için kromatografik ayırım süresi 45 dakika olarak tayin edildi.

3.2.6.3. Sonuçların hesaplanması

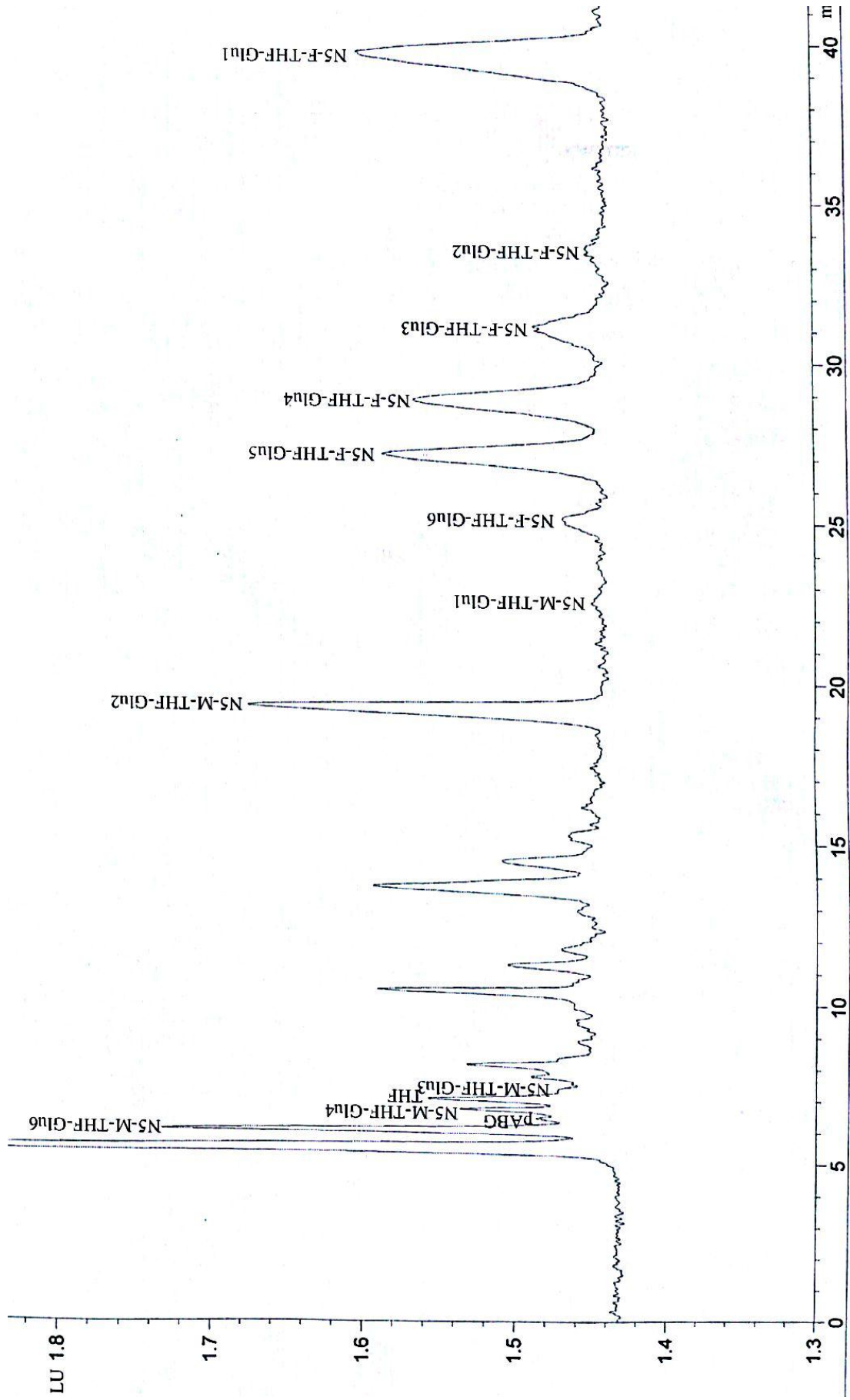
Folat alt gruplarına ait pikler kromatogramda şu sıra ile elde edildi:

- | | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| 1. 5-Metiltetrahidrofolat Glu6 | 8. 5-Metiltetrahidrofolat Glu1 |
| 2. 5-Metiltetrahidrofolat Glu5 | 9. 5-Formiltetrahidrofolat Glu6 |
| 3. Paraaminobenzoilglutamat | 10. 5-Formiltetrahidrofolat Glu5 |
| 4. 5-Metiltetrahidrofolat Glu4 | 11. 5-Formiltetrahidrofolat Glu4 |
| 5. Tetrahidrofolat | 12. 5-Formiltetrahidrofolat Glu3 |
| 6. 5-Metiltetrahidrofolat Glu3 | 13. 5-Formiltetrahidrofolat Glu2 |
| 7. 5-Metiltetrahidrofolat Glu2 | 14. 5-Formiltetrahidrofolat Glu1 |

“Eritrosit İçi Total Folik Asit Konsantrasyonu” ölçümünden elde edilen sonuçlar, kromatogramda(Şekil 3.1) elde edilen folat alt gruplarına ait piklerin yüzdesi ile çarpıldı. Böylece her bir folat türevinin konsantrasyonu, ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak folat alt gruplarını hasta-kontrol grupları arasında kıyaslarken konsantrasyon yerine yüzde oranları kullanıldı. Çünkü eritrosit içi total folik asit düzeylerindeki değişimler ile folat alt gruplarının kendi içinde oransal değişimlerini ayrı ayrı karşılaştırarak değerlendirmek istedik.

3.2.7. İstatistiksel Yöntemler

Tüm istatistiki işlemler SPSS Windows(Versiyon 20.0) programı ile yapıldı. 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. Normal dağılıma uymayan ve nonparametrik özellikleri taşıyan verilerin incelenmesi için Mann Whitney-U testi kullanıldı. Benzer olarak veriler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde ise parametrik özellikleri taşıyan veriler için Pearson ilişki katsayısı, karşılamayan veriler için ise Spearman ilişki katsayısı kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 3.1. Folik asit alt gruplarına ait kromatogram örneği

BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen 78 kişilik astım hasta grubumuzun %80 i erkeklerden oluşmakta ve yaş ortalaması $25 \pm 3,15$ idi. Kontrol grubumuz da benzer yaş ve cinsiyet dağılımındaki, test parametrelerini bozucu ilaç, gıda takviyesi, vitamin ve/veya bitkisel ürün kullanmayan sağlıklı bireylerden seçildi.

Serum folat düzeyleri yönünden hasta ve kontrol grubumuz ortalamaları arasında anlamlı fark bulunmadı($p=0,186$), (Tablo 4.1).

Yine her iki grup arasında serum B12 vit. düzeylerinin ortalamaları kıyaslandığında da anlamlı farklılık görülmedi($p=0,135$), (Tablo 4.1).

Ancak hasta ve kontrol grubumuzda plazma homosistein düzeyleri ortalamaları(ortalama $\pm$ standart sapma; $11,4 \pm 3,3$; $9,3 \pm 1,6$), laboratuvarımızda kabul gören referans aralık değerleri içindeyse de($6-12 \mu\text{mol/L}$), hasta grubunun ortalaması istatistiksel anlamlılık açısından önemli düzeyde daha yüksek bulundu($p=0,002$), (Tablo 4.1).

İdrar MMA düzeyleri açısından her iki grubun ortalamaları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi($p=0,67$), (Tablo 4.1).

Eritrosit içi total folat konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, hasta grubunda($128,1 \pm 74,8$), kontrol grubuna($159,2 \pm 45,9$) göre istatistiksel anlamlılık düzeyinde düşüklük saptandı($p=0,037$), (Tablo 4.1).

Serum folat ile B12 vit. konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, hasta grubunda($p=0,03$) istatistiksel anlamlılık düzeyinde saptanan korelasyon, kontrol grubunda($p=0,093$) saptanmadı(Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol gruplarına ait serum folat, serum B12 vitamini, plazma homosistein, idrar MMA, ve eritrosit içi total folatı(RBC folat) konsantrasyonlarının ortalamaları, standart sapma ve p değerleri(aradaki farkların önemliliği testi)

	HASTAKONTROL	N	Mean	Std. Deviation	p degeri
SERUMFOLAT	KONTROL	35	6,2343	2,08495	0,186
	HASTA	78	5,4936	2,98169	
SERUMVITB12	KONTROL	35	289,5143	84,89002	0,135
	HASTA	77	318,4286	114,58178	
HOMOSISTEIN	KONTROL	32	9,3656	1,64716	0,002**
	HASTA	76	11,3813	3,33284	
IDRARMMA	KONTROL	24	4,0908	1,47765	0,669
	HASTA	66	3,7814	3,41212	
RBCFOLAT	KONTROL	30	159,1667	45,89349	0,037*

Serum folat ile plazma homosistein konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, yine hasta grubunda(p=0,001) istatistiksel anlamlılık düzeyinde saptanan korelasyon, kontrol grubunda(p=0,681) saptanmadı(Tablo 4.2).

B12 vit. ile plazma homosistein konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında ise, hasta grubunda(p=0,032) istatistiksel anlamlılık düzeyinde saptanan korelasyon, kontrol grubunda(p=0,123) saptanmadı(Tablo 4.2).

B12 vit. ile eritrosit içi total folat konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, yine hasta grubunda(p=0,003) istatistiksel anlamlılık düzeyinde saptanan korelasyon, kontrol grubunda(p=0,386) saptanmadı(Tablo 4.2).

Plazma homosistein ile eritrosit içi folat konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında ise, hasta grubunda(p=0,067) istatistiksel anlamlılığa yakın düzeyde saptanan korelasyon, kontrol grubunda(p=0,472) saptanmadı(Tablo 4.2)

Tablo 4.2. Ana Tek Karbon Parametre Düzeylerinin Grup İçi Kıyaslamalarının, Gruplar Arasında(Hasta ve Kontrol) Farklılık Gösterenleri

	Hasta Grubu		Kontrol Grubu	
	r	P	r	P
Serum Folat-B12 vitamini	0,248	0,03	0,288	0,093
Serum Folat- Plazma Hcy	-0,372	0,001	-0,076	0,681
B12 vitamini- Plazma Hcy	-0,248	0,032	-0,278	0,123
B12 vitamini-RBCFolat	0,343	0,003	0,164	0,386
Hcy-RBCFolat	-0,217	0,067	0,145	0,472

Serum folat ile serum treonin konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, hasta grubunda istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptandı($p=0,011$),(Tablo 4.3).

Serum folat ile serum asparagin konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında ise, hasta grubunda istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptandı($p=0,018$),(Tablo 4.3).

Serum B12 vit. ile serum treonin konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, hasta grubunda istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptandı($p=0,012$),(Tablo 4.3).

Plazma homosistein ile serum treonin konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, hasta grubunda istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptandı($p=0,037$),(Tablo 4.3).

Plazma homosistein ile serum asparagin konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, hasta grubunda istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptandı($p=0,028$),(Tablo 4.3).

İdrar MMA ile serum alanin konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, hasta grubunda istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptandı($p=0,026$),(Tablo 4.3).

Eritrosit içi total folat ile treonin konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, hasta grubunda istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptandı($p=0,006$),(Tablo 4.3).

Eritrosit içi total folat ile serin konsantrasyonlarının ortalamaları kıyaslandığında, hasta grubunda istatistiksel anlamlılık düzeyinde korelasyon saptandı($p=0,039$),(Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hasta Grubunda, Ana Tek Karbon Parametre Düzeyleri ile Aminoasit Düzeylerinin Karşılaştırması Sonucu Anlamlı İlişki Tespit Edilenler

	Hasta Grubu	
	r	P
Folat-Treonin	-0,286	0,011
Folat-Asparagin	-0,268	0,018
B12 vitamini-Treonin	-0,285	0,012
Hcy-Treonin	0,239	0,037
Hcy-Asparagin	0,251	0,028
Hcy-Hidroksiprolin	0,215	0,062
Hcy-Lizin	-0,216	0,061
iMMA-Alanin	-0,274	0,026
RBCFolat -Treonin	-0,317	0,006
RBCFolat -Serin	-0,241	0,039

Hasta grubunda, eritrosit içi folat alt gruplarının korelasyon analizinde; N^5 -M-THF-Glu6 ile eritrosit içi total folat($p=0,049$), N^5 -F-THF-Glu3($p=0,019$) ve N^5 -M-THF-Glu1($p=0,033$) arasında pozitif ilişki saptandı(Tablo 4.4).

N^5 -M-THF-Glu5 ile; serum B12 vit.($p=0,018$), N^5 -F-THF-Glu1($p=0,003$), N^5 -F-THF-Glu3($p=0,003$), N^5 -M-THF-Glu2($p=0,000$), N^5 -M-THF-Glu3($p=0,000$), THF($p=0,035$) ve pABG($p=0,000$) arasında ilişki saptandı(Tablo 4.4).

pABG ile iMMA($p=0,000$), eritrosit içi total folat($p=0,093$), N^5 -F-THF-Glu1($p=0,0012$), N^5 -M-THF-Glu2($p=0,000$), N^5 -M-THF-Glu3($p=0,000$),

THF(p=0,042) ve N⁵-M-THF-Glu4(p=0,047) arasında pozitif ilişki saptandı(Tablo 4.4).

N⁵-M-THF-Glu4 ile; iMMA(p=0,009), eritrosit içi total folat(p=0,004), N⁵-F-THF-Glu3(p=0,022), N⁵-M-THF-Glu2(p=0,000), N⁵-M-THF-Glu3(p=0,000), THF(p=0,042) ve N⁵-M-THF-Glu4(p=0,047) arasında pozitif ilişki saptandı(Tablo 4.4).

THF; serum folat, serum B12 vitamini, iMMA, RBCfolat, N⁵-F-THF-Glu1, N⁵-F-THF-Glu2, N⁵-F-THF-Glu3, N⁵-F-THF-Glu4, N⁵-F-THF-Glu5, N⁵-F-THF-Glu6, N⁵-M-THF-Glu1, N⁵-M-THF-Glu2, N⁵-M-THF-Glu3, N⁵-M-THF-Glu4, N⁵-M-THF-Glu5, pABG ile istatistiksel anlamlılıkta pozitif ilişki içinde saptandı.

N⁵-M-THF-Glu3 yukarıda bahsedilenlerin dışında; serum B12 vitamini, RBC folat, N⁵-F-THF-Glu1, N⁵-M-THF-Glu2 ile pozitif ilişki içinde saptandı.

N⁵-M-THF-Glu2, yukarıda bahsedilenlerin dışında, serum folat, serum B12 vitamini, RBCfolat, N⁵-F-THF-Glu1 ile pozitif ilişki içinde saptandı.

N⁵-M-THF-Glu1, yukarıda bahsedilenlerin dışında, serum folat, serum B12 vit. İle pozitif ilişki içinde saptandı(Tablo 4.4).

Tablo 4.4 Hasta Grubunda Eritrosit İçi Folat Alt Gruplarının Kendi İçlerinde ve Ana Tek Karbon Parametreleri ile Karşılaştırılması Sonucu Anlamlı İlişki Tespit Edilenler

HASTA	SFOLAT	S.VİTB12	H.SİSTENİ	MMA	EIFOLAT	F1	F2	F3	F4	F5	F6	M1	M2	M3	THF	M4	PABG	M5	
M6	Pearson Correlation	0,232	0,179	-0,244	0,053	283*	0,02	0,259	326*	0,226	0,174	0,164	299*	-0,011	0,043	0,21	0,206	0,114	-0,176
	Sig. (2-tailed)	0,102	0,213	0,091	0,75	0,049	0,89	0,067	0,019	0,11	0,222	0,25	0,033	0,94	0,763	0,139	0,147	0,427	0,217
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
M5	Pearson Correlation	0,134	0,332*	-0,178	0,04	0,16	404**	-0,357*	-0,408**	-0,187	-0,08	-0,075	-0,185	705**	0	0	0,006	608**	
	Sig. (2-tailed)	0,348	0,018	0,222	0,808	0,271	0,003	0,01	0,003	0,188	0,579	0,6	0,193	0	0	0,035	0,965	0	
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
PABG	Pearson Correlation	0,132	0,19	-0,207	0,545**	0,242	0,349*	-0,161	-0,167	-0,019	-0,015	-0,076	-0,056	582**	493**	285*	280*		
	Sig. (2-tailed)	0,357	0,186	0,154	0	0,093	0,012	0,26	0,242	0,897	0,919	0,597	0,697	0	0	0,042	0,047		
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
M4	Pearson Correlation	0,156	0,146	-0,236	0,415**	0,407**	0,237	0,161	0,321*	0,181	0,231	0,284*	0,16	0,254	0,266	0,510**			
	Sig. (2-tailed)	0,273	0,313	0,103	0,009	0,004	0,094	0,258	0,022	0,203	0,102	0,043	0,262	0,072	0,06	0			
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
THF	Pearson Correlation	0,745**	0,331*	-0,207	0,504**	0,858**	0,447**	0,362**	0,461**	0,583**	0,762**	0,524**	0,466**	435**					
	Sig. (2-tailed)	0	0,019	0,153	0,001	0	0,001	0,009	0,001	0	0	0	0	0,001	0,001				
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
M3	Pearson Correlation	0,123	0,355*	-0,26	0,113	0,339*	0,416**	-0,104	-0,091	0,028	0,055	0,006	0,014	0,794**					
	Sig. (2-tailed)	0,391	0,011	0,071	0,493	0,017	0,002	0,468	0,526	0,846	0,704	0,964	0,924	0					
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
M2	Pearson Correlation	0,282*	0,426**	-0,302*	0,118	0,429**	0,492**	-0,097	0	0,089	0,092	0,047	-0,035						
	Sig. (2-tailed)	0,045	0,002	0,035	0,476	0,002	0	0,498	0,998	0,536	0,521	0,742	0,808						
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
M1	Pearson Correlation	0,645**	0,251	-0,076	0,025	0,712**	0,398**	0,555**	0,627**	0,735**	0,729**	0,707**							
	Sig. (2-tailed)	0	0,079	0,603	0,879	0	0,004	0	0	0	0	0	0						
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
F6	Pearson Correlation	0,817**	0,148	-0,115	0,197	0,847**	0,296*	0,621**	0,693**	0,814**	0,922**								
	Sig. (2-tailed)	0	0,305	0,433	0,23	0	0,035	0	0	0	0	0							
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
F5	Pearson Correlation	0,864**	0,226	-0,147	0,241	0,906**	0,281*	0,719**	0,767**	0,929**									
	Sig. (2-tailed)	0	0,114	0,315	0,14	0	0,046	0	0	0	0								
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
F4	Pearson Correlation	0,792**	0,233	-0,209	0,205	0,875**	0,275	0,838**	0,896**										
	Sig. (2-tailed)	0	0,104	0,15	0,212	0	0,051	0	0										
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
F3	Pearson Correlation	0,610**	0,16	-0,238	0,169	0,747**	0,164	0,906**											
	Sig. (2-tailed)	0	0,266	0,099	0,304	0	0,252	0											
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
F2	Pearson Correlation	0,539**	0,175	-0,114	0,247	0,644**	0,063												
	Sig. (2-tailed)	0	0,224	0,436	0,13	0	0,663												
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
F1	Pearson Correlation	0,402**	0,390**	-0,165	-0,042	0,578**													
	Sig. (2-tailed)	0,003	0,005	0,257	0,798	0													
	N	51	50	49	39	49	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51

Hasta ve kontrol grupları amino asitlerinin kendi içlerindeki kıyaslamaların iki grup arasında karşılaştırılmasıyla elde edilen korelasyon analizinde istatistiksel anlam ifade edenleri tablo şeklinde topluca ifade edilmiştir(Tablo 4.5).

Ayrıca amino asitlerin teker teker ele alındığı takdirde hasta ve kontrol grupları arasındaki kıyaslamaları ise Tablo 4.6'da gösterilmiş olup tartışma bölümünde detaylıca ele alınmıştır.

Tablo 4.5. Aminoasit Düzeylerinin Grup İçi Kıyaslamalarının, Gruplar Arasında(Hasta ve Kontrol) Farklılık Gösterenleri

	Hasta Grubu		Kontrol Grubu	
	r	P	r	P
Alanin -Glisin	0,223	0,05	0,06	0,691
Alanin -Valin	0,165	0,148	0,487	0,001
Alanin -Lösin	0,028	0,807	0,335	0,023
Alanin -İzolösin	0,182	0,111	0,613	0
Alanin -Treonin	0,314	0,005	0,007	0,963
Alanin -Serin	0,281	0,013	-0,074	0,624
Alanin -Hidroksiprolin	0,117	0,307	0,294	0,047
Alanin -glutamat	0,114	0,318	0,455	0,002
Alanin -Glutamin	0,165	0,149	0,387	0,008
Alanin -Lizin	0,237	0,037	0,145	0,335
Alanin -Hidroksilizin	0,165	0,148	0,510	0,005
Alanin -Tirozin	0,114	0,322	0,423	0,003
Alanin -Tryptofan	-0,068	0,553	0,444	0,002
Glisin -Treonin	0,322	0,004	0,296	0,046
Glisin -Hidroksiprolin	0,274	0,015	-0,06	0,693
Valin –Prolin	0,183	0,108	0,621	0
Valin -Asparagin	0,333	0,003	0,264	0,077
Valin -Metyonin	0,196	0,085	0,577	0
Valin -Histidin	0,198	0,082	0,402	0,006
Valin -Hidroksilizin	0,024	0,833	0,521	0,004

Valin -Tryptofan	0,203	0,075	0,324	0,028
Lösin -Prolin	0,115	0,314	0,629	0
Lösin -Asparagin	0,048	0,678	0,298	0,044
Lösin -Metyonin	0,066	0,567	0,620	0
Lösin -glutamat	-0,319	0,004	0,272	0,067
Lösin -Fenilalanin	-0,209	0,066	0,537	0
Lösin -Glutamin	0,066	0,568	0,315	0,033
Lösin -Ornitin	0,048	0,677	0,538	0
Lösin -Lizin	0,037	0,748	0,616	0
Lösin -Histidin	0,212	0,062	0,508	0
Lösin -Hidroksilizin	0,031	0,789	0,467	0,011
Alloizolösin -İzolösin	0,054	0,636	0,376	0,01
Alloizolösin -Prolin	-0,02	0,859	0,399	0,006
Alloizolösin -Hidroksiprolin	-0,09	0,432	0,369	0,012
Alloizolösin -Fenilalanin	0,022	0,847	-0,350	0,017
İzolösin -Prolin	0,144	0,209	0,699	0
İzolösin -Metyonin	0,11	0,337	0,625	0
İzolösin -glutamat	0,236	0,038	0,077	0,612
İzolösin -Fenilalanin	0,319	0,004	0,027	0,857
İzolösin -Ornitin	0,329	0,003	0,163	0,279
İzolösin -Hidroksilizin	-0,056	0,624	0,454	0,013
İzolösin -Tryptofan	0,329	0,003	0,173	0,251
İzolösin -Sistin	0,235	0,038	0,1	0,508
Treonin -Prolin	0,311	0,006	0,184	0,22
Treonin -Asparagin	0,697	0	0,156	0,301
Treonin -Hidroksiprolin	0,522	0	0,162	0,283
Treonin -Ornitin	0,064	0,577	0,323	0,028
Treonin -Histidin	0,356	0,001	0,246	0,1
Serin -Aspartat	0,102	0,377	-0,302	0,041
Serin -Metyonin	0,259	0,022	0,228	0,128
Serin -Hidroksiprolin	0,444	0	0,177	0,238
Serin -Fenilalanin	-0,01	0,933	0,481	0,001
Serin -Ornitin	-0,014	0,903	0,514	0
Serin -Hidroksilizin	-0,098	0,392	0,439	0,017
Prolin -Hidroksiprolin	0,181	0,112	0,453	0,002

Prolin -Glutamin	0,131	0,253	0,516	0
Prolin -Lizin	0,014	0,902	0,297	0,045
Prolin -Histidin	0,362	0,001	0,265	0,075
Prolin -Hidroksilizin	0,021	0,854	0,513	0,004
Asparagin -Fenilalanin	0,449	0	0,233	0,119
Asparagin -Histidin	0,314	0,005	0,272	0,067
Asparagin -Hidroksilizin	-0,015	0,899	0,648	0
Asparagin -Tirozin	0,144	0,209	0,312	0,035
Asparagin -Tryptofan	-0,03	0,793	0,349	0,018
Aspartat -Metyonin	0,318	0,005	-0,008	0,96
Aspartat -Glutamin	0,139	0,223	-0,321	0,029
Metyonin -Ornitin	0,298	0,008	0,201	0,18
Metyonin -Tirozin	0,269	0,017	0,183	0,223
Hidroksiprolin -glutamat	0,459	0	0,015	0,922
Hidroksiprolin -Fenilalanin	0,420	0	-0,13	0,39
Hidroksiprolin -Hidroksilizin	-0,048	0,674	0,603	0,001
Hidroksiprolin -Tirozin	0,288	0,01	-0,116	0,444
glutamat -Hidroksilizin	0,026	0,819	0,394	0,035
Fenilalanin -Lizin	0,178	0,12	0,647	0
Fenilalanin -Histidin	0,114	0,321	0,484	0,001
Fenilalanin -Hidroksilizin	-0,054	0,642	0,489	0,007
Ornitin -Tirozin	0,321	0,004	0,022	0,884
Ornitin -Tryptofan	0,338	0,002	-0,045	0,769
Lizin -Hidroksilizin	0,091	0,428	0,455	0,013
Lizin -Tirozin	0,364	0,001	0,06	0,692
Lizin -Tryptofan	0,272	0,016	0,036	0,813
Histidin -Hidroksilizin	-0,145	0,205	0,725	0
Histidin -Tirozin	0,305	0,007	0,063	0,678
Histidin -Tryptofan	0,332	0,003	0,061	0,686
Hidroksilizin -Tirozin	0,081	0,482	0,394	0,034

Tablo 4.6. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Ana Tek Karbon Parametreleri ve Amino Asit Konsantrasyonlarının Karşılaştırması

	HASTAKONTROL	N	Mean	Std. Deviation	p degeri
SERUMFOLAT	KONTROL	35	6,2343	2,08495	0,186
	HASTA	78	5,4936	2,98169	
SERUMVITB12	KONTROL	35	289,5143	84,89002	0,135
	HASTA	77	318,4286	114,58178	
HOMOSISTEIN	KONTROL	32	9,3656	1,64716	0,002**
	HASTA	76	11,3813	3,33284	
IDRARMMA	KONTROL	24	4,0908	1,47765	0,669
	HASTA	66	3,7814	3,41212	
RBCFOLAT	KONTROL	30	159,1667	45,89349	0,037*
	HASTA	74	128,0811	74,82157	
ALANIN	KONTROL	35	394,5657	55,54369	0,715
	HASTA	78	400,8679	94,47733	
GLISIN	KONTROL	46	271,6261	53,27701	0,871
	HASTA	78	273,5205	67,20513	
VALIN	KONTROL	46	243,663	46,79014	0,031*
	HASTA	78	262,2462	45,24374	
LOSIN	KONTROL	35	151,0857	18,14047	0,000**
	HASTA	78	118,8244	30,58894	
ALLOIZOLOSIN	KONTROL	35	0,5568	0,636	0,500
	HASTA	78	1,9026	11,72281	
IZOLOSIN	KONTROL	46	74,1478	17,02945	0,031*
	HASTA	78	67,9051	14,32461	
TREONIN	KONTROL	35	121,7971	25,59713	0,771
	HASTA	78	123,7346	35,35179	
SERIN	KONTROL	46	132,7743	31,870001	0,019*
	HASTA	78	118,5128	32,58674	
PROLIN	KONTROL	46	217,8239	69,48347	0,002*
	HASTA	78	293,7167	154,0541	
ASPARAGIN	KONTROL	46	62,3826	14,75867	0,000*
	HASTA	82	46,4366	19,95521	
ASPARTIKASIT	KONTROL	46	38,28	51,43666	0,126
	HASTA	82	27,3902	11,53128	
METIYONIN	KONTROL	35	26,0743	4,4927	0,012*
	HASTA	78	23,6897	4,66375	
OHPROLIN	KONTROL	35	3,5143	2,72009	0,011*
	HASTA	78	7,4773	8,81325	
GLUTAMIKASIT	KONTROL	46	100,8606	51,72802	0,103
	HASTA	78	80,7385	72,78271	
FENILALANIN	KONTROL	46	62,5761	13,80023	0,045*
	HASTA	78	68,7526	17,71234	
GLUTAMIN	KONTROL	46	691,0304	162,99458	0,023*
	HASTA	78	615,5359	184,22533	
ORNITIN	KONTROL	35	119,0571	27,34455	0,000**
	HASTA	78	66,9359	19,55327	
LIZIN	KONTROL	46	178,0435	43,43433	0,011*
	HASTA	78	158,3846	39,03861	
HISTIDIN	KONTROL	35	70,6587	14,25832	0,024*
	HASTA	78	89,9974	23,7044	
OHLIZIN	KONTROL	29	6,8671	11,40066	0,000*
	HASTA	78	0,8452	3,76072	
TIROZIN	KONTROL	35	66,8114	10,788	0,097
	HASTA	78	73,1949	21,32745	
TRIPTOFAN	KONTROL	35	51,7086	14,05452	0,002**
	HASTA	78	62,0692	17,27295	
SISTATYONIN	KONTROL	46	1,2731	2,95	0,03*
	HASTA	50	0,2545	0,49206	
SISTIN	KONTROL	46	8,7003	6,37861	0,000**
	HASTA	78	35,2115	14,2751	

TARTIŞMA

Çalışmamızda astım hastalığında folat aktive tek karbon metabolizmasındaki değişiklikler incelendi. Bu incelememiz, tek karbon kaynağı olan aminoasitler ve tek karbonları taşıyan folat kofaktörünün ve ilişkili moleküllerin ölçümlenmesi şeklinde gerçekleşti. Erken veya geç reaksiyonlar ile karakterize olan astım, havayolları aşırı duyarlılığı, havayolu alerjik ve/veya non-alerjik enflamasyonu ve havayolu yeniden yapımını içermektedir(8). Astım, folat aktive tek karbon metabolizmasının doğrudan işe karıştığı kronik enflamatuvar bir hastalıktır(31).

Hücre içerisinde aktif folatların katabolizmasının regülasyonu oldukça karmaşıktır. Folat katabolizması arttığında, sistemik veya lokal hücre içi folat yetersizliğine ait sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle metil kaynağı olan aminoasitlerin metabolizması da büyük önem kazanmaktadır. Ayrıca arjininden nitrik oksit sentaz enzimiyle NO üretimi için gerekli olan THB sentezinde, öncelikle, formil-tetrahidrofolatın kullanıldığı guanozin sentezine ihtiyaç bulunmaktadır(32). Astım hastalığı da hem doğrudan hem de nitrik oksit sentezi ile ilişkili olarak tek karbon metabolizmasıyla yakından ilişkili olması beklenir(33). Bu nedenlerle astım hastalığında metilasyon düzeyini etkileyen aminoasit veya folat-metiyonin döngülerinin durumunu bilmekte büyük yarar bulunmaktadır. Bu bağlamda, çalışmamız astım hastalığında tek karbon metabolizmasının önemli düzeyde değişiklik gösterebileceği hipotezi üzerine kurgulanmıştır.

Çalışmamızda hasta grubu ile kontrol grubu arasında plazma homosistein düzeyleri açısından önemli fark saptandı. Hasta grubu plazma homosistein düzeyleri ortalaması kontrol grubu ortalaması düzeylerinden daha yüksek bulundu($p=0,002$). Yine hasta grubunda eritrosit içi total folat düzeyi ortalaması, kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşüktü($p=0,037$). Buna göre, hücre içerisinde çoğunluğu N^5 -M-THF olan eritrosit içi folat miktarı azalmıştır, ve metiyonin döngüsünde de homosistein düzeyinde yükselme görülmüştür. Bununla orantılı olarak da serum metiyonin düzeyleri hasta grubunda önemli düzeyde düşük saptanmıştır($p=0,012$). Buna göre

homosisteinden metiyonin sentez hızında bir azalma olduğu, bu azalmanın ya metil-THF düzeyinden kaynaklanabileceği, ya da metiyonin döngüsünün yavaşlamış olabileceği, veya metil transfer reaksiyonlarında bir aksama nedeniyle bu tablonun ortaya çıkabileceği düşünülebilir(23). Bu metabolizmanın temel elemanları serum folat, serum B12 vit. ve idrar metilmalonik asit düzeyleri hasta-kontrol grubunda birbirinden farklı bulunmamıştır.

Tek karbon kaynağı olan aminoasitlerden en önemlilerinden biri serindir(29). Hasta grubumuzdaki serin amino asiti düzeylerinin ortalaması, kontrol grubumuzdakine göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur($p=0,019$). Serin ve glisin dönüşümü serinin üçüncü karbonunun aktif folat üzerine aktarımı tek karbonların en önemli kaynağıdır. Serindeki azalmanın, metil kapasitesinde önemli bir yetmezliğe yolaçacağını düşünebiliriz(34). Glisin aminoasidi düzeyleri ise hasta ve kontrol grubumuzun ortalamaları arasında farklı bulunmamıştır. Serine ayrıca homosisteinden sistatyonin sentezi ve buradan da glutatyon sentez yolağında da ihtiyaç duyulması sebebiyle, düşük serin seviyelerine bu yolaktaki tüketimin neden olmadığı, ve fakat SAM/SAH dönüşümündeki tüketimin belirleyici neden olduğu düşünülmektedir(35). Dolayısıyla hasta grubunda saptanan yükselmiş homosistein düzeylerine bakarak, teorik olarak artmış SAH düzeylerinin eşlik etmiş olabileceğini tahmin etmek beklenen bir sonuçtur.

Ayrıca hasta grubumuzda fenilalanin düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla yükseklik saptandı($p=0,045$). Tirozin düzeylerinde ise bir farklılık görülmedi. Bu sonuç ise fenilalaninden tirozine dönüşümde bir aksamanın olduğu işaret etmektedir. İstatistik anlamlılık seviyesinde olmasa da tirozinin hasta grubunda saptanan yüksekliğin($p=0,097$) sebebi de tirozin hidroksilaz ile fenilalanin hidroksilaz enzimlerinin kofaktörlerinin aynı olmasına bağlanmalıdır. Bu kofaktör de bilindiği üzere tetrahidrobiopterindir(THB). Bu enzimlerdeki aksaklığın enzimin genetik yetersizliğinden ziyade kofaktör yetersizliğinden kaynaklanmış olması daha akla yatkındır(36). Çünkü tek bir enzimde defekt olsaydı, ilgili reaksiyondaki substrat artarken ürünün azalması beklenirdi. Fakat burada fenialanin artarken tirozin azalmak yerine artışa meylettiği görüldüğünden dolayı bu enzimlerdeki aksaklığın, THB

sentezindeki bir azalmanın sonucu olabileceği; bunun kaynağının da bir pürin olan guanozin sentezindeki aksamaya bağlı olabileceği şeklindeki ilişkilendirme isabetli olacaktır(32). Burada sorun tirozin hidroksilaz enzim defekti olsaydı, o zaman da tirozin düzeylerinin fenilalaninden daha yüksek olması beklenecekti. Dolayısı ile aktif folatların rol aldığı guanozin sentezindeki aksaklığın, THB sentezini bozması, bunun da fenilalanin, tirozin ve dopa dönüşüm yolağını etkilemesiyle, ortaya çıkması kaçınılmaz olan nörotransmitter aksaklıklarının, astım hastalığı ile stres ve emosyonel durumların ilişkisinin aydınlatılmasında yeni bir pencere de aralanmaktadır. Ayrıca aynı yolağın sürrenal dokuda adrenalin sentezini de bozarak bronkodilatasyon defekti yaratacağı da aşıkardır.

Tetrahirobioplerin kofaktörü olan diğer bir hidroksilaz enzimi de triptofan hidroksilazdır. Hasta grubumuzda triptofan düzeyleri de çok önemli düzeyde yüksek bulundu($p=0,002$). Bu verilerle, tetrahirobioplerin eksikliğinin her üç hidroksilaz üzerinde de aynı oranda etkili olduğunu tespit etmiş olduk. Triptofandan sentezlenen serotonin nörotransmitterinin de bu eksiklikten etkileneceğini söyleyebiliriz. Astım ile duygudurum etkileşimini, klinisyen deneyimlerini temellendirebilecek yeni bir bakışla, temelde ortak biyokimyasal nedenlere bağlı ortaya çıkan iki eşzamanlı semptomlar bütünü şeklinde niteleyebiliriz. Dolayısı ile, astım hastalarının nörotransmitter metabolit düzeylerinin izlenmesinin de, hastalığın seyriyle ilgili ipuçları verebileceği sonucuna ulaştık. Bu bulgularımız ileri araştırmalara ışık tutacaktır.

Hasta grubumuzda prolin aminoasiti düzeyinin kontrol grubumuza göre çok önemli düzeyde arttığını tespit ettik($p=0,002$). Prolin düzeylerinin kollajen sentezinin devamlılığı veya regülasyonunda önemli rol aldığı bilinmektedir. Hasta grubumuzda prolin düzeyinin yüksek olması; prolin metabolizmasıyla ortak bir yolağa sahip olan glutamat, ornitin, histidin ve glutamin aminoasitleriyle birlikte ele alınmasını gerekli kılmaktadır. Ornitin aminoasiti düzeylerinin hasta grubumuzdaki ortalaması, kontrol grubumuza göre çok önemli düzeyde azalmış bulundu($p=0,000$). Glutamin amino asiti ise hasta grubumuzdaki ortalaması itibariyle kontrol grubumuza nazaran önemli düzeyde azalmış olarak saptandı($p=0,023$). Glutamin, prolin, ornitin,

arjinin ve histidin aminositleri ortak metabolik yolak üzerinden glutamata ve oradan da alfa-ketoglutarata metabolize olurlar. Glutamatın da bir nörotransmitter olduğu düşünülürse, glutamat kaynağı olan glutamin ve ornitin düzeylerinin hasta grubunda azaldığını, prolin sentezinin ise arttığını görmekteyiz. Bu tablo, astım hastalığında kollajen sentezinin önemli değişime uğradığını gösterirken, ornitin ve glutamat aracılığıyla hücrenin enerji metabolizmasında önemli değişim yarattığını da göstermektedir.

Alanin amino asiti düzeylerinin ortalaması, hasta ve kontrol grupları arasında farklı bulunmamıştır. Enerji metabolizmasında aksamaya ait bir kanıt, alanin üzerinden elde edilmemiştir. Zira alanin-pirüvat ilişkisi bağlamında, alanin bir hücre içi enerji göstergesi kabul edilmektedir.

Histidin katabolizması, formiminoglutamat üzerinden çok önemli tek karbon kaynağıdır. Diğer ifadeyle histidin amino asiti ve pürinlerin yıkımı tek karbonların üretiminde önemli bir kaynaktır. Zira histidin kataboliti olan formiminoglutamat, N⁵-formimino-tetrahidrofolat molekülünün öncülüdür. Bu molekül de müteakiben siklodeaminaz enzimiyle ara metabolit olan N⁵,N¹⁰-metenil-tetrahidrofolata dönüşerek siklohidrolaz enzimlerine substrat oluşturur. Nihayetinde de, en okside aktif tek karbon taşıyıcısı olan formil-tetrahidrofolatları oluşturur. O yüzden formiminoglutamat sentetaz eksikliğinde hücre içi aktif folat üretimi azalırken(37), histidin düzeyi yüksek kalır(38). Hasta grubumuzda histidin düzeyleri önemli oranda yüksek bulunmuştur(p=0,024). Astım hastalığında histidin katabolizmasının ve dolayısıyla tek karbon üretiminin aksadığını gösteren bu bulgu, hem formimino-tetrahidrofolat üzerinden aktif tek karbonların oluşumunda yetersizlik olduğuna dair, hem de biriken histidinin başka yollara yönlenebileceğine dair kanıt olabilir. Bu yollardan hasta grubumuzu ilgilendirebilecek olan en önemlisi histamin oluşumudur(39). Zira histamin astımlı hastalardaki hem bronkokonstriksiyon hem de vazodilatasyona bağlı sekresyon etkilerinden sorumlu ana mediyatörlerden biridir(23). Ayrıca histaminin nörotransmitter de olma özellikleriyle, astımda ne denli karmaşık ve güçlü etkilere sahip molekül olduğu aşıkardır.

Hasta grubumuzda hidroksiprolin aminoasit ortalaması da kontrol grubumuza kıyasla çok önemli düzeyde yükselmiş olarak saptandı($p=0,011$). Hasta grubumuzdaki prolin aminoasidinin yüksekliğiyle hidroksiprolin yüksekliği yakından ilişkili sonuçlar oldu. Bu bulgu, kronik enflamatuvar hastalıkta, kollajen sentezinin regülasyonunun değiştiğinin göstergelerinden biri olarak kabul edildi.

Çalışmamızda, eritrosit içi aktif folat alt grupları ölçüldü. Total metil ve total formillerin, total tetrahidrofolat içerisindeki yüzde miktarları da belirlendi. Hasta grubumuzda total metil tetrahidrofolat düzeylerinin çok önemli düzeyde azaldığı tespit edildi($p=0,000$). Total formil tetrahidrofolat düzeyleri ortalamasının ise, hasta grubumuzda kontrol grubumuza oranla, total metil-THF düzeyleriyle orantılı olarak yükseldiği saptandı($p=0,000$). Metil ve formil THF düzeylerindeki bu anlamlı değişim total metil-THF/total formil-THF oranıyla da çok belirgin şekilde ortaya çıktı. Hasta grubunda 0,54 olan oran, kontrol grubunda 0,93 olarak saptandı($p=0,000$). Bu sonuçlardan, astım hastalığında metilasyon kapasitesinin önemli oranda bozulabileceğinin kanıtları elde edilmiş oldu.

Çalışmamızda kronik enflamatuvar hastalık olan astımda folat katabolizmasının düzeyini özellikle merak ediyorduk. Yaptığımız folat alt grupları çalışmasında pABG(para-amino benzoil glutamat) düzeyinin çok önemli oranda azaldığını belirledik($p=0,001$). Folat alt grupları içerisinde belirlediğimiz bir diğer önemli metabolit yalın THF tır. THF, aktif folat sentezi için ana kaynaktır. THF düzeyinde hasta ve kontrol grubu arasında istatistik açıdan anlamlı bir fark gözlenmemekle birlikte hasta grubunda hafif bir artış bulunmaktaydı($p=0,067$). Bu sonuç, yalın THF üretiminin yeterli düzeyde olduğu, ancak metil-THF ve formil-THF dağılımında aksamanın bulunduğunu göstermiş oldu.

Demir bağlı ferritin, folat katabolizmasını hızlandırıcı etkiye sahiptir. Bu durum aktif folatların poliglutaminasyonu da bağlantılıdır. Mono ve di-Glutamatlı folatlar katabolizmaya daha yatkındırlar. Ferritin bir anlamda enzimlere bağlanmayan az sayıda glutamat kalıntısına sahip aktif folatların

degradasyonunu sağlayarak hücrede fazla folat barınmasını engellemeye çalışmaktadır.

PABG ve asetillenmiş formu hücre içinde tutulmayıp hızla hücre dışına uzaklaştırılıyor ve idrarla atılıyor, ve idrarda ölçülmesinin sebebi de budur. Eritrosit içi folat ölçümlerinde pABG'nin, diğer alt gruplar içinde en düşük seviyede ölçülen yüzde fraksiyona sahip olması da hücre içinde birikmemesiyle açıklanabilir. Bu yüzden de referans aralığa dayalı bireysel ölçümlerde, hücre içi seviyelerinden idrardaki seviyelerinin daha güvenilir bir belirteç niteliği taşıyacağı söylenebilir. Fakat biz vaka kontrol çalışması yaptığımız için, hücre içi seviyeleri üzerinden bir kıyaslama yolunu kullanmakta mahsur görmedik.

N^{10} -formil-tetrahidrofolat dehidrogenaz enzimi ile N^{10} -formil-tetrahidrofolat; tetrahidrofolat ve CO_2 'e ayrılır. Bu enzimatik yolak ile formil tetrahidrofolatların birikmesi engellenir. Deneysel çalışmalarla oluşturulan bu enzimi genetik olarak eksik hayvanlarda karaciğerde N^{10} -formil-tetrahidrofolat düzeyinin biriktiği ve hücre içi folat düzeyinin %30 oranında azaldığı gösterilmiştir. N^{10} -F-THF ve dihidrofolat nonenzimatik spontan degradasyona en duyarlı folat formlarıdır. N^5 -F-THF ise en dayanıklı formdur. Fakat N^{10} -F-THF'in katabolizmasında enzimatik veya non-enzimatik yollardan hangisinin baskın olduğu konusunda kanıt bulunmamaktadır. N^{10} -F-THF'in hücre içi miktarı, baskın olan yolağı belirliyor görünmektedir; çünkü enzimin doygunluğunu aşan konsantrasyonlarda nonenzimatik degradasyonla fazla folat düzeyinden hücreyi koruma ön plana geçerken, düşük seviyelerde enzimatik yolakla folat düzeyini kısıktan korumak için tetrahidrofolata dönüşümü sağlayarak kurtarma yolunu tercih ediyor. Bu yüzden biz stabil olan N^5 -formil ve N^5 -metil formlarını ölçüyoruz. Folat katabolizması labil folatlar olan dihidrofolat(timidilat sentez reaksiyonunun ürünü olarak ortaya çıkar) ve N^{10} -F-THF'in yıkımı ile ve en dayanıklı folat formu olan N^5 -F-THF'in katabolizması ile sürdürülür(40).

Labil folat olan N^{10} -F-THF'in yıkımında N^{10} -F-THF dehidrogenaz(FDH) görev alır ve bu aktif folat formunu CO_2 ve yalın THFa parçalar. Böylece bu aktif folat formunun hücre içerisinde birikimi önlenmiş

olur, diğer taraftan da diğer folat kofaktörlerinin sentezi için ihtiyaç duyulan yalın THF üretilmiş olur. Bu reaksiyon hücre içi yalın THF ihtiyacının yaklaşık %30 gibi önemli bir kısmını tek başına sağlamaktadır. İkinci folat yıkım yolu ise en dayanıklı folat formu olan N⁵-F-THF'in yıkımıdır. Bu yıkımı yapan protein izole edilmiş ve bu proteinin aslında ferritin olduğu anlaşılmıştır(14). Bu yıkım sonucunda da pABG ortaya çıkmaktadır(41). pABG hücre içerisinde birikmeyen bu nedenle de çok süratle idrara çıkan bir moleküldür(42). O yüzden folat katabolizmasıyla ilgili çalışmalarda pABG idrarda ölçülmektedir. Genellikle de asetillenmiş formu idrarla atıldığı için asetaminobenzoilglutamat şeklinde ölçülmektedir. Folatın hücre dışı oksidatif degradasyonundan kaynaklanan asetillenmemiş formda pABG de idrara çıkabilmektedir(43).

Folat katabolizmasında rol alan ferritin molekülleri ağır zincir ferritin subünitleridir. Ferritinin görev yapabilmesi için molekülün bünyesinde demir bulunmasının zorunlu olduğu anlaşılmıştır. Demir şelatörleriyle demir ortamdan uzaklaştırılırsa katabolizma durmaktadır(44). Bu bilgi de folat ve demir arasındaki biyolojik ilişkinin anlaşılmasında oldukça önemli bir kilit rolü ortaya çıkarmıştır. Çünkü folat ve demir metabolizmalarındaki bozuklukların bir kesişme noktası olan anemilerin, karışık tipte bozuklukları barındırdığı çok eski yıllardan beri bilinmekte ve soru işaretleri barındırmaktaydı. Folat katabolizmasıyla ilgili bu veriler de yeni araştırmaları cesaretlendirecek farkındalık ortaya çıkarmıştır. Ferritinin hem akut faz reaktanı olmasının hem de hücre döngüsünün arttığı durumlar olan malinite, gebelik gibi durumlarda hücre içinde yükselmesinin folat katabolizmasındaki artışla birlikte olduğu anlaşılmıştır(18)

Hücre çoğalmasının olduğu durumlarda folat katabolizmasının artması, malinite veya büyüme ile ilişkili biyolojik olaylarda folat ve ferritin arasındaki ilişkinin ortaya çıkışıyla daha iyi anlaşılır hale gelmiştir. Bizim çalışmamızda astım hastalarında pABG düzeylerinin hücre içi folat alt grupları arasındaki yüzdesinin kontrol grubuna kıyasla önemli oranda azaldığı saptandı. Aslında ilk bakışta pABG düzeylerinin artması beklenirdi. Ancak bu süreçte pABG düzeyinin %3,1 den %1.7 ye inmesini yorumlarken, pABG nin hücre içindeki folat alt grupları arasında çok düşük bir oranda

bulunması nedeniyle oransal ifadesi yerine tek başına ölçümlenerek birimsel değerlerle yorumlanması ve bunun daha geniş hasta popülasyonu üzerinde teyit edilmesinin anlamlı olacağı kanısındayız. Buna rağmen, $p=0,001$ anlamlılık düzeyinde veriler elde ettiğimiz için, buradan şu anlamı çıkarmamız makul görünüyor ki, folat katabolizması hasta grubunda azalmıştır. Bu bulgu, son araştırmalar ışığında N^5 -F-THF'in yıkımının azaldığı anlamına gelmektedir(43). Hasta grubumuzda folat alt grupları içerisinde N^5 -F-THF'in artmıştır($p=0,000$). Hasta grubunda folat katabolizmasının azalması, pABG düzeyinin kontrol grubuna göre daha düşük oluşu ve toplam N^5 -F-THF düzeyinin de artması birbiriyle uyumlu sonuçlardı.

Folat katabolizmasının azalması ve N^5 -F-THF'in artmasının altında yatan biyolojik mantığın ne olduğu konusunda kesin bir sonuca varmak zor gözükmemektedir. Astımdaki hücre yapım-yıkım döngüsünün kısmen artmasına bağlı folat tüketim artışı olmaktadır. Bununla birlikte kronik enflamasyonun bulunması nedeniyle demir tüketiminin artışı olmaktadır. N^5 -F-THF katabolizması için ise ferritin ve demirin birlikte çalışma zorunluluğu vardır. Tüm bunları biraraya getirdiğimizde, N^5 -F-THF katabolizmasındaki azalma ve formil folatların birikmesinin sebepleri daha netleşmiş olur. Bu bağlamda, hasta grubunda ilgi çekici şekilde eritrosit içi toplam N^5 -formil folatların oranını yüksek, pABG oranının düzeylerini düşük saptadık. Bu bilgi de hipotezimizi destekleyen diğer bir sonuç olmuştur.

THF-poliglutamatlar folat bağlayıcı proteinlere sıkıca bağlanırlar. Böylece hücre dışına çıkışları engellenmiş olur. Diğer taraftan monoglutamat ve diglutamat bağlamış THF alt grupları, folat bağlayıcı proteinlere çok daha zayıf bağlanırlar, dolayısıyla poliglutamatlarla yarışamayacak kadar çok daha az bağlanıp hücre dışına rahatlıkla çıkabilirler. Ayrıca ferritin, tetrahidrofolatın mono ve diglutamat formlarına çok daha rahat ulaşip katabolize edebilir. Bu durumda poliglutamat bağlamış folat formları kofaktör olarak enzimlere hizmet edebilir hem de ferritin katabolize edici etkisinden korunabilmektedirler. Bu nedenle çalışmamızda folat alt gruplarını ölçtük. N^5 -F-THF ları glutamat sayılarına göre sınıflandırdığımızda, hem N^5 -F-THF-Glu2'nin hem de N^5 -F-THF-Glu1'nin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla

yüzde oranları önemli düzeyde artmış bulduk. Özellikle N⁵-F-THF-Glu1 çok daha önemli düzeyde artış göstermişti. Bu veri, hasta grubundaki total N⁵-F-THF düzeyindeki artış ile uyumlu bir sonuç olarak görüldü. Ayrıca ferritin ve demirin ortaklaşa şekilde katabolize ettiği folat formları olan N⁵-F-THF-Glu1 ve N⁵-F-THF-Glu2'nin hasta grubumuzdaki artışları(p=0,000; p=0,000), kronik enflamasyon kaynaklı demir eksikliğine bağlı N⁵-F-THF-Glu1 ve N⁵-F-THF-Glu2 nin yıkımında azalma şeklinde de yorumlanabilir. Diğer bir deyişle astım kronik enflamatuvar bir hastalık olması nedeniyle, demir düzeyinin azalması, ve bu nedenle ferritinin katabolik etki gösterememesi ile total formil, N⁵-F-THF-Glu1 ve N⁵-F-THF-Glu2 alt gruplarının yükselip pABG'nin düşmesi ilişkili olabilir. Ve artan mono ve diğlutamatlar, sentetaz enziminin etkisiyle daha fazla glutamat kalıntıları ile polimerize olarak poliglutamat haline dönüşme şansına sahip olur. Bu da hücre içerisinde poliglutamatlı F-THF'ların kofaktör olarak enzimatik reaksiyonlarda daha fazla kullanılma şansını yaratır. Bunun kanıtı niteliğinde de, N⁵-F-THF-Glu6'nın kontrol grubuna göre çok önemli düzeyde(p=0,000) artış göstermesini anlamlı bulgularımız arasında sayabiliriz. Ayrıca bu değişimler, subklinik anemi belirteç adayı olabilir; ve mikst anemilere giden yoldaki ilk değişimler olabilir. Elde ettiğimiz veriler ışığındaki bu değerlendirmemiz daha geniş araştırmalardan gelecek bilgilere açık olup ileri araştırmalara da ışık tutulabilecek niteliktedir. Toplam N⁵-M-THF'ların formlara oranı hasta grubumuzda %30 civarındayken, kontrol grubunda %41,5 düzeyinde bulundu. Bu önemli azalış içerisinde N⁵-M-THF-Glu1 N⁵-M-THF-Glu3 ve N⁵-M-THF-Glu6 oranlarının azalışının etkili olması dikkat çekiciydi. Özellikle N⁵-M-THF-Glu6 oranı kontrol grubunda %24,3 iken hasta grubunda %7,7 ye inmiştir(p=0,000). N⁵-M-THF-Glu6 oranının bu boyutta azalışı, tüm metilasyon reaksiyonlarını etkileyecek çok dikkat çekici bir sonuç olarak saptanmıştır. Çünkü N⁵-M-THF'ların içerisinde en yüksek oranda bulunan alt grup N⁵-M-THF-Glu6 dır. N⁵-M-THF'ların içerisinde sadece N⁵-M-THF-Glu2 alt grubu artış göstermiştir ve bu artış önemli düzeydedir. Kontrol grubunda N⁵-M-THF-Glu2 düzeyi %8,9 iken hasta grubunda %14,9 olmuştur. N⁵-M-THF-Glu2 alt grubunun çok önemli oranda artışı ile, aktif kofaktör olan N⁵-M-THF-Glu6 azalışı birbirini destekler sonuç olarak kabul edildi. Her ikisi de

total metil grupları içinde yüzde oran olarak yüksek düzeyde bulunan alt gruplardır. N⁵-M-THF-Glu2 nin artışı daha üst poliglutamilasyona geçilemediğinin göstergesi olarak kabul edildi. Böylece en fazla glutamat birimi taşıyan aktif folat kofaktör formu olan N⁵-M-THF-Glu6 nın düzeyinin düşük olmasının nedensel ilişkisi bu şekilde kuruldu. N⁵-M-THF-Glu2 basamağındaki tıkanmanın olması ve glutamat zincirinin uzamasının durmasının Formil-THF miktarının artışıyla ilişkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Hasta grubunda N⁵-M-THF-Glu2 deki tıkanma N⁵-M-THF-Glu3 deki azalmayla kendisini göstermiştir(p=0,001). Sonuçta metil-THF'lerin en aktif formu olan N⁵-M-THF-Glu6 çok düşük düzeye inmiştir, metilasyon reaksiyonlarının önemli oranda etkilendiğini söylemek mümkündür. Ancak arada köprü formlar olan N⁵-M-THF-Glu3 ve N⁵-M-THF-Glu4 değişmemiş saptandı.

N⁵-M-THF-Glu1/THF oranı açısından hasta-kontrol grupları kıyaslandığında(sırasıyla, 0,13 ± 0,17; 0,23 ± 0,13) ise, hasta grubu ortalaması kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı oldukça düşüklük gözlemlendi(p=0,002). Bu yorumlanmış veri bizi şaşırtmamıştır. Çünkü hasta grubundaki “metiyonin sentaz” enziminin aktivitesinin artmış olması yorumumuzu destekleyen bir sonuç olmuştur.

Metiyonin sentaz aktivite artışı ve N⁵-M-THF-Glu1 azalması; metilasyon açığı metiyonin azalması ve homosisteinin artması, kapatmak için bir kompensasyon olarak değerlendirilebilir.

Hasta grubu içindeki karşılaştırmada N⁵-F-THF-Glu5 ile serum folat çok yüksek korelasyon göstermiştir.

Homosistein ile N⁵-M-THF-Glu2 arasında da negatif korelasyon tespit ettik.

Folat eksikliğinde pürin sentezi azalır, proteinlere ait olan mRNA ekspresyonu azalır ayrıca her protein için başlangıç aminoasidi olan metiyonin eksikliği de işe karışır ve dolayısıyla protein sentezi azalır, ve bir protein olan kollajen sentezi de azalır.

Folat ayrıca kollajen sentezine özgü olarak, prolin hidroksilasyonunda askorbik asit gibi etkilidir(40). Zira düz kas kollajen üretiminin homosistinüride de arttığı bilinmektedir. Dolayısı ile THF'in, kollajenin hidroksilasyonunda da önemli olduğunu belirten çalışmaları destekler sonuçlar elde etmiş olduk.

Folat eksikliğinde protein sentezinin bozulduğuna dair araştırma bilgileri mevcuttur. Folat eksikliğinin kollajen sentezinin bozucu etkisi, prolin hidroksilasyonundaki aksamadan çok, protein sentezi üzerine olan etkisi nedeniyledir. Diğer taraftan ileri derecede homosistein yüksekliğinin bulunduğu homosistinüri hastalarında kollajen birikimi ortaya çıkmaktadır. Damar sağlığının bozulmasının, hem de kollajen sentezine bağlı diğer patolojilerin ortaya çıkmasının; homosistein yüksekliğinin kollajen sentezini arttırmasıyla ilişkili olduğunu bildiren araştırmalar mevcuttur(45). Hücre içi folat eksikliğinin bulunduğu durumlarının, diğer ifadeyle folat alt gruplarında kullanım dengesizliğinin(hücre dışı homosistein düzeyinin çok yüksek düzeylere ulaşmadığı durumlar) kollajen sentezi üzerine nasıl etki ettiğine dair bilgi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda hasta grubumuzda kontrol grubumuza kıyasla belirttiğimiz gibi prolin ve hidroksiprolin amino asitlerinin miktarları önemli düzeyde yüksek bulundu. Kollajen sentezi için düzenleyici rolü olduğu son yıllarda anlaşılan prolin amino asitinin yüksek düzeyde bulunmasının, artmış kollajen sentezine işaret edebileceğini düşünebiliriz. İdiopatik pulmoner fibrozis hastalığı hakkındaki kliniğimizin çalışmasında da prolidaz aktivitesi yüksek bulunmuştu(46). Astım hastalarında kollajen sentezinin artışıyla ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak bizim bu bulgularımız, bu konuda yeni araştırmalar yapılmasını cesaretlendirecek niteliktedir. Astım hasta grubumuzda hücre içi total folat ve folat alt gruplarındaki değişimlerin kollajen sentezine yönelik etkilerine dair bu bulgularımızın daha geniş çalışmalarla desteklenmesi ve aydınlatılması gerekmektedir. Bu bulgularımız, astım hastalığında sadece kollajen sentezinin artışı ile fibrozis gelişimini açıklamaya yönelik değil; astım hastalarında geri dönüşümsüz fonksiyon kayıplarından korunmada, eksikliği tespit edilen aktif folatların eksojen yolla yerine konacağı tedavi protokolleri

geliştirilmesinin, fibrozisi durdurulabileceği veya yavaşlatılabileceği hipotezimize de kaynak teşkil etmektedir.

Hasta-kontrol grupları arasındaki korelasyon analizlerinde....folat-B12 vit. arasındaki korelasyon kontrol grubunda yoktu. RBC folat ile serum B12 vit. arasında da vardı. Böylece sağlıklı kontrol grubunda bulunmayan bu ilişkiler hasta grubunda mevcuttu. B12 vit. ile treonin arasında negatif yönde önemli ilişki saptandı, homosistein treonin arasındaki ilişkiyle desteklendi. Hcy ile OH-prolin arasında önemliliğe yakın bir korelasyon saptandı($p=0,06$). İdrar MMA ile serum alanin arasında negatif korelasyon, alaninin enerji metabolizmasıyla çok yakın ilişkideki bir aminoasit olduğu hatırlanırsa, enerji yoksunluğuna bağlı apoptotik ve katabolik etkiler lehine yorumlanabilir. Hücre içi folat düzeyleri treonin ve serin amino asitleriyle negatif yönde önemli ilişki gösterdi. Treonin amino asidinin katabolizmasının sadece B12 vit. ile değil folat ile de ilişki gösterdiği anlaşılmaktadır, hücre içi folat düzeyi azaldığında treonin birikiminin olabileceği görülmüştür. Zira treonin aminoasidinin glisin ile dönüşümü düşünüldüğünde bu bulgumuzun ifade ettiği anlam daha iyi anlaşılabilir. Yine, tek karbon taşıyıcısı olarak serinin çok önemli bir yerinin olması nedeniyle hücre içi folat eksikliğinde serin amino asitinin miktarının değişmesi, astım hastalarında hücre içi folat ve tek karbon taşıyıcısı aminoasitlerin metabolizmalarının önemli oranda değiştiğinin kanıtı olarak kabul edildi. Hasta grubumuzda pABG azalmıştı. pABG, hem eritrosit içi total folat, hem THF ile pozitif ilişki içindeydi pABG azalmıştı, RBCfolat da azaldı. Total serum folat miktarsal olarak azalmasına rağmen, azalan eritrosit içi folatın bir bileşeni şeklinde pABG de miktarsal olarak azaldığı gibi eritrosit içi folat alt grupları arasında da oransal azalma göstermiştir; yani azalan folatla orantılı miktarsal azalmaya ek olarak totalin içindeki oranında da azalma göstermiş. Dolayısıyla bu bulgu, azalan folat nedeniyle katabolizmanın kısıtlandığını nedensel şekilde açıklar nitelikte bir kanıt ortaya sunmaktadır. N⁵-M-THF-Glu4 ile de anlamlı korelasyon gösterdi.

Hasta grubunda total metil gruplarının azaldığını saptadığımızdan bahsetmiştik. Formil grupları hakim formu oluşturuyordu. Ayrıca katabolizmanın azaldığından da bahsettik. Hücre yapım-yıkım döngüsü arttığı durumlarda yolak timidilat sentaza kayarak, ürün olarak dihidrofolat

oluşur; o da çok dayanıksız bir form olduğu için kolaylıkla yıkıma gider ve pABG artar. Bizim grubumuzda pABG azaldığı için timidilat sentaza gidemiyor ve formil formlarında birikme oluyor; çünkü metilen-THF'ı timidilat sentaz kullanıyor. N⁵-F-THF formlarının dayanıklı olması nedeniyle, artmış katabolik sürecin bulunmadığını görmekteyiz. Metil sentezinin azaldığı ve Formil üretiminin daha önemli ve öncelikli düzeyde tutulduğunu, dolayısıyla F-THF aracılığıyla pürin sentezine gidişin daha aktif olduğunu söyleyebiliriz. Timidilat sentaz ile DNA sentezine gidiş belki azalmış oluyor, ancak Formil üzerinden bakılırsa pürine gidiş artınca bu sefer DNA sentezi ve mitotik aktivite artışıyla uyumlu oluyor. Zira hastalardaki metabolizma değişikliklerinde pürin sentezine daha öncelik verilmiş görünüyor. Bunu ise yine bir pürin olan guanozin, ve guanozinden sentezlenen THB; ve inflamasyonda önemli roller üstlenen bir pürin olan adenozin açısından da ele almak gerektiğine inanmaktayız. N⁵-F-THF-Glu4 ve N⁵-M-THF-Glu4, RBCfolat ile uyumlu davranmıştır. N⁵-M-THF-Glu1, serum folat ve RBC folatla pozitif ilişki gösteriyor. N⁵-M-THF-Glu2 de serum ve RBC folatla pozitif ilişki gösteriyor. N⁵-M-THF-Glu6; RBC folatla, N⁵-F-THF-Glu2, N⁵-F-THF-Glu3, N⁵-M-THF-Glu1(MS'in substratı) ile pozitif ilişki içindedir. N⁵-M-THF-Glu1 kullanılıp azalınca N⁵-M-THF-Glu6 ya da geçiş azaldığını saptamış olduk. N⁵-F-THF-Glu5, N⁵-M-THF-Glu5 N⁵-M-THF-Glu6 gibi alt grupların SHMT'nin inhibitörü olduğuna dair literatürde bilgiler bulunmaktadır(26). Bizim çalışmamızda N⁵-F-THF-Glu5, p=0,06 düzeyinde önemlilik ile artmıştı. Bu artışın, SHMT inhibisyonunu, metilen THF üretiminin aksamasını ve metiyonin sentezine giden yolun yavaşlamasını, N⁵-M-THF üretiminin azalmasını, bu nedenle de metil alt gruplarının N⁵-F-THFa göre çok düşük düzeyde bulmamızı açıkladığını söyleyebiliriz. Böylece formil alt gruplarının daha yüksek oranda bulunması ile, pürin sentezine giden yolun daha aktif olduğunu, metiyonin sentezine giden yolun daha yavaş olduğunu söyleyebiliriz. Bu bulgularımız amino asit düzeylerinden metiyonin miktarının düşük olmasıyla da uyumlu bir bulgudur. N⁵-F-THF-Glu6 ve N⁵-F-THF-Glu5 in birbiriyle çok yüksek uyumluluk içinde olması, formlerin hücre içinde depolanacak tarzda hareket ettiğini gösteriyor.

Özetle metilasyon reaksiyonlarının aksadığını görmemiz hipotezimizi doğrulayan başlı başına bir bulgu oluşturdu. Formil formdaki folatlar birikerek pürin sentezine kaydı. Metiyonin sentezi aksadı ve düzeyi düştü. Katabolizmada düşüş oluştu. Kollajen sentezi bozuldu. RBC folat azalırken, HCYde hafif artış görüldü. Bütün bunlar astım hastalarındaki folat metabolizmasının çok önemli düzeyde bozulduğunu gösteriyor. Bu değişimlerin nedensel mi sonuçsal mı olduğunu ileri çalışmalar gösterecektir.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Ueland, P. M., Holm, P. I. & Hustad, S. Betaine: A key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, 1069–1075, 2005.
3. Di Salvo, M. L., Contestabile, R., Paiardini, A. & Maras, B. Glycine consumption and mitochondrial serine hydroxymethyltransferase in cancer cells: The heme connection. *Med. Hypotheses* 80, 633–636, 2013.
4. Schwedhelm, E. *ve diğ.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: Impact on nitric oxide metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 65, 51–59, 2008.
5. Önal, A., Tekkeli, S. E. K. & Önal, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* 138, 509–515, 2013.
6. Maarsingh, H., Zaagsma, J. & Meurs, H. Arginase: A key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. *Br. J. Pharmacol.* 158, 652–664, 2009.
7. Fowler, S. J., Dempsey, O. J., Sims, E. J. & Lipworth, B. J. Screening for bronchial hyperresponsiveness using methacholine and adenosine monophosphate: Relationship to asthma severity and β_2 -receptor genotype. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1318–1322, 2000.

8. Goncharova, E. *ve diş*. Alpha 2-Adrenergic Receptor Agonists Modulate Human Airway Smooth Muscle Cell Migration Via Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 48–54, 2012.
9. Tiwary, A. S. & Mukherjee, A. K. Inductive effect of methyl group in a series of methylated indoles : A graph theoretical analysis in the light of density functional theory. 125, 905–912, 2013.
10. Home, A. Inductive effect. 1077, 10–12, 1994.
11. Gregory, J. F., Bailey, B. & Toth, P. Relative bioavailability of deuterium-labeled tetrahydrofolates and folic acid in human. *Measurement* 1992.
12. Anguera, M. C. *ve diş*. Regulation of folate-mediated one-carbon metabolism by 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 281, 18335–18342, 2006.
13. 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.
14. Pathologies, F. & Stover, P. J. One-Carbon Metabolism – Genome Interactions. *Metab. Clin. Exp.* 2402–2405, 2009.
doi:10.3945/jn.109.113670.2402
15. Banerjee, R. V & Matthews, R. G. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J.* 4, 1450–1459, 1990.
16. Layer, G., Heinz, D. W., Jahn, D. & Schubert, W. D. Structure and function of radical SAM enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 468–476, 2004.

17. Woeller, C. F., Fox, J. T., Perry, C. & Stover, P. J. A ferritin-responsive internal ribosome entry site regulates folate metabolism. *J. Biol. Chem.* 282, 29927–29935, 2007.
18. Westerhof, G. R. *ve diğ.* Carrier- and receptor-mediated transport of folate antagonists targeting folate-dependent enzymes: correlates of molecular-structure and biological activity. *Mol. Pharmacol.* 48, 459–471, 1995.
19. Beaudin, A. E. & Stover, P. J. Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: A minireview. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* 85, 274–284, 2009.
20. Ubbink, J. B. *ve diğ.* The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J. Clin. Invest.* 98, 177–184, 1996.
21. Kalhan, S. C. & Marczewski, S. E. Methionine, homocysteine, one carbon metabolism and fetal growth. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 13, 109–119, 2012.
22. Pacheco, Y. *ve diğ.* Modulation by S-adenosyl-methionine and S-adenosyl-homocysteine of the human leucocytes histamine release. *Clin. Allergy* 14, 37–43, 1984.
23. Quinzii, C. M., DiMauro, S. & Hirano, M. Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochem. Res.* 32, 723–727, 2007.
24. Ly, A., Hoyt, L., Crowell, J. & Kim, Y.-I. Folate and DNA Methylation. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 302–326, 2012.
25. Lucock, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab.* 71, 121–138, 2000.

26. Finkelstein, J. D. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, 1694–1699, 2007.
27. Yango, a. ve diğ. Rapid communication: L-folinic acid versus folic acid for the treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 59, 324–327, 2001.
28. Kastanos, E. K., Woldman, Y. Y. & Appling, D. R. Role of mitochondrial and cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase isozymes in de Novo purine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 36, 14956–14964, 1997.
29. Brosnan, J. T. ve diğ. Creatine synthesis is a major metabolic process in neonatal piglets and has important implications for amino acid metabolism and methyl balance. *J. Nutr.* 139, 1292–1297, 2009.
30. Lin, J. H. ve diğ. Relationships between folate and inflammatory features of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 2013.
31. Crabtree, M. J. & Channon, K. M. Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 25, 81–88, 2011.
32. Maarsingh, H. ve diğ. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. *Eur. Respir. J.* 38, 318–328, 2011.
33. Zhang, X., El-Hajj, Z. W. & Newman, E. Deficiency in L-serine deaminase interferes with one-carbon metabolism and cell wall synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 192, 5515–5525, 2010.
34. Stabler, S. P., Lindenbaum, J., Savage, D. G. & Allen, R. H. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 81, 3404–3413, 1993.

35. Blau, N., Thöny, B., Cotton, R. G. H. & Hyland, K. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. *Metab. Mol. bases Inherit. Dis.* 2, 1725–1776, 2001.
36. Matsui, E. C. & Matsui, W. Higher serum folate levels are associated with a lower risk of atopy and wheeze. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 1253–1259.e2, 2009.
37. Jung, J. ve diğ. Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis. *Clin. Exp. Allergy* 43, 425–433, 2013.
38. Maarsingh, H., Leusink, J., Zaagsma, J. & Meurs, H. Role of the L-citrulline/L-arginine cycle in iNANC nerve-mediated nitric oxide production and airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Eur. J. Pharmacol.* 546, 171–176, 2006.
39. Hur, G. Y. ve diğ. Serum ferritin and transferrin levels as serologic markers of methylene diphenyl diisocyanate-induced occupational asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 774–780, 2008.
40. Caudill, M. a, Bailey, L. B. & Gregory, J. F. Consumption of the folate breakdown product para-aminobenzoylglutamate contributes minimally to urinary folate catabolite excretion in humans: investigation using [(13)C(5)]para-aminobenzoylglutamate. *J. Nutr.* 132, 2613–2616, 2002.
41. Smelt, V. a ve diğ. Expression of arylamine N-acetyltransferases in pre-term placentas and in human pre-implantation embryos. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1101–1107, 2000.
42. Suh, J. R., Herbig, a K. & Stover, P. J. New perspectives on folate catabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 255–282, 2001.
43. Hautvast, J. G. & Barnes, M. J. Collagen metabolism in folic acid deficiency. *Br. J. Nutr.* 32, 457–469, 1974.

44. Tyagi, N. ve diğ. Homocysteine mediated decrease in bone blood flow and remodeling: Role of folic acid. *J. Orthop. Res.* 29, 1511–1516, 2011.
45. Gültepe, M., Coşar a. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis, *Biyokimyasal Mekanizmalar ve Belirteçler.* 122–139
46. 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.