

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KRONİK HİPERHOMOSİSTEİNEMİ OLUŞTURULAN
RATLARDA ALFA-LİPOİK ASİDİN PLAZMA ve ÇEŞİTLİ
DOKULARDA OKSİDAN ANTİOKSİDAN SİSTEM
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Funda GÜLCÜ BULMUŞ
ELAZIĞ-2006**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Necip İLHAN

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Necip İLHAN

Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Prof. Dr. Ümit MUTLU TÜRKOĞLU

Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN

Çok Değerli Anneme, Babama

Sevgili Eşime ve Minik Emir'ime

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında benden gerekli her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında ve eğitimim süresince yardım ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Necip İLHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Doç. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na, Doç.Dr. Nevin İLHAN'a teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında yardımını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Dilara SEÇKİN'e, asistan arkadaşlarıma ve Biyokimya Anabilim Dalında görevli bütün personele teşekkür ederim. Tez konumun seçimindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Gıyaseddin BAYDAŞ'a; histopatolojik incelemelerde büyük emeği geçen Doç. Dr. İbrahim H. ÖZERCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Biriminde (FÜTDAM) tezimin deneysel çalışmalarını gerçekleştiren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Özgür BULMUŞ'a teşekkür ederim.

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli anneme ve babam Prof. Dr. H. Basri GÜLCÜ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasını 738 no'lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelendirme (FÜBAP) fonuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. HOMOSİSTEİN	5
3.1.1. Homosistein Metabolizması	7
3.1.1.1. Transmetilasyon	7
3.1.1.2. Remetilasyon	8
3.1.1.3. Transsülfürasyon	9
3.1.2. Homosisteinin Biyolojik Fonksiyonları	11
3.1.3. Homosistein Metabolizmasının Regülasyonu	11
3.1.4. Dolaşımdaki Homosistein Formları	13
3.1.5. Homosistein Düzeyleri	14
3.1.5.1. Homosistein Düzeylerinin Ölçülmesi	14
3.1.6. Hiperhomosisteinemi	15
3.1.7. Hiperhomosisteineminin Nedenleri	15
3.1.7.1. Genetik Faktörler	15
3.1.7.1.1. Transsülfürasyon Yolundaki Bozukluklar	16
3.1.7.1.2. Remetilasyon Yolundaki Bozukluklar	16
3.1.7.2. Fizyolojik Faktörler	17
3.1.7.3. Edinsel Faktörler	18
3.1.7.3.1. Vitamin Eksiklikleri	18
3.1.7.3.2. Beslenme ve Yaşam Şekli	20
3.1.7.4. Kronik Hastalıklar	21
3.1.7.5. İlaçlar	21
3.1.8. Homosistein ve Vasküler Hastalıklar	23
3.1.9. Hiperhomosisteineminin Patofizyolojik Mekanizmaları	24
3.1.10. Hiperhomosisteineminin Tedavisi	29

3.2. SERBEST RADİKALLER ve REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ	30
3.2.1. Serbest Radikaller	30
3.2.2. Reaktif Oksijen Türevleri	31
3.2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)	33
3.2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	34
3.2.2.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	35
3.2.2.4. Singlet Oksijen (1O_2)	36
3.2.3. Serbest Radikallerin Kaynakları	37
3.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri	38
3.2.4.1. Proteinlere Etkileri	38
3.2.4.2. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	38
3.2.4.3. Karbonhidratlara Etkileri	39
3.2.4.4. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)	39
3.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	42
3.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	44
3.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)	44
3.3.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px; EC 1.11.1.9)	44
3.3.1.3. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6)	45
3.3.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2)	46
3.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	46
3.3.2.1. Vitamin C (Askorbik Asit: AA)	46
3.3.2.2. Vitamin E (α - tokoferol)	47
3.3.2.3. Vitamin A (β -karoten)	47
3.3.2.4. Redükte Glutasyon (GSH)	48
3.4. LİPOİK ASİT	49
3.4.1. Lipoik Asidin Genel Özellikleri ve Kaynakları	49
3.4.2. Lipoik Asidin Yapısı	50
3.4.3. Lipoik Asidin Fonksiyonları	51
3.4.4. Lipoik Asidin Antioksidan Özellikleri	51

3.5. AMAÇ	55
4. GEREÇ ve YÖNTEM	56
4.1. GEREÇ	56
4.1.1. Deney Hayvanları	56
4.1.2. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	58
4.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	58
4.2. YÖNTEMLER	59
4.2.1. Plazma Homosistein Düzeylerinin Ölçümü	59
4.2.2. Plazma Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Ölçümü	59
4.2.3. Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü	62
4.2.4. Doku ve Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü	64
4.2.5. Doku ve Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü	66
4.2.6. Doku ve Eritrosit Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü	68
4.2.7. Eritrosit Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü	70
4.2.8. Hemoglobin Ölçümü	72
4.2.9. Doku Protein Ölçümü	73
4.2.10. Vitamin A ve E Düzeylerinin Ölçümü	74
4.2.11. Vitamin C Düzeylerinin Ölçümü	75
4.2.12. Vitamin B ₆ Düzeylerinin Ölçümü	75
4.2.13. Vitamin B ₁₂ ve Folik Asit Düzeylerinin Ölçümü	76
4.2.14. Lipid Parametrelerinin Ölçümü	76
4.2.15. Dokuların Histopatolojik İncelenmesi	76
4.2.16. İstatistiksel Analizler	76
5. BULGULAR	77
5.1. Biyokimyasal Parametreler	77
5.1.1. Plazma Homosistein Düzeyleri	77
5.1.2. Plazma MDA Düzeyleri	78
5.1.3. Eritrosit SOD Aktiviteleri	79
5.1.4. Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri	80

5.1.5. Eritrosit CAT Aktiviteleri	81
5.1.6. Doku MDA Düzeyleri	81
5.1.7. Doku SOD Aktiviteleri	83
5.1.8. Doku GSH-Px Aktiviteleri	84
5.1.9. Doku CAT Aktiviteleri	85
5.1.10. Eritrosit GSH Düzeyleri	87
5.1.11. Vitamin Düzeyleri	87
5.1.11.1. Vitamin E, C ve A Düzeyleri	87
5.1.11.2. Vitamin B ₆ , B ₁₂ ve Folik Asit Düzeyleri	88
5.1.12. Lipid Parametreleri	89
5.2. Plazma Homosistein Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki	91
5.2.1. Kontrol Grubunda Plazma Homosistein Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki	91
5.2.2. hHcy Grubunda Plazma Homosistein Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki	94
5.2.3. hHcy+LA Grubunda Plazma Homosistein Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki	100
5.3. Histopatolojik Bulgular	105
6. TARTIŞMA	107
7. KAYNAKLAR	132
8. ÖZGEÇMİŞ	151

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Dolaşımdaki homosistein formları	13
Tablo 2. Plazma total homosistein düzeyleri	15
Tablo 3. Plazma homosistein düzeylerini etkileyen faktörler	22
Tablo 4. Reaktif oksijen türevleri	32
Tablo 5. Antioksidanların sınıflandırılması	43
Tablo 6. α -LA ve DHLA'nın nötralize ettiği radikaller	54
Tablo 7. Ratlara verilen yemin bileşimi	56
Tablo 8. Gruplara ait doku MDA düzeyleri	82
Tablo 9. Gruplara ait doku SOD aktiviteleri	83
Tablo 10. Gruplara ait doku GSH-Px aktiviteleri	85
Tablo 11. Gruplara ait doku CAT aktiviteleri	86
Tablo 12. Gruplara ait Vitamin E, C ve A düzeyleri	88
Tablo 13. Gruplara ait Vitamin B ₆ , B ₁₂ ve Folik asit düzeyleri	89
Tablo 14. Gruplara ait trigliserit, kolesterol, HDL, LDL ve VLDL düzeyleri	90
Tablo 15. Kontrol grubunda plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki	91
Tablo 16. hHcy grubunda plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki	94
Tablo 17. hHcy+LA grubunda plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki	100

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Homosistein metabolizması	10
Şekil 2. Homosisteinin olumsuz vasküler etkileri	25
Şekil 3. Hiperhomosisteineminin hipertansiyon oluşumunda rolü	27
Şekil 4. α -LA ve DHLA'nın yapıları	50
Şekil 5. Lipoik asidin diğer antioksidanlarla etkileşimi	53
Şekil 6. MDA Standart Grafiği	60
Şekil 7. Protein Standart Grafiği	74
Şekil 8. Gruplara ait plazma homosistein düzeyleri	77
Şekil 9. Gruplara ait plazma MDA düzeyleri	78
Şekil 10. Gruplara ait eritrosit SOD aktiviteleri	79
Şekil 11. Gruplara ait eritrosit GSH-Px aktiviteleri	80
Şekil 12. Gruplara ait eritrosit CAT aktiviteleri	81
Şekil 13. Gruplara ait eritrosit GSH düzeyleri	87
Şekil 14. Kontrol grubunda Hcy ile plazma MDA düzeyleri arasındaki ilişki	92
Şekil 15. Kontrol grubunda Hcy ile LDL düzeyleri arasındaki ilişki	93
Şekil 16. Kontrol grubunda Hcy ile eritrosit GSH düzeyleri arasındaki ilişki	93
Şekil 17. hHcy grubunda Hcy ile plazma MDA düzeyleri arasındaki ilişki	95
Şekil 18. hHcy grubunda Hcy ile trigliserit düzeyleri arasındaki ilişki	96
Şekil 19. hHcy grubunda Hcy ile eritrosit GSH-Px aktiviteleri arasındaki ilişki	96
Şekil 20. hHcy grubunda Hcy ile eritrosit CAT aktiviteleri arasındaki ilişki	97
Şekil 21. hHcy grubunda Hcy ile eritrosit GSH düzeyleri arasındaki ilişki	97
Şekil 22. hHcy grubunda Hcy ile Vitamin B ₁₂ düzeyleri arasındaki ilişki	98
Şekil 23. hHcy grubunda Hcy ile folik asit düzeyleri arasındaki ilişki	98

Şekil 24. hHcy grubunda Hcy ile LDL düzeyleri arasındaki ilişki	99
Şekil 25. hHcy+LA grubunda Hcy ile plazma MDA düzeyleri arasındaki ilişki	101
Şekil 26. hHcy+LA grubunda Hcy ile Vitamin E düzeyleri arasındaki ilişki	102
Şekil 27. hHcy+LA grubunda Hcy ile LDL düzeyleri arasındaki ilişki	102
Şekil 28. hHcy+LA grubunda Hcy ile eritrosit GSH düzeyleri arasındaki ilişki	103
Şekil 29. hHcy+LA grubunda Hcy ile Vitamin B ₁₂ düzeyleri arasındaki ilişki	103
Şekil 30. hHcy+LA grubunda Hcy ile folik asit düzeyleri arasındaki ilişki	104
Şekil 31. hHcy+LA grubunda Hcy ile HDL düzeyleri arasındaki ilişki	104
Şekil 32. Kontrol grubu ratlara ait aortların normal histolojik görünümü	105
Şekil 33. Hiperhomosisteinemi grubu ratlara ait aortların histolojik görünümü	106
Şekil 34. Hiperhomosisteinemi+ α -lipoik asit grubu ratlara ait aortların histolojik görünümü	106

KISALTMALAR

ADMA	: Asimetrik dimetilarginin
ATP	: Adenozin trifosfat
BHMT	: Betain-homosistein metil transferaz
BSA	: Bovin serum albumin
CAT	: Katalaz
CBS	: Sistasyonin β -sentaz
DHLA	: Dihidrolipoik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
GS-MC	: Gaz kromatografisi – kütle spektroskopisi
GST	: Glutasyon-S-transferaz
Hcy	: Homosistein
hHcy	: Hiperhomosisteinemi
tHcy	: Total homosistein
Hcy-T	: Homosistein-tiolakton
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
α-LA	: α -Lipoik asit
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein

MAT	: Metiyonin S-adenozil transferaz
MDA	: Malondialdehid
MS	: Metiyonin sentaz
5,10-MTHF	: 5,10-metilen tetrahidrofolat
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
tMTHFR	: Termolabil Metilentetrahidrofolat redüktaz varyantı
NADP⁺	: Nikotin amid adenin dinükleotid (Okside form)
NADPH	: Nikotin amid adenin dinükleotid (Redükte form)
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NO	: Nitrik oksit
O₂^{·-}	: Süperoksit anyon radikali
¹O₂	: Singlet oksijen
OH[·]	: Hidroksil radikali
PTA	: Fosfotungustik asit
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
SAH	: S-adenozil-L-homosistein
SAM	: S-adenozil metiyonin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SNOHcy	: S-nitrozo-homosistein
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbütirik asit
THF	: Tetrahidrofolat
TM	: Trombomodulin
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein

1. ÖZET

Plazma homosistein düzeylerinin yüksekliği, serbest radikal üretimi ve çeşitli mekanizmalar yoluyla vasküler ve kardiovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür. Aksine, α -lipoik asit ise özellikle oksidatif stres ile ilişkili birçok hastalıkta kullanıma potansiyeline sahip güçlü, terapötik bir antioksidandır. Bu çalışmada, kronik hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistemler üzerindeki etkilerinin ve α -lipoik asidin bu etkiler üzerinde ne şekilde değişiklikler yapacağını araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 200-250 gr. ağırlığında toplam 45 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanılarak 3 grup oluşturuldu. Grup 1 (n=15, kontrol grubu; 6 hafta i.p. 1 ml/kg serum fizyolojik uygulandı); Grup 2 (n=15, hHcy grubu; 6 hafta i.p. 1 ml/kg serum fizyolojik uygulanmasına ilaveten içme sularına 1 g/kg/gün dozda L-metiyonin katılarak kronik hiperhomosisteinemi oluşturuldu); Grup 3 (n=15, hHcy+LA grubu; 6 hafta içme sularına 1 g/kg/gün dozda L-metiyonine ilaveten 100 mg/kg/gün dozda α -LA i.p. olarak uygulandı). Altı hafta sonunda ratlar dekapite edilerek biyokimyasal parametreler için kan örnekleri, karaciğer, böbrek, kalp, beyin doku örnekleri ile histopatolojik inceleme için aort örnekleri alındı.

Deneyel olarak kronik hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda lipoik asit uygulanmasının plazma Hcy düzeylerini önemli şekilde azalttığı ve hHcy oluşumunu engellediği görüldü. Lipid peroksidasyonun göstergesi olarak plazma ve doku MDA düzeyleri Grup 2'de Grup 1'e göre anlamlı şekilde yüksek bulunurken, lipoik asit uygulanmasının MDA düzeylerinde önemli düşüşe yol açtığı görüldü. Hiperhomosisteinemi eritrosit, karaciğer ve böbrek dokularında

GSH-Px ve CAT aktivitelerinde anlamlı azalmaya yol açarken; kalp ve beyinde böyle bir azalma görülmedi. Diğer taraftan, hiperhomosisteineminin eritrosit ve doku SOD aktiviteleri üzerine anlamlı bir etkisi bulunmadı. Lipoik asidin ise eritrosit SOD aktivitesi hariç, eritrosit ve dokularda SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri ile eritrosit GSH düzeylerinde anlamlı şekilde artışa yol açtığı görüldü. Hiperhomosisteineminin lipid parametrelerinin (kolesterol, LDL, VLDL, trigliserid) düzeylerini artırdığı; lipoik asidin ise, homosisteinin bu olumsuz etkisini önlediği ortaya konulmuştur. Ayrıca hHcy'nin aortta dejeneratif vasküler bozukluklara neden olup, lipoik asidin ise bu damar değişikliklerini önlediği görülmüştür.

Sonuç olarak lipoik asidin lipid peroksidasyonunu azalttığı, antioksidan aktiviteyi artırdığı, lipid profilini düzelttiği; ayrıca hiperhomosisteinemi ve bundan kaynaklanan damar lezyonlarını önleyerek vazoprotektif etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Lipoik asidin bütün bu yararlı etkileri göz önüne alındığında, kardiovasküler hastalıklarda suplementasyon için önemli bir potansiyele sahip olduğu düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Hiperhomosisteinemi, α -lipoik asit, L-metiyonin, oksidan-antioksidan sistemler.

2. ABSTRACT

The increase in plasma homocysteine levels is an important risk factor for vascular and cardiovascular diseases through free radical production and several other mechanisms. On the contrary, α -lipoic acid is a strong, therapeutic antioxidant with treatment potential in many diseases especially related with oxidative stress. In the present study, the effects of homocysteine in oxidant-antioxidant systems in chronic hyperhomocysteinemia induced rats and how α -lipoic acid would change these effects were aimed to be investigated.

A total of 45 male Wistar albino rats weighing 200-250 gr. were used in the study and rats were divided into 3 groups. Group 1 (n=15, control group; 1 ml/kg normal saline administered i.p. for 6 weeks); Group 2 (n=15, hHcy group; 1 ml/kg normal saline administered i.p. and chronic hyperhomocysteinemia was induced by adding 1 g/kg/day L-methionine in tap water for 6 weeks); Group 3 (n=15, hHcy+LA group; chronic hyperhomocysteinemia induced by adding 1 g/kg/day L-methionine in tap water and 100 mg/kg/day α -lipoic acid administered i.p. for 6 weeks). After 6 weeks, rats were decapitated; blood samples, liver, kidney, heart and brain tissue samples obtained for biochemical parameters and aorta samples for histopathological investigation.

Lipoic acid administration was shown to decrease plasma Hcy levels significantly and prevent hHcy development in experimentally hyperhomocysteinemia induced rats. Plasma and tissue MDA levels, as an indicator of lipid peroxidation, were found significantly higher in Group 2 than Group 1; whereas lipoic acid treatment was seen to lower MDA levels significantly. Hyperhomocysteinemia led to a significant decrease in GSH-Px and

CAT activities in erythrocyte, liver and kidney tissues but not in heart and brain. On the other hand, there was no significant effect of hyperhomocysteinemia on erythrocyte and tissue SOD activities. Lipoic acid was shown to increase erythrocyte and tissue SOD, CAT and GSH-Px activities and erythrocyte GSH levels significantly, except erythrocyte SOD activity. Hyperhomocysteinemia was also shown to increase the levels of lipid parameters (cholesterol, LDL, VLDL, triglyceride) and lipoic acid was found to prevent this adverse effect of hHcy. In addition, it was found that hHcy lead to degenerative vascular damage in aorta and lipoic acid was shown to prevent these vascular changes.

In conclusion; lipoic acid was found to decrease lipid peroxidation, increase antioxidant activity and improve lipid profile as well as prevent hyperhomocysteinemia and related vessel lesions, thus have vasoprotective effects. When all these beneficial effects of lipoic acid taken into account, it could be thought to have a strong potential for being used as supplementation in cardiovascular diseases.

Key Words: Hyperhomocysteinemia, α -lipoic acid, L-methionine, oxidant-antioxidant systems.

3. GİRİŞ

3.1. HOMOSİSTEİN

Yüksek plazma konsantrasyonları vasküler hastalıklar açısından önemli bir risk faktörü olan homosistein (Hcy; 2-amino-4-merkaptobutirik asit); metiyonin metabolizması sırasında bir ara ürün olarak oluşan ve proteinlerin yapısına katılmayan bir aminoasittir (57,77,83,144). Sülfür içeren bu aminoasit, ilk kez 1932 yılında DuVigneaud tarafından tanımlanmıştır (26,103).

Homosistein metabolizmasında önemli bir yere sahip olan metiyonin;

- Proteinlerin sentezinde,
- Poliaminlerin sentezinde,
- S-adenozil metiyonin (SAM) şeklinde, hücrel metabolizma için en önemli metil-grubu donörü olarak, transmetilasyon reaksiyonlarında,
- Sistein ve taurin için sülfür kaynağı olarak; sistatyonin, sistein ve transsülfürasyon yolunun diğer ürünlerinin oluşumunda,
- İntraselluler folat metabolizması ve kolin katabolizması için gerekli homosisteinin sağlanması gibi biyolojik süreçlerde rol oynayarak, memelilerin normal büyüme ve gelişimi için esansiyeldir (105).

Metiyonin esansiyel bir aminoasit olduğundan, homosistein de kaynağı itibarıyla esansiyel olarak kabul edilmektedir. Metiyonin ile homosistein birbirlerinin prekürsörleri niteliğinde olup, birinin detoksifikasyonu diğerinin sentez aşamasını kapsamaktadır ve bu ilişkinin temeli metiyonin metabolizmasını oluşturmaktadır (47).

Kardiovasküler hastalık gelişiminde etkili olan çeşitli risk faktörlerinin (hipertansiyon, dislipidemi, sigara kullanımı gibi) kardiovasküler kaynaklı ölümlerin bazılarında tespit edilemeyişi, araştırmacıları başka faktörleri incelemeye yönlendirmiştir.

Yüksek plazma total homosistein düzeylerini kardiovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğu ilk kez 1969 yılında McCully tarafından, homosistinürinin tanımlanmasıyla ortaya konulmuştur. McCully, hiperhomosisteinemi ve homosistinüri görülen çocuklarda ilerlemiş damar lezyonlarına rastlamış ve metiyonin metabolizmasındaki bir bozukluğun buna sebep olduğunu ileri sürmüştür (101). Son yıllarda, ılımlı düzeyde hiperhomosisteineminin artmış periferik damar hastalıkları, venöz tromboz, kardiovasküler hastalıklar ve inme ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (18,36,39).

Amerika Birleşik Devletlerinde kardiovasküler kaynaklı mortalite ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada bireylerin %57'sinde hiperhomosisteinemi görülürken, yalnızca %14'ünde hiperkolesterolemi tespit edilmiştir (152). Daha sonra yapılan araştırmalarda koroner kaynaklı ölümlerde homosisteinin kolesterolden daha önemli bir parametre olduğu fikri ileri sürülmüştür (67). Araştırmacıların dikkatlerini hiperhomosisteinemi üzerine çeken bu çalışmayı; miyokard enfarktüsü geçiren hastaların %40'ında, serebrovasküler hastalığı olanların %42'sinde, periferik vasküler hastalığı olanların %28'inde ve koroner vasküler hastalığı olan bireylerin %30'unda yüksek plazma homosistein düzeylerini tespit eden başka bir çalışma takip etmiştir (28). Yapılan bir meta-analizde ise; homosistein düzeylerindeki her 2.5 µmol/L'lik artışın miyokard enfarktüsü riskini %10, inme riskini ise %20 arttırdığı ileri sürülmüştür (65,85).

Homosistein; serebrovasküler, periferik vasküler, koroner kalp hastalığı ve tromboz için önemli bir risk faktörü olup (99,144); vasküler ve kardiovasküler bozukluklar ile arasındaki ilişki yaş, sigara içimi, hipertansiyon, dislipidemi ve şişmanlık gibi diğer risk faktörlerinden bağımsızdır (44).

3.1.1. Homosistein Metabolizması

Homosistein metabolizmasında *remetilasyon* ve *transsülfürasyon* olmak üzere başlıca 2 yol vardır. Metiyoninden oluşan homosistein ya remetilasyon ile tekrar metiyonine dönüştürülmekte ya da sistatyonin ve sistein ara bileşikleri üzerinden sülfata metabolize edilmektedir (106). Her iki yol da aynı öneme sahip olup, aynı oranda kullanılmaktadır.

3.1.1.1. Transmetilasyon

Diyet ile alınan metiyoninin, Metiyonin adenzil transferaz (MAT) enzimi ile kükürt atomuna ATP'den bir adenzil grubunun transferi sonucu, oldukça reaktif bir metil grubuna sahip olan S-adenzil-L-metiyonin (SAM) oluşur. SAM'daki bu metil grubu ise; fosfolipidler, proteinler, myelin, katekolaminler, polisakkaridler, kreatin, karnitin, DNA, RNA ve birçok nöromediyatöre transfer edilerek, yaşamsal öneme sahip metilasyon reaksiyonlarının devamlılığı sağlanır. SAM, organizmadaki en önemli ve merkezi sinir sistemindeki tek biyolojik metil donörü (vericisi)'dür (108). SAM, yapısındaki metili çoklu transferaz enzimi ile metil alıcılara verince S-adenzil-L-homosisteine (SAH) dönüşmektedir. SAH ise reversible bir enzim olan S-adenzil-homosistein hidrolaz tarafından homosistein ve adenzine hidroliz olur. Homosistein ve adenzinin hızlı metabolizması, SAH hidrolazın in vivo artışıyla dengelenmeye çalışılır. SAH önemli bir regülatör olup, metiltransferaz enzim proteininin aktif bölgesi için SAM ile yarışarak, transmetilasyonun kuvvetli bir inhibitörüdür (72,110). SAH'ın hidrolizi sonucu oluşan homosistein bundan sonra hem remetilasyona girerek metiyonine, hem de serin ile birleşerek sistatyonine dönüşmektedir (55).

3.1.1.2. Remetilasyon

Homosisteinin remetilasyon ile metiyonine dönüşümü iki enzimden biri aracılığı ile olur:

1- Metiyonin sentaz (MS; 5-metiltetrahidrofolat-homosisteinmetiltransferaz)

2- Betain-homosistein metiltransferaz (BHMT; E.C. 2.1.1.5)

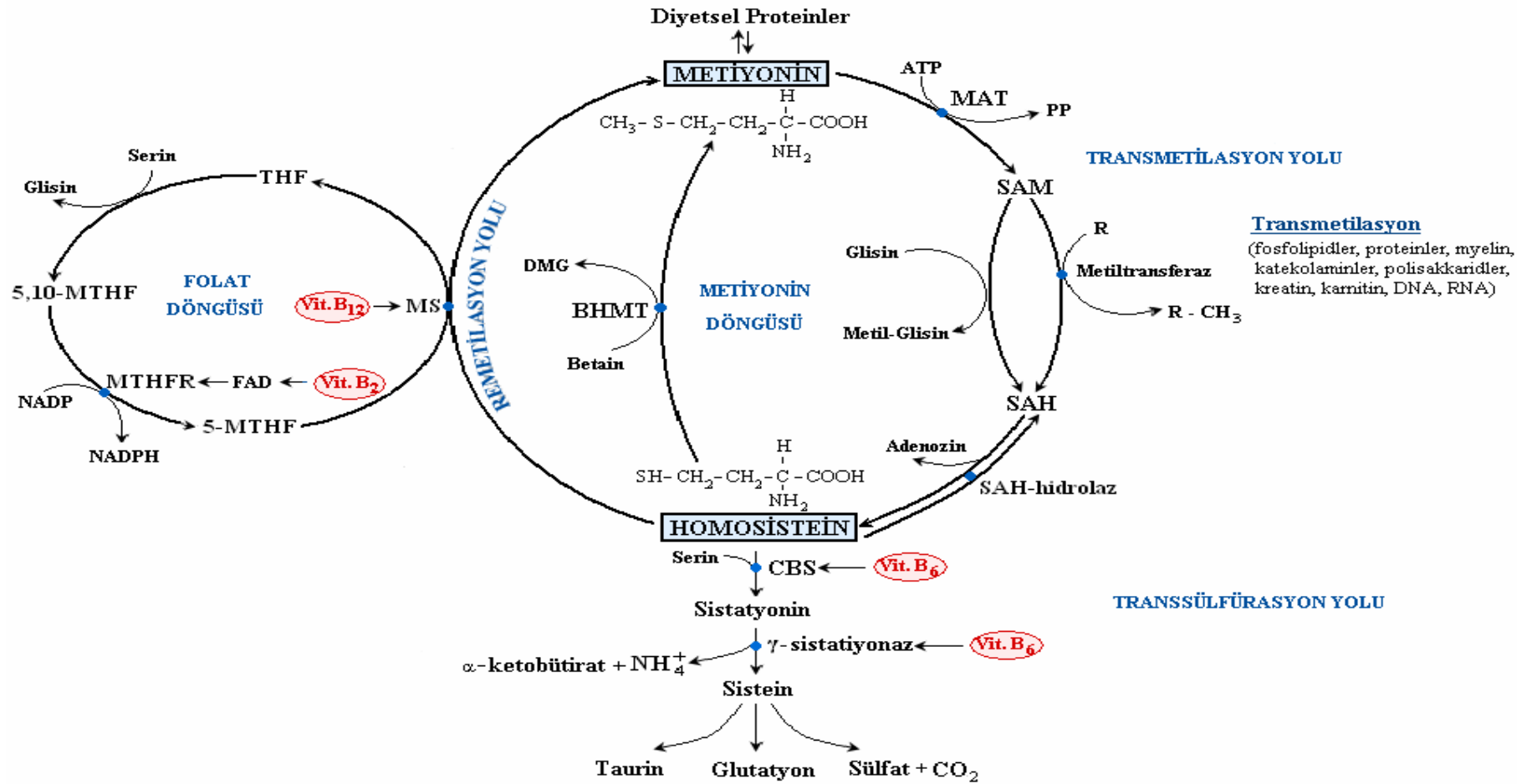
Homosisteinin remetilasyonu, hayvan dokularında yaygın olarak bulunan, 5-metiltetrahidrofolatı metil vericisi ve Vitamin B₁₂'nin bir formu olan metilkobalamini ise kofaktör olarak kullanan Metiyonin sentaz (MS) tarafından katalizlenmektedir. 5-metiltetrahidrofolatın oluşumu; tetrahidrofolattan (THF) elde edilen 5,10-metilentetrahidrofolatın redüksiyonunu katalizleyen 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaza (MTHFR; E.C. 1.5.1.20) bağımlıdır. MTHFR enzimi ise kofaktör olarak Vitamin B₂'yi (riboflavin) kullanmaktadır. Bu remetilasyon yolunda folat hem koenzim hem de kofaktör olarak kullanılmakta ve bu olay döngü şeklinde devam etmektedir (26,83,146). Bu “temel metiyonin döngüsü” bütün mormal memeli hücrelerinde görülmektedir (47).

Folat ve kobalaminden bağımsız olarak çalışan minör bir remetilasyon yolu ise böbrekte az miktarda olmak üzere, başlıca karaciğerde bulunmaktadır. Bu yolu katalize eden BHMT, metil vericisi olarak kolinin oksidasyon ürünü olan betaini kullanarak N,N-dimetilglisin ve metiyonin oluşturmaktadır. Folat ve/veya kobalamin eksikliğinde bu yol SAM sentezi için gerekli metiyoninin doku konsantrasyonunu sürdürmektedir (146).

3.1.1.3. Transsülfürasyon

Metiyonin ve homosisteinin karbon ve sülfür gruplarının katabolizması transsülfürasyon yolundaki oksidasyonlarla gerçekleşmektedir. Bu yol özellikle ortamda fazla miktarda metiyonin bulunduğu zaman kullanılmaktadır ve geriye dönüşümsüzdür. Transsülfürasyonun ilk basamağında homosistein ve serin amino asidi, sistatyonin- β -sentaz (CBS; E.C. 4.2.1.22) enzimi tarafından katalize edilen bir kondensasyon reaksiyonu ile sistatyonini oluşturmaktadır. Sistatyonin daha sonra γ -sistatyonaz enzimi ile α -ketobütirat, NH_4^+ ve sisteine metabolize edilir. Transsülfürasyon yolunun her iki enzimi kofaktör olarak Vitamin B₆'nın aktif formu olan pridoksal-5-fosfatı kullanmaktadır (83,146). Oluşan sistein, serinin karbon iskeleti ve metiyonin veya homosisteinin orijinal sülfür parçalarını içeren formu olup; glutatyonun yapısına girmekte ya da sülfata dönüşerek glikozaminoglikanların yapısına katılmaktadır. Diğer yandan, homosistein ile birleşerek sistein-homosistein disülfid bileşiklerini de oluşturabilmektedir. Transsülfürasyon yolu memeli dokularında sınırlı bir dağılım göstermekte olup, bu yolun bulunmadığı hücreler eksojen bir sistein kaynağına gerek duyarlar (45). Karaciğer, böbrek, ince barsak ve pankreas transsülfürasyon yolunun her iki enzimine de sahiptir. Bu dokularda, sistein kullanan hızlı bir glutatyon turnover'ı bulunur. Beyinde ise CBS bulunurken, γ -sistatyonaz bulunmaz ve sistatyonin bu dokuda birikir (47).

Homosistein metabolizması Şekil 1'de gösterilmiştir.



3.1.2. Homosisteinin Biyolojik Fonksiyonları

Homosistein 4 önemli biyolojik fonksiyona sahiptir:

- 1- Sistatyonin, sistein ve diğer metabolitler için prekürsör olarak,
- 2- Metiyoninin korunmasına aracı olarak,
- 3- Kolin metabolizmasında zorunlu bir basamak olan BHMT reaksiyonunda metil reseptörü olarak,
- 4- Doku folatlarının döngüsünde gerekli bir substrat olarak (Metiyonin sentaz, metiltetrahidrofolatı kullanan tek reaksiyon olduğundan, buradaki bir bozuklukta folatlar bu formda kalır) görev yapar (47).

3.1.3. Homosistein Metabolizmasının Regülasyonu

Memeli dokularında homosistein (veya metiyonin) metabolizmasının regülasyon mekanizmasını, iki metabolik alanda kompetatif reaksiyonlar arasında substrat dağılımı oluşturmaktadır. Birinci regülatör basamağı metiyoninin protein sentezi ile SAM oluşumu arasında yarışması oluştururken; ikinci basamak ise homosisteini kullanan reaksiyonları kapsamaktadır (46,47). Her iki noktada da ilgili enzimlerin doğal kinetik özellikleri ve doku konsantrasyonlarındaki değişiklikler olmak üzere bu enzim aktivitelerinin iki belirleyicisi bulunmaktadır. Bu özellikleri ile enzimler metiyonin-koruyucu ve metiyonini-katabolize edenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Metiyonini-koruyan enzimler sülfür-içeren substratlarına karşı nispeten düşük K_m değerlerine sahip olup, kendi ürünleri ve diğer metabolitler tarafından inhibe edilirler. Fazla metiyonin ile beslenen ratların karaciğerlerinde bu enzimler azalmaktadır. Üç izoenzim formuna sahip olan

metiyonin S-adenozil transferazın (MAT) düşük K_m 'li tip I ve tip II ekstrahepatik MAT izoenzimleri ile çoğu SAM-bağımlı transmetilazlar, metiyonin sentaz (MS) ve BHMT; metiyonin-koruyan gruba ait enzimlerdir. Bu enzimler ile ara özelliklere sahip adenoziilhomosisteinaz enzimi birlikte metiyonin döngüsünü oluşturmaktadır. Metiyonin-katabolize eden enzimler ise yüksek K_m değerlerine sahip olup, döngü metabolitleri tarafından aktive edilirler ve metiyonin ile beslenme sonucu bunların hepatik düzeyleri artar. Sistatyonin sentaz, sistatyonaz, yüksek K_m 'e sahip hepatik MAT III ve adenoziilhomosisteinaz ise katabolize eden enzimler grubunda yer almaktadır (46,47).

Homosistein metabolizmasının düzenlenmesinde en önemli belirleyicilerden biri S-adenozilmetiyonindir (45,145). Metiyoninden zengin hayvansal proteinlerin diyetle fazla alınması veya doku SAM düzeylerinin yaşamsal öneme sahip transmetilasyon reaksiyonlarını sürdürmek için yeterli olduğu durumlarda SAM; MTHFR aktivitesini inhibe ederek homosisteinin metiyonine remetilasyonunu baskılar (49,108). Ayrıca SAM; CBS aktivitesini ve γ -sistatyonaz aktivitesini de artırır ve homosistein transsülfürasyon yoluna girer (45,49,108). Aksine, düşük metiyonin alımı ve/veya metil grupları ve transmetilasyon reaksiyonlarına ihtiyacın arttığı durumlarda MTHFR-bağımlı folat mobilizasyonunun hızlanması ile remetilasyon yolu aktifleşir ve homosistein tekrar metiyonine dönüştürülür (108). Uzun süreli yüksek metiyonin alımı remetilasyonun inhibisyonu ile ilişkili olup, transsülfürasyon yolunun satürasyonuna yol açabilir. Bu durum homosisteinin hücrelerden dışarı atılmasına ve böylece plazma homosistein düzeylerinin yükselmesine yol açmaktadır (163).

3.1.4. Dolaşımdaki Homosistein Formları

Plazmada bulunan homosisteinin ancak %1 gibi çok az bir kısmı indirgenmiş formda bulunmaktadır. Yükseltgenmiş homosisteinin ise %80-90 kadarı başta albümin olmak üzere plazma proteinlerine disülfid bağlarla bağlanmıştır. Bağlı olmayan fraksiyon ise fizyolojik pH'da oksidasyona duyarlı olup, kendisiyle birleşerek dimer homosistein (homosistin) veya başta sistein olmak üzere diğer tiyollerle birleşerek sistein-homosistein karışık disülfidi oluşturmaktadır. Total plazma homosisteini, bu dört formun toplamıdır (71,146).

Tablo 1. Dolaşımdaki homosistein formları (71).

<u>Redükte (İndirgenmiş) Form</u>		
Homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-SH} \end{array}$	%1
<u>Okside (Yükseltgenmiş) Form</u>		
Homosistin	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	%5-10
<u>Karışık disülfidler:</u>		
Sistein-Homosistein disülfid	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{-S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	%5-10
Proteine-bağlı Homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{PROTEİN-S} \end{array}$	%80-90
SERBEST (%10-20)		
TOTAL Hcy		
PROTEİNE BAĞLI (%80-90)		

3.1.5. Homosistein Düzeyleri

Homosistein düzeyleri genel olarak total plazma homosisteini veya total serum homosisteini olarak ölçülmektedir. İnsanlarda normal total homosistein konsantrasyonları plazmada 5-15 $\mu\text{mol/L}$, serumda ise 13-18 $\mu\text{mol/L}$ olarak kabul edilmektedir. Pediatrik normal homosistein düzeyleri ise 3.7-10.3 $\mu\text{mol/L}$ arasındadır. Yapılan çalışmalarda yaşlanma, cinsiyet ve kadınlarda postmenopozal durumun homosistein düzeylerini etkilediği ortaya konulduğundan, homosisteinin normal düzeyleri belirlenirken bu durumların dikkate alınması gerekmektedir (71,83).

Normal açlık tHcy düzeylerine rağmen, bozuk homosistein metabolizmasından şüphe edilen bireylerin belirlenmesinde “*oral metiyonin yükleme testi*” uygulanmaktadır. Böylece, oral olarak metiyonin verilmesiyle indüklenen homosistein üretimi ve kullanımı arasındaki denge araştırılmaktadır. Kişiye 100 mg/kg dozda metiyonin verilmeden önce ve verildikten sonra 6 ve 8. saatlerde plazma homosistein düzeyleri ölçülmektedir. Metiyonin yüklenmesinden sonra ölçülen değerin yüklemeden önceki düzeye göre 2 standart deviasyondan daha fazla olması; veya yüklemeden 2 saat sonrası ve yükleme öncesi değerler arasındaki farkın erkeklerde $\geq 15.1 \mu\text{mol/L}$, kadınlarda ise $\geq 20.3 \mu\text{mol/L}$ ’den fazla olması metabolizmadaki muhtemel bir defekti göstermektedir (83,176).

3.1.5.1. Homosistein Düzeylerinin Ölçülmesi

Homosistein düzeylerinin ölçümü için mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde (oda ısısında 1 saat, örnekler buzda bekletiliyorsa 4 saat içinde) plazmalar ayrılmalıdır. Aksi takdirde eritrosit ve lökositlerden homosistein salınımı sonucu saatte %10-15 oranında artan yanlış yüksek sonuçlar elde edilecektir (83,85,128).

Homosistein ölçümü için farklı yöntemler kullanılabilmektedir. Bunlardan bazıları; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS), aminoasit kromatografisi, ELISA, antikor floresans polarizasyon immunoassay, elektrokimyasal ölçüm ve radyoenzimatik ölçümdür (128).

3.1.6. Hiperhomosisteinemi

Plazma total homosistein düzeylerinin 15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde olması “*hiperhomosisteinemi*” olarak kabul edilmektedir. Hiperhomosisteinemi kendi arasında hafif, orta ve şiddetli olmak üzere 3 form olarak ele alınmaktadır (71).

Tablo 2. Plazma total homosistein düzeyleri.

Normal aralık	5-15 $\mu\text{mol/L}$
Arzulanan	<10 $\mu\text{mol/L}$
<u>HİPERHOMOSİSTEİNEMİ</u>	
Hafif Form	15-25 $\mu\text{mol/L}$
Orta Form	25-50 $\mu\text{mol/L}$
Şiddetli Form	50-500 $\mu\text{mol/L}$

3.1.7. Hiperhomosisteineminin Nedenleri

Plazma homosistein düzeylerini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; genetik, edinsel, fizyolojik faktörler ile bazı kronik hastalıklar ve çeşitli ilaçlar olmak üzere sınıflandırılabilir.

3.1.7.1. Genetik Faktörler

Transsülfürasyon ve remetilasyon yollarına ait enzimlerin genetik defektleri veya eksiklikleri hiperhomosisteinemiye yol açmaktadır.

3.1.7.1.1. Transsülfürasyon Yolundaki Bozukluklar

Sistasyonin β -sentaz (CBS) Eksikliği/Defekti

Şiddetli hiperhomosisteinemi ve klasik (kongenital) homosistinürinin en yaygın genetik nedeni homozigot CBS eksikliğidir. Otozomal resesif olarak geçiş gösteren bu defektin prevalansı 1/100.000 canlı doğumdur. Homozigot bu form, total homosistein konsantrasyonlarında yaklaşık 40 kata (400 μ mol/L'ye) kadar bir artışa yol açmaktadır. Klinik bulgular arasında mental retardasyon, iskelet deformiteleri, lens dislokasyonu ve diğer oküler komplikasyonlar ile birlikte, prematür ateroskleroz ve prematür vasküler (aterotrombotik) olaylar yer almaktadır. Aterotrombotik komplikasyonlar sıklıkla genç yaşta ortaya çıkar ve ölümcüldür. Heterozigot CBS eksikliği bulunan bireylerin ise %30-50'si normal plazma homosistein düzeylerine sahiptir ve bu formda klinik bulgular daha az belirgindir (63,114).

3.1.7.1.2. Remetilasyon Yolundaki Bozukluklar

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) Eksikliği/Defekti

Hafif hiperhomosisteinemi ile ilişkili en yaygın genetik defekt, MTHFR genini kodlayan bölgedeki 677. nükleotid pozisyonunda sitozin yerine timinin gelmesi ile oluşan bir nokta mutasyonudur (C677T). Bu mutasyon fonksiyonel enzimde alanin ile valinin yer değiştirmesi ile sonuçlanarak, enzimin termolabil bir varyantının (*t*MTHFR) oluşmasına ve total aktivitesinin %55-65 düşmesine yol açar (25,57,104). Beyaz popülasyonun %10-13'ü bu mutasyon için homozigot (TT genotipi) olup, özellikle düşük folat alımı durumunda total homosisteinde orta düzeyde (yaklaşık %50 kadar) yükselme ile birlikte (63).

MTHFR'deki ikinci yaygın polimorfizm ise 1298. nükleotid pozisyonunda görülür (A1298C) ve enzimde glutamatın alanin ile yer değiştirmesi ile sonuçlanır ve enzim aktivitesinde azalmaya yol açar (104,146).

Son zamanlarda MTHFR geninde saptanan T1317C polimorfizmi ise sessiz formda olup; enzim aktivitesi, mRNA stabilitesi ve total Hcy düzeyleri üzerine etkisi henüz ortaya konulmamıştır (83).

Metiyonin sentaz (MS) Eksikliği/Defekti

Metiyonin sentazın esansiyel kofaktörü olan metilkobalaminin sentezini etkileyen beş mutasyon, MS'ın fonksiyonel yetmezliğine neden olarak hiperhomosisteinemi oluşturabilmektedir (örn: A2756G polimorfizmi) (83).

Remetilasyon yolundaki bu bozukluklara ilaveten defektif Vitamin B₁₂ transportu ve defektif B₁₂ koenzim sentezi de hiperhomosisteinemiye yol açmaktadır.

3.1.7.2. Fizyolojik Faktörler

Yaş, cinsiyet, gebelik gibi birçok fizyolojik faktör plazma homosistein düzeylerini etkilemektedir. Premenopozal kadınlarda homosistein düzeyleri, aynı yaştaki postmenopozal kadınlara ve erkeklere göre daha düşüktür. Erkeklerde homosistein düzeylerinin kadınlardan yaklaşık %25 daha yüksek olması testosteron ve kas kitlesiyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca oral kontraseptif kullanımı ve hormon replasman tedavisinin de homosistein düzeylerini düşürdüğü ve homosistein ile östradiol arasında negatif bir korrelasyonun bulunduğu ortaya konulmuştur. Her iki cinsiyette de ilerleyen yaş ile birlikte homosistein düzeyleri yükselmektedir. Cinsiyet ve yaş ile ilişkili bu farklılıklar homosistein metabolizması için gerekli vitaminlerin ve besinlerin alımındaki değişikliklerden

de etkilenmektedir. İlerleyen yaş ile birlikte homosistein düzeylerinde görülen artış; renal fonksiyonlardaki ve CBS enzim aktivitesindeki azalma ile de ilişkilendirilebilir. Gebelikte ise homosistein düzeylerinde yaklaşık %60'lık bir azalma görülmektedir. Bu da muhtemelen, homosisteinin önemli miktarda bağlandığı albumin düzeylerindeki azalmaya ve BHMT enzim aktivitesinde artışa bağlıdır (83,128,146).

3.1.7.3. Edinsel Faktörler

Hiperhomosisteinemi etiyolojisinde etkili faktörlerden biri de vitamin eksiklikleridir. Homosistein metabolizmasında görevli Vitamin B₆, B₁₂ ve folik asit kan düzeyleri total homosistein düzeyleri ile ters bir ilişki göstermektedir. Bu vitaminlerin besinsel olarak eksikliği veya yetersizliği, hiperhomosisteinemi riskini artırmaktadır (78). Beslenme alışkanlıkları ve yaşam şekli de homosistein düzeylerini etkilemektedir (83,146).

3.1.7.3.1. Vitamin Eksiklikleri

Folik Asit

Folik asit; bir pteridin halkası, p-aminobenzoik asit (PABA) ve glutamik asidin konjugasyonu ile oluşmuştur. Folik asidin etkin şekli tetrahidrofolattır.

Folatlar;

- serinden glisin sentezinde karbon donörü olarak,
- pürin ve pirimidin bazlarının sentezinde direkt olarak,
- tRNA sentezinde indirekt olarak,
- homosisteinin metiyonine remetilasyonunda yer alan metilkobalamin oluşumu için metil donörü olarak fonksiyon gösterirler.

Folik asit öncelikle intestinal hücrelerde monoglutamat formuna dekonjuge edilir. Bu form daha sonra folat redüktaz enzimi ile dihidrofolata indirgenir; bu da ikinci bir reaksiyonda dihidrofolat redüktaz enzimi ile aktif formu olan tetrahidrofolata (THF) dönüştürülür. Her iki enzim kofaktör olarak NADPH'ı kullanır. Serin, pridoksal-5-fosfat ile birleşerek THF'a bir hidroksimetil grubu transfer eder. Bu reaksiyon sonucunda 5,10-MTHF ve glisin oluşur. Bu molekül, homosistein metabolizmasına katılan metabolik aktif 5-MTHF'nin prekürsörü olarak oldukça önemlidir.

Besinle alınımda eksiklik durumları, aşırı alkol tüketenlerde olduğu gibi kullanım defektleri, malabsorbsiyon, kanser hastaları ve gebelerde artan ihtiyaç durumları, ilaçlar tarafından metabolik interferans, hemodiyalizde folat kayıpları ile aktif folik asit oluşumu için gerekli enzim veya kofaktör eksiklikleri gibi birçok faktör folik asit eksikliğine yol açmaktadır (105).

Vitamin B₁₂ (Kobalamin)

Vitamin B₁₂, hayvansal gıdalarda bulunan bir vitamin olup; siyanokobalaminler, hidrosikobalaminler, adenozil kobalaminler ve metilkobalaminler olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. Vitamin B₁₂'nin koenzim formu; 5 nitrojen ve bir karbon atomuna bağlı ve bir korin halkası ile çevrili kobalt içeren oldukça kompleks bir moleküldür.

İnsanlarda Vitamin B₁₂'ye bağımlı iki enzimatik reaksiyon bulunmaktadır:

- 1- Metilmalonik asit Vitamin B₁₂'yi kofaktör olarak kullanarak süksinilCoA'ya dönüşmektedir. Bu nedenle, Vit B₁₂ eksikliği serum metilmalonik asit düzeylerinin yükselmesine yol açmaktadır.

2- Homosisteinin remetilasyon ile metiyonine dönüşümünde Vit B₁₂ ve folik asit kofaktör olarak rol oynadıkları için; bu vitaminlerin eksikliği homosistein düzeylerinin yükselmesine yol açmaktadır (105,110).

Diyetle alınımında eksiklik durumları, Vitamin B₁₂ emilimi için gerekli olan “*Intrinsik faktör*”ün eksikliği, Vitamin B₁₂’nin taşınmasını sağlayan “*transkobalamin*”in yokluğu ile ince barsaklarla ilgili patolojiler veya ilaç kullanımı sonucu emiliminin bozulması gibi birçok faktör Vitamin B₁₂ eksikliğine yol açmaktadır.

Vitamin B₆

Vitamin B₆; piridoksin, piridoksal ve piridoksamin için kullanılan ortak bir terimdir. Bu üç bileşik, biyolojik aktiviteye sahip piridoksal fosfatın öncül yapılarıdır. Vitamin B₆’nın en önemli fonksiyonu aminoasit metabolizmasında rol almasıdır. Piridoksin; metiyoninin transaminasyonunda, dekarboksilasyonunda ve transmetilasyonunda, triptofandan niasin oluşumunda, melanin oluşumunda, glikojenden glikoz oluşumunda koenzim olarak ve 100’den fazla enzimatik olayda piridoksalfosfat kofaktör olarak rol almaktadır. Homosisteinin transsülfürasyon yolunun her iki enzimi (sistatyonin β -sentaz ve γ -sistatyonazın) kofaktör olarak Vitamin B₆’nın aktif formu olan pridoksal-5-fosfatı kullanmaktadır (83,146). Vitamin B₆; serotonin, γ -aminobütirik asit, hem, noradrenalin, histamin, safra asitleri, folik asit metabolizması ve hematopoezde etkin olarak rol alır.

3.1.7.3.2. Beslenme ve Yaşam Şekli

Metiyonin bakımından zengin hayvansal proteinlerin fazla tüketimi homosistein düzeylerinde artışa yol açarken; bitkisel ağırlıklı beslenme

alışkanlıkları ve vitamin takviyeleri ise düşük homosistein düzeyleri ile ilişkilidir (83,128). Aşırı sigara, alkol ve kahve tüketimi de homosistein düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır. Sedanter yaşam homosistein düzeylerini artırırken, fiziksel aktivite ise azaltmaktadır (71,133,146).

3.1.7.4. Kronik Hastalıklar

Homosisteinin atılımı renal yoldan olduğu için, özellikle akut ve kronik böbrek yetmezliği olmak üzere böbrekleri etkileyen hastalıklarda plazma homosistein düzeyleri oldukça yükselmektedir. Lösemi, lenfoma, over, meme, pankreas kanserleri gibi çeşitli malign hastalıklarda hücrelerin yeterince olgunlaşamaması, homosistein metabolizmasında görevli enzimlerin yeterince sentezlenememesi ve transforme hücrelerin endojen homosisteini metabolize edememelerine bağlı olarak homosistein düzeyleri artmaktadır. Hipotiroidizm, diyabet, romatoid artrit, psöriazis, Alzheimer, inme, koroner arter hastalığı, derin ven trombozu, hipertansiyon, gastrointestinal cerrahiler, kronik atrofik gastrit, malabsorbsiyon sendromları, hipogonadizm gibi birçok durumda da hiperhomosisteinemi görülmektedir (69,83,134,146).

3.1.7.5. İlaçlar

Siklosporin, diüretikler, kortikosteroidler, Vitamin B₁₂ antagonistleri (Nitröz oksit), Vitamin B₆ antagonistleri (teofilin, 6-aza-üridin triasetat), folik asit antagonistleri (fenitoin, karbamazepin), dihidrofolat redüktaz inhibitörleri (metotreksat), metiyonin sentaz inhibitörleri (Nitröz oksit), kolesterol düşürücü ilaçlar (kolestiramin, niasin) ve L-DOPA gibi pekçok ilaç homosistein düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte tamoxifen, oral kontraseptifler, penisillamin ve N-asetilsistein gibi bazı ilaçlar ise homosistein düzeylerini düşürmektedir (83,146).

Tablo 3. Plazma homosistein düzeylerini etkileyen faktörler (83,133,146).

		Plazma Hcy Düzeyi
GENETİK	Homozigot CBS defekti	↑↑↑
	Heterozigot CBS defekti	↑
	Homozigot MTHFR defekti	↑↑↑
	Heterozigot MTHFR defekti	↑
	Termolabil MTHFR defekti	↑
	Metiyonin sentaz defekti	↑
	Kobalamin mutasyonları	↑↑↑
	Down's sendromu	↓
FİZYOLOJİK	İlerleyen yaş	↑
	Erkek cinsiyet	↑
	Menopoz	↑
	Glomerular filtrasyon hızının azalması	↑
	Kas kitlesinde artış	↑
	Gebelik	↓
YAŞAM ŞEKLİ	Vitamin alımı	↓
	Aşırı hayvansal protein tüketimi	↑
	Bitkisel ağırlıklı beslenme	↓
	Aşırı sigara tüketimi	↑
	Aşırı kahve tüketimi	↑
	Aşırı alkol tüketimi	↑
	Sedanter yaşam	↑
	Fiziksel aktivite artışı	↓
HASTALIKLAR	Vitamin B ₁₂ eksikliği	↑↑↑
	Folat eksikliği	↑↑
	Vitamin B ₆ eksikliği	↑
	Böbrek yetmezliği	↑↑
	Hipotiroidizm	↑
	Çeşitli malign hastalıklar (Lösemi, lenfoma, meme, pankreas kanserleri)	↑
İLAÇLAR	Vitamin B ₁₂ antagonistleri (Nitröz oksit)	↑↑
	Vitamin B ₆ antagonistleri (Teofilin, 6-aza-üridin triasetat)	↑
	Folik asit antagonistleri (Fenitoin, karbamazepin)	↑
	Dihidrofolat redüktaz inhibitörleri (Metotreksat)	↑
	Metiyonin sentaz inhibitörleri (Nitröz oksit),	↑
	Kolesterol düşürücü ilaçlar (kolestiramin, niasin)	↑
	L-DOPA (transmetilasyonu artırıcı etki)	↑
	Siklosporinler (renal fonksiyonu azaltarak)	↑
	Aminotioller (asetilsistein, penisillamin)	↓
	Oral kontraseptifler, östrojen tedavisi	↓

3.1.8. Homosistein ve Vasküler Hastalıklar

Genel popülasyonda yapılan birçok epidemiyolojik çalışmada homosisteinin düzeylerinin koroner arter, serebrovasküler ve periferik vasküler hastalıklar, derin ven trombozu, miyokard infarktüsü ve inme için bağımsız bir risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur (18,36,39,99). Clark ve ark. (28) yaptıkları bir çalışmada miyokard enfarktüsü geçiren hastaların %40'ında, serebrovasküler hastalığı olanların %42'sinde, periferik vasküler hastalığı olanların %28'inde ve koroner vasküler hastalığı olan bireylerin %30'unda yüksek plazma homosistein düzeyleri tespit etmişlerdir.

Hiperhomosisteinemi vasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olarak ortaya konulmasına rağmen, homosistein ile indüklenen bozuklukların altındaki moleküler mekanizmalar sadece kısmen açıklanabilmiştir (83).

Aterosklerozun Homosistein Teorisi

1969 yılında McCully "*aterosklerozun homosistein teorisi*"ni öne sürmüştür (101). Vücutta homosisteinden meydana gelen oldukça reaktif bir molekül olan homosistein-tiolaktonun (HcyT), düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ile birleşmesi sonucu oluşan LDL-HcyT agregatları karaciğerden kana salındıktan sonra arter duvarındaki makrofajlar tarafından alınarak, erken aterosklerotik plağın köpük hücreleri oluşur. Bu köpük hücrelerinden, gelişen plağa yağ ve kolesterol salınırken aynı zamanda HcyT da salınarak hücrelerin oksijen kullanımı da etkilenir. Sonuç olarak hücrelerde reaktif oksijen radikalleri birikir ve arter hücrelerinde hasara neden olur. Trombosit agregasyonu, pıhtılaşma kaskadının aktivasyonu, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ile fibröz doku, mukoid matriks ve dejeneratif elastik doku oluşumu sonucunda aterosklerotik plak meydana gelir (25,101,102).

3.1.9. Hiperhomosisteineminin Patofizyolojik Mekanizmaları

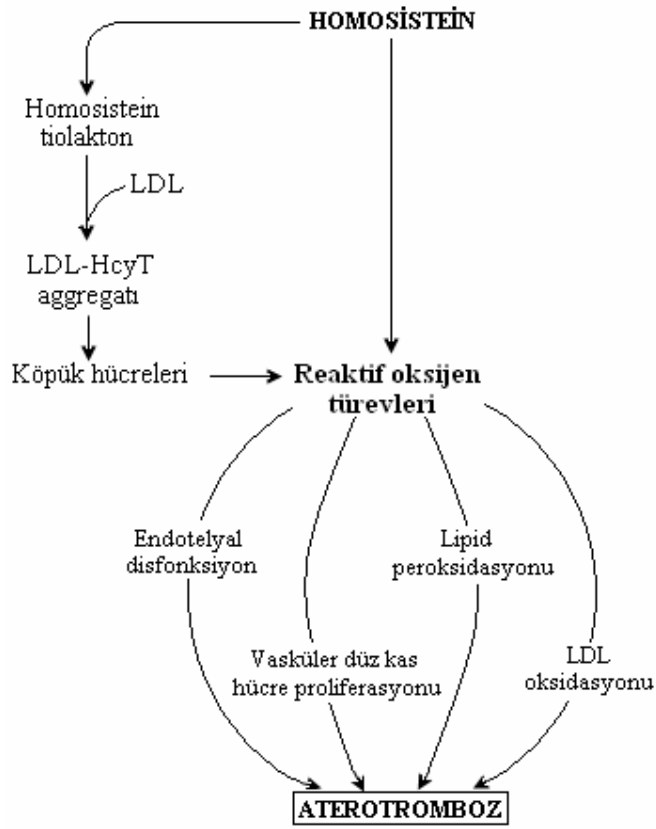
Hiperhomosisteinemi ile ilişkili atherojenik olaylar endotelial disfonksiyon ve endotelium hasarı ile başlayıp, bunu takip eden trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu ve trombüs oluşumunu kapsamaktadır (18,173).

Homosistein, pro-oksidant bir molekül olarak düşünülmektedir. Homosisteinin homosistin ve hidrojen peroksite otooksidasyonu potansiyel sitotoksik pek çok reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Homosisteinin tiyol (-SH) grubu hızlı bir şekilde okside olur ve bu oksidasyon sırasında süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikal ($OH^{\cdot}$) meydana gelir. Aterojenik olayların başlangıç basamağı reaktif oksijen türevlerinin oluşumu ile indüklenir. Bu oksijen türevleri endotelial hücre bütünlüğünü bozarak endoteliumda hasara yol açabilir ve etkilenen damarlar ateroskleroz gelişimine predispoze hale gelir (93).

Homosistein, LDL kolesterolün oksidasyonuna neden olarak LDL'nin plazmadan temizlenmesini sağlayan reseptörlere bağlanmasını engellemekte, okside LDL'nin serum düzeyini artırmakta ve endotelde köpük hücrelerine dönüşümleri sağlayarak ateroskleroza zemin hazırlamaktadır (173).

Homosistein ile indüklenen vasküler hasara ait diğer bir mekanizma ise Nitrik oksit (NO) ile ilişkilidir. NO, nitrik oksit sentaz tarafından katalize edilen bir reaksiyon sonucu L-argininden oluşan, birçok biyolojik etkiye sahip bir moleküldür. Endotelium-bağımlı bir vazodilatör olan NO, antitrombotik ve antiproliferatif bir molekül olup, kardiyak kontraktiliteyi de düzenlemektedir. Normal plazma konsantrasyonlarında Hcy, NO ile birleşerek S-nitrozo-homosisteini (SNOHcy) oluşturmaktadır. SNOHcy vazodilatör etkiye sahip olup, trombosit agregasyonu ve trombosit-aracılı vazokonstriksiyonu inhibe ederek;

NO'nun damar-koruyucu etkilerini artırmaktadır. Hiperhomosisteinemide ise, Hcy'nin otooksidasyonu sonucu oluşan reaktif oksijen türevleri NO'yu inaktive ederek vazodilatasyonun bozulmasına, trombosit agregasyonu ile vazokontrüksiyonun ise artmasına neden olur (84,146). Homosisteinin NO sentezini bozarak da NO miktarını azalttığı bildirilmiştir. NO'nun biyoyararlanımının azalmasıdaki diğer bir muhtemel mekanizması ise; endojen inhibitörü olan asimetrik dimetilarginin (ADMA) tarafından eNOS'un baskılanmasıdır (86).



Şekil 2. Homosisteinin olumsuz vasküler etkileri.

Hiperhomosisteinemi, koagülasyon ve araşidonik asit yollarını etkileyerek, endotelial antitrombotik ve profibrinolitik defansların aktivitesini azaltarak, protrombotik bir ortam oluşturmaktadır. Homosistein, heparan sülfat salınımını ve

Trombomodulin (TM) ekspresyonunu azaltmaktadır. Koagülasyon sisteminde normalde TM, Protein C'yi aktif hale getirmekte, aktif Protein C ise aktive olmuş kofaktörü Protein S ile birlikte Faktör Va ve Faktör VIIIa'yı inaktive ederek trombin oluşumunu önlemekte ve koagülasyonu baskılamaktadır. Böylece homosistein, TM-bağımlı protein C aktivasyonunu engelleyerek trombotik etki yapmaktadır (84,146). Homosistein Faktör V ve X aktivitesini artırıp, Faktör XII'yi stimüle eder, ayrıca von Willebrand faktörün düzeyini ve endotelial hücreler tarafından doku faktörü üretimini de artırmaktadır. Hiperhomosisteinemi antitrombin-III'ün hücre yüzeyine bağlanma kapasitesini de doz ve zamana bağımlı bir şekilde azaltmaktadır. Bu etkilerine ilaveten, homosisteinin doku plazminojen aktivatörünün (tPA) endotelial hücre membranına bağlanmasını azalttığı da belirtilmektedir (54,146).

Yüksek homosistein düzeyleri Lipoprotein(a)'nın fibrine affinitesini arttırarak; fibrinolizis için gerekli bir basamak olan plazminojenin fibrine bağlanmasını da inhibe etmektedir (146).

Hiperhomosisteinemi prostasiklin sentezini inhibe ederek, tromboksan B₂ sentezini ve tromboksan A₂ aktivitesini artırarak araşidonik asit metabolizmasını da etkiler, damar endotel yapısında spazm ve iskemiye yol açar (54).

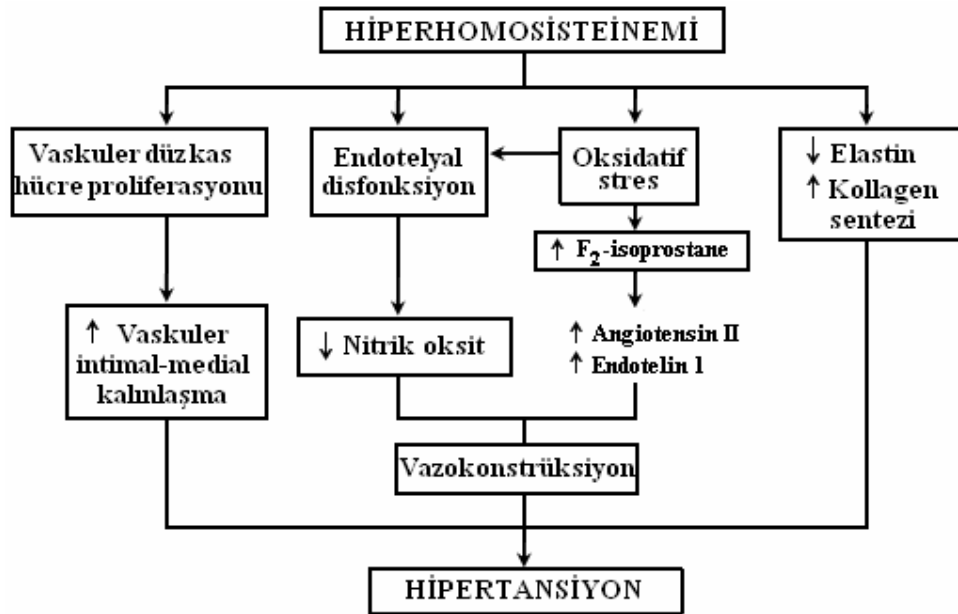
Homosistein düzeylerinin artmasının diğer bir olumsuz etkisi de endotelde bulunan ve lipid peroksidasyonunu engelleyen glutatyon peroksidaz aktivitesinin baskılanmasıdır (167).

Homosisteinin vasküler düz kas hücrelerinde DNA sentezini artırarak bu hücrelerin proliferasyonunu sağladığı ve böylece endotel hasara yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca homosisteinin vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu için esansiyel bir faktör olan transkripsiyon faktör NF-κB'yi serbest oksijen radikalleri ile aktive ederek de mutajenik etki gösterdiği rapor edilmiştir (173).

Endotelial hücre kültürleri ile yapılan bir çalışmada ise homosisteinin kolesterol homeostazında görevli enzimlerden 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA redüktazın ekspresyonunu artırarak endotelial intrasellüler ve ekstrasellüler kolesterol seviyelerini yükselttiği belirtilmiştir (66).

Hiperhomosisteineminin ateroskleroz patogeneğinde muhtemel diğer bir mekanizma ise adenzin ile ilişkilidir. Adenzinin kardiovasküler homeostazda birçok koruyucu etkisi bulunmaktadır: Koroner ve serebral arter vazodilatasyonuna aracılık eder, mikrosirkülasyonda kan akımını artırır, trombosit agregasyonunu inhibe eder, mezengial veya düz kas hücrelerinin proliferasyonunu azaltır. Homosistein metabolizmasında SAH hidrolaz tarafından katalize edilen basamak iki yönlü olduğundan; yüksek homosistein düzeylerinin plazma veya doku adenzin düzeylerinde azalma sonucu kardiovasküler hastalıklara neden olabileceği ileri sürülmüştür (77).

Hiperhomosisteineminin hipertansiyon oluşumunda da etkili olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 3).



Şekil 3. Hiperhomosisteineminin hipertansiyon oluşumunda rolü.

Hiperhomosisteineminin endotelyum, trombositler, koagülasyon kaskadı ve oksidan/antioksidan sistemler üzerine başlıca etkileri şu şekilde özetlenebilir:

Hiperhomosisteineminin Endotelyum Üzerine Etkileri

- Prokoagülantların endotelyal ekspresyonunu artırır.
- Antikoagülantların endotelyal ekspresyonunu azaltır.
- Reaktif oksijen türevlerinin oluşumu ile endotelyumu hasara uğratar.
- Hasarlanmış endotelyumun NO oluşturma yeteneği bozulur.

Hiperhomosisteineminin Trombositler Üzerine Etkileri

- Hasarlanan endotelyumda trombosit adezyonu ve trombüs formasyonunu başlatır.
- Araşidonik asit metabolizmasını değiştirerek, Tromboksan B₂ sentezini ve Tromboksan A₂ aktivitesini artırır.
- Trombositlerin yaşam sürelerini etkiler.

Hiperhomosisteineminin Koagülasyon Kaskadı Üzerine Etkileri

- Endotelyal antitrombotik ve profibrinolitik defansların aktivitesini azaltarak, protrombotik bir ortam oluşturur.
- TM ekspresyonu ve heraran sülfat salınımını azaltır.
- Protein C aktivitesi ve Antitrombin-III'ü azaltır.
- Prokoagülan aktivite, Faktör V ve XII ile doku faktörü salınımını artırır.
- tPA'nın endotelyal hücre membranına bağlanmasını azaltır.
- Fibrin oluşumunu artırır, fibrinolitik aktiviteyi bozar.

Hiperhomosisteineminin Oksidan/Antioksidan Sistemler Üzerine Etkileri

- Süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal oluşumunu artırır.
- Endotelyal glutatyon peroksidaz aktivitesinin baskılar.
- Lipid peroksidasyonunu artırır.

3.1.10. Hiperhomosisteineminin Tedavisi

Hiperhomosisteinemi tedavisinde ilk basamak, homosisteinin temel kaynağı olan metiyonin içeren hayvansal proteinlerin kısıtlanmasını ve sebze-meyve ağırlıklı beslenme alışkanlığını kapsamaktadır. Tedavideki ikinci basamak ise homosistein metabolizmasında görevli enzimlerin kofaktörleri olan folik asit, Vitamin B₁₂ ve Vitamin B₆'nın yeterli miktarda alınmasıdır.

Yüksek Hcy düzeylerine sahip hastalar; açlık plazma Hcy düzeyleri yüksek olanlar ve metiyonin yükleme testini takiben plazma Hcy düzeyleri yüksek olanlar şeklinde ikiye ayrılabilir. Birinci grup hastalarda öncelikle remetilasyon yolunu etkileyen defektler düşünülürken; ikinci grup hastalarda ise transsülfürasyon yolunu etkileyen defektler akla gelmektedir (128).

Açlık plazma Hcy düzeyleri yüksek olan hastalara 650 µg/gün dozda folat verilmesi plazma Hcy düzeylerinde %40'a kadar bir azalma sağlayabilir (18). Folat dozunun 5 mg/güne çıkarılması %10'luk ilave bir düşüş daha sağlamaktadır; fakat daha yüksek dozlarda etkisi değişmemektedir. Bu hastalara oral olarak 0.4 mg Vit B₁₂ verilmesi de Hcy düzeylerinde %10-15'lik bir azalmaya yol açar (128)

Oral metiyonin yükleme testini takiben yüksek Hcy düzeylerine sahip hastalarda folik asit ve Vitamin B₆ kullanımı eşit düzeyde etki göstermektedir.

Pratikte remetilasyon defektleri ile transsülfürasyon defektlerinin ayırımıdaki zorluklardan dolayı, orta düzeyde hiperhomosisteinemisi bulunan hastalara folat, Vitamin B₁₂ ve Vitamin B₆ içeren kombine bir tedavi tercih edilmektedir. Metiyonin sentazın fonksiyonel defektleri veya MTHFR'nin termolabil mutasyonlarını taşıyan bireylerde ise betain desteği verilebilir.

Hiperhomosisteinemi için genel olarak öngörülen tedavi yaklaşımı: 0.4-2 mg folik asit; 10-50 mg Vit B₆; 0.4-1 mg Vit B₁₂; 0.7-1 g kolin; 0.25-3 g betainin ayrı ayrı veya kombine olarak kullanılması şeklindedir. Tedaviye 8-10 hafta devam edilerek homosistein düzeylerinde önemli ölçüde düşüş sağlanmaktadır (26).

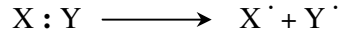
3.2. SERBEST RADİKALLER ve REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ

3.2.1. Serbest Radikaller

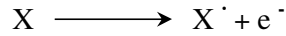
Serbest radikaller, atomik veya moleküler yapılarında eşlenmemiş elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan moleküllerdir. Hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkabildikleri gibi, çeşitli dış etkenlerin varlığında da oluşmaktadırlar. Eşlenmemiş elektrona sahip bu molekül veya atom, elektronunu bir başka moleküle vererek veya ondan elektron alarak daha stabil hale gelme eğilimindedir (2,9,27,157).

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşmaktadır (2).

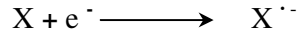
- 1- Bir molekülü oluşturan kovalent bağın hemolitik yarılması ve eşlenmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması sonucu:



- 2- Bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu:



- 3- Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu:

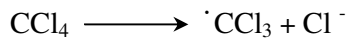


Biyolojik sistemlerdeki radikaller şu şekilde sınıflandırılabilir (9):

1. Oksijen kaynaklı serbest radikaller:

Örn: Süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen.

2. Karbon kaynaklı serbest radikaller: Örn: CCl₄



Karbon merkezli radikaller çoğunlukla O₂ ile reaksiyona girerek peroksil radikali verirler: $\cdot CCl_3 + O_2 \longrightarrow \cdot O_2CCl_3$ (Triklorometilperoksil radikali)

3. Nitrojen kaynaklı serbest radikaller:

Örn: Nitrik oksit (NO) ve fenilhidrazin radikali ($C_6H_5N=N\cdot$)

4. Sülfür kaynaklı serbest radikaller:

Tiyol bileşikleri (R-SH) geçiş metallerinin varlığında oksitlenerek $RS\cdot$ (thiyl) radikali oluştururlar: $R-SH + Cu^{+2} \longrightarrow RS\cdot + Cu^+ + H^+$

5. Transian metal kompleksleri:

Örn: Fe^{+3} / Fe^{+2} ; Cu^{+3} / Cu^{+2}

Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metallerinin de eşlenmemiş elektronları bulunmaktadır. Tam olarak serbest radikal kabul edilmemekle birlikte, bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.

6. Fosfor merkezli radikallerin de olduğu bildirilmiştir

3.2.2. Reaktif Oksijen Türevleri

Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest radikallere oksidan moleküller, *serbest oksijen radikalleri* veya en doğru adlandırma ile “*reaktif oksijen türevleri (ROS)*” de denilmektedir.

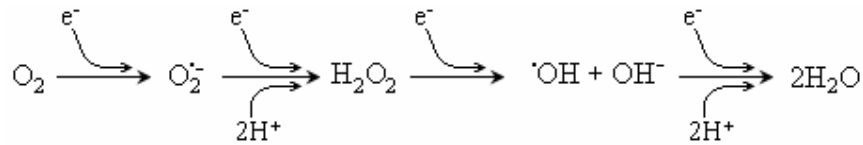
Normal metabolizma esnasında gelişen oksidasyon-redüksiyon olayları sonucunda oluşan reaktif oksijen türevleri biyolojik bir bozukluğa neden olmamasına rağmen; bazı hücrel metabolik bozukluklar nedeniyle (iskemi, inflamasyon, radyasyon, hiperoksi vb.) çok daha fazla miktarlarda üretilmeleri sonucu membranlar, nükleik asitler, enzimler ve polisakkaritler üzerinde değişik derecelerde toksik etki yaparak çeşitli dokularda hasara yol açmaktadırlar (19,187).

Bunlar; elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alış-verişi yapabilenler (*radikaller*) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşenler (*non-radikaller*) olmak üzere iki grupta toplanabilirler (Tablo 4).

Tablo 4. Reaktif oksijen türevleri.

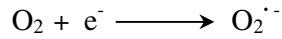
Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikal ($OH^{\cdot}$)	Singlet oksijen (1O_2)
Peroksil radikal ($ROO^{\cdot}$)	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Alkoksil radikal ($RO^{\cdot}$)	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)
Organik radikaller ($R^{\cdot}$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Organik peroksit radikali ($RCOO^{\cdot}$)	Hipohalöz asit (HOX)
Nitrik oksid ($NO^{\cdot}$)	Azot dioksit (NO_2)
Semikinon radikal ($HQ^{\cdot}$)	Ozon (O_3)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	N-halojenli aminler ($R-NH-X$)

Oksijen, elektron ilgisi yüksek olan bir element olup; normalde kademeli olarak dört basamakta suya indirgenmektedir. Bu sırada tüm aerobik solunum yapan hücreler tarafından bir elektron alıcı olarak kullanılır ve yüksek reaktiviteye sahip bileşikler oluşur (27,117):

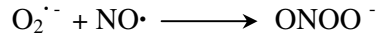


3.2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Biyolojik sistemlerde en fazla oksijen taşıyan primer serbest radikal, kendisinin protonlanmış şekli olan perhidroksi radikali ($HO_2^{\cdot}$) durumundaki süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)'dir. Bu radikalin en önemli kaynağı mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulum elektron transport zincirinden küçük elektron sızıntılarıdır. Hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşmaktadır (2,157,117):



Süperoksit radikali, organizmaya direkt olarak zarar vermemesine rağmen bir hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağıdır ve geçiş metal iyonlarının indirgenmesine neden olmaktadır. Süperoksit radikali ayrıca nitrik oksit ile reaksiyona girerek reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitriti ($ONOO^{\cdot}$) oluşturmaktadır.



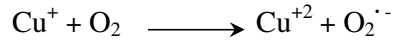
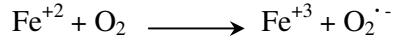
Böylece $NO^{\cdot}$ 'nin etkisi inhibe edilir. Peroksinitritlerin proteinler üzerine direkt zararlı etkileri de vardır, ayrıca daha başka reaktif ve toksik ürünlere [azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve nitronyum iyonu] dönüşebilirler (2).

Süperoksit radikalının başlıca kaynakları (50,117):

1. Elektron transport zincirinden elektron sızıntıları,
2. Aktive fagositler,
3. Ksantin ve hipoksantin'in ksantin oksidaz tarafından oksidasyonu,
4. NADPH'nin NADPH oksidaz tarafından oksidasyonu,
5. Dopamin, epinefrin, norepinefrin gibi biyolojik aminlerin otooksidasyonu,
6. Sitokrom P_{450} tarafından O_2 'nin bir elektron indirgenmesi,

7. Arjinin ve tetrahidrobiopterin defektif olduğu zaman eNOS ve nNOS tarafından O₂'nin bir elektron alarak indirgenmesi,

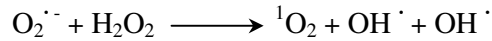
8. İndirgenmiş geçiş metallerrinin otooksidasyonu da O₂'- meydana getirebilir.



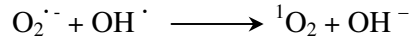
Ortamda biriken O₂'- radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler:

1. Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali (HO₂') oluşturabilir.

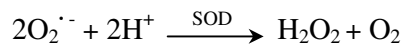
2. H₂O₂ ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ve singlet oksijen oluşturabilir.



3. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen üretimine neden olur.

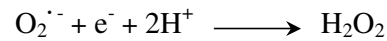
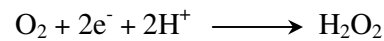


Süperoksit radikali kendiliğinden dismutasyon tepkimesi ile veya bir metaloenzim olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenerek H₂O₂ ve moleküler oksijene dönüşür:

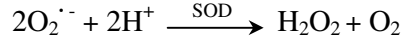


3.2.2.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya O₂' nin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek H₂O₂'yi meydana getirir (2).

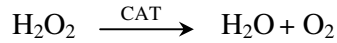


Ancak, biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl üretimi $\text{O}_2^{\cdot -}$ 'nin dismutasyonu ile olmaktadır. Bu dismutasyon spontan olarak veya Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla katalizle olabilir:



H_2O_2 gerçekte bir serbest radikal türü olmamasına rağmen; serbest elektron içermesi, serbest hidroksil radikali oluşturabilmesi ve hücrel membranlara kolaylıkla girebilmesi nedeniyle önem kazanmaktadır. H_2O_2 , geçiş metal iyonlarının varlığında kolayca parçalanarak en reaktif ve en toksik oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmaktadır. H_2O_2 ; $\text{OH}^{\cdot}$ üretmek suretiyle canlı sistemlerde önemli hasarlara sebep olduğu için, H_2O_2 akümüülasyonunun kontrolü hücreler için biyolojik olarak önemlidir (2,100).

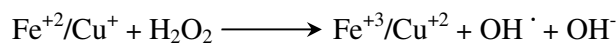
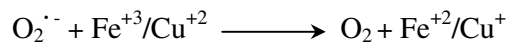
SOD aktivitesi sonucu ortaya çıkan H_2O_2 ; katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri ile su ve oksijene dönüştürülür:



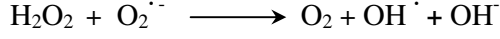
3.2.2.3. Hidroksil Radikali ($\text{OH}^{\cdot}$)

Hidroksil radikali; hemen hemen bütün moleküllerle reaksiyona girebilen çok reaktif bir yapı olup, oksidatif strete en güçlü oksidan olarak bilinmektedir. Biyolojik sistemlerde hidroksil radikali birkaç şekilde oluşabilmektedir (13,52,79)

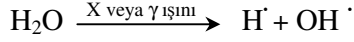
1. **Fenton reaksiyonu:** Hidrojen peroksit, Fe^{+2} ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek $\text{OH}^{\cdot}$ radikali oluşur (117):



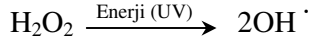
2. **Haber-Weiss reaksiyonu:** Hidrojen peroksit $O_2^{\cdot -}$ ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur.



3. Suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyona maruz kalmasıyla da $OH^{\cdot}$ oluşur:

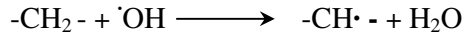
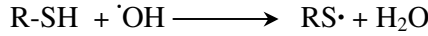


4. H_2O_2 'nin UV ışığına maruz kalması ile de $OH^{\cdot}$ oluşabilir:



$OH^{\cdot}$ hücresel DNA hasarının oluşumundan ve iyonize radyasyonun membranlara etkisinden sorumludur.

Hidroksil radikali, tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına da sebep olmaktadır (2):



Hidroksil radikali, lipid peroksidasyon prosesini de başlatmaktadır.

3.2.2.4. Singlet Oksijen (1O_2)

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türevleri arasında yer alan 1O_2 serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. 1O_2 , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi, süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (2,139).

3.2.3. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikallerin başlıca iki önemli kaynağı vardır:

1. Endojen Kaynaklar:

- *Küçük moleküllerin otooksidasyonu*; tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler vb. (2,27,61,118)
- *Çözünür enzimler ve proteinler*; ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenaz, dihidroorotat dehidrogenaz, aminoasit oksidaz gibi enzimler, hemoglobin vb. (2,33)
- *Mitokondrial elektron transportu*
- *Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri*; sitokrom P₄₅₀, sitokrom b₅ (2,23).
- *Peroksizomlar*; oksidazlar, flavoproteinler
- *Plazma membranı*; lipoksijenaz, NADPH oksidaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu.
- *Oksidatif stres oluşturan durumlar*; iskemi, travma, intoksikasyon.
- *Aktive olmuş fagositler (solunumsal patlama)*

2. Eksojen Kaynaklar:

- *Çevresel ajanlar*; hava kirliliği, hiperoksijenasyon, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar vb.
- *Radyasyon*
- *Antineoplastik ajanlar*; nitrofurantoin, bleomisin, adriamicine vb.
- *Bağımlılık yapan maddeler*; alkol, uyuşturucu vb.
- *Sıcak şoku, güneş ışınları*
- *Karsinojen maddeler*
- *Stres*; katekolamin düzeylerinde artış ve bunların oksidasyonu sonucu.

3.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Organizma fizyolojisinde birçok reaksiyonda rol oynayan serbest radikallerin aşırı üretilmesi veya antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda; doku hasarına neden olan oksidatif strese bağlı olarak, özellikle serbest radikallerin hedef hücrel makromoleküller olan membran lipitleri, DNA, karbonhidratlar, proteinler ile reaksiyona girmeleri sonucu hücre hasarı hatta ölümü meydana gelebilir (59,92,151,177).

3.2.4.1. Proteinlere Etkileri:

Radikallerle ilgili protein hasarı elektron sızıntısı, metal iyon bağımlı reaksiyonlar, lipid ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilir. Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri, aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikal hasarına açıktırlar (2,41). Bu aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerin parçalanmasına, çapraz bağ oluşumuna, agregasyona ve proteinlerin proteolitik parçalanmaya yatkın hale gelmesine neden olmaktadır.

3.2.4.2. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

Serbest radikaller DNA yapısında mutasyon, karsinogenez ve hücre ölümüne yol açabilirler. Serbest radikaller etkilerini DNA'nın temel taşı olan nükleotid yapısındaki purin ve pirimidin bazları üzerinde gösterirler. Sitotoksiste büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom

değişikliklerine yada DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Radikaller aracılığı ile özellikle guanin bazının hidroksilasyonu sonucu DNA molekülünün yapısı değişerek mutasyonlar ortaya çıkmaktadır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar. Ayrıca, aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 de membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (2,56).

3.2.4.3. Karbonhidratlara Etkileri

Fizyolojik pH ve sıcaklıkta glikoz gibi monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda birçok patolojik proseste rol oynayan hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler oluşmaktadır. Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (2,62).

3.2.4.4. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

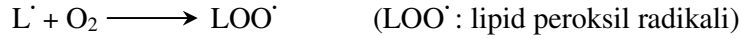
Serbest radikal hasarına en hassas biyomoleküller membran lipidleridir. Lipid peroksidasyonu; membran yapısını teşkil eden fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki poliansature yağ asitlerinin (PUFA), reaktif oksijen türevleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi sekonder ürünlere yıkılma reaksiyonudur (81). Lipid peroksidasyonu hedef sistemlerin yapı ve fonksiyonlarını bozan dejeneratif bir süreç olup (56); kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (2).

Biyolojik membranlarda serbest radikallerle indüklenen lipid peroksidasyonu; başlangıç basamağı, ilerleme ve yayılma basamağı ile sonlanma basamağı olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir (11,56,81,140):

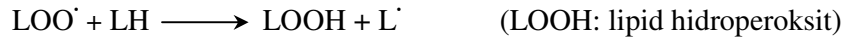
1. Serbest radikal doymamış yağ asidinin bir metilen karbonuna bağlı bir H^+ atomunu koparır ve lipid radikali oluşur. Oluşan lipid radikali konjuge diene dönüşür.



2. Oluşan karbon merkezli radikal O_2 ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini oluşturur.



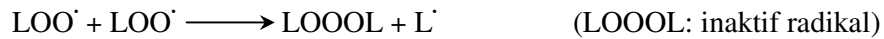
Oluşan lipid peroksil radikali başka bir yağ asidi ile reaksiyona girer; kendisi lipid hidroperokside indirgenirken, yağ asidi lipid alkil radikaline dönüşür.



Lipid peroksitler ortamda geçiş metal iyonlarının varlığında tekrar radikal haline dönüşürler ve lipid peroksidasyonun daha da ilerlemesi ve zincirleme reaksiyonun yayılmasına neden olur.



3. Yayılma aşamasından sonra ya iki radikal birleşerek inaktif, radikal olmayan bir ürün oluştururlar yada bir antioksidan tarafından ortadan kaldırılırlar.



Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehyitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olmaktadır. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması nedeniyle reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikrovizkozitesi önemli şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid (MDA), membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklamaktadır (2).

Serbest radikaller bütün bu etkilerinden dolayı birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadırlar. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, ateroskleroz, kardiovasküler hastalıklar, hipertansiyon, kanser, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit ve çeşitli immün hastalıklar ile yaşlılık gibi birçok hastalık durumunda serbest radikal üretimi artmakta ve antioksidan savunma mekanizmaları yetersiz kalmaktadır (19,74,98,151,177). Ancak bu hastalıkların çoğunda serbest radikallerin hastalığın sebebi mi yoksa bir sonucu olarak mı meydana geldikleri tam olarak bilinmemektedir.

3.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Normal fizyolojik koşullarda hücreler, oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur.

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (2,142):

1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- a) Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
- b) Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- c) Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- a) *Toplayıcı (scavenging) etki*: Reaktif oksijen türevlerini etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme. (örneğin; antioksidan enzimler)
- b) *Bastırıcı (quencher) etki*: Reaktif oksijen türevleri ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivitelerini azaltma veya inaktif hale dönüştürme (örneğin; flavinoidler, vitaminler)
- c) *Onarıcı (repair) etki*
- d) *Zincir kırıcı (chain breaking) etki*: Reaktif oksijen türevlerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki. (örneğin; hemoglobin, seruloplazmin, mineraller)

Antioksidanlar; endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki grupta sınıflandırılabilir (Tablo 5).

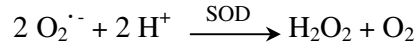
Tablo 5. Antioksidanların sınıflandırılması.

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
1. Enzimatik Antioksidanlar	2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	I. Makromoleküller	II. Mikromoleküller
- Süperoksit Dismutaz (SOD)	- Seruloplazmin	- Vitamin E
- Katalaz (CAT)	- Transferin	- Vitamin C
- Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	- Ferritin	- Vitamin A
- Glutasyon Redüktaz (GR)	- Hemoglobin	- Tiyol içerenler:
- Glutasyon-S-transferaz (GST)	- Miyoglobin	Glutasyon
- Mitokondrial sitokrom oksidaz		N-asetil sistein
- Hidroperoksidaz		Metiyonin
		Kaptopril
		- Glukoz
		- Ürik asit
		- Bilirubin
		- Albumin
		- Ubiquinon
		- Melatonin
		- Selenyum
		- Lipoik asit
EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR		
- Ksantin oksidaz inhibitörleri	- Trolox-C	
Allopurinol	- Endojen antioksidan aktiviteyi artıran mad.	
Oksipurinol	Ebselen, Asetilsistein	
Folik asit	- Non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları	
- NADPH oksidaz inhibitörleri	Mannitol, DMSO	
Adenozin	- Demir şelatörleri	
Lokal anestezikler	Desferroksamin	
Kalsiyum kanal blokörleri	Dimetiltiyoüre	
Non-steroid antiinflamatuvarlar	- Sitokinler	
- Nötrofil adezyon inhibitörleri	TNF, İnterlökin-1	
- Soya fasulyesi inhibitörleri	- Barbitüratlar	
- Rekombinant human-SOD	- Flavonoidler	

3.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

3.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)

Süperoksit Dismutaz (SOD), süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmesini katalizleyerek organizmayı toksik reaktif oksijen metabolitlerine karşı koruyan bir metalloenzimdir (79,147).



Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılır. Çünkü $\text{O}_2^{\cdot-}$, zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki $\text{O}_2^{\cdot-}$ düzeyleri kontrol altında tutulur.

Bütün canlılardaki SOD, kofaktör olarak içerdği metal iyonuna göre dört izoenzim halinde sınıflandırılabilir (98,175):

1. Cu/Zn-SOD: Sitozolik SOD ve vasküler endotele bağlı bulunan ekstrasellüler SOD’un kofaktörleri çinko ve bakırdır. Bu enzimlerin aktivitelerinden bakır, stabilitelelerinden çinko sorumludur.
2. Mn-SOD: Mitokondrial SOD’ın kofaktörü mangandır.
3. Fe-SOD: Bazı bakterilerde saptanmıştır.
4. Ni-SOD: Bazı bakterilerde bulunur. Aminoasit kompozisyonu diğer izoenzimlerden farklıdır.

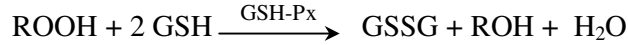
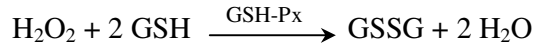
İnsanlarda SOD enzimi: sitozolik Cu/Zn-SOD; mitokondrial Mn-SOD; plazma, lenf ve sinovyal sıvılarda bulunan ekstrasellüler SOD olmak üzere 3 formda bulunur (98).

3.3.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozolde yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir (98,117). GSH-Px

enziminin selenyum bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki formu bulunur. Selenyum bağımlı izoenzim selenosistein formunda olup; hem H₂O₂'ye hem de hidroperoksitlere etki etmektedir. Selenyuma bağımlı olmayan form ise hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olup; sadece lipid hidroperoksitlerin yıkımında görev alır (147).

GSH-Px, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG, glutatyon disülfid) oksidasyonunu katalize eder; bu arada H₂O₂ ise suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur:



3.3.1.3. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalaz (CAT); esas olarak peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoproteindir (2,98,147). Oksidazların aktivitesi ile oluşan H₂O₂'yi direkt suya çevirir. Böylece toksik hidroksil radikallerinin sentezlenmesi ve H₂O₂'nin vücutta birikimi engellenmiş olur. Katalaz enzimi iki önemli reaksiyonu katalize etmektedir (147):

- Hidrojen peroksitin dismutasyonu
- Alifatik alkollerin peroksidasyonu

Katalaz, H₂O₂'nin oluşum hızının düşük olduğu veya elektron vericisinin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda peroksidatif reaksiyonla etkir:

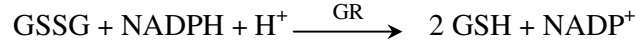


H₂O₂ oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda katalitik reaksiyonla etkir:



3.3.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2)

Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutasyonun tekrar indirgenmiş şekle dönmesi gerekir. Glutasyon redüktaz NADPH varlığında, oksitlenmiş glutasyonun (GSSG) indirgenme reaksiyonunu katalizler (147).



3.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

3.3.2.1. Vitamin C (Askorbik Asit: AA)

Askorbik asit; kollagen sentezi, demir emilimi ve hücrelerin redoks durumunun devamlılığı için gerekli, suda çözünen, düşük molekül ağırlıklı bir antioksidandır (151). Prokollagen, katekolamin ve karnitin biyosentezi için kosubstrat olarak rol oynamaktadır (51). Organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında güçlü bir indirgeyici ajan olarak görev yapan Vitamin C; birçok reaktif oksijen türevini ($\text{OH}^\cdot$, $\text{ROO}^\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, HOCl ve O_3), reaktif nitrojen türevlerini (ONOO^-) ve antioksidan-kaynaklı radikalleri (α -tokoferoksil ve ürat radikalleri) toplayıcı etkiye sahip güçlü bir antioksidandır (24). Askorbik asit bu radikallerle reaksiyona girerek, bir ara ürün olan semidehidroaskorbat aracılığıyla metaboliti olan dehidroaskorbik asidi (DHA) oluşturur. Vitamin C ayrıca tokoferoksil radikalinin α -tokoferole indirgenmesini de sağlayarak E vitamininin rejenerasyonunda da görev almaktadır. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde LDL'yi oksidasyona karşı korumaktadır. C vitamini yüksek ve fizyolojik konsantrasyonlarda antioksidan etki gösterirken, düşük konsantrasyonlarda Na^+K^+ -ATPaz aktivitesini azaltır ve membran fosfolipid yapısını değiştirerek lipid peroksidasyonunu artırır. Bu şekilde C vitamini doza bağımlı olarak paraoksal bir etki göstermektedir (60,147).

3.3.2.2. Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin E, lipid fazda çözünen zincir-kırıcı etkiye sahip bir antioksidandır. E vitamini aktivitesine sahip 4 tokoferol ve 4 tokotrienol bulunmaktadır. Dokularda Vitamin E aktivitesinin yaklaşık %90'ından sorumlu en aktif ve en yaygın formu α -tokoferol'dur. Yapısında izoprenoid yan zinciri bulunan vitaminin aktif kısmını fenolik hidroksil grubuna sahip olan aromatik halka oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (2,117,147). Güçlü bir antioksidan olan E vitamini hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansature yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E; süperoksit, hidroksil radikali, singlet oksijen, lipid peroksi radikali ve diğer radikalleri indirger. Vitamin E peroksitlerin yapımını engellerken, GSH-Px ise oluşan peroksitleri ortadan kaldırdığı için bu iki antioksidan birbirini tamamlayıcı etkiye sahiptir. Alfa-tokoferol lipid peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksid ve tokoferoksil radikalini oluşturur. Böylece lipid peroksidasyonunun ilerleme ve yayılmasını önler. Bu sırada oluşan tokoferoksil radikali stabil bir moleküldür. Lipid peroksidasyonunu başlatacak kadar reaktif olmayan bu radikal glukuronik asit ile konjuge edilerek safra yoluyla atılmaktadır (2,147,172).

3.3.2.3. Vitamin A (β -karoten)

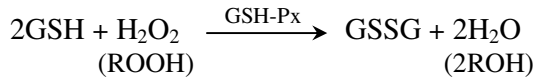
Vitamin A'nın metabolik öncül maddesi olan β -karoten, plazmada α -tokoferole oranla çok düşük düzeylerde bulunmasına rağmen; aynı şekilde serbest radikal yakalayıcı olarak görev yapmakta ve doku hasarını önlemektedir. Beta-karoten singlet oksijeni baskılayıp, süperoksit radikalini temizleyerek ve peroksi radikalleri ile direkt etkileşerek antioksidan özelliklere sahiptir. Düşük

oksijen parsiyel basıncında β -karoten, daha yüksek oksijen konsantrasyonlarında ise α - tokoferol peroksit radikallerinin dokularda yakalanmasından sorumludur (2,185).

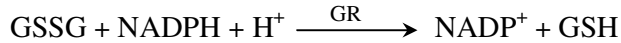
3.3.2.4. Redükte Glutasyon (GSH)

Glutasyon (L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin); glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptiddir. Aktif grubu sisteinin sülfhidril (-SH) grubudur. Redükte (GSH) ve okside (GSSG) şekilde bulunan glutasyon hücrenin oksidasyon-redüksiyon dengesini koruyan önemli bir indirgen ve antioksidan olup; hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır (2).

GSH; GSH-Px'in katalizlediği bir reaksiyonla okside hale dönüşür.



Okside glutasyon; glutasyon redüktazın katalizlediği NADPH bağımlı bir reaksiyonla tekrar redükte hale gelir.



GSSG'nin total glutatyona (GSH+GSSG) oranı, oksidatif stres için sensitiv bir indikatör olarak değerlendirilmektedir (34).

Çok önemli bir antioksidan olan glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır. Ayrıca proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutarak oksidasyondan korur ve fonksiyonel protein ve enzimlerin inaktivasyonunu önler. GSH, glutasyon-S-transferaz enziminin katalizi ile endojen ve eksojen toksik bileşikler de konjuge etmektedir (2,34).

3.4. LİPOİK ASİT

Alfa-Lipoik asit (α -LA; 1,2-dithiolan-3-pentanoik asit; 6,8-dithio-oktanoik asit veya tioktik asit) mikroorganizmalardan insanlara kadar bütün organizmalarda enerji metabolizmasında kofaktör olarak gerekli olan ve son zamanlarda antioksidan özellikleri ortaya konulan bir moleküldür (116,126).

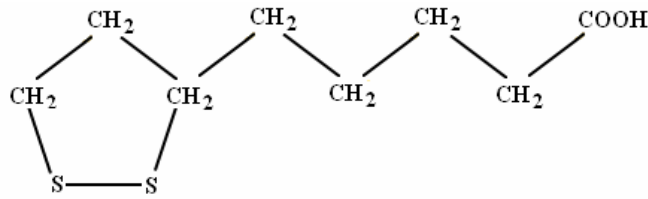
İlk olarak 1937’de, bazı bakterilerin gelişimleri için patates ekstraktında bulunan bir maddeye gereksinim duydukları ortaya konulmuş ve bu maddeye “*potato growth factor*” denilmiştir. 1951’de ise Reed ve arkadaşları tarafından bu madde tonlarca karaciğerden birkaç miligram olarak izole edilmiş ve α -lipoik asit olarak adlandırılmıştır (42,123,124).

3.4.1. Lipoik Asidin Genel Özellikleri ve Kaynakları

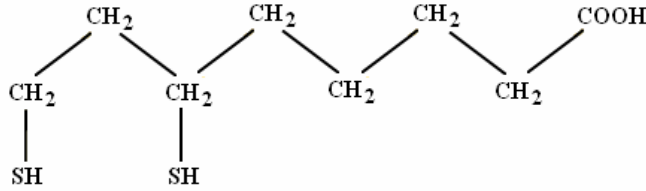
Lipoik asit (LA) bakterilerden insanlara kadar birçok organizmada sentezlenmektedir. İnsanlarda karaciğer ve diğer dokular tarafından sentezlenerek, doğal bir kofaktör olarak görev yapmaktadır (42). LA predominant olarak beyin, böbrek, karaciğer, ince barsak ve iskelet kaslarında bulunmaktadır. Memeli dokuları 5-25 nmol/g LA içermekle birlikte, bunun hemen hemen tümü proteine-bağlı formda bulunup, dışarıdan verilmediği sürece hücrede sadece çok az serbest LA bulunmaktadır (131). Çeşitli sebze ve meyveler ile hayvansal dokular farklı düzeylerde *lipoillizin* formunda R-LA içerirler. Ispanak başta olmak üzere brokoli, domates, bezelye, Brüksel lahanası ve pirinç α -LA içeren bitkisel kaynaklardır. Kalp, karaciğer ve böbrek gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip hayvansal dokular da α -LA bakımından zengin kaynaklardır (109,124).

3.4.2. Lipoik Asidin Yapısı

Alfa-Lipoik asit yapısında iki sülfür atomu ve bir karboksilik asit grubu bulunan beşli bir halka içermektedir. α -LA kendi orijinal okside formunda yada dihidrolipoik asit (DHLA;) şeklinde redükte formda bulunabilir. LA diyetten hızla emilir, transport sonucu hücreler tarafından alınarak, beyin dahil birçok dokuda redükte formu olan DHLA'ya indirgenir (42,123,124,126,131). Alfa-LA; DHLA'ya indirgendiği zaman molekülün uç kısmındaki atomların oluşturduğu dithiolan halkası kırılır ve sülfür atomları sülfhidril (-SH) grupları şekline dönüşür. α -LA ve DHLA'nın yapıları Şekil 4'de verilmiştir.



α -Lipoik Asit (α -LA)



Dihidrolipoik Asit (DHLA)

Şekil 4. α -LA ve DHLA'nın yapıları.

α -LA'nın DHLA'ya indirgenmesi;

Mitokondri bulunan çoğu hücrede α -LA dihidrolipoamid dehidrogenaz (E_3 enzimi -mitokondriyal α -ketoasit dehidrogenaz kompleksi- E.C.1.8.1.4) tarafından NADH-bağımlı bir reaksiyon ile DHLA'ya indirgenir (73,125). Mitokondri bulunmayan hücrelerde ise indirgenme NADPH-bağımlı olarak

glutasyon redüktaz (31,73) ve thioredoksin redüktazlar (8,73) tarafından gerçekleştirilir. Ayrıca sentetik olarak NaBH₄ ile de indirgenme oluşabilir. LA'nın antioksidan özelliklerine büyük ölçüde indirgenmiş formunun katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (15,131).

3.4.3. Lipoik Asidin Fonksiyonları

Alfa-LA'nın vücutta iki şekilde fonksiyon yaptığı düşünülmektedir. Bunlardan ilki, metabolik süreçlerde koenzim olarak görev alması; ikincisi ise suplementasyon yoluyla ulaşılan dozlarda antioksidan özellikler göstermesidir. Lipoik asit; α -ketoglutarat dehidrogenaz, dallı zincir α -ketoasit dehidrogenaz, pirüvat dehidrogenaz multienzim kompleksleri için kofaktör olarak rol oynayıp, enerji metabolizmasında çok önemli bir yere sahiptir (116,123). α -LA'nın karboksilik grubu pirüvat dehidrogenaz komplekslerinin dihidrolipoil transasetilaz subünitine (E₂) spesifik lizin ϵ -amino grubuna amid bağı ile kovalent olarak bağlanır. α -LA ayrıca glisin dekarboksilaz kompleksinin H proteinine de bağlanır ve glisinin CO₂, amonyak, 5,10-MTHF ve NADH'a reversible oksidasyonunu katalize eden glisin cleavage sistemin de bir bileşenidir (22,116,117,123,126).

3.4.4. Lipoik Asidin Antioksidan Özellikleri

Bir bileşiğin antioksidan potansiyeli değerlendirilirken bazı kriterler göz önünde bulundurulmaktadır: *a)* serbest radikalleri temizleme spesifitesi, *b)* diğer antioksidanlarla etkileşimi, *c)* metallerle şelat yapma yeteneği, *d)* absorpsiyonu, biyolojik yararlılığı ve hücre konsantrasyonu, *e)* gen ekspresyonuna etkileri, *f)* molekülün membran veya akuöz fazda lokalize olması, *g)* oksidatif hasarı onarma yeteneği (116,126,131).

Bir maddenin iyi bir antioksidan olması için bu özelliklerin tümüne sahip olması gerekmez. Örneğin Vitamin E vücutta iyi bir antioksidan olarak düşünülmesine rağmen sadece membran ya da lipid fazda etkisini gösterip özellikle lipid peroksil radikallerini nötralize ederken, akuöz fazdaki radikallere karşı çok az ya da hiç etki göstermemektedir (126).

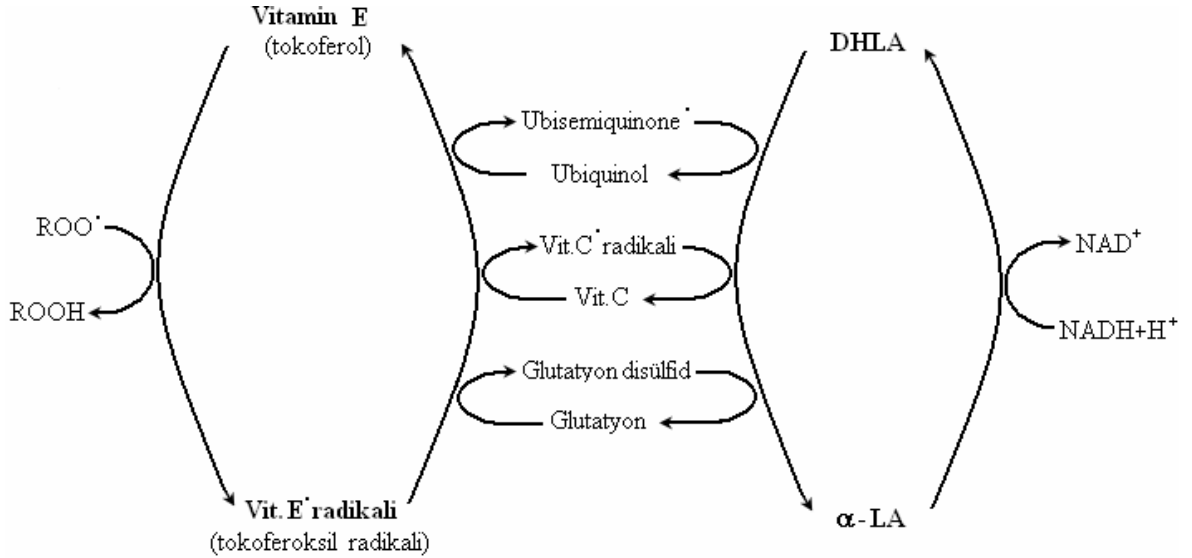
İdeal bir antioksidan ise yukarıdaki kriterlerin tümünü sağlamalıdır. α -lipoik asit/dihidrolipoik asit redoks çifti, diğer antioksidanlarda bulunmayan bazı özelliklere sahiptir. α -lipoik asit “*ideal*”, “*eşsiz*” ve “*evrensel antioksidan*” olarak tanımlanmaktadır. Bunun nedenleri:

1. **Hızla absorbe edilmesi:** Diyet ya da dışarıdan alınan α -LA hızlı bir şekilde absorbe edilir. Birçok dokuya dağılır ve kan-beyin bariyerini de geçer (109,126).
2. **Redükte ve okside formlarının antioksidan etkiye sahip olması:** α -LA hücre içerisinde DHLA'ya indirgenir ve antioksidan yeteneklerine büyük ölçüde indirgenmiş formunun katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (15,131). Çoğu antioksidan bileşik sadece indirgenmiş formda bulundukları zaman antioksidan olarak rol oynamasına rağmen (örn: redükte glutatyon), α -LA'nın hem okside hem de redükte formu kuvvetli antioksidanlar olarak rol oynarlar (126). DHLA'nın tiyol grupları için yüksek pKa'sı (10.7) bu molekülün, pKa'sı 9.45 olan GSH'dan bile daha kuvvetli bir nükleofil olduğunu göstermektedir (15).
3. **Hem sıvı, hem de lipid fazda çözünmesi:** α -LA, amfifilik özellik gösterip hem sıvı hem de lipid fazda çözünebilmektedir. Bu özelliği oldukça önemlidir. Çünkü suda çözünen antioksidan bileşikler (örn: Vit C) hücre içinde, yağda

çözünen antioksidanlar (örn: Vit E) ise hücre membranında bulunurken; α -LA ve DHLA hem hücre içinde hem de membran düzeyinde etki göstererek çift koruma sağlamaktadır (15,76,125,126,131).

4. Glutasyon düzeylerini artırması: α -LA, hücrelerde başlıca antioksidan olan glutasyon üretimini stimüle etmektedir (21).

5. Diğer antioksidanlarla etkileşimi: α -LA; Vitamin C (95), Vitamin E (143), glutasyon (21) ve koenzim Q (75)'u da kapsayan çeşitli antioksidanları aktif durumlarına dönüştürüp yeniden oluşturma yeteneğine sahiptir (123,124,178).



Şekil 5. Lipoik asidin diğer antioksidanlarla etkileşimi.

6. Serbest metal iyonlarıyla şelat yapması: α -LA; geçiş metal iyonlarıyla şelat yapma yeteneğine sahiptir. Arsenik, kadmiyum, kurşun, civa gibi toksik metallerle çözünmeyen kompleksler oluşturduğu ortaya konulmuştur. α -LA ve DHLA'nın şelasyon yaptığı geçiş metalleri: Pb^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3}/Fe^{+2} , Ni^{+2} (15,126,131).

7. **Serbest radikalleri nötralize etmesi:** α -LA ve DHLA; $\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{LOO}^\cdot$, $\text{NO}^\cdot$ ve HOCl 'yi içeren çeşitli radikallere karşı antioksidan olarak rol oynarlar. Ayrıca $^1\text{O}_2$ ve H_2O_2 ile de etkileşime girdikleri bilinmektedir (15,124). DHLA mükemmel bir indirgeyici ajandır ve serbest radikale bağlı patolojilere karşı insanlardaki antioksidan defansları artırıcı potansiyele sahiptir (76).

Tablo 6. α -LA ve DHLA'nın nötralize ettiği radikaller.

Radikaller	α -LA tarafından toplananlar	DHLA tarafından toplananlar
Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	-	+
Hidroksil radikal ($\text{OH}^\cdot$)	+	+
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	+	+
Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)	+	+
Peroksinitrit ($\text{ONOO}^\cdot$)	+	+
Peroksil radikal ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$)	+	+
Nitrik oksit radikali ($\text{NO}^\cdot$)	+	+
Hipokloröz asit (HOCl)	+	+
Lipid peroksil radikali ($\text{LOO}^\cdot$)	-	+

8. **Normal gen ekspresyonunu artırması**
9. **Birçok hastalıkta terapotik olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olması:**
 α -LA'nın; klinik olarak mantar zehirlenmesi ve metal toksisitesinin tedavisinde kullanılmanın yanı sıra; yukarıda bahsedilen önemli etkileri ile iskemi-reperfüzyon hasarı, diabet, katarakt oluşumu, HIV aktivasyonu, nörodejenerasyon ve radyasyon hasarı gibi çeşitli oksidatif stres modellerinde yararlı olduğu ortaya konulmuştur (126).

3.5. AMAÇ

Serbest radikal üretimi ve çeşitli mekanizmalar yoluyla vasküler ve kardiovasküler hastalıklarla ilişkili bulunan hiperhomosisteineminin çeşitli zararlı etkilerinin, serbest radikalleri temizleyen ve oldukça kuvvetli “ideal” bir antioksidan olarak düşünülen α -lipoik asit tarafından ne yönde etkileneceği konusunda bu güne kadar hiç çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında kronik hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda Hcy’nin oksidan-antioksidan sistemler üzerinde nasıl etki gösterdiği ve α -LA’nın bu etkiler üzerinde ne şekilde değişiklikler yapacağının araştırılması amaçlanmıştır.

Oksidan-antioksidan sistemin ne yönde etkilendiğinin değerlendirilmesi amacıyla çalışmamızda hiperhomosisteinemi oluşturulan ve hiperhomosisteinemi ile birlikte lipoik asit uygulanan ratlarda plazma ve dokularda lipid peroksidasyonun göstergesi olarak MDA düzeyleri ile eritrosit ve dokularda SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzim aktiviteleri ölçülecektir. Ayrıca lipoik asit ile de etkileşime giren Vitamin E ve Vitamin C ile yine antioksidan özelliğe sahip Vitamin A düzeyleri de değerlendirilecektir. Bununla birlikte; homosistein metabolizmasına katılan folik asit, Vitamin B₁₂ ve Vitamin B₆ düzeyleri de incelenecektir. Lipid parametrelerinin homosistein ve lipoik asitten ne yönde etkileneceğinin araştırılması da çalışmanın diğer bir amacıdır. Bütün bu biyokimyasal parametrelerin dışında; özellikle homosisteinin damar yapısında meydana getireceği muhtemel hasarların araştırılması için ratlardan alınan aort örneklerinin histopatolojik incelemesi yapılacak; ve yine lipoik asidin damar hasarı üzerine olumlu etkiler gösterip göstermediği değerlendirilecektir.

Bütün bu değerlendirmelerin ışığında çalışmamız; çeşitli oksidatif stres modellerinde yararlı olduğu gösterilen, yaklaşık son 10 yıldır başta Almanya olmak üzere çeşitli ülkelerde diyabetik polinöropati gibi bazı bozuklukların tedavisinde kullanılan ve herhangi bir yan etkisi saptanmayan kuvvetli antioksidan α -lipoik asidin ateroskleroz ve kardiovasküler hastalıklarda suplement tarzında kullanılıp kullanılamayacağı konusunda da bir fikir verecektir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. GEREÇ

4.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden (FÜTDAM) temin edilen 200-250 gr. ağırlığında 45 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı ve çalışma FÜTDAM'da gerçekleştirildi. Ratlar standart şartlarda (sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) 5'erli gruplar halinde özel kafeslerde bekletildi. Ratların beslenmesinde Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen 8 mm'lik rat pellet yemleri kullanıldı. Ratların beslenmesinde kullanılan yemin bileşimi Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Ratlara verilen yemin bileşimi.

Yem Bileşimi	
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en çok)	% 7
Ham kül (en çok)	% 8
HCl'de çözünmeyen kül (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması *	% 1.25
Vitamin Karması **	%1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0-2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (%0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

** Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit. D₃ (1000 IU/kg), Vit. E (60 mg/kg), Vit. B₂ (4 mg/kg).

Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında F.Ü. Tıp Fakültesi Etik Kurulu (05.09.2002 / Toplantı: 7; Karar No: 1) onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Deney süresi 6 hafta olarak belirlendi.

Ratlar eşit sayıda 3 gruba ayrıldı:

Grup 1 (*Kontrol grubu; n=15*); Diğer gruplarda oluşan enjeksiyon stresini karşılamak için, 6 hafta intraperitoneal olarak 1 ml/kg serum fizyolojik uygulandı.

Grup 2 (*hHcy grubu; n=15*); Altı hafta boyunca içme sularına 1 g/kg/gün dozda L-metiyonin (Merck, Germany) katılarak kronik hiperhomosisteinemi oluşturuldu (165) ve intraperitoneal olarak 1 ml/kg serum fizyolojik uygulandı.

Grup 3 (*hHcy+LA grubu; n=15*); Altı haftalık deney süresince içme suyu ile 1 g/kg/gün dozda L-metiyonine ilaveten 100 mg/kg dozda α -Lipoik asit intraperitoneal olarak uygulandı (5,150).

α -LA'nın hazırlanması; α -LA (MP Biomedicals Inc., Germany) %0.5 NaOH içeren serum fizyolojikte çözündürülüp, HCl ile pH:7.4'e ayarlandı (5).

4.1.2. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Altı hafta sonunda ratlar dekapite edilerek öldürüldü. Yapılacak analizler için uygun olacak şekilde Heparinli, EDTA'lı ve düz biyokimya tüplerine kan örnekleri alındı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany) serum ve plazmaları ayrıldı. Çalışmada birçok parametreye bakılacağı için, elde edilen serum ve plazmalar küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konuldu. EDTA'lı tüplere alınan kanların plazmaları ayrıldıktan sonra geriye kalan kısım % 0.9'luk NaCl ile 4 kez yıkanarak, her yıkamadan sonra eritrosit süspansiyonu 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve eritrosit paketleri oluşturuldu. Homosistein ve MDA düzeylerinin ölçümü için ayrılan plazmalar, antioksidan enzim aktivitelerinin (eritrosit GSH-Px, SOD, CAT) ölçümü için hazırlanan eritrositler ve biyokimyasal parametreler için kullanılacak serum örnekleri analizler yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Hayvanlardan doku örnekleri (karaciğer, kalp, böbrek, beyin) alınarak MDA düzeyleri ile SOD, CAT ve GSH-Px aktivite ölçümleri için -20°C'de saklandı. Hayvanlardan ayrıca aort örnekleri de alındı ve histopatolojik inceleme için %10'luk formol içerisinde patoloji laboratuvarına gönderildi.

Hemolizat, homojenat hazırlanması ve kullanılan numuneler ölçülen parametreler için farklı olduğundan; örneklerin hazırlanışı her parametrenin yöntem kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

4.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merck (Germany), Sigma-Aldrich (ABD) ve MP Biomedicals (Germany) firmalarından temin edilmiştir.

4.2. YÖNTEMLER

4.2.1. Plazma Homosistein Düzeylerinin Ölçümü

Homosistein düzeyleri EDTA'lı plazmada HPLC (Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi) yöntemi ile ClinRep marka ticari kitler (Recipe Chemicals Instruments GmbH, Germany) kullanılarak ölçüldü. HPLC'de Shimadzu RF-10A_{XL} floresans dedektör (Shimadzu Co., Japan) kullanıldı ve eksitasyon 385 nm'de, emissiyon 515 nm'de uygulandı. Kolon sıcaklığı 30°C olarak ayarlandı ve ticari kitin özel C8 kolonu kullanıldı. Bu çalışmada akış hızı 1 ml/dk, injeksiyon hacmi 20 µl ve çalışma süresi 10 dakika alınarak ölçüm yapıldı.

4.2.2. Plazma Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Ölçümü

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehid (MDA) tayini, Satoh (141) ve Yagi (180)'den modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak Techcomp 8500 II uv-vis (Techcomp Ltd., China) spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

Prensip: Plazmada bulunan ve lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA, aerobik şartlarda, pH'nın 3.4 olduğu bir ortamda tiyobarbütirik asit (TBA) ile 95°C'de inkubasyonu sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan bu rengin 532 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile MDA miktarı saptanır.

Ayırıcılar:

- 1- N/12'lik H₂SO₄
- 2- %10'luk fosfotungustik asit (PTA)
- 3- Tiyobarbütirik asit (TBA) ayırıcı:

Eşit hacim %0.67 TBA ile glasiyel asetik asit karıştırılır.

- 4- n-Bütanol
- 5- Standart (1,1,3,3 tetraetoksipropan)

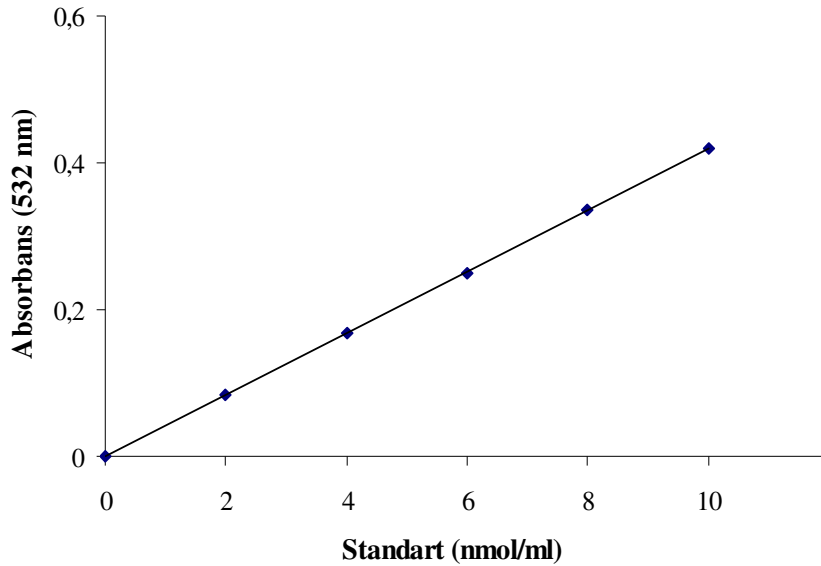
Standart Eğri Çizimi:

Stok standarttan 10 µl alınıp 100 ml'ye tamamlanarak, konsantrasyonu 40 mmol/L olan günlük stok standart hazırlandı. Bu stok standarttan belli oranlarda

dilüsyonlar yapılarak 2, 4, 8, 10, 20 nmol/ml konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Hazırlanan standartlar tüplere şu şekilde ilave edildi:

	Kör	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
Distile su (ml)	4	3	3	3	3	3
TBA Ayıracı (ml)	1	1	1	1	1	1
Standart (ml)	-	1	1	1	1	1
		2nmol/ml	4nmol/ml	8nmol/ml	10nmol/ml	20nmol/ml

Tüpler iyice karıştırıldı. Üzerlerine cam bilye konularak 95C°'de 60 dakika kaynar su banyosunda kaynatıldıktan sonra soğutuldu ve her tüpe 3 ml. n-butanol ilave edildi. Daha sonra vortekslenen tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bütün standartların n-Bütanol fazı 532 nm'de köre karşı okundu ve bu standartlardan eğri çizimi yapıldı. Daha sonra çalışılan tüm örnekler için bu eğri kullanılarak MDA düzeyleri belirlendi. Ölçülen plazma MDA düzeyleri nmol/ml olarak ifade edildi.



Şekil 6. MDA Standart Grafiği.

Yöntem:

Örnek çalışması için ayıraçlar tüplere şu şekilde konuldu:

	Kör	Standart	Örnek
Plazma (ml)	-	-	0.3
N/12 H₂SO₄ (ml)	-	-	4
%10 PTA (ml)	-	-	0.5

Tüpler iyice karıştırıldı, oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, altta kalan presipitat alındı, üzerine 3 ml distile su konularak vortekslendi ve iyice homojenize edildi. Daha sonra tekrar 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve yine presipitat alındı.

	Kör	Standart	Örnek
Distile su (ml)	4	3	4
TBA ayıracağı (ml)	1	1	1
Standart (ml)	-	1	-

Tüpler vortekslendi ve üzerlerine cam bilye konularak 95C°’de 60 dakika kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Soğuk su altında soğutulan tüplere 3 ml n-Bütanol eklenerek vortekslendi. Tüpler tekrar 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak 532 nm’de köre karşı absorpsanları okundu.

Hesaplama:

532 nm’de okunan örnek absorpsanları (OD), standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \frac{\text{Örnek O.D}}{\text{Std. O.D}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

4.2.3. Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü

Doku MDA düzeylerinin tayini Ohkawa ve ark. (120)'dan modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak yapıldı

Prensip: Doku MDA tayini; aerobik şartlar altında ve pH:3.5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda 1 saat inkubasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

Homojenat hazırlanması:

Derin dondurucudan çıkarılan dokuların tartımı yapıldı ve soğuklukları muhafaza edilerek cam tüplere aktarıldı. Dokuların üzerine 1/10 oranında dilüsyon olacak şekilde soğuk Tris-HCl tamponu (0.2 M, pH:7.4) eklendi. Daha sonra dokular yine soğuklukları muhafaza edilerek, Ultra Turrax T25 Basic (IKA Labortechnik, Germany) homojenizatöründe 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika süreyle homojenize edildi. Hazırlanan bu homojenatlarda MDA ve protein tayini yapıldı.

Ayıraçlar:

- 1- % 8.1'lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
- 2- % 20'lik Glasiyel Asetik Asit
- 3- % 0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA)
- 4- n-Bütanol / Piridin (15/1, v/v)
- 5- Standart (1,1,3,3 tetraetoksipropan)

Stok standarttan günlük standart dilüe edilerek değişik derişimler hazırlanır ve standart çalışması yapılarak eğri çizilir. Bu eğriden faydalanılarak sonuçlar hesaplanır.

Yöntem:

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Standart (4.4 nmol/ml)	-	0.2	-
Homojenat	-	-	0.2
SDS	0.2	0.2	0.2
Asetik Asit	1.5	1.5	1.5
TBA Ayıracı	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.6	0.6

95C°’de 1 saat inkübe edildikten sonra soğuk su altında soğutuldu. Tüplere:

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Saf su	1	1	1
n-Bütanol / Piridin	5	5	5

İlave edilerek iyice karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak 532 nm’de köre karşı standart ve örnek absorbensları ölçüldü.

Hesaplama:

532 nm’de okunan örnek absorbensları (OD), standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$\text{MDA (nmol/gr yaş doku)} = \frac{\text{Örnek O.D}}{\text{Std. O.D}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

4.2.4. Doku ve Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Eritrosit SOD enzim aktivitesi Sun ve ark. (158) metodu ile Durak ve ark.'nın (38) modifikasyona göre ölçüldü.

Prensip: Bu yöntemde SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan süperoksit radikallerinin NBT'yi indirgemesi ile oluşan renkli formazon spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbands verir. Enzimin olmadığı ortamlarda indirgenme meydana gelerek mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD bulunduğunda ise indirgenme olmayıp mavi-mor renk oluşmaz ve enzim aktivitesine bağlı olarak daha açık bir renk oluşur.

Homojenat hazırlanması:

Derin dondurucudan çıkarılan dokuların tartımı yapıldı ve soğuklukları muhafaza edilerek cam tüplere aktarıldı. Dokuların üzerine 1/10 oranında dilüsyon olacak şekilde soğuk Tris-HCl tamponu (0.2 M, pH:7.4) eklendi. Daha sonra dokular yine soğuklukları muhafaza edilerek, Ultra Turrax T25 Basic (IKA Labortechnik, Germany) homojenizatöründe 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika süreyle homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4°C soğutmalı santrifüjde 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlar 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile vortekslenip tekrar soğutmalı santrifüjde 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazında SOD enzim aktivitesi ve protein ölçümü yapıldı.

Ayıracılar:

1- Assay Reaktifi:

- 200 ml. 0.3 mM ksantin;
- 100 ml. 150 µM Nitroblue tetrazoliumu (NBT);
- 100 ml. 0.6 mM Na₂EDTA;
- 30 ml. 1 g/L bovin serum albumin (BSA),
- 60 ml. 400 mmol/L Na₂CO₃).

Toplam hacim 490 ml olacak şekilde bütün çözeltiler karıştırılarak beyaz açık saman sarısı renkte assay reaktifi hazırlanır.

2- Ksantin oksidaz (167 U/L)

3- CuCl₂ (0.8 mM)

Yöntem:

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Assay reaktifi	2.85	2.85
Örnek (hemolizat/ekstrakt)	-	0.1
Distile su	0.1	-
Ksantin oksidaz	0.05	0.05

Tüpler vortekslenerek 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra:

CuCl ₂	1	1
-------------------	---	---

Eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra spektrofotometrede 560 nm’de assay reaktifi ile sıfırlanarak kör ve test tüplerinin absorbansları kaydedildi.

Hesaplama:

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = [\text{Absorbans}_{\text{Kör}} (\text{K}) - \text{Absorbans}_{\text{Örnek}} (\text{Ö})] / \text{K} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/gr Hb ve U/mg protein olarak ifade edildi.

4.2.5.Doku ve Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü

GSH-Px, redükte glutasyonu kullanarak H_2O_2 'nin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. GSH-Px aktivitesi Paglia de Valentine (127) metodu ile ölçüldü.

Prensip: GSH-Px, H_2O_2 varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) dönüşmesini katalize eder. H_2O_2 'nin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımıyla tekrar GSH'a dönüştürülür. GSH-Px aktivitesi, deney ortamındaki NADPH'nin $NADP^{+}$ 'ya çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen absorbans farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplanır.

Hemolizat hazırlanması:

EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 3 defa soğuk % 0.9'luk NaCl ile yıkandı. Oluşan eritrosit süspansiyonundan 0.1 ml alınıp 0.4 ml soğuk distile su eklenerek lizat elde edildi. Eritrositlerin tamamen parçalanması için 10 dakika dondurucuda bekletildi. Bu karışımın 0.1 ml'sine içerisinde 0.005 M EDTA bulunan pH:7'de 0.05 M fosfat tamponundan 2.58 ml eklenerek enzim kaynağı hazırlandı.

Homojenat hazırlanması:

Derin dondurucudan çıkarılan dokuların tartımı yapıldı ve soğuklukları muhafaza edilerek cam tüplere aktarıldı. Dokuların üzerine 1/10 oranında dilüsyon olacak şekilde soğuk Tris-HCl tamponu (0.2 M, pH:7.4) eklendi. Daha sonra dokular yine soğuklukları muhafaza edilerek, Ultra Turrax T25 Basic (IKA Labortechnik, Germany) homojenizatöründe 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika süreyle homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4°C soğutmalı santrifüjde 45

dakika süreyle 3500 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlarda GSH-Px enzim aktivitesi ve protein ölçümü yapıldı.

Ayırıcılar:

- 1- EDTA’lı Fosfat Tamponu (50 mM, pH: 7.5)
(600 ml, 50 mM Na₂HPO₄ ile; 400 ml 50 mM KH₂PO₄ karıştırılır; 2.08 g Na₂EDTA eklenir.)
- 2- GSH (150 mM)
- 3- NADPH (10 mM)
- 4- GSH Redüktaz (1 U/10µL)
- 5- NaN₃ (1M Sodyum azid)
- 6- H₂O₂ çözeltisi (2 mM)

Yöntem:

	Örnek (ml)	Kör (ml)
EDTA’lı Fosfat Tamponu	2.65	2.67
GSH	0.10	0.10
NADPH	0.10	0.10
GSH Redüktaz	0.01	0.01
NaN₃	0.01	0.01
Örnek (hemolizat/ekstrakt)	0.02	-

Test tüpleri iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda her tüpe 0.100 ml H₂O₂ çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Dalga boyu 340 nm’ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbans azalmaları 5 dakika boyunca 15 saniyede bir kaydedildi. İlk absorbans

değerinden son absorbands değeri çıkartılarak 5 dakikalık net değişim tespit edildi ve bu değer 5'e bölünerek dakikadaki absorbands değişimi bulundu.

Hesaplama:

$$U/L \text{ (mikromol/min/L)} = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times t}$$

E : NADP'nin ekstinksiyon sabiti (6.22×10^3)

V_t : Total reaksiyon hacmi (ml)

V_s : Total hacim içindeki numune hacmi (ml)

t : Küvet çapı (1 cm)

$\Delta A/t$: Dakikadaki absorbands değişimi

10^6 : Molü mikromole çevirim faktörü

$$U/L = \frac{\Delta A/t \times 3 \times 10^6}{6.22 \times 10^3 \times 0.02 \times 1} = \frac{\Delta A/5 \text{ dk} \times 3 \times 10^6}{124.44}$$

Elde edilen Ünite değeri hemoglobine bölünerek spesifik aktivitesi elde edildi.

$$U/\text{gr Hb} = \frac{U/L}{\text{Hb (gr/dl)}}$$

4.2.6. Doku ve Eritrosit Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz, katalitik aktivitesiyle H₂O₂'yi dekompoze ederek su ve oksijene dönüştürmektedir. Katalaz enzim aktivitesi Aebi (1) metodu ile ölçüldü.

Prensip: Hidrojen peroksit, 240 nm dalga boyunda maksimum absorbands göstermektedir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂'nin katalaz enzimi tarafından parçalanması, ultraviyole spektrumda bir absorbands azalması olarak takip edilir. Absorbansta görülen bu azalma enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Hemolizat ve homojenat hazırlanması: CAT aktivitesi ölçümü için eritrosit ve doku örnekleri GSH-Px enzim aktivitesi ölçümündeki gibi hazırlanır. Aradaki tek fark, hemolizat hazırlanırken, lizatın 5 kat daha sulandırılmasıdır.

Ayırıcılar:

- 1- Fosfat Tamponu (50 mM, pH:7)
(600 ml, 50 mM Na₂HPO₄ ile; 400 ml 50 mM KH₂PO₄ karıştırılır)
- 2- H₂O₂ (%30'luk) : 100 ml tampona, optik dansite 0.50 oluncaya kadar azar azar ilave edilir. Her defasında optik dansite okunur.

Yöntem:

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Fosfat tamponu	3	-
H ₂ O ₂	-	1
Örnek (hemolizat/ekstrakt)	-	2

Numune ilavesi ile 240 nm dalga boyundaki absorbans azalması her 15 saniyede bir olmak üzere 2 dakika süre ile kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alındı.

Hesaplama:

$$k/sec = k \times sec^{-1} = \frac{2.31 \log OD_1/OD_2}{30 sn}$$

$$k/ gr Hb = \frac{k \times sec^{-1}}{gr Hb}$$

Dokular için sonuçlar k/gr protein olarak hesaplandı.

4.2.7. Eritrosit Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü

Prensip: Eritrositlerin bütün nonprotein sülfidril grupları GSH şeklinde bulunur. 5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit] (DTNB), sülfidril bileşikleri tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturur. Bu sarı renkli bileşiğin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülerek GSH aktivitesi saptanır (14).

Ayırıcılar:

1- Presipitasyon çözeltisi:

Glasiyel metafosforik asit: 1.67 gr.

Disodyum EDTA: 0.2 gr.

NaCl: 30 gr.

100 ml. Distile su içerisinde çözülür.

2- 0.3 M Na₂HPO₄

3- DTNB çözeltisi:

20 mg DTNB; 100 ml % 1'lik sodyum sitrat içerisinde hazırlanır.

Hemolizat hazırlanması:

Hemolizat; iki mililitre distile suya 200 µl EDTA'lı tam kan eklenerek hazırlandı. Hemolizatların hemoglobin değerleri Drabkin yöntemiyle belirlendi.

Yöntem:

	Örnek (ml)	Kör (ml)
Hemolizat	2	-
Su	-	2
Çöktürücü	3	3

Örnekler 5 dakika bekletildi. Daha sonra karışım filtre kağıdından süzüldü.

	Örnek (ml)	Kör (ml)
Süzüntü (filtrat)	2	2
Na ₂ HPO ₄	8	8

Absorbanslar 412 nm’de köre karşı okundu (OD₁). Daha sonra her tüpe:

DTNB	1	1
------	---	---

İlave edilerek; 412 nm’de köre karşı okundu (OD₂). Tüplere eklendikten 5 dakika sonra DTNB ayırıcının rengi solmaya başlar. Bu nedenle 30 dakikadan daha kısa bir süre içinde tüm okumalar yapılmalıdır.

Hesaplama:

GSH ile DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyon katsayısı 13600’dür. Ancak, 6 nm’den büyük eni olan bant kullanılırsa daha küçük bir ekstinksiyon katsayısı elde edilmektedir. Hem ışık yolu hem de bant genişliği farklarını düzelten bir türev ekstinksiyon katsayısı kullanılmakta ve E₁ olarak ifade edilmektedir.

$$E_1 = \frac{D_1}{D_2}$$

D₁ = 1 cm’lik küvette, dar bir aralığı olan spektrofotometredeki okuma değeri.

D₂ = Aynı örneğin kalibrasyonu önceden yapılmış bir sistemdeki okuma değeri.

Glutasyon derişimi:

$$C (\mu\text{mol/gr Hb}) = \frac{(OD_2 - OD_1) \times E_1 \times 101}{Hb (g/dl)}$$

4.2.8. Hemoglobin Ölçümü

Prensip: Hemoglobin miktarı Drabkin yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemde ferrisiyanür hemoglobindeki demiri oksitler; iki değerlikli demiri üç değerlikli demire çevirerek methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid ile kararlı bir pigment olan siyan methemoglobin meydana gelir. Oluşan siyanmethemoglobinin absorbansı spektrofotometrik olarak 546 nm’de okunur (43).

Ayırıcılar:

1- Drabkin çözeltisi:

50 mg KCN; 200 mg K₃Fe(CN)₆; 1 gr NaHCO₃

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan bu çözelti renkli şişede ve oda ısısında 1 yıl süreyle sakalanabilir.

2- Hemoglobin Standardı: 18 gr/dl.

Yöntem:

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Drabkin çözeltisi	5.0	5.0	5.0
Hemoglobin standardı	-	0.02	-
Hemolizat	-	-	0.02
Distile su	0.02	-	-

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra 546 nm’de köre karşı absorbansları okundu.

$$\text{Hesaplama: Hemoglobin (g/dl)} = \frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{Standart Kons. (18 g/dl)}$$

4.2.9. Doku Protein Ölçümü

Prensip: Homojenatlardaki protein miktarı Lowry (94) yöntemine göre ölçüldü. Alkali bakır ayırıcındaki Cu^{++} peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Folin-Fenol ayıracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi bir renk şekillenir. Oluşan bu renk 650 nm’de okunur.

Ayıraçlar:

1- Alkali Bakır Ayıracı:

10 gr Na_2CO_3 ; 0.1 gr potasyum tartarat; 0.05 gr. Bakır sülfat

0.5 N NaOH içinde çözünerek 100 ml’ye tamamlandı.

Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

2- Fenol Ayıracı:

3.75 ml 2 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayıracı, 63.75 ml distile suya ilave edilir.

3- Protein Standardı: 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Bovine serum albumin -BSA- ile hazırlandı)

4- Sulandırılarak okuma sınırları içerisine getirilmiş örnek.

Yöntem:

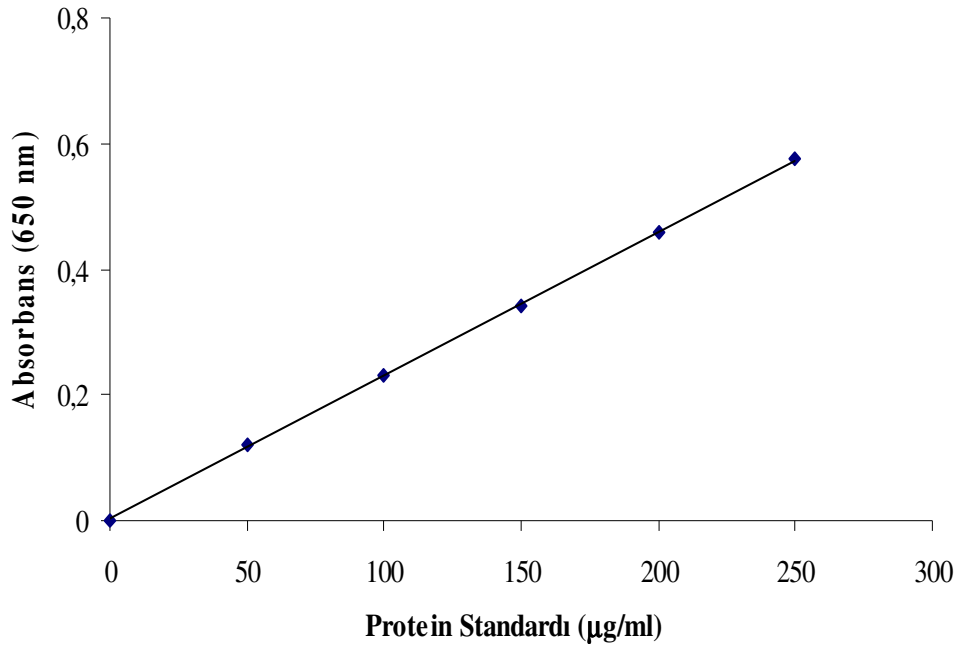
	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Alkali Bakır Ayıracı	1.0	1.0	1.0
Günlük Protein Standardı	-	1.0	-
Örnek	-	-	1.0
Distile su	1.0	-	-

Tüpler iyice karıştırılır, hiç oynatmadan 10 dakika oda ısısında bekletilir.

Fenol Ayıracı	4.0	4.0	4.0
---------------	-----	-----	-----

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 55 °C’de 5 dakika bekletildi. İnkübasyon sonucunda hemen soğutuldu. Daha sonra standart ve örnek tüplerinin absorbansları 650 nm’de köre karşı okundu.

Hesaplama: Doku proteini ($\mu\text{g/ml}$) = $\frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{Standart Kons. (150 } \mu\text{g/ml)}$



Şekil 7. Protein Standart Grafiği.

4.2.10. Vitamin A ve E Düzeylerinin Ölçümü

Vitamin A ve E düzeyleri EDTA’lı plazmada HPLC yöntemi ile, ClinRep marka ticari kitler (Recipe Chemicals Instruments GmbH, Germany) kullanılarak ölçüldü. HPLC’de SPD-10A_{VP} uv-vis dedektör (Shimadzu Co., Japan) kullanıldı.

325 nm’de (Vitamin A) ve 3 dakika sonra 295 nm’de (Vitamin E) ölçümü yapıldı. Kolon sıcaklığı 30°C olarak ayarlandı ve ticari kitin özel C8 kolonu kullanıldı. Bu çalışmada akış hızı 1 ml/dk, injeksiyon hacmi 20 µl ve çalışma süresi 10 dakika alınarak ölçüm yapıldı.

4.2.11. Vitamin C Düzeylerinin Ölçümü

Vitamin C düzeyleri Li-Heparinli plazmada HPLC yöntemi ile, Immundiagnostik marka kitler (Immundiagnostik AG, Germany) kullanılarak ölçüldü. Vitamin C düzeylerinin ölçümü için ayrılan plazmalar dondurulmadan taze olarak ve 6 saat içerisinde çalışıldı. HPLC’de Shimadzu SPD-10A_{VP} uv-vis dedektör (Shimadzu Co., Japan) kullanıldı ve 264 nm’de ölçüm yapıldı. Kolon sıcaklığı 30°C olarak ayarlandı ve ticari kitin özel C8 kolonu kullanıldı. Bu çalışmada akış hızı 1 ml/dk, injeksiyon hacmi 20 µl ve çalışma süresi 10 dakika alınarak ölçüm yapıldı.

4.2.12. Vitamin B₆ Düzeylerinin Ölçümü

Vitamin B₆ (pidoksal 5-fosfat) düzeyleri EDTA’lı plazmada HPLC yöntemi ile, ClinRep marka kitler (Recipe Chemicals Instruments GmbH, Germany) kullanılarak ölçüldü. HPLC’de Shimadzu RF-10A_{XL} floresans dedektör (Shimadzu Co., Japan) kullanıldı ve eksitasyon 370 nm’de, emisyon 470 nm’de uygulandı. Kolon sıcaklığı 25°C olarak ayarlandı ve ticari kitin özel C8 kolonu kullanıldı. Bu çalışmada akış hızı 1 ml/dk, injeksiyon hacmi 50 µl ve çalışma süresi 10 dakika alınarak ölçüm yapıldı.

4.2.13. Vitamin B₁₂ ve Folik Asit Düzeylerinin Ölçümü

Serum Vitamin B₁₂ ve folik asit düzeyleri Roche Elecsys E170 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim-Germany) hormon analizöründe kemiluminesans yöntem kullanılarak ölçüldü.

4.2.14. Lipid Parametrelerinin Ölçümü

Serumda Total Kolesterol, HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol, Trigliserid düzeyleri Olympus AU 600 (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo-Japan) otoanalizöründe Olympus marka ticari kitler kullanılarak ölçüldü. VLDL-Kolesterol düzeyleri ise yine aynı otoanalizörde hesaplama ile elde edildi.

4.2.15. Dokuların Histopatolojik İncelenmesi

Ratlardan alınan doku örnekleri (aort) %10'luk formolde tespit edildi. Dokular rutin takip işlemi sonrası parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler Hematoksilen-Eozin (H-E), Verhoeff elastik boyası ve Mason Tricrom ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (Olympus B×50) ve fotoğraflandı.

4.2.16. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS for Windows 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında parametrelerin karşılaştırılmasında One-way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve Post hoc Tukey testi kullanıldı. Parametreler arasındaki korelasyonun saptanmasında Pearson's korelasyon analizinden yararlanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

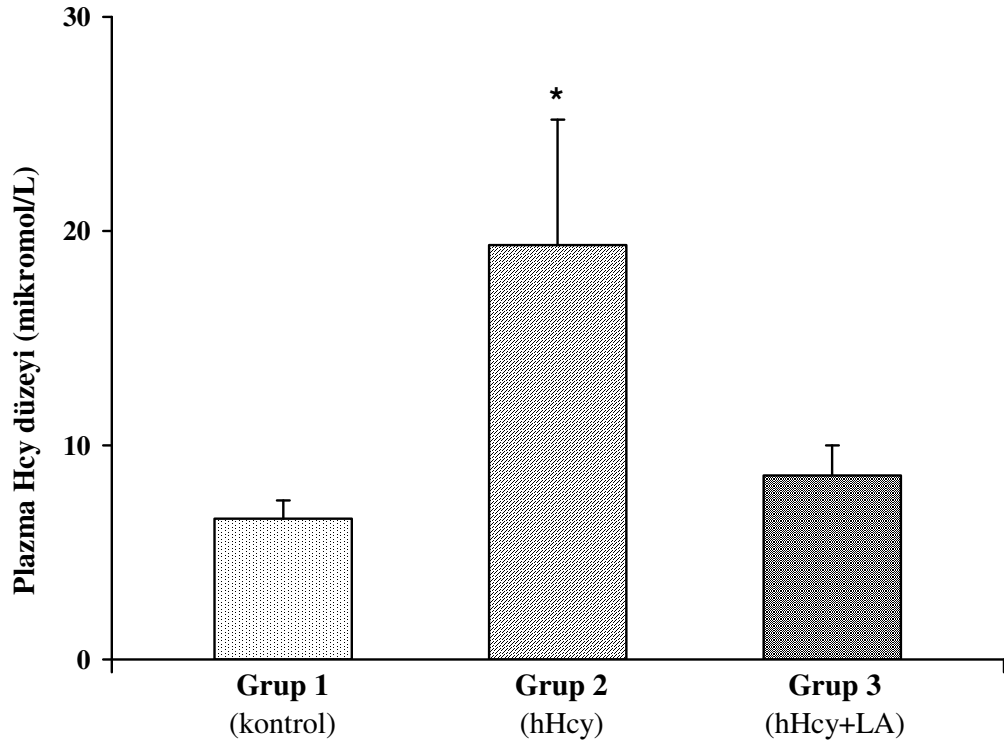
5. BULGULAR

5.1. Biyokimyasal Parametreler

5.1.1. Plazma Homosistein Düzeyleri

Homosistein düzeyleri Grup 2’de ($19.35 \pm 5.86 \mu\text{mol/L}$); Grup 1 ($6.58 \pm 0.84 \mu\text{mol/L}$) ve Grup 3’e ($8.59 \pm 1.41 \mu\text{mol/L}$) göre anlamlı şekilde yüksek tespit edildi ($p < 0.001$). Grup 1 ile Grup 3’e ait homosistein düzeyleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Gruplara ait plazma homosistein düzeyleri Şekil 8’de verilmiştir.



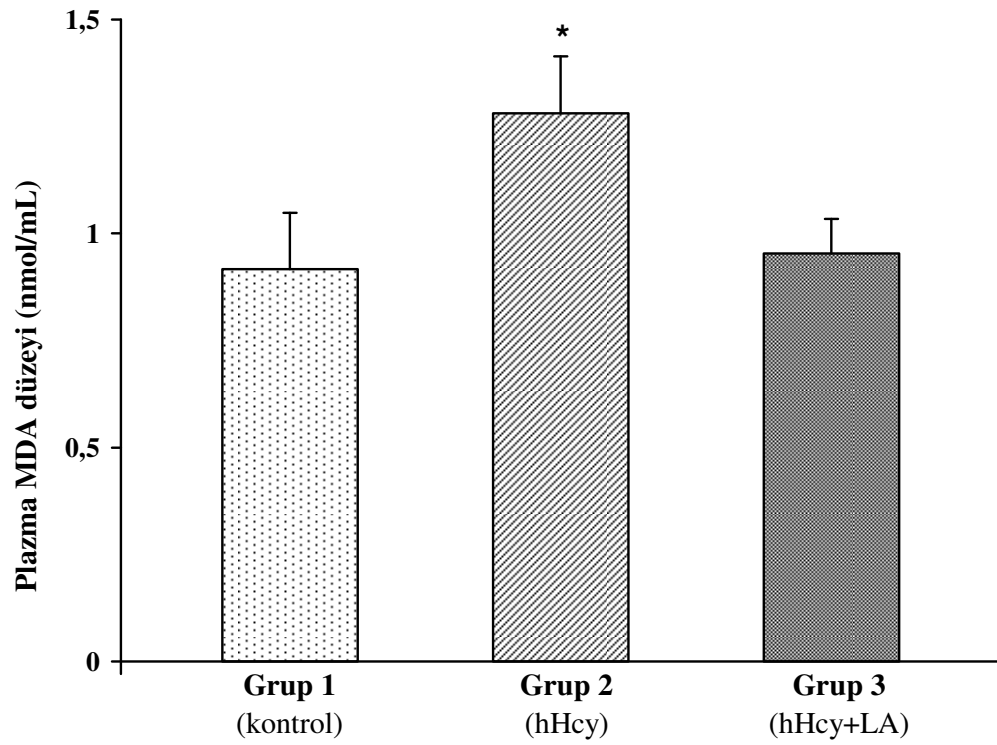
Şekil 8. Gruplara ait plazma homosistein düzeyleri.

* : $p < 0.001$; Grup 2 ile Grup1; Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

5.1.2. Plazma MDA Düzeyleri

Grup 2’de (1.281 ± 0.133 nmol/mL) plazma MDA düzeylerinin Grup 1 (0.917 ± 0.132 nmol/mL) ve Grup 3’e (0.954 ± 0.080 nmol/mL) göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Grup 1 ile Grup 3 arasında ise plazma MDA düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0.05$).

Gruplara ait plazma MDA düzeyleri Şekil 9’da verilmiştir.



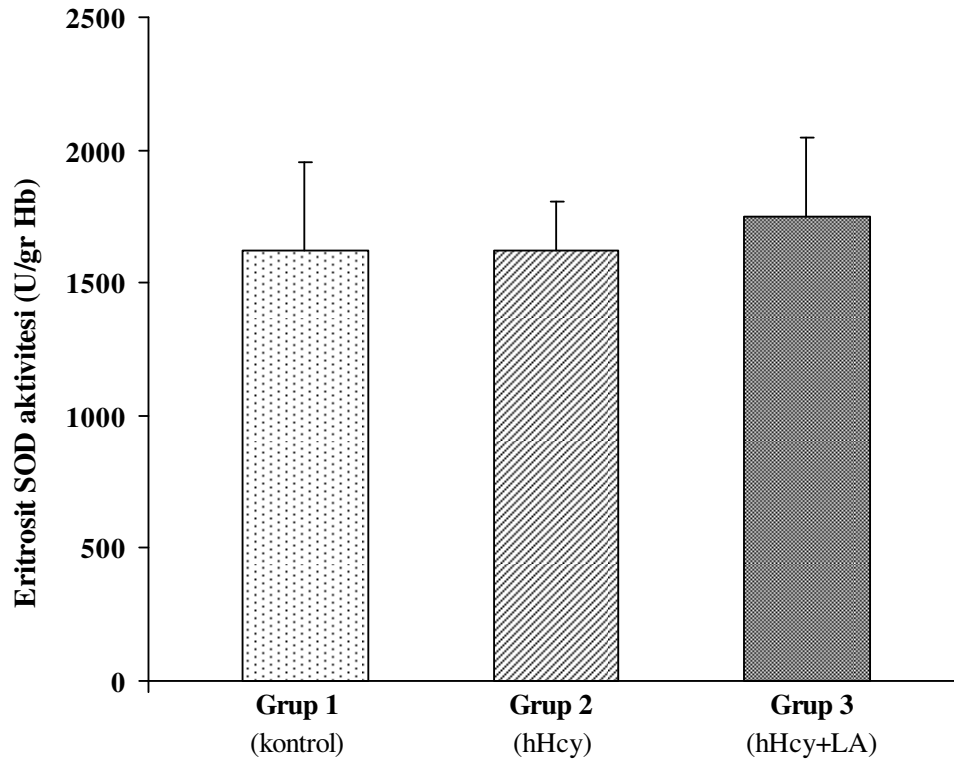
Şekil 9. Gruplara ait plazma MDA düzeyleri.

*: $p < 0.001$; Grup 2 ile Grup 1; Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

5.1.3. Eritrosit SOD Aktiviteleri

Eritrosit SOD aktiviteleri Grup 3’de (1751.35 ± 294.09 U/gr Hb), Grup 1 (1620.56 ± 332.56 U/gr Hb) ve Grup 2’ye (1618.48 ± 184.74 U/gr Hb) göre yüksek olarak bulundu ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Eritrosit SOD aktiviteleri bakımından Grup 1 ile Grup 2 arasında da anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$).

Gruplara ait eritrosit SOD aktiviteleri Şekil 10’da verilmiştir.

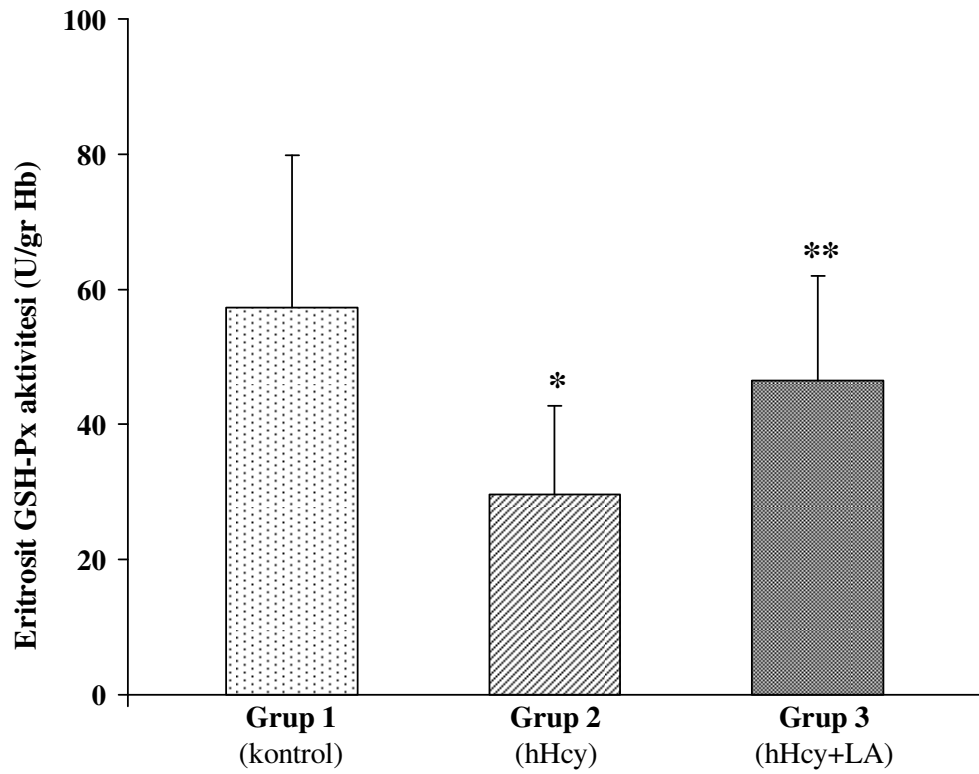


Şekil 10. Gruplara ait eritrosit SOD aktiviteleri.

5.1.4. Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri

Eritrosit GSH-Px aktiviteleri Grup 2’de (29.67 ± 13.06 U/gr Hb); Grup 1 (57.21 ± 22.67 U/gr Hb) ve Grup 3’e (46.40 ± 15.61 U/gr Hb) göre anlamlı şekilde düştü (sırasıyla; $p < 0.001$ ve $p < 0.05$). GSH-Px aktivitesi Grup 1’de Grup 3’e göre yüksek olmasına rağmen, bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Gruplara ait eritrosit GSH-Px aktiviteleri Şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 11. Gruplara ait eritrosit GSH-Px aktiviteleri.

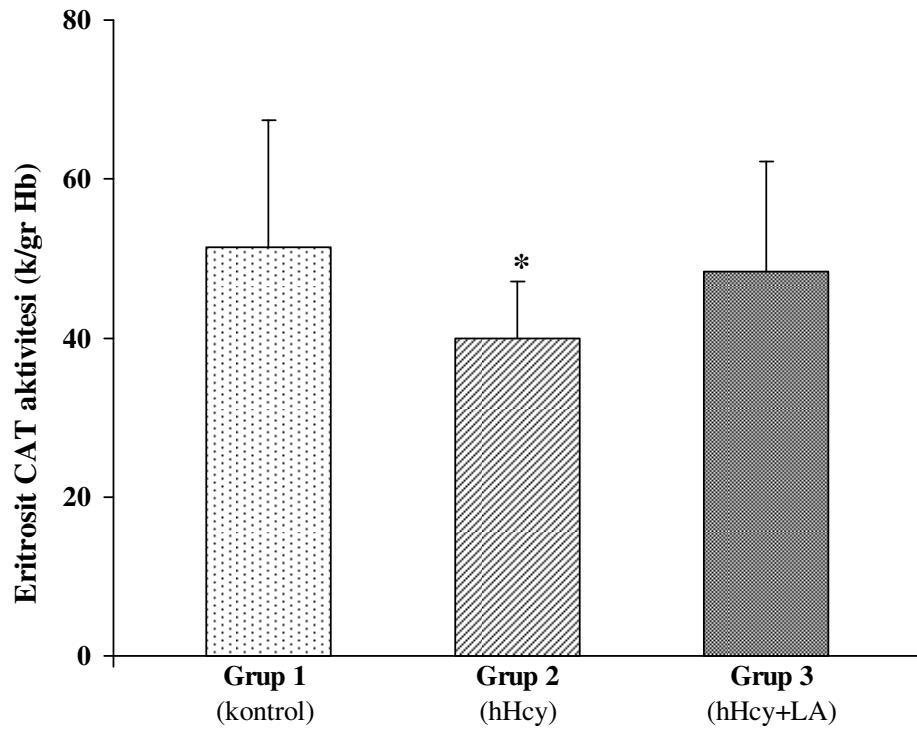
*: $p < 0.001$; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

**: $p < 0.05$; Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

5.1.5. Eritrosit CAT Aktiviteleri

Eritrosit CAT aktiviteleri Grup 2’de (39.91 ± 7.14 k/gr Hb); Grup1’e (51.40 ± 15.95 k/gr Hb) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ($p < 0.05$). CAT aktivitesi Grup 3’te (48.29 ± 13.92 k/gr Hb) Grup 2’ye göre yüksek olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Gruplara ait eritrosit CAT aktiviteleri Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12. Gruplara ait eritrosit CAT aktiviteleri.

*: $p < 0.05$; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

5.1.6. Doku MDA Düzeyleri

Karaciğer: Karaciğer dokusu MDA düzeyleri Grup 2’de; Grup 1 ve Grup 3’e göre anlamlı şekilde yüksek olarak bulundu ($p < 0.001$). Grup 1 ile Grup 3’e ait karaciğer MDA düzeyleri arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$).

Böbrek: Böbrek dokusu MDA düzeyleri Grup 2’de; Grup 1 ve Grup 3’e göre anlamlı şekilde yüksek olarak bulundu ($p<0.001$). Grup 1 ile Grup 3’e ait böbrek MDA düzeyleri arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$).

Kalp: Kalp dokusu MDA düzeyleri Grup 2’de; Grup 1 ve Grup 3’e göre anlamlı şekilde yüksek olarak bulundu ($p<0.001$). Grup 1’de kalp MDA düzeyleri Grup 3’e göre anlamlı şekilde düşüktü ($p<0.05$).

Beyin: Beyin dokusu MDA düzeyleri bakımından Grup 2 ile Grup 1 ve Grup 3 arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü ($p>0.05$). Bununla birlikte; Grup 3’te beyin MDA düzeyleri Grup 1’e göre anlamlı şekilde düşüktü ($p<0.05$).

Gruplara ait karaciğer, böbrek, kalp ve beyin doku MDA düzeyleri Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Gruplara ait doku MDA düzeyleri.

	Grup 1 (kontrol) <i>n=15</i>	Grup 2 (hHcy) <i>n=15</i>	Grup 3 (hHcy + LA) <i>n=15</i>
Karaciğer			
MDA (nmol/g yaş doku)	28.91±3.61	34.38±5.06*	26.57±3.69
Böbrek			
MDA (nmol/g yaş doku)	18.21±2.83	22.68±3.58*	17.34±2.97
Kalp			
MDA (nmol/g yaş doku)	14.00±1.47	22.26±3.57*	16.98±2.52**
Beyin			
MDA (nmol/g yaş doku)	16.41±1.56	17.27±2.82	14.28±2.33**

* : $p<0.001$; Grup2 ile Grup1; Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

** : $p<0.05$; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

5.1.7. Doku SOD Aktiviteleri

Karaciğer: Karaciğer SOD aktiviteleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

Böbrek: Böbrek SOD aktivitesi bakımından Grup 2 ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü ($p>0.05$). Grup 3’de böbrek SOD aktivitesi Grup 1’e göre anlamlı şekilde yüksek olarak bulundu ($p<0.05$).

Kalp: Kalp dokusu SOD aktivitesi bakımından Grup 2 ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü ($p>0.05$). Grup 3’te kalp dokusu SOD aktivitesi ise Grup 1’e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

Beyin: Beyin dokusu SOD aktivitesi bakımından Grup 1 ile Grup 2 arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü ($p>0.05$). Grup 3’de ise beyin dokusu SOD aktivitesi Grup 1 ve Grup 2’ye göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.01$).

Gruplara ait karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokusu SOD aktiviteleri Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Gruplara ait doku SOD aktiviteleri.

	Grup 1 (kontrol) <i>n=15</i>	Grup 2 (hHcy) <i>n=15</i>	Grup 3 (hHcy + LA) <i>n=15</i>
Karaciğer			
SOD (U/mg protein)	60.10±16.29	68.97±14.63	70.46±10.92
Böbrek			
SOD (U/mg protein)	31.12±6.15	32.71±4.87	37.41±5.53*
Kalp			
SOD (U/mg protein)	61.78±10.54	65.30±7.95	73.88±13.55*
Beyin			
SOD (U/mg protein)	35.12±2.34	35.20±1.99	38.28±2.64**

* : $p<0.05$; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

** : $p<0.01$; Grup 3 ile Grup 1; Grup 3 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

5.1.8. Doku GSH-Px Aktiviteleri

Karaciğer: Karaciğer dokusu GSH-Px aktiviteleri Grup 2’de; Grup 1 ve Grup 3’e göre anlamlı şekilde düşüktü ($p<0.05$). GSH-Px aktivitesi Grup 1’de Grup 3’e göre yüksek olmasına rağmen, bu iki grup arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Böbrek: Böbrek GSH-Px aktivitelerinin Grup 2’de; Grup 1’e göre anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü ($p<0.01$). Böbrek GSH-Px aktivitesi Grup 3’de Grup 2’ye göre hafif yüksek olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Böbrek GSH-Px aktiviteleri bakımından Grup 1 ile Grup 3 arasında da anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$).

Kalp: Kalp dokusu GSH-Px aktivitesi Grup 1’de; Grup 2 ve Grup 3’e göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0.05$). Kalp dokusu GSH-Px aktivitesi bakımından Grup 2 ile Grup 3 arasında ise anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Beyin: Beyin GSH-Px aktivitelerinin Grup 3’de; Grup 1’e göre anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). Beyin GSH-Px aktivitesi Grup 2’de Grup 1’ye göre hafif yüksek olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Beyin GSH-Px aktiviteleri bakımından Grup 2 ile Grup 3 arasında da anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$).

Gruplara ait karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokusu SOD aktiviteleri Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Gruplara ait doku GSH-Px aktiviteleri.

	Grup 1 (kontrol) <i>n=15</i>	Grup 2 (hHcy) <i>n=15</i>	Grup 3 (hHcy + LA) <i>n=15</i>
Karaciğer			
GSH-Px (U/mg protein)	48.04±18.85	32.65±7.39*	46.85±12.50
Böbrek			
GSH-Px (U/mg protein)	24.72±4.85	19.79±2.43**	22.24±3.67
Kalp			
GSH-Px (U/mg protein)	13.11±3.70	16.10±1.60 #	16.28±2.57 ##
Beyin			
GSH-Px (U/mg protein)	5.79±0.63	6.02±0.59	6.35±0.43 ##

* : p<0.05; Grup 2 ile Grup 1, Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

** : p<0.01; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

: p<0.05; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

: p<0.05; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

5.1.9. Doku CAT Aktiviteleri

Karaciğer: Karaciğer doku CAT aktivitelerinin Grup 2’de; Grup 1 (p<0.01) ve Grup 3’e göre (p<0.001) anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü. Grup 1 ve Grup 3 arasında ise karaciğer CAT aktiviteleri arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi (p>0.05).

Böbrek: Böbrek CAT aktivitesi Grup 2’de Grup 1’e göre anlamlı şekilde düşük olarak bulundu (p<0.05). Grup 3 ile diğer iki grup arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü (p>0.05).

Kalp: Kalp CAT aktivitesi Grup 3’te; Grup 1 (p<0.01) ve Grup 2’ye (p<0.05) göre anlamlı şekilde yüksek olarak tespit edildi. Grup 1 ile Grup 2

arasında kalp CAT aktiviteleri bakımından anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü ($p>0.05$).

Beyin: Beyin CAT aktivitesi Grup 3'te Grup 2'ye göre anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.001$). Beyin CAT aktivitesi bakımından diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).

Gruplara ait karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokusu CAT aktiviteleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Gruplara ait doku CAT aktiviteleri.

	Grup 1 (kontrol) <i>n=15</i>	Grup 2 (hHcy) <i>n=15</i>	Grup 3 (hHcy + LA) <i>n=15</i>
Karaciğer			
CAT (k/gr protein)	41.57±10.09	27.11±12.38 *	45.41±10.06 **
Böbrek			
CAT (k/gr protein)	37.41±8.87	31.82±4.06 ***	32.88±3.12
Kalp			
CAT (k/gr protein)	4.14±1.29 #	4.66±1.18	6.09±2.09 ##
Beyin			
CAT (k/gr protein)	1.47±0.42	1.16±0.25	1.76±0.45 **

* : $p<0.01$; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

** : $p<0.001$; Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

*** : $p<0.05$; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

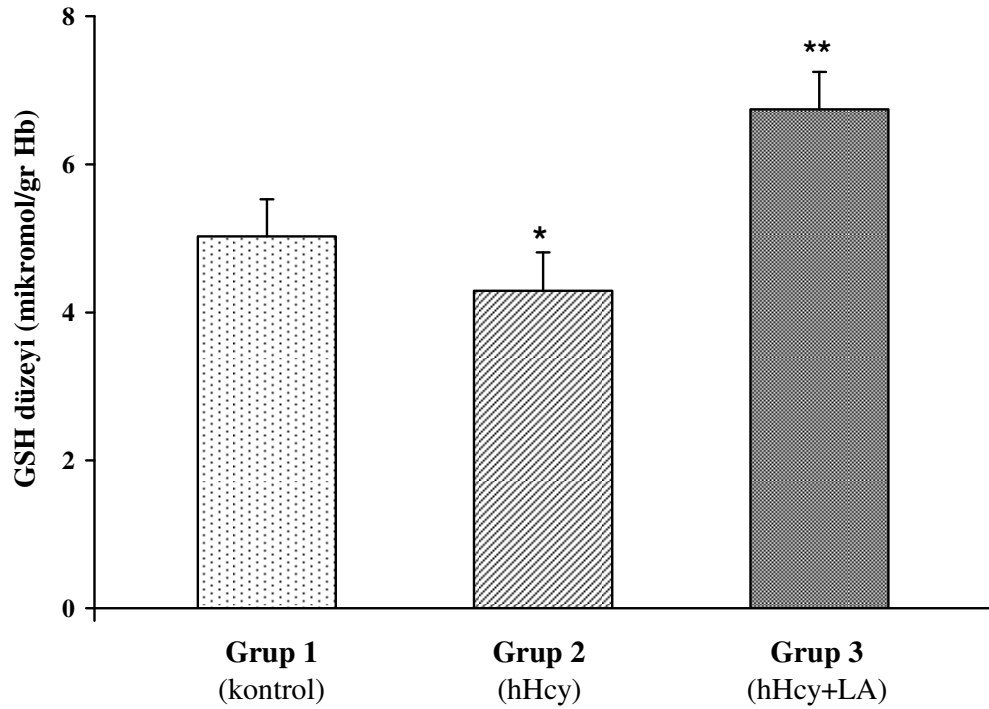
: $p<0.01$; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

: $p<0.05$; Grup 3 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

5.1.10. Eritrosit GSH Düzeyleri

Redükte glutatyon düzeyleri Grup 2’de (4.29 ± 0.52 $\mu\text{mol/gr Hb}$); Grup 1 (5.03 ± 0.50 $\mu\text{mol/gr Hb}$) ve Grup 3’e (6.74 ± 0.51 $\mu\text{mol/gr Hb}$) göre anlamlı şekilde düşük olarak bulundu ($p < 0.001$). Grup 3’de eritrosit GSH düzeyleri Grup 1’e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p < 0.001$).

Eritrosit GSH düzeyleri Şekil 13’te verilmiştir.



Şekil 13. Gruplara ait eritrosit GSH düzeyleri.

* : $p < 0.001$; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

** : $p < 0.001$; Grup 3 ile Grup 1; Grup 3 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

5.1.11. Vitamin Düzeyleri

5.1.11.1. Vitamin E, C ve A Düzeyleri

Vitamin E düzeyleri karşılaştırıldığında Grup 3’te bu vitaminin Grup 1 ve Grup 2’ye göre anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü ($p < 0.001$). Vitamin E düzeyleri bakımından Grup 1 ile Grup 2 arasında ise anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p > 0.05$).

Vitamin C düzeyleri Grup 3'te Grup 2'ye göre yüksek bulunurken ($p<0.05$); diğer gruplar arasında Vitamin C düzeyleri bakımından anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü ($p>0.05$).

Vitamin A düzeyleri Grup 3'te; Grup 1'e göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0.05$). Vitamin A düzeyleri bakımından diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Gruplara ait Vitamin E, C ve A düzeyleri Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Gruplara ait Vitamin E, C ve A düzeyleri.

	Grup 1 (kontrol) <i>n=15</i>	Grup 2 (hHcy) <i>n=15</i>	Grup 3 (hHcy + LA) <i>n=15</i>
Vitamin E (mg/L)	9.40±1.79	9.24±1.59	13.56±4.13*
Vitamin C (mg/L)	13.81±1.55	13.42±1.55	15.18±1.63**
Vitamin A (mg/L)	1.34±0.24	1.21±0.17	1.15±0.17***

* : $p<0.001$; Grup 3 ile Grup 1, Grup 3 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

** : $p<0.05$; Grup 3 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

*** : $p<0.05$; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

5.1.11.2. Vitamin B₆, B₁₂ ve Folik Asit Düzeyleri

Vitamin B₆ (pidoksal 5-fosfat) düzeyleri Grup 2'de; Grup 1 ve Grup 3'e göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0.01$). Grup 1 ile Grup 3 arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Vitamin B₁₂ düzeyleri de Grup 2'de; Grup 1 ($p<0.001$) ve Grup 3'e ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu. Bununla birlikte Grup 3'ün Vitamin B₁₂ düzeyleri de Grup 1'e göre anlamlı şekilde düşüktü ($p<0.001$).

Folik asit düzeyleri ise Grup 2 ve Grup 3'te; Grup 1'e göre anlamlı şekilde düşük olarak tespit edildi ($p<0.001$). Grup 2 ile Grup 3 arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Gruplara ait Vitamin B₆, B₁₂ ve Folik asit düzeyleri Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. Gruplara ait Vitamin B₆, B₁₂ ve Folik asit düzeyleri.

	Grup 1 (kontrol) n=15	Grup 2 (hHcy) n=15	Grup 3 (hHcy + LA) n=15
Vitamin B₆ (µg/L)	25.11±5.88	16.74±5.55*	24.19±7.11
Vitamin B₁₂ (pg/mL)	975.94±106.49 **	657.79±61.34 ***	761.75±82.67
Folik asit (ng/mL)	18.17±1.83 **	11.23±3.65	12.41±2.45

* : $p<0.01$; Grup 2 ile Grup 1; Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

** : $p<0.001$; Grup 1 ile Grup 2; Grup 1 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

*** : $p<0.01$; Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

5.1.12. Lipid Parametreleri

Trigliserit düzeyleri Grup 2'de, Grup 1 ve Grup 3'e göre anlamlı şekilde yüksek bulunurken ($p<0.01$); Grup 1 ile Grup 3 arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Kolesterol düzeyleri de Grup 2'de; Grup 1 ($p<0.001$) ve Grup 3'e göre ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu. Grup 1 ile Grup 3'ün kolesterol düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Gruplar arasında HDL düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0.05$).

LDL düzeyleri Grup 1 ile karşılaştırıldığında, Grup 2 ($p<0.001$) ve Grup 3'te ($p<0.05$) anlamlı şekilde yüksek bulunurken; Grup 2 ile Grup 3 arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).

VLDL düzeyleri yine Grup 2'de; Grup 1 ($p<0.01$) ve Grup 3'e ($p<0.001$) göre anlamlı şekilde yüksek olarak tespit edildi. Grup 1 ile Grup 3 arasında ise anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Gruplara ait trigliserit, kolesterol, HDL, LDL ve VLDL düzeyleri Tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 14. Gruplara ait trigliserit, kolesterol, HDL, LDL ve VLDL düzeyleri.

	Grup 1 (kontrol) n=15	Grup 2 (hHcy) n=15	Grup 3 (hHcy + LA) n=15
Trigliserit (mg/dL)	113.33±18.90	141.93±37.02*	108.133±14.25**
Kolesterol (mg/dL)	55.73±7.22	72.80±14.87***	57.06±8.94**
HDL-K (mg/dL)	33.00±5.11	31.73±8.93	31.80±7.08
LDL-K (mg/dL)	10.33±1.44	14.46±3.75***	13.13±2.09 [#]
VLDL-K (mg/dL)	22.20±3.68	28.66±5.45*	20.93±4.84 ^{##}

* : $p<0.01$; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

** : $p<0.01$; Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında.

*** : $p<0.001$; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

: $p<0.05$; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

: $p<0.001$; Grup 3 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

5.2. Plazma Homosistein Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki

5.2.1. Kontrol Grubunda Plazma Homosistein Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki

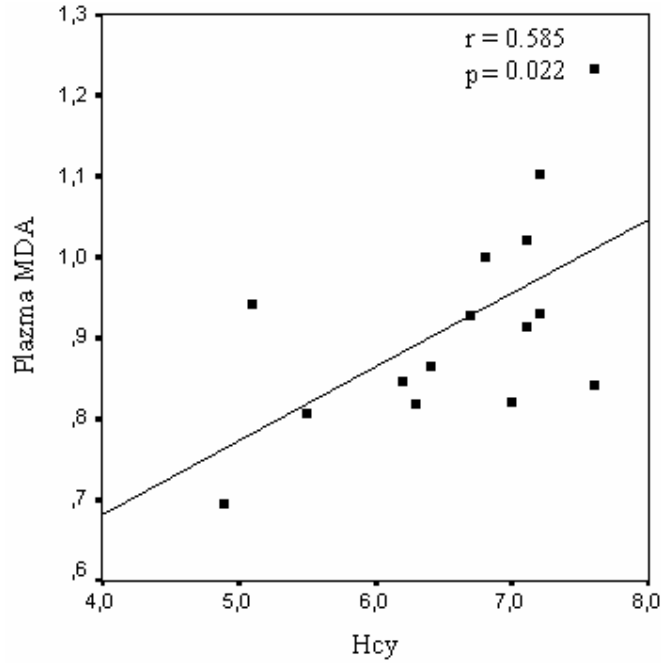
Kontrol grubunda plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki korelasyonlar Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. Kontrol grubunda plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki.

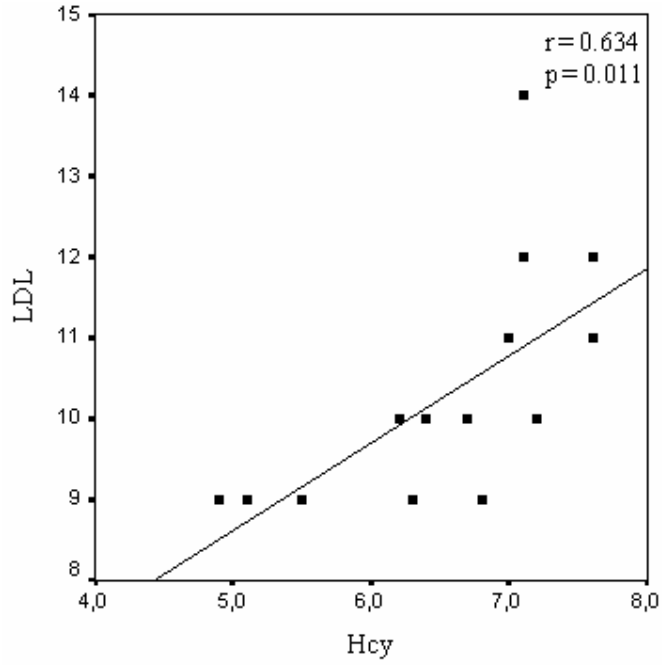
Grup 1 (kontrol)		
	Homosistein	
	<u>r</u>	<u>P</u>
Plazma MDA	0.585	0.022
Eritrosit SOD	0.299	0.278
Eritrosit GSH-Px	0.107	0.703
Eritrosit CAT	- 0.399	0.141
Eritrosit GSH	- 0.812	0.000
Vitamin E	0.441	0.100
Vitamin C	- 0.194	0.489
Vitamin A	0.011	0.968
Vitamin B ₆	0.469	0.078
Vitamin B ₁₂	- 0.241	0.386
Folik asit	- 0.223	0.425
Trigliserit	0.021	0.940
Kolesterol	0.114	0.685
HDL-K	0.140	0.619
LDL-K	0.634	0.011
VLDL-K	0.106	0.706

Kontrol grubuna ait plazma Hcy düzeyleri ile plazma MDA düzeyleri ($r=0.585$, $p=0.022$; Şekil 14) ve LDL düzeyleri ($r=0.634$, $p=0.011$; Şekil 15) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi.

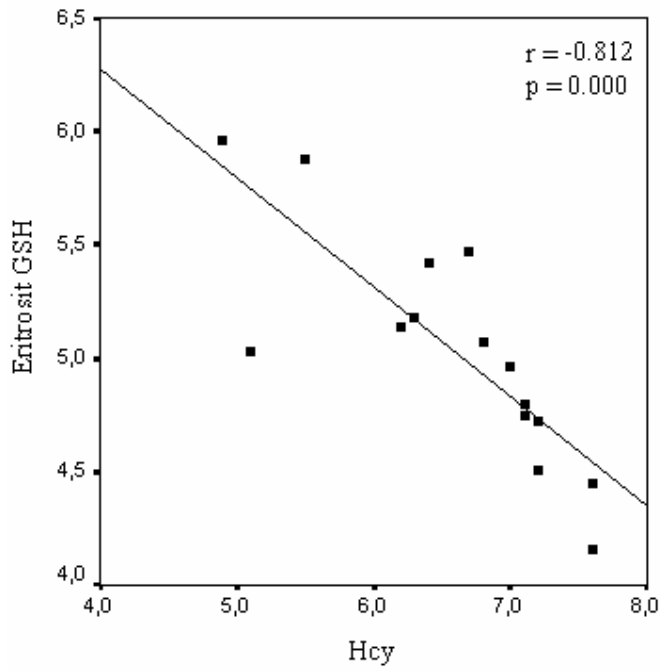
Kontrol grubuna ait plazma Hcy düzeyleri ile eritrosit GSH düzeyleri ($r=-0.812$, $p=0.000$; Şekil 16) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon tespit edildi.



Şekil 14. Kontrol grubunda Hcy ile plazma MDA düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 15. Kontrol grubunda Hcy ile LDL düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 16. Kontrol grubunda Hcy ile eritrosit GSH düzeyleri arasındaki ilişki.

5.2.2. hHcy Grubunda Plazma Homosistein Düzeyleri ile Diğer

Parametreler Arasındaki İlişki

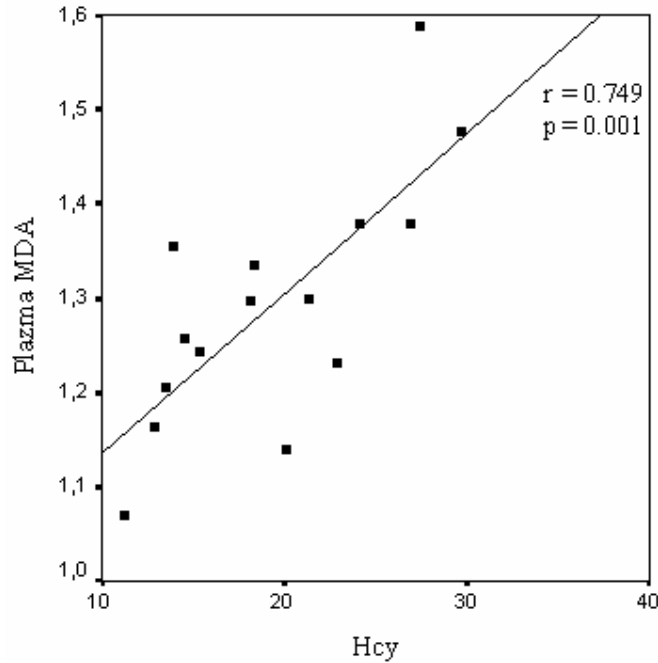
hHcy grubunda plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki korelasyonlar Tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 16. hHcy grubunda plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki.

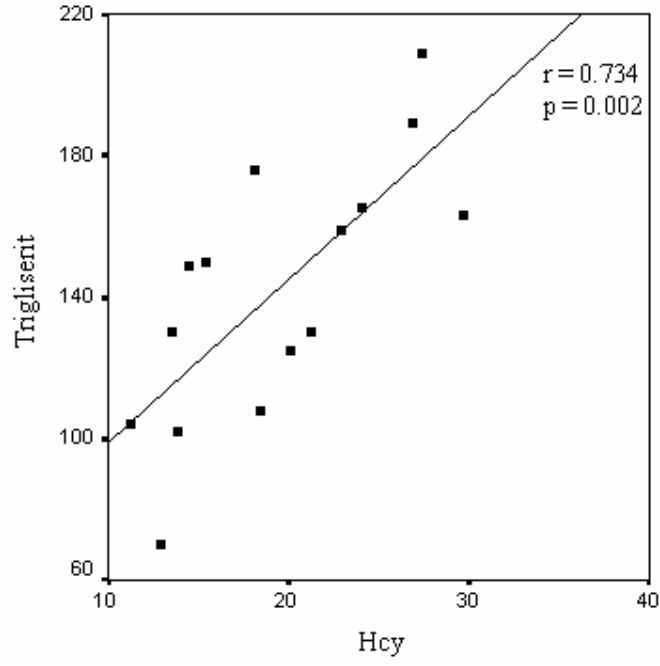
Grup 1 (hHcy)		
	Homosistein	
	<u>r</u>	<u>P</u>
Plazma MDA	0.749	0.001
Eritrosit SOD	- 0.013	0.962
Eritrosit GSH-Px	- 0.567	0.028
Eritrosit CAT	- 0.667	0.004
Eritrosit GSH	- 0.658	0.008
Vitamin E	0.386	0.155
Vitamin C	- 0.092	0.745
Vitamin A	- 0.312	0.257
Vitamin B ₆	- 0.086	0.761
Vitamin B ₁₂	- 0.525	0.045
Folik asit	- 0.673	0.006
Trigliserit	0.734	0.002
Kolesterol	- 0.377	0.166
HDL-K	- 0.328	0.233
LDL-K	- 0.684	0.005
VLDL-K	0.412	0.128

hHcy grubuna ait plazma Hcy düzeyleri ile plazma MDA düzeyleri ($r=0.749$, $p=0.001$; Şekil 17) ve trigliserit düzeyleri ($r=0.734$, $p=0.002$; Şekil 18) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi.

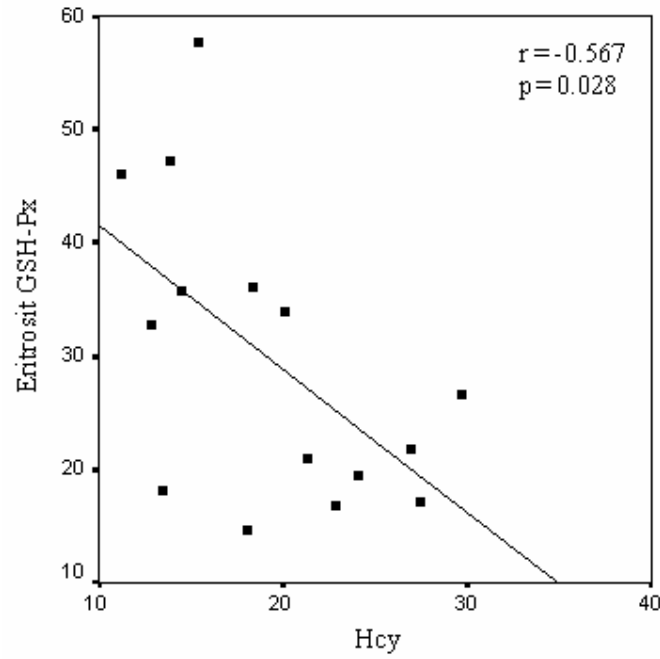
hHcy grubuna ait plazma Hcy düzeyleri ile eritrosit GSH-Px aktiviteleri ($r=-0.567$, $p=0.028$; Şekil 19); eritrosit CAT aktiviteleri ($r=-0.667$, $p=0.004$; Şekil 20); eritrosit GSH düzeyleri ($r=-0.658$, $p=0.008$; Şekil 21); Vitamin B₁₂ düzeyleri ($r=-0.525$, $p=0.045$; Şekil 22); folik asit düzeyleri ($r=-0.673$, $p=0.006$; Şekil 23) ve LDL düzeyleri ($r=-0.684$, $p=0.005$; Şekil 24) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyonlar tespit edildi.



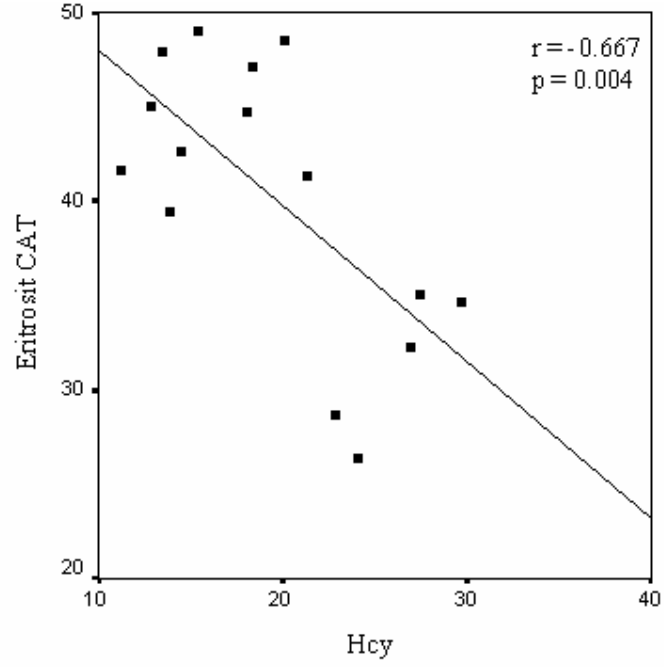
Şekil 17. hHcy grubunda Hcy ile plazma MDA düzeyleri arasındaki ilişki.



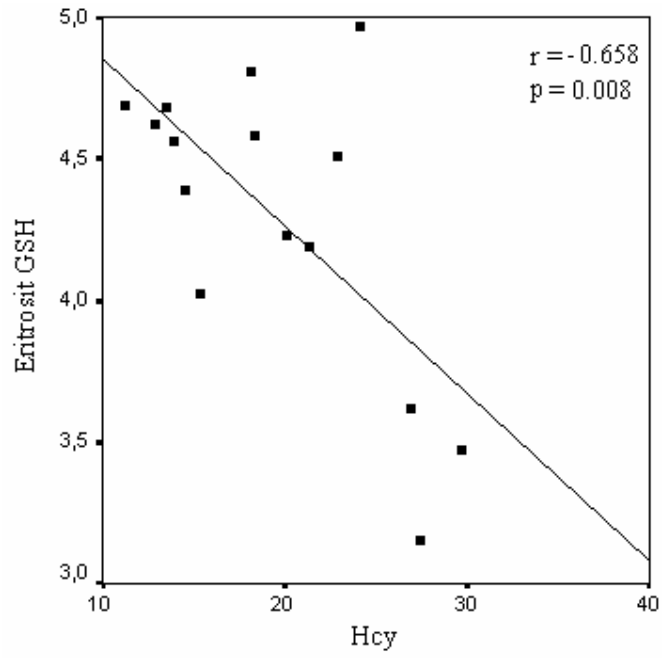
Şekil 18. hHcy grubunda Hcy ile trigliserit düzeyleri arasındaki ilişki.



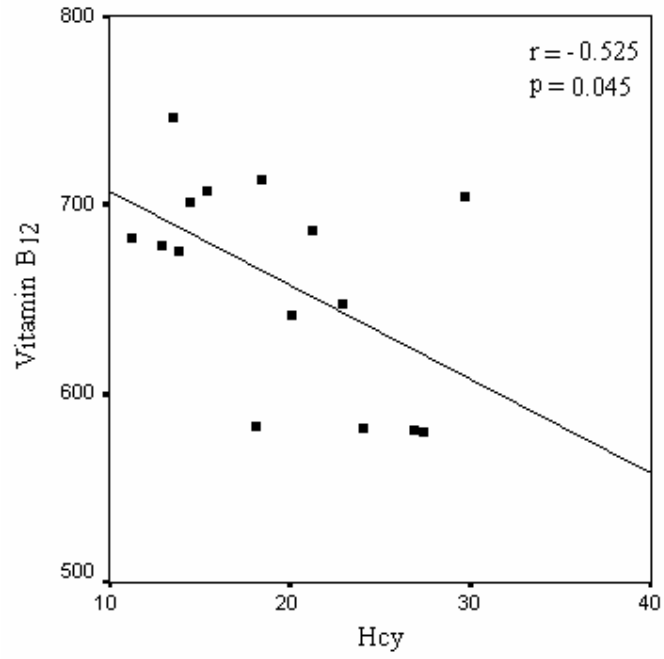
Şekil 19. hHcy grubunda Hcy ile eritrosit GSH-Px aktiviteleri arasındaki ilişki.



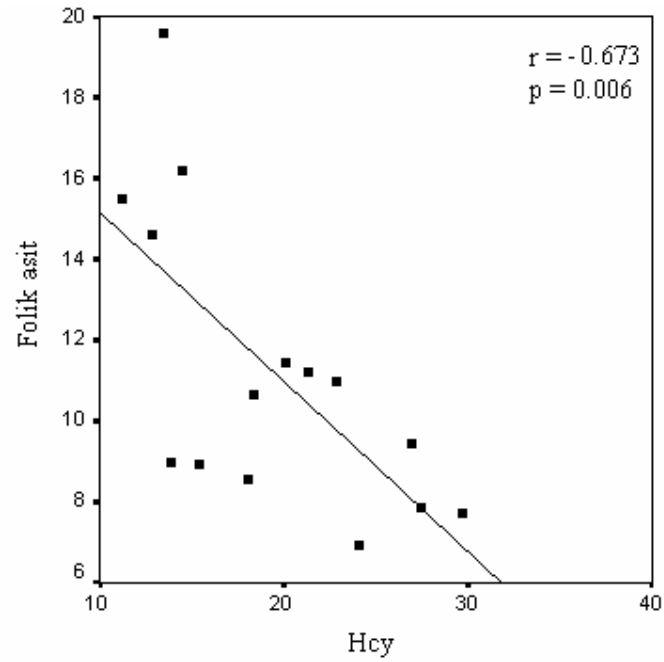
Şekil 20. hHcy grubunda Hcy ile eritrosit CAT aktiviteleri arasındaki ilişki.



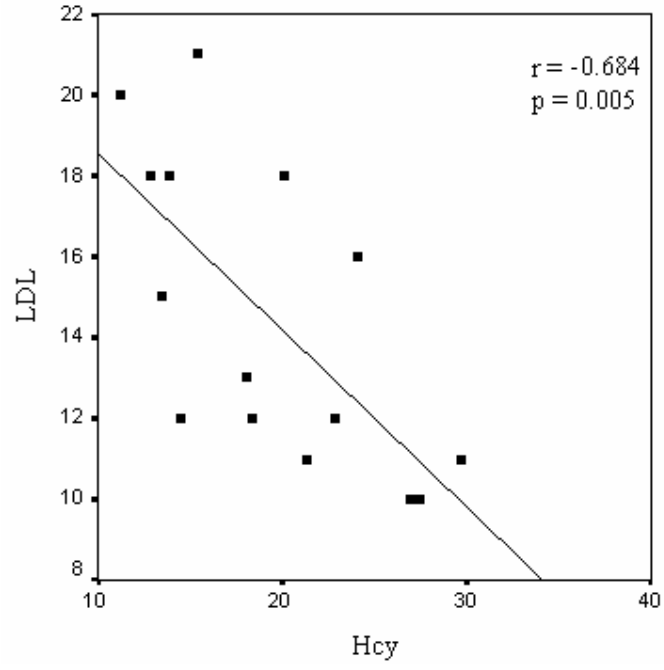
Şekil 21. hHcy grubunda Hcy ile eritrosit GSH düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 22. hHcy grubunda Hcy ile Vitamin B₁₂ düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 23. hHcy grubunda Hcy ile folik asit düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 24. hHcy grubunda Hcy ile LDL düzeyleri arasındaki ilişki.

5.2.3. hHcy+LA Grubunda Plazma Homosistein Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki

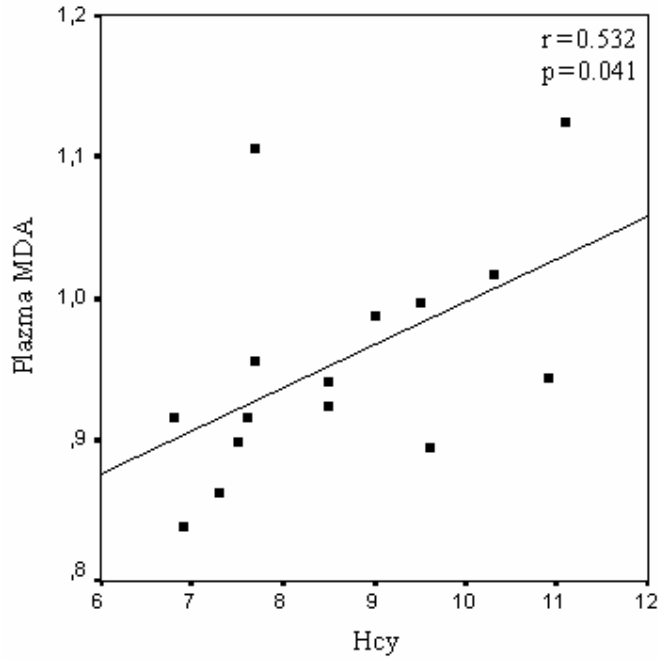
hHcy+LA grubunda plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki korelasyonlar Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. hHcy+LA grubunda plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki.

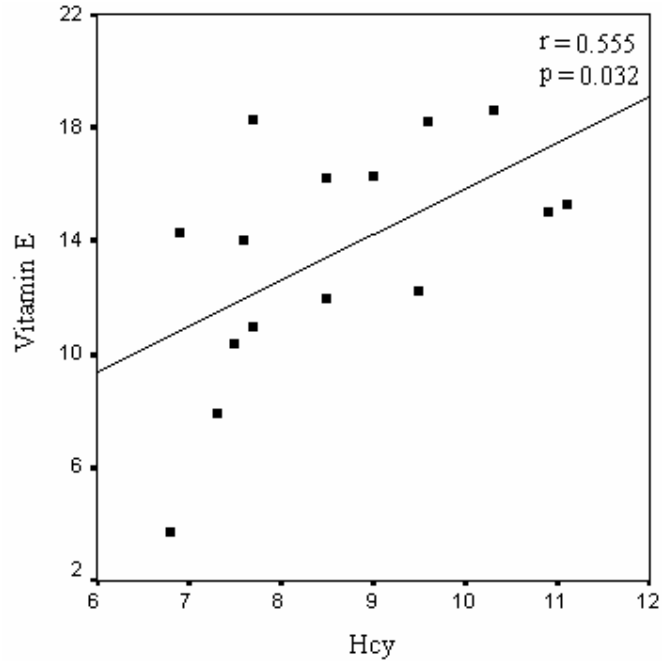
Grup 1 (hHcy+LA)		
	Homosistein	
	r	P
Plazma MDA	0.532	0.041
Eritrosit SOD	- 0.005	0.987
Eritrosit GSH-Px	0.106	0.708
Eritrosit CAT	0.022	0.937
Eritrosit GSH	- 0.597	0.019
Vitamin E	0.555	0.032
Vitamin C	0.115	0.683
Vitamin A	0.104	0.713
Vitamin B₆	- 0.132	0.639
Vitamin B₁₂	- 0.606	0.017
Folik asit	- 0.709	0.003
Trigliserit	0.465	0.081
Kolesterol	- 0.471	0.076
HDL-K	- 0.573	0.025
LDL-K	0.572	0.026
VLDL-K	0.145	0.607

hHcy+LA grubuna ait plazma Hcy düzeyleri ile plazma MDA düzeyleri ($r=0.532$, $p=0.041$; Şekil 25); Vitamin E düzeyleri ($r=0.555$, $p=0.032$; Şekil 26) ve LDL düzeyleri ($r=0.572$, $p=0.026$; Şekil 27) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi.

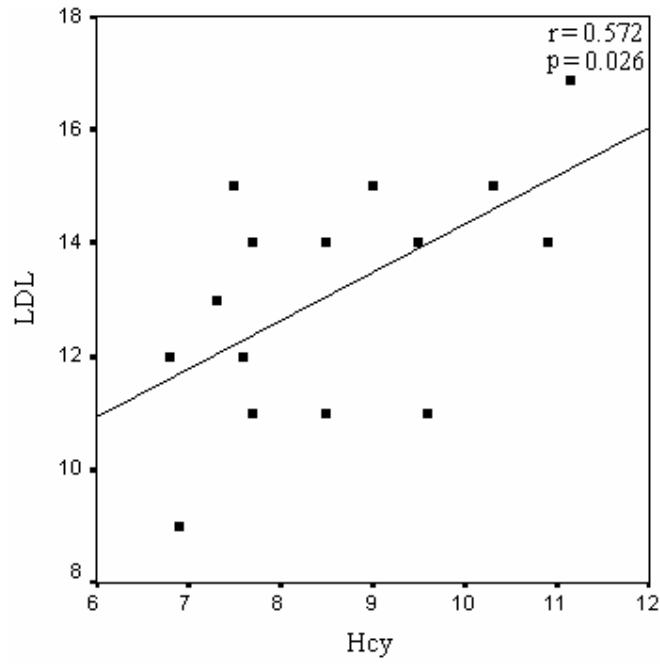
hHcy+LA grubuna ait plazma Hcy düzeyleri ile eritrosit GSH düzeyleri ($r=-0.597$, $p=0.019$; Şekil 28); Vitamin B₁₂ düzeyleri ($r=-0.606$, $p=0.017$; Şekil 29); folik asit düzeyleri ($r=-0.709$, $p=0.003$; Şekil 30); ve HDL düzeyleri ($r=-0.573$, $p=0.025$; Şekil 31) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyonlar tespit edildi.



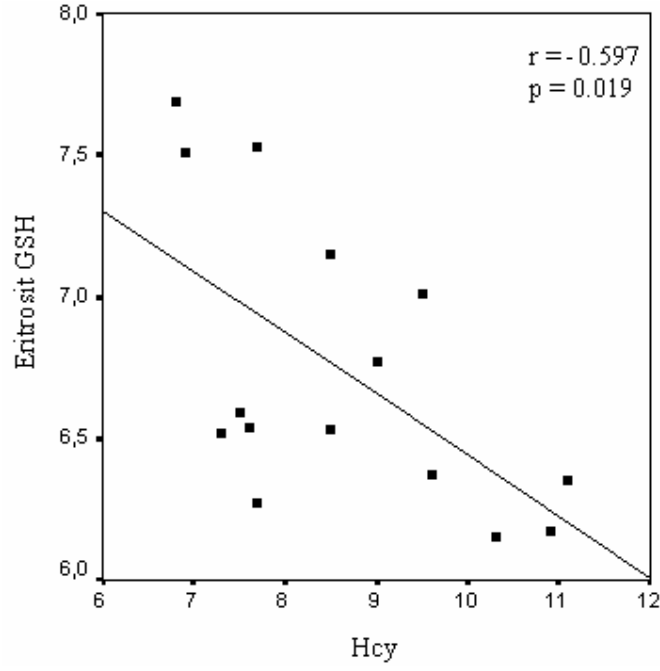
Şekil 25. hHcy+LA grubunda Hcy ile plazma MDA düzeyleri arasındaki ilişki.



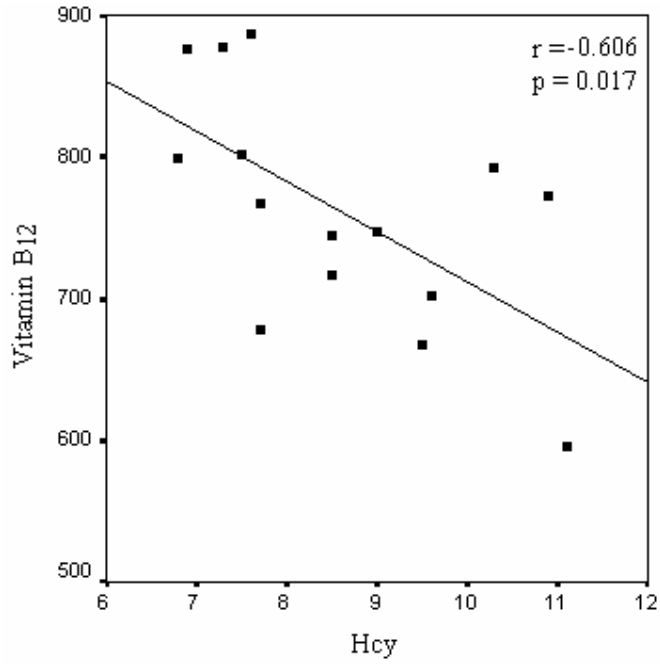
Şekil 26. hHcy+LA grubunda Hcy ile Vitamin E düzeyleri arasındaki ilişki.



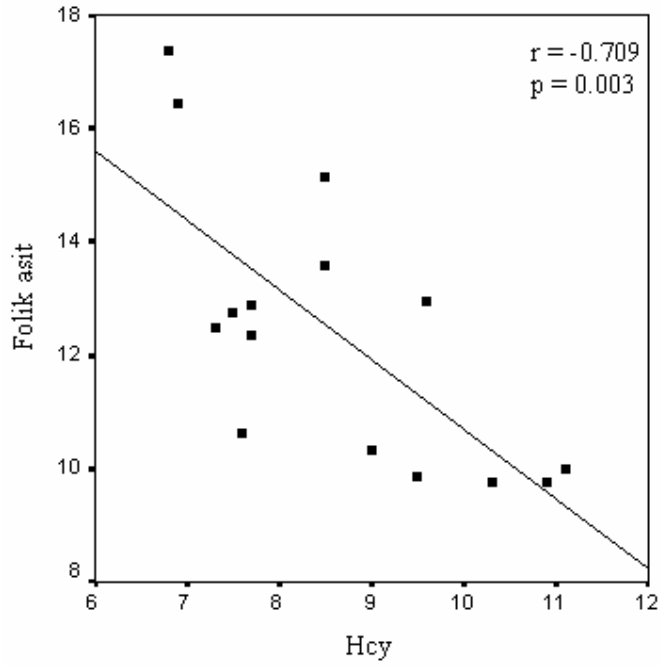
Şekil 27. hHcy+LA grubunda Hcy ile LDL düzeyleri arasındaki ilişki.



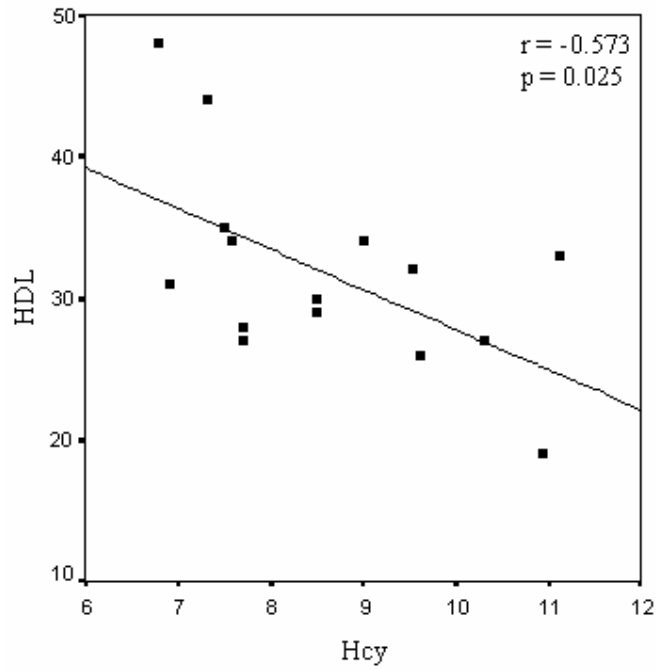
Şekil 28. hHcy+LA grubunda Hcy ile eritrosit GSH düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 29. hHcy+LA grubunda Hcy ile Vitamin B₁₂ düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 30. hHcy+LA grubunda Hcy ile folik asit düzeyleri arasındaki ilişki.

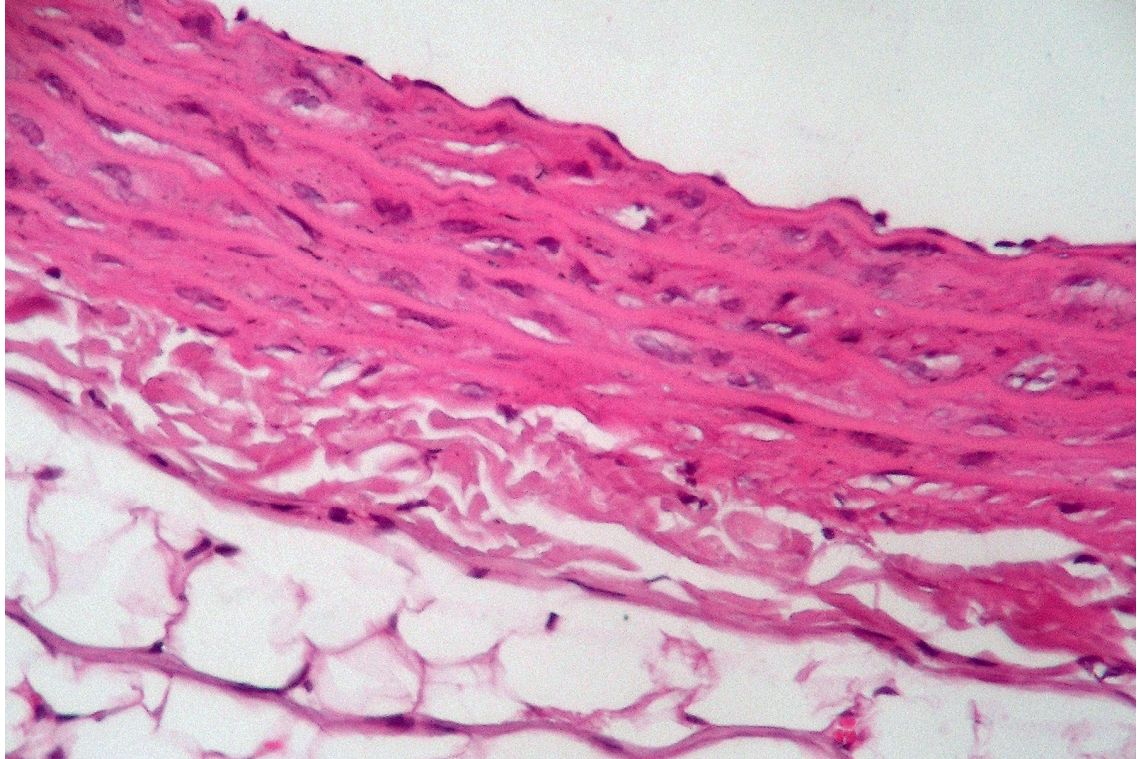


Şekil 31. hHcy+LA grubunda Hcy ile HDL düzeyleri arasındaki ilişki.

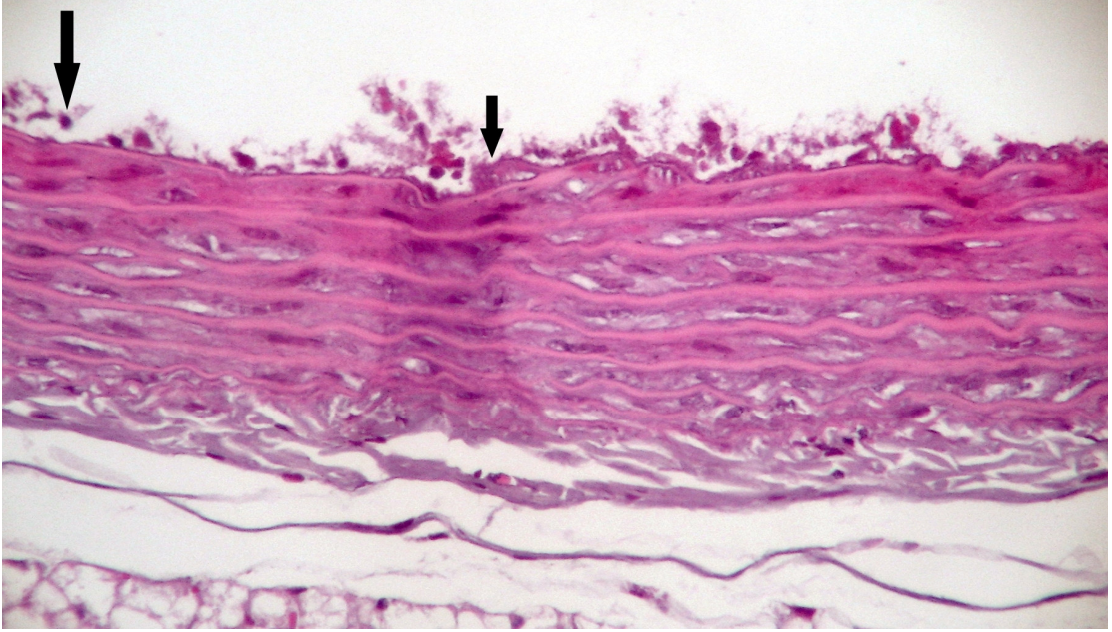
5.3. Histopatolojik Bulgular

Ratların aortlarından hazırlanan histolojik preparatların incelenmesi sonucu, hiperhomosisteinemi oluşturulan ratların damar endotel hücrelerinde şişme, dizilim bozuklukları, hücrelerde düzensizlik, yer yer ayrılma ve dökülmeler olduğu görüldü. Ayrıca lümen iç yüzeyinde intima tabakasına bitişik fibrin birikimi dikkat çekti (Şekil 33).

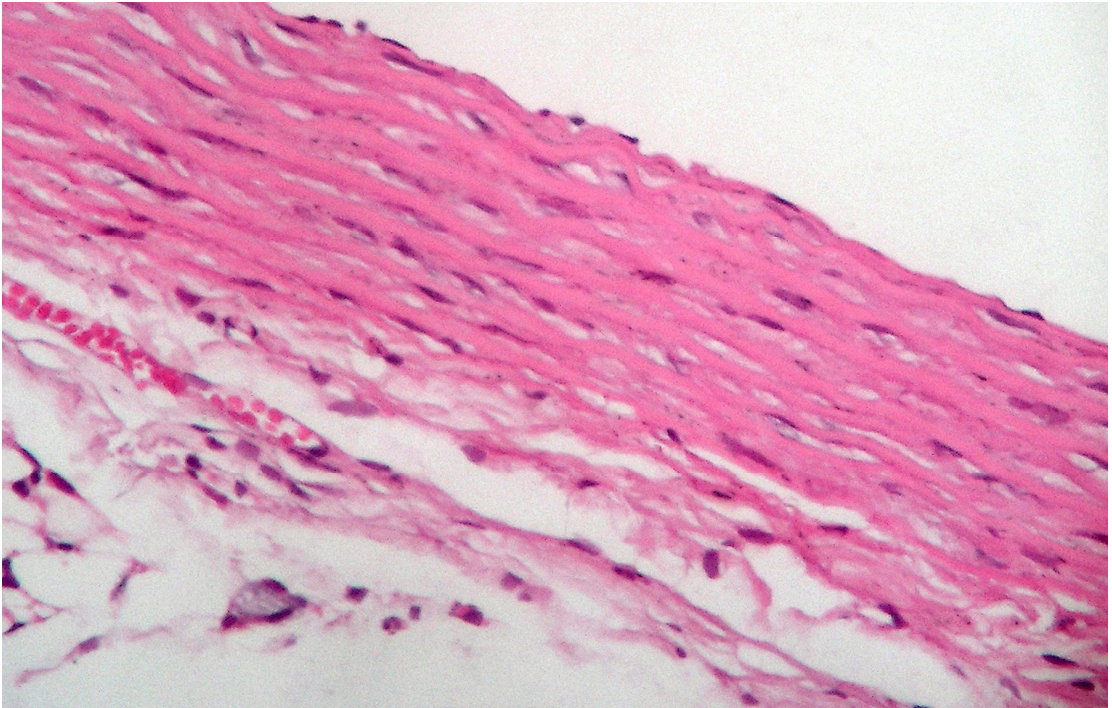
Hiperhomosisteinemi oluşturularak α -lipoik asit uygulanan gruptaki ratların aortlarından hazırlanan preparatlarda ise kontrol grubuyla aynı histolojik özellikler ve normal endotelial hücre dizilimi tespit edildi (Şekil 34).



Şekil 32. Kontrol grubu ratlara ait aortların normal histolojik görünümü (H.E $\times$ 200).



Şekil 33. Hiperhomosisteinemi grubu ratlara ait aort endotelyal hücrelerinde dökülme (uzun ok) ve lümen iç yüzeyinde fibrin birikiminin (kısa ok) histolojik görünümü (H.E $\times$ 200).



Şekil 34. Hiperhomosisteinemi + α -lipoik asit grubu ratlara ait aortların normal histolojik görünümü (H.E $\times$ 200).

6. TARTIŞMA

Günümüzde koroner kalp hastalığı (KKH) tüm dünyada ve Türkiye’de en önemli morbidite ve mortalite nedenleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle KKH gelişimine neden olan risk faktörleri ve korunma yollarının bilinmesi oldukça önem taşımaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalara paralel olarak sürdürülen klinik ve laboratuvar çalışmaları ile KKH ve aterosklerozun patogenezi aydınlatılmış, endojen ve ekzojen risk faktörleri belirlenmiştir (121). Ancak, kardiyovasküler hastalık gelişiminde etkili geleneksel ve majör risk faktörlerinin bazı kardiyovasküler kaynaklı ölümlerde tespit edilememesi araştırmacıların yeni risk faktörleri üzerine yoğunlaşmalarına neden olmuştur.

Koroner arter hastalığı da dahil olmak üzere ateroskleroz bulunan hastaların sadece 2/3’ünde obezite, sigara içimi, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diyabet veya pozitif aile öyküsü gibi klasik kardiyovasküler risk faktörleri tespit edilebilmektedir. Son zamanlarda yeni risk faktörleri olarak sol ventriküler hipertrofi, hiperhomosisteinemi, lipoproteinemi (a), C-reaktif protein (CRP), hiperfibrinojenemi ve inflamatuvar faktörler ele alınmaktadır (149).

Son 10 yılda, homosisteinin KKH için bağımsız ve yeni bir risk faktörü olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Plazma homosistein düzeylerindeki artış ile vasküler hastalıklar arasındaki klinik ilişki ilk kez 1969’da McCully tarafından, plazma Hcy düzeyleri yüksek ve homosistinürisi olan iki çocuğun otopsisinde yaygın arteriyel tromboz saptanması ile ortaya konulmuştur. Aynı araştırmacı daha sonra “*homosisteinin ateroskleroz teorisi*”ni ileri sürmüştür (101). Kardiyovasküler aterosklerotik hastalıkların gelişiminde yüksek homosistein düzeylerinin diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak önemli bir marker olduğu yapılmış birçok çalışmada ortaya konulmuştur (18,44,136).

Clarke ve ark. yaptıkları bir kohort çalışmada serebrovasküler hastalığı bulunanların %42'sinde, periferik vasküler hastalığı bulunanların %28'inde ve koroner arter hastalığı bulunanların %30'unda hiperhomosisteinemi görülürken; aynı çalışmada sağlıklı kişilerin hiçbirinde hiperhomosisteinemi bulunmadığını tespit etmişlerdir. Konvansiyonel risk faktörlerinin etkisi düzeltildikten sonra sağlıklı kişilere göre hiperhomosisteinemili hastalar arasında vasküler risk oranı 3.2 kat olarak tespit edilmiştir. Vasküler hastalığı olanlarda serum Hcy düzeylerinin geometrik ortalaması normal kişilere göre 1.33 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda Hcy'nin koroner hastalıklar da dahil vasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu sonucuna varılmıştır (28).

27 vaka-kontrollü retrospektif çalışmanın 1995 yılında yapılmış meta-analizinde yüksek homosistein düzeylerinin ölümcül ya da ölümcül olmayan aterosklerotik vasküler hastalık riskini koronerlerde 1.7, serebral dolaşımda 2.5, periferik dolaşımda ise 6.8 kat artırdığı saptanmıştır. Bu analizde total homosistein düzeylerinin aterosklerotik vasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu; homosistein düzeylerindeki 5 $\mu\text{mol/L}$ lik artışın plazma kolesterolünde 20 mg/dL artışa denk geldiği ve bu artışın vasküler riski 1/3 kat artırdığı ortaya konulmuştur. Ayrıca, popülasyonda koroner arter hastalık riskinin %10'unun homosisteine ait olduğu belirtilmiştir (18).

Nygard ve ark.'nın yaptıkları prospektif bir çalışmada ise koroner kalp hastalığı anjiyografik olarak gösterilmiş 587 hastada (4.6 yıl takiplerinde %10.9'u ölmüş) yüksek Hcy düzeyleri ile tüm nedenlere bağlı ölümler arasında ciddi bir ilişki ortaya konulmuştur. Homosistein konsantrasyonu 9 $\mu\text{mol/L}$ 'nin altında

olanlarda mortalite oranı % 3.8 iken, 15 $\mu\text{mol/L}$ veya üzerinde olanlarda %24.7 olarak belirlenmiş ve plazma total homosistein düzeylerinin koroner arter hastalarında mortalite için güçlü bir prediktör olduğu belirtilmiştir (119). Aynı yıl yapılan diğer bir çalışmada ise, homosistein düzeylerindeki her %10'luk artışın koroner arter hastalığı gelişme riskini yaklaşık %10 artırdığı ileri sürülmüştür (169).

Yine, Tokgözoğlu ve ark. (160) ile Aksoy ve ark.'nın (3) çalışmalarında da plazma Hcy düzeyinin 15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde olması ile koroner arter hastalığı riskinin 2.1-2.35 kat arttığı saptanmıştır.

“Homocysteine Studies Collaboration” grubunun 2002 yılında yaptığı, 12 prospektif ve 28 retrospektif çalışmayı kapsayan bir meta-analizde 16.786 kişilik sağlıklı popülasyonda normalden %25 yüksek homosistein konsantrasyonlarının (yaklaşık 3 $\mu\text{mol/L}$) iskemik kalp hastalığını %11, inmeyi %19 artırdığı ortaya konulmuştur (65).

Yine aynı yıl Wald ve ark. tarafından 72 genetik çalışma ve 20 prospektif çalışmayı kapsayan diğer bir meta-analizde de, homosistein düzeylerinin 3 $\mu\text{mol/L}$ 'lik azaltılması ile iskemik kalp hastalığı riskinin %16, derin ven trombozu riskinin %25 ve inme riskinin %24 azalacağı belirtilmiştir (171).

2005 yılına ait çeşitli yeni çalışmalarda da 12 $\mu\text{mol/L}$ 'den yüksek homosistein düzeylerinin koroner plak ve ateroskleroz gelişimi için prediktör olduğu ortaya konulmuştur (132). Yapılan diğer bir yeni çalışmada ise yüksek homosistein düzeylerinin koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü ve önemli bir medikal problem olduğu bir kez daha ortaya konulmuştur. Ayrıca yüksek homosistein konsantrasyonlarının ilerleyen yaş, sigara içimi ve

hipertansiyon ile ilişkili riski daha da artırdığı ve bununla mücadele için etkili stratejilerin acilen gerekli olduğu belirtilmiştir (58).

Görüldüğü gibi; homosisteinin kardiyovasküler hastalıklardaki rolünü araştırmak için son 15 yılda yapılan çok sayıda çalışmada orta düzeyde hiperhomosisteineminin inme (17), koroner arter hastalığı (48), venöz tromboz (35,36,37) periferik vasküler hastalıklar, koroner kalp hastalığı (32) ve miyokard infarktüsü (16,17) için bağımsız bir risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur. Bu ilişki, daha sonraları yapılan prospektif çalışmalar (119,129,130,154) ve meta-analizler (18,65,171) ile de desteklenmiştir.

Homosisteinin koroner kalp hastalığı ve aterosklerotik vasküler hastalıklar için risk faktörü olmayıp, sağlıksız yaşamının bir göstergesi olabileceğini ileri süren sınırlı sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen (20,30,80); günümüzde homosistein artık vasküler hastalıklar için bağımsız ve üzerinde durulması gereken önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir.

Hiperhomosisteinemi ile vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiden sorumlu mekanizmalar bütün yönleriyle aydınlatılamamış olmakla birlikte, oldukça kompleks ve multifaktöryel etkenleri söz konusu olduğu bilinmektedir. Homosisteinin trombomodülin aktivitesini azaltarak protein C aktivitesini azalttığı, protein C tarafından inaktive edilen temel koagülasyon faktörlerini harekete geçirdiği (137), antitrombin III'ü inhibe ettiği, endotel hücrelerindeki doku faktörünü aktive ettiği (53), serum fibrinojen düzeylerini artırdığı, fibrinolitik aktiviteyi bozduğu, bu etkileriyle prokoagülan aktivite ve protrombotik bir ortam oluşturduğu bilinmektedir. Homosisteinin ayrıca özellikle LDL olmak üzere lipidlerin oksidasyonunu sağlayarak damar duvarında köpük

hücre oluşumuna yol açtığı ve ateroskleroza zemin hazırladığı gösterilmiştir (53,173). Hiperhomosisteineminin ateroskleroz ve komplikasyonlarının gelişimine katkıda bulunduğu ileri sürülen mekanizmalardan en çok kabul görenlerinden biri de, oluşturduğu serbest radikallerin toksik etkisiyle endotelde meydana getirdiği hasar ve endotelyal fonksiyonlardaki bozukluklardır (155,164).

Homosisteinin farklı yönlerdeki birçok etkisini araştırmak için çeşitli çalışmalarda intraperitoneal yolla homosistein uygulanarak ya da içme sularına metiyonin katılarak rat, tavşan ve maymunlarda deneysel hiperhomosisteinemi modelleri oluşturulmuştur (87,165). Biz de, çalışmamızda ratlarda deneysel olarak kronik hiperhomosisteinemi modeli oluşturarak, hiperhomosisteineminin oksidan-antioksidan sistem, lipid parametreleri ve çeşitli vitaminler ile damar yapısı üzerine etkilerini ve oldukça kuvvetli “ideal” bir antioksidan olan α -lipoik asidin bu etkileri ne yönde değiştireceğini araştırmayı amaçladık. Günümüzde özellikle hayvansal protein ağırlıklı beslenme ile kalp hastalıkları arasındaki ilişkinin birçok platformda ele alınan bir konu olması nedeniyle, biz çalışmamızda buna daha yakın olarak ratların içme sularına metiyonin katılarak oluşturulan hiperhomosisteinemi modelini tercih ettik.

Altı haftalık deney süresi sonunda; içme sularına metiyonin katılan grupta plazma homosistein düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yaklaşık 3 kat arttığı ve orta düzeyde bir hiperhomosisteinemi olduğu belirlendi ($p < 0.001$; Şekil 8). Lipoik asit uyguladığımız grupta homosistein düzeyleri kontrol grubuna göre hafif bir yükselme göstermekle birlikte, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmaması oldukça dikkat çekiciydi. Bulgularımızda asıl çarpıcı olan sonuç, metiyonin ile birlikte uygulanan lipoik asidin

hiperhomosisteinemi oluşmasını önlemesi, homosistein düzeylerinde oldukça önemli bir azalma sağlaması ve bu gruba ait homosistein değerleri ile kontrol değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamasıydı. Literatürde homosistein ile lipoik asidin karşılıklı etkileşimlerine ait deneysel çalışma bulunmadığı da göz önüne alınırsa, tarafımızdan tespit edilen bu ilk bulguların özellikle kardiovasküler hastalıkların tedavi stratejisinde önemli bir yer edineceği düşünülebilir. Lipoik asidin bu etkisinin muhtemelen homosistein metabolizmasındaki enzimler veya kofaktörler ile etkileşiminden kaynaklandığı düşünülebilir.

Homosisteinin olumsuz ve ateroskleroza tetikleyen en önemli etkilerinden biri hiç şüphesiz oksidatif stres oluşturmaları ve lipid peroksidasyonuna yol açmasıdır. Pro-oksidan bir molekül olarak kabul edilen homosisteinin otooksidasyonu potansiyel sitotoksik pekçok reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Homosisteinin yüksek düzeyde reaktif tiyol grubu hızlı bir şekilde okside olur ve bu oksidasyon esnasında süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal meydana gelir (93). Oksijenden türeyen bu moleküllerin homosisteinin yol açtığı endotelial sitotoksikite ve damar düz kas hücre proliferasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Endotel hasarın mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte; hiperhomosisteineminin homosistein otooksidasyonu ve tiolakton oluşumu yoluyla bilinen lipid peroksidasyon başlatıcılarının, hidroksil radikallerin üretimini teşvik ettiği ileri sürülmektedir (153).

Yapılan çeşitli çalışmalarda da homosisteinin lipid peroksidasyonunu artırdığı farklı şekillerde ortaya konulmuştur. Lipid peroksidasyonun değerli bir göstergesi olarak F₂-izoprostan konsantrasyonlarının değerlendirildiği bir

çalışmada, yüksek plazma homosistein düzeyleri erkeklerde artan *in vivo* lipid peroksidasyon ile ilişkilendirilmiştir (170). Zhang ve ark. metiyoninden-zengin veya folattan-fakir diyet uygulanarak orta düzeyde hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda oksidatif stres göstergesi olarak MDA düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir (188). Young ve ark. ise deneysel olarak hiperhomosisteinemi oluşturulan domuzlarda kardiyak lipid peroksidasyon düzeylerinin yükseldiğini ortaya koymuşlardır (186). Ventura ve ark.'nın yaptığı diğer bir klinik çalışmada ise insanlarda oral metiyonin yüklemesi sonucu oluşan hiperhomosisteineminin *in vivo* lipid ve protein oksidasyonunda artış ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada homosistein düzeyleri arttıkça okside protein, konjuge dien ve MDA düzeylerinin de arttığı, ve homosistein ile MDA arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu ($r=0.47$, $p<0.05$) ortaya konulmuştur (168). Yapılan diğer bir çalışmada ise kardiyovasküler hastalığı olanlarda homosistein düzeylerinin ve buna paralel olarak MDA düzeylerinin yüksek bulunduğu ve homosistein ile MDA arasında güçlü bir pozitif ilişki ($r=0.59$, $p<0.05$) bulunduğu belirtilmiştir (112). Lipid peroksidasyon derecesini yansıtmak için TBARS düzeylerinin ölçüldüğü diğer bir çalışmada da yine yüksek homosistein düzeylerinin artan lipid peroksidasyon ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (40). Yüksek homosistein düzeylerinin lipid peroksidasyonunu artırdığı yönündeki çok sayıda çalışmaya rağmen, sınırlı sayıda birkaç çalışmada ise homosistein düzeyleri ile oksidatif stres arasında önemli bir ilişki bulunmadığı yönünde veriler sunulmuştur (68).

Kuvvetli bir antioksidan olan α -lipoik asidin hidroksil radikali, süperoksit radikali, lipid peroksil radikali, nitrik oksit radikali ve hipokloröz asidi kapsayan çeşitli radikallere karşı antioksidan olarak rol oynadığı, ayrıca singlet oksijen ve

hidrojen peroksit ile de etkileşime girdiği bilinmektedir (15,89,124). Yapılan pek çok *in vivo* ve *iv vitro* çalışmada α -lipoik asidin lipid peroksidasyon düzeylerini azalttığı ortaya konulmuştur. Birbirine paralel olarak yapılan iki ayrı çalışmada lipoik asidin, adriamycin ile ratlarda oluşturulan nefrotoksisite ve kardiotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği ve artmış lipid peroksidasyonunu önemli düzeyde azalttığı belirtilmiştir (10,96). Arivazhagan ve ark. tarafından yapılan üç ayrı deneysel rat çalışmasında ise yaşlanma ile artan lipid peroksidasyon düzeyleri farklı organlarda değerlendirilmiş; lipoik asidin plazma (4), karaciğer, böbrek (5) ve farklı beyin bölgelerinde (7) MDA düzeylerini azalttığı, lipid peroksidasyon ve protein oksidasyonunu önlediği ortaya konulmuştur.

Serbest radikaller yüksek reaktivitelerinden dolayı membran çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşerek peroksidasyonu başlatmaktadır. Bu şekilde oluşan lipid peroksitleri kolaylıkla yıkılarak başta MDA olmak üzere farklı sekonder ürünleri meydana getirmektedir. Bu ürünlerin çok çabuk bir şekilde ortamda farklı ürünlere dönüşmesi ve saptanmalarının zorluğu nedeniyle, lipid peroksidasyonunun indeksi olarak TBA reaksiyonu ile MDA düzeylerini ölçtük. Çalışma gruplarımızda plazma MDA düzeyleri karşılaştırıldığında hiperhomosisteinemi oluşturulan grupta MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükselmiş olduğu ($p<0.001$); bununla birlikte lipoik asit uygulanmasının lipid peroksidasyonunu azalttığı ve kontrol grubuna yakın bir seviyeye indirdiği tespit edildi (Şekil 9). Dokularda MDA düzeyleri karşılaştırıldığında ise karaciğer, böbrek ve kalpte plazma ile benzer şekilde MDA düzeylerinin hiperhomosisteinemi ile anlamlı şekilde arttığı ($p<0.001$) ve lipoik asit uygulanmasının bu artışı engellediği, hatta karaciğer ve böbrekte MDA

düzeylerini kontrol grubu değerlerinin bile altına çektiği görüldü (Tablo 8). Beyinde ise hiperhomosisteinemi lipid peroksidasyonunu etkilememekle beraber, lipoik asitin bu dokuda MDA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşürdüğü tespit edildi ($p<0.05$). Literatür taramalarından elde edilen verilerle uyumlu şekilde hiperhomosisteineminin lipid peroksidasyonunu artırdığı tespit edildi. Metabolizmanın oldukça değişkenlik göstermesi nedeniyle; ele alınan dört ayrı organda oluşan hasarın farklı mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşturulamamakla birlikte; karaciğer, böbrek ve kalbin bu hasardan daha ileri düzeyde etkilendiği sonucuna varılabilir.

Oksidan moleküller organizmada sürekli bir oluşum ve antioksidanlar tarafından sürekli bir etkisizleştirilme süreci içindedirler. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır (181). Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunan Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Katalaz (CAT) enzimleri serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı en önemli defans mekanizmalarını oluştururlar. SOD enzimi, toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırarak, potansiyel zararlı etkilere karşı savunmada çok önemli bir rol oynar. Normal koşullarda hücrelerde bulunan hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin yıkımını katalize eden GSH-Px, lipid peroksidasyonunun başlaması ve gelişmesini engelleyen önemli bir enzimdir. Ancak yüksek konsantrasyonlardaki hidrojen peroksitin detoksifikasyonunu esas olarak CAT üstlenmektedir (147).

Plazmada üretilen ve eritrosit hücre membranını geçebilen hidrojen peroksit ve süperoksit iyonları eritrositlerde toplanır. Bu açıdan eritrositler önemli bir

radikal havuzu olup, hidrojen peroksidin detoksifikasyonu için GSH-Px ve CAT, süperoksit anyon radikallerinin dismutasyonu için SOD ile Vitamin A, E, C gibi hücre içi antioksidan defans sistemleri devreye girerek daha toksik hidroksil radikallerinin oluşması engellenir (70). Eritrositlerde ve homojenize edilmiş doku örneklerinde SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerine bakılarak organizmanın oksidatif strese ne düzeyde etkilendiği hakkında fikir edinilebilir.

Homosistein düzeylerinin artmasının olumsuz etkilerinden biri, endotelde bulunan ve lipid peroksidasyonunu engelleyen glutatyon peroksidaz aktivitesinin baskılanmasıdır. Upchurch ve ark. aortik endotel hücrelerin 4 saat boyunca 50 μ M homosistein ile inkübasyonunun GSH-Px aktivitesini %64 oranında azalttığını (167), 250 μ M homosistein konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinde %81 oranında azalma görüldüğünü *in vitro* deneyler ile ortaya koymuşlardır (166).

Yamamoto ve ark. endotel hücre yüzeyine ekstrasellüler SOD'un bağlanması üzerine homosisteinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, homosisteinin SOD etkinliğini azalttığını ifade etmişlerdir. Homosisteinin endotel heparan sülfat proteoglikanını bozarak, SOD'un arteriyel endotel hücre yüzeyine bağlanmasını engellediği belirtilmektedir. Yüksek miktarda homosistein fibroblastlarca ortama verilen SOD ekspresyonunu azaltmaktadır. Böylece homosisteinin endotel hücrelerin özellikle süperoksit radikali olmak üzere serbest radikallere karşı savunma yeteneğini azalttığı bildirilmiştir (182).

Homosisteinin antioksidan enzimler üzerine etkisini araştırmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada, artan homosistein düzeylerinin hidrojen peroksid oluşumunu artırdığı ve başlıca antioksidan enzimler olan GSH-

Px, SOD ve CAT aktivitesinin baskılanmasına yol açtığı ve oksidatif stres oluşturduğu ileri sürülmüştür (138). Toborek ve ark. 6-9 ay boyunca metiyoninden-zengin diyetle beslenen tavşanlarda plazma ve aortik TBARS düzeyleri ile aortta antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı artış tespit ederken; eritrositlerde ise SOD aktivitesinin arttığını, CAT aktivitesinin değişmediğini, GSH-Px aktivitesinin ise azaldığını belirlemişlerdir (159). Yine deneysel bir çalışmada metiyoninden-zengin ve folattan-fakir diyetle beslenen ratlarda kan, karaciğer, barsak, aort endotelyumu ve myokardda lipid peroksidasyon substanslarının yükseldiği; GSH-Px, SOD, CAT ve GSH-Redüktaz aktivitelerinin ise azaldığı ortaya konulmuştur (82).

Moat ve ark. tarafından homosistein metabolizma defekti bulunan hasta grubunda yapılan diğer bir çalışmada ise yüksek plazma homosistein konsantrasyonlarının antioksidan enzimler üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda homosistein düzeylerinin yüksekliği ile eritrosit SOD ve plazma GSH-Px aktivitesinde artışa rağmen eritrosit CAT ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Yüksek homosistein düzeylerinde antioksidan enzim aktivitelerindeki artışın, oluşan oksidatif strese karşı, serbest radikal hasarını minimize etmek için oluşan adaptif bir yanıt olduğu ileri sürülmüştür (107).

Kuvvetli bir antioksidan olan lipoik asidin antioksidan enzimler üzerine etkisini araştırmak için de birçok çalışma yapılmıştır. Maritim ve ark. streptozotosin ile diyabet oluşturdukları ratlarda oksidatif stres biyomarkerlarını araştırdıkları bir çalışmada; lipoik asidin karaciğer, böbrek ve kalpte SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerini değiştirerek diyabet sonucu oluşan oksidatif stresi

azalttığını belirtmişlerdir (97). Shila ve ark. ise arsenik intoksikasyonu oluşturulan ratlarda beyinde artan oksidan üretimi ve lipid peroksidasyon düzeylerinin lipoik asit uygulanmasından sonra azaldığını ortaya koymuşlardır. İntoksikasyon ile azalan enzim aktivitelerine rağmen; lipoik asidin bütün beyin bölgelerinde SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerini artırdığını belirtmişlerdir (148). Lipoik asidin antioksidan enzim aktivitelerini artırdığını belirten başka çalışmalar da yapılmıştır (4,10).

Çalışmamızda gruplara ait eritrosit GSH-Px aktivitelerini karşılaştırdığımız zaman; literatür bilgileri ile uyumlu olarak hiperhomosisteinemi oluşturulan grupta GSH-Px aktivitelerinin, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.001$). Lipoik asit uygulanmasının ise bu azalmanın önüne geçtiği ve GSH-Px aktivitesinin daha ılımlı bir seviyede tutulduğu belirlendi (Şekil 11). Hiperhomosisteinemi grubuna ait plazma homosistein düzeyleri ile eritrosit GSH-Px aktiviteleri karşılaştırıldığında; aralarında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki olduğu görüldü ($r = -0.567$, $p=0.028$; Şekil 19).

Karaciğer ve böbrekte GSH-Px aktivitelerinin hiperhomosisteinemi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düştüğü görüldü. Lipoik asit uygulanmasının karaciğerde bu düşüşü tamamen önlerken, böbrekte kontrol grubuna yakın bir seviyede tuttuğu belirlendi. Kalpte ise eritrosit, karaciğer ve böbreğin aksine; hiperhomosisteinemi grubunda GSH-Px aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü. Beyinde ise GSH-Px aktiviteleri bakımından kontrol grubu ile hiperhomosisteinemi grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Özellikle karaciğer ve böbrekte görülen bu farklılık; homosistein metabolizmasında daha etkin rol alan bu iki organda oluşan oksidatif

strese karşı, serbest radikal hasarını önlemek amacıyla intrasellüler bir enzim olan GSH-Px'in tüketilme sonucu azaldığı şeklinde yorumlanabilir. Lipoik asit uygulanmasının ise dört dokuda da GSH-Px aktivitelerini artırdığı görüldü (Tablo 10). Bu da bize, dışarıdan verilen bu kuvvetli antioksidanın vücutta antioksidan defans sistemi destekler mahiyette bir özellik göstererek eritrosit ve doku GSH-Px aktivitelerini artırdığını göstermektedir.

Gruplara ait eritrosit CAT aktiviteleri karşılaştırıldığında; hiperhomosisteinemi grubunda CAT aktivitelerinin, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Lipoik asit uygulanmasının ise CAT aktivitesindeki azalmanın önüne geçerek, enzim aktivitesinin hemen hemen kontrol grubuna yakın değerlerde tutulmasını sağladığı görüldü (Şekil 12). Hiperhomosisteinemi grubuna ait plazma homosistein düzeyleri ile eritrosit CAT aktiviteleri karşılaştırıldığında; aralarında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki olduğu görüldü ($r = -0.667$, $p = 0.004$; Şekil 20).

Karaciğer ve böbrekte CAT aktivitelerinin hiperhomosisteinemi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düştüğü görüldü. Kalp ve beyinde ise CAT aktiviteleri bakımından kontrol grubu ile hiperhomosisteinemi grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Lipoik asit uygulanmasının ise yine GSH-Px aktivitesine benzer şekilde CAT aktivitelerini de hiperhomosisteinemi grubuna kıyasla artırdığı görüldü (Tablo 11).

Eritrosit ve dokulara ait GSH-Px ve CAT aktiviteleri genel olarak ele alındığı zaman; hiperhomosisteineminin bu antioksidan enzimlerin aktivitesini azalttığı görüldü. Bu azalma, hiperhomosisteinemi sonucu oluşan serbest radikal hasarına karşı antioksidan savunma amaçlı olarak bu iki enzimin tüketildiği

şeklinde açıklanabilir. Lipoik asidin ise; homosisteinin oluşturduğu oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu azaltmanın yanı sıra, antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmayı önemli ölçüde önlediği dikkati çekti. Dokular düzeyinde bakıldığı zaman, bu etkilerin karaciğer ve böbrekte daha belirgin olduğu; kalp ve beyinde ise yeterince oluşmadığı görüldü. Bunun muhtemel bir nedeni olarak; homosisteinin karaciğer ve böbreği daha ileri bir seviyede etkilemesi düşünülebilir.

Eritrosit SOD aktiviteleri bakımından her üç grup arasında da anlamlı bir farklılık bulunamadı. Her üç grupta da plazma homosistein düzeyleri ile eritrosit SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında; aralarında anlamlı bir korelasyon bulunmadığı görüldü.

Dokulara ait SOD aktiviteleri karşılaştırıldığı zaman; hiperhomosisteinemi oluşturulan grupta SOD aktiviteleri hafif artmakla birlikte, kontrol grubu ile hiperhomosisteinemi grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi. Bununla birlikte; böbrek, kalp ve beyin SOD aktivitelerinin lipoik asit uygulanan grupta kontrol grubu değerlerinden bile anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). Lipoik asit uygulanan grupta karaciğer SOD aktivitesi de kontrol grubundan daha yüksek olmakla birlikte, bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 9).

Eritrosit ve dokulara ait SOD aktivitelerine genel olarak bakıldığı zaman; GSH-Px ve CAT'ın aksine hiperhomosisteineminin SOD aktivitelerini etkilemediği, ancak lipoik asidin yine bu enzimin de aktivitesini artırdığı görüldü.

Özetle; incelediğimiz üç antioksidan enzim birlikte düşünüldüğü zaman, hiperhomosisteineminin GSH-Px ve CAT aktivitelerini azaltırken, SOD

aktivitelerini etkilemediği görüldü. Çalışmamızda 6 hafta boyunca yüksek doz metiyonin verilerek oluşturulan hiperhomosisteineminin gerçekten de literatürlerde belirtildiği şekilde hidrojen peroksit oluşumunu artırdığı ve bunun sonucu olarak da antioksidan savunma amaçlı olarak GSH-Px ile CAT'ın tüketildiği düşünülebilir. Hiperhomosisteineminin SOD aktivitesini etkilememesi, çalışmamızda homosisteinin süperoksit anyon radikali oluşumunu çok fazla tetiklemediğini düşündürebilir. Bununla birlikte bizim Cu/Zn SOD aktivitesini ölçtüğümüz göz önüne alınırsa; ratlarda bu enzimin kofaktörü olan çinko ve bakır düzeylerini ölçmediğimiz ve Mn-SOD, ekstrasellüler-SOD veya total SOD düzeylerini belirleyemediğimiz için, homosisteinin SOD aktivitesi üzerine etkisi konusunda kesin bir yargıya varılamamıştır.

Normal hücrelerde enzimatik savunma sistemi dışında birçok non-enzimatik savunma sistemi de bulunmaktadır. Önemli bir endojen ve non-enzimatik antioksidan olan redükte glutatyon (GSH) serbest radikaller ve peroksinitritlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Ayrıca protein yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller (181). Glutatyonun apoptozisin regülasyonunda önemli bir rol oynadığı, homosistein ve diğer prooksidan bileşiklerin oluşturduğu serbest oksijen radikallerinin lipoprotein ve proteinleri oksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (64).

Hernanz ve ark. yaş gruplarında yaptıkları bir çalışmada total intrasellüler glutatyon düzeyleri ile plazma homosistein düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunduğunu belirtmişlerdir (64). Özdemir ve ark. da mikroalbüminürisi bulunan ve bulunmayan tip 2 diyabetik hastalarda homosistein, MDA, GSH-Px ve GSH düzeylerini araştırdıkları çalışmada homosistein düzeyleri ile eritrosit GSH

düzeyleri arasında anlamlı negatif korelasyon tespit etmişlerdir ($r=-0.385$, $p<0.01$) (122). Muda ve ark. da tedavi görmemiş hipertansif hastalarda homosistein ve sistolik kan basıncının, intrasellüler oksidatif stresin göstergesi olarak eritrosit GSH düzeylerinde azalma ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (113).

Lipoik asidin, hücrelerde başlıca antioksidan olan glutatyon üretimini *in vivo* ve *iv vitro* olarak stimüle ettiği bildirilmiştir (21). Arivazhagan ve ark. yaptıkları iki ayrı çalışmada, yaşlanan ratlarda lipoik asidin doza bağımlı bir şekilde tam kan GSH düzeyleri (4) ile karaciğer ve böbrek mitokondri GSH düzeylerini (6) anlamlı şekilde artırdığını, hatta kontrol grubundan daha yüksek seviyelere çıkardığını göstermişlerdir. Yine yapılan iki farklı deneysel rat çalışmasında da α -lipoik asidin adriamycin ile nefrotoksisite oluşturulan ratlarda serum GSH düzeylerini artırdığı (96), yine kardiyak lipid peroksidasyon oluşturulan ratlarda da kalp dokusu GSH düzeylerini artırdığı ortaya konulmuştur (10).

Bizim çalışmamızda eritrosit GSH düzeyleri hiperhomosisteinemi oluşturulan grupta, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük olarak bulundu ($p<0.001$). Lipoik asit uygulanan grupta ise eritrosit GSH düzeylerinin her iki gruba göre anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$). Bu sonuçlar lipoik asidin, hiperhomosisteineminin oluşturduğu lipid peroksidasyonu da aşarak eritrosit GSH düzeylerinin oldukça çarpıcı bir şekilde artmasına neden olduğunu açıkça göstermektedir (Şekil 13). Her üç grupta da, plazma homosistein düzeyleri ile eritrosit GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyonlar tespit edildi (kontrol grubunda $r= -0.812$, $p=0.000$, Şekil 16; hHcy

grubunda $r = -0.658$, $p = 0.008$, Şekil 21 ve hHcy+LA grubunda $r = -0.597$, $p = 0.019$, Şekil 28).

Endojen, enzimatik olmayan antioksidanlardan Vitamin A, E ve C de antioksidan sistemin önemli bileşenleri arasındadır. Vitamin A'nın öncül maddesi olan β -karoten alkoksil ve peroksil radikallerinin etkin temizleyicisi olarak görev yapmaktadır (2,185). Lipid faz antioksidanlardan biri olan Vitamin E'nin başlıca fonksiyonu, lipid peroksitlerini etkisizleştirerek peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Güçlü bir indirgeyici ajan olan Vitamin C ise süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştiren önemli bir antioksidandır. Sulu fazda bulunmasına karşın lipid peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipidleri ve zarları da oksidan hasara karşı korumaktadır. Vitamin C aynı zamanda Vitamin E'nin rejenerasyonunda da görev almaktadır (181).

Hiperhomosisteineminin Vitamin A, E ve C düzeyleri üzerindeki etkileri veya bu etkilerin mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır. Kardiovasküler hastalıklarda plazma tiyol bileşikleri ve antioksidan vitaminlerin değerlendirildiği bir çalışmada, plazma homosistein düzeyleri ile Vitamin E ve Vitamin A düzeyleri arasında anlamlı negatif korelasyon bulunduğu ortaya konulurken (sırasıyla; $r = -0.260$, $p = 0.033$ ve $r = -0.255$, $p = 0.036$); homosistein ile Vitamin C düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir (184). Clarke ve ark. tarafından heterozigot CBS eksikliğine sahip hiperhomosisteinemili hasta grubunda yapılan bir çalışmada ise hiperhomosisteinemi ve kontrol grupları arasında Vitamin A ve Vitamin E düzeyleri bakımından herhangi bir fark bulunmadığı belirtilmiştir (29). Limpach ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise

homosisteinin A vitamini aktivitesi gösteren retinoik asit formunun sentezini inhibe ettiği; homosistein kaynaklı kongenital defektlerin bu inhibisyondan kaynaklanabileceği ileri sürölmüştür (90).

Lipoik asidin ise Vitamin C ve Vitamin E'yi, aktif durumlarına dönüştürüp yeniden oluşturma yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir (95,143). Arivazhagan ve ark. yaptıkları iki ayrı deneysel rat çalışmasında α -lipoik asidin yaşlanmış ratlarda plazma Vit.E ve tam kan Vit C düzeylerini artırdığını (4); karaciğer ve böbrek mitokondrisinde de aynı şekilde bu vitaminlerin düzeylerinde önemli artışa yol açtığını bildirmişlerdir (6). Balachandar ve ark ise kardiyak toksisite oluşturdıkları ratlarda α -lipoik asidin kalp dokusu Vit. E ve C düzeylerini anlamlı şekilde artırdığını belirtmişlerdir (10).

Biz çalışmamızda gruplar arasında Vitamin A, E ve C düzeylerini karşılaştırdığımız zaman kontrol grubu ile hiperhomosisteinemi oluşturulan grup arasında bu vitaminlerin düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığını belirledik. Metiyonin ile indüklediğimiz hiperhomosisteineminin bu vitaminlerin düzeylerini etkilemediğini tespit ettik. Lipoik asit uyguladığımız grupta Vitamin E ve Vitamin C düzeylerinin gerçekten de kontrol grubundan bile daha yüksek değerlere ulaştığını gördük. Bununla birlikte, Vitamin A düzeylerinin lipoik asit uygulanan grupta kontrol değerlerinden daha düşük olduğu göröldü (Tablo 12).

Folik asit, Vitamin B₁₂ ve Vitamin B₆; homosistein metabolizmasında kofaktör ve kosubstrat olarak görev alan önemli vitaminlerdir (57,83,85,144,146). Bu vitaminlerin eksiklikleri, hiperhomosisteineminin etiyolojisinde oldukça etkili ve önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır. Morrison ve ark. yaptıkları çalışmada 5056 kişiye 15 yıl süreyle klinik takip uygulamışlar ve folat eksikliği

bulunanlarda koroner arter hastalığını folat seviyesi yüksek olanlara oranla 1.69 kat daha yüksek bulmuşlardır (111). Rimm ve ark. ise kadınlarda koroner kalp hastalığı risk faktörlerini kontrol altına alarak 14 yıl takip etmişler ve yeterli miktarlarda folik asit ve Vit B₆ kullananlarda koroner kalp hastalığı ve myokard infarktüsü gelişiminde bu vitaminleri almayanlara oranla azalma tespit etmişlerdir (135). Birçok çalışmada folik asit, Vit B₁₂ ve Vit B₆'nın yüksek homosistein düzeyleri ile ters orantılı olduğu; bu vitaminlerin eksikliğinde hiperhomosisteinemi oluşması yanısıra, hiperhomosisteineminin tedavisinde de bu vitaminlerden yararlanıldığı ortaya konulmuştur (78,91,105,110,162). Koroner anjiyografi yapılan 165 kişilik hasta grubunda yapılan bir çalışmada yüksek homosistein konsantrasyonlarında folik asit ve Vit. B₁₂ düzeylerinin düşük bulunduğu ve homosistein ile bu iki vitamin arasında negatif bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (156).

Çalışmamızda gruplara ait Vitamin B₁₂, Vitamin B₆ ve folik asit düzeylerini karşılaştırdığımız zaman; hiperhomosisteinemi oluşturulan grupta her üç vitamin düzeyinin kontrol grubuna göre oldukça anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Lipoik asit uygulanan grupta Vitamin B₁₂ ve Vitamin B₆ düzeylerinin hiperhomosisteinemi grubuna göre anlamlı şekilde yükselmiş oldukları görülmektedir. Folik asit düzeyleri ise lipoik asit uygulanan grupta hiperhomosisteinemi grubuna göre hafif bir artış göstermekle birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (Tablo 13). hHcy grubu ve hHcy+LA grubunda plazma homosistein düzeyleri ile Vitamin B₁₂ ve folik asit düzeyleri arasında anlamlı negatif korelasyon olduğu görülmektedir. Hiperhomosisteinemi

oluşturulan ratlarda bu vitaminlerin düzeylerindeki azalmanın; artan homosisteinin metabolizmasına bağlı olarak burada kofaktör ve kosubstrat olarak görev yapan bu vitaminlerin fazla kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Lipoik asit uygulanan grupta Vit. B₁₂ ve folik asit düzeyleri hiperhomosisteinemi grubuna göre yüksek bulunmakla birlikte; lipoik asidin bu vitaminler üzerinde bilinen herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Bu artışın lipoik asidin vitaminler üzerine herhangi bir etkisinden değil de, homosistein düzeylerinde oluşturduğu anlamlı düşüş sonucu metabolizmada kullanılan bu vitaminlerin daha az harcanmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

2005 yılında yapılan bir çalışmada hiperhomosisteinemi ile ilişkili kardiovasküler patolojik değişiklikler; endotelial hücre hasarı ve bozulmuş endotelial fonksiyon, vasküler düz kas hücre proliferasyonu, tromboz aktivasyonu, monosit aktivasyonu ve bunlara ilaveten kolesterol ve trigliserit biyosentezinin bozulması olarak ele alınmıştır. Yine aynı çalışmada homosisteinin vasküler patolojisi; otooksidasyon ve reaktif oksijen türevlerinin oluşumu, SAH oluşumu ile hipometilasyon, nitrik okside bağlanma sonucu nitrozilasyon ve proteinlerle birleşme sonucu protein-homosisteinilasyon oluşumu olmak üzere başlıca dört biyokimyasal parametre ile açıklanmıştır (183).

Homosisteinin olumsuz etkilerinden önemli biri de LDL kolesterolün oksidasyonuna neden olarak LDL'nin plazmadan temizlenmesini sağlayan reseptörlere bağlanmasını engellemesi, okside LDL'nin serum düzeyini artırması ve endotelde köpük hücrelerine dönüşümleri sağlayarak ateroskleroza zemin hazırlamasıdır (173).

Endotelial hücre kültürleri ile yapılan bir çalışmada homosisteinin kolesterol biyosentezinde hız-sınırlayıcı enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA redüktaz (HMGCoA redüktaz) ekspresyonu artırdığı, böylece hem endotelial intrasellüler hem de ekstrasellüler kolesterol düzeylerinin yükseldiği tespit edilmiştir (87). Yapılan deneysel bir çalışmada da 4 hafta metiyoninden-zengin diyet verilerek hiperhomosisteinemi oluşturulan ratların karaciğerlerinde HMGCoA redüktaz enzim aktivitesi ve mRNA ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Homosisteinin hepatik kolesterol biyosentezi üzerine stimülatör etkilerinin hepatik lipid birikimi, hiperkolesterolemi ve hiperhomosisteinemi ile ilişkili kardiovasküler bozukluklar için önemli bir mekanizma oluşturacağı ileri sürülmüştür (179). Yapılan diğer bir çalışmada ise hepatositlerde hiperhomosisteinemi ile oluşturulan endoplazmik retikulum stresinin, sterol regülatör eleman bağlayıcı proteini aktive ederek lipid biyosentezini artırdığı ve hepatik steatoza yol açtığı belirtilmiştir (174). Hiperhomosisteinemi oluşturulan bir rat çalışmasında da homosisteindeki artışa paralel olarak kolesterol ve trigliserit düzeylerinde yaklaşık 2 kat artış görüldüğü belirtilmiştir (40).

Baydaş ve ark. lipoik asit uygulanan ratlarda kolesterol, trigliserit, LDL-K ve VLDL-K düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığını; HDL-K düzeylerinin ise yine kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığını ortaya koymuşlardır (12).

Arivazhagan ve ark. α -lipoik asidin lipid peroksidasyonu ve lipid düzeyleri üzerine etkilerini araştırdıkları deneysel bir rat çalışmasında lipoik asidin plazma, karaciğer ve böbrekte kolesterol, trigliserid, fosfolipid ve serbest yağ asit düzeylerini azalttığını belirtmişlerdir (5). Lipoik asidin LDL'nin oksidatif

modifikasyonunu inhibe ettiği ve hepatik HMG-CoA redüktazın inhibisyonu ile plazma kolesterol düzeylerini azalttığı, anti-kolesterol aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Yine lipoik asidin trigliserid düzeylerini azaltması da trigliserit klerensini stimüle eden lipoprotein lipaz aktivitesindeki artış ile ilişkilendirilmiştir (5).

Çalışmamızda literatür bilgileri ile uyumlu şekilde; trigliserit, kolesterol, LDL-K ve VLDL-K düzeyleri hiperhomosisteinemi oluşturulan grupta kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olarak bulundu. Lipoik asidin ise, LDL-K hariç diğer lipid parametrelerine ait olumsuz değişiklikleri nötralize ettiği görüldü (Tablo 14). Gruplar arasında HDL-K düzeyleri bakımından ise anlamlı bir fark bulunamadı. hHcy+LA grubunda plazma homosistein düzeyleri ile LDL düzeyleri arasında pozitif ($r=0.572$, $p=0.026$; Şekil 27); HDL düzeyleri arasında ise negatif korelasyon ($r= -0.573$, $p=0.025$; Şekil 31) tespit edildi.

Hiperhomosisteinemi oluşturulan çeşitli rat modellerinde aortta endotelyal hasar, hücre proliferasyonu ve hiperplazisi, subendotelyal aralıkta kalınlaşma, fibröz döküntü, elastik laminada ayrılmalar, değişik düzeylerde aterosklerotik damar lezyonları olduğu görülmüştür (88,115,161,189).

Çalışmamızda aortlara ait histolojik kesitler incelendiğinde hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda aort endotelyal hücrelerinde şişme, dizilim bozuklukları, yer yer ayrılma ve dökülmeler ile lümen iç yüzeyinde intimaya bitişik fibrin birikimi dikkati çekti (Şekil 33). Hiperhomosisteinemi oluşturulan gruptaki ratların hepsinde farklı düzeylerde bu damar lezyonları görülürken, hiperhomosisteinemi ile birlikte lipoik asit uygulanan gruptaki ratların hiçbirinde bu tarz oluşumlara rastlanmadı ve kontrol grubuyla aynı histolojik özelliklere sahip normal endotelyal hücre dizilimi tespit edildi (Şekil 34). Bu

bulgular ele alındığında hHcy'nin olumsuz vasküler etkilerinin lipoik asit tarafından önlendiği ve lipoik asidin Hcy düzeylerindeki artışın önüne geçerek homosisteinin zararlı etkilerini baskıladığı düşünülmektedir.

Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları özetleyecek olursak:

- Deneysel olarak kronik hHcy oluşturulan ratlarda lipoik asit uygulanmasının plazma Hcy düzeylerini önemli bir oranda azalttığı ve hHcy oluşumunu engellediği görüldü. Bu etkinin mekanizması bilinmemekle birlikte; lipoik asidin muhtemelen homosistein metabolizmasında görev yapan enzimlerin aktivitelerini veya bu enzim kofaktörlerinin düzeylerini artırarak etkili olduğu düşünülebilir.
- hHcy'nin lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak plazma ve dokularda MDA düzeylerini artırdığı tespit edildi. Lipoik asidin ise hHcy'den kaynaklanan oksidatif stres sonucu artan MDA düzeylerini normale, hatta kontrol grubundan daha düşük düzeylere indirdiği görüldü.
- hHcy'nin eritrosit, karaciğer ve böbrekte GSH-Px ve CAT aktivitelerinde anlamlı şekilde azalmaya yol açtığı tespit edildi. hHcy'de GSH-Px ve CAT aktivitelerinin baskılanmasının muhtemel mekanizması olarak Hcy'nin H_2O_2 oluşumunu ve oksidatif stresi artırmasına karşılık antioksidan savunma amaçlı olarak bu enzimlerin tüketildiği sonucuna varılabilir. Dokular düzeyinde bu etkinin kalp ve beyinde yeterince oluşmayıp, karaciğer ve böbrekte belirgin olması; özellikle bu iki organın Hcy metabolizmasında daha etkili olması ile Hcy'nin zararlarından daha ileri bir seviyede etkilendiklerini düşündürebilir.

- Eritrosit ve dokulara ait SOD aktivitesine bakıldığı zaman; GSH-Px ve CAT'ın aksine hiperhomosisteineminin SOD aktivitesini etkilemediği görüldü.
- Lipoik asidin ise eritrosit SOD aktivitesi hariç, eritrosit ve dokularda SOD, GSH-Px ve CAT aktivitesini artırdığı; Hcy'nin neden olduğu azalmanın önüne geçtiği, hatta bazı dokularda bu antioksidanların aktivitesini kontrol grubundan bile daha yüksek seviyelere çıkardığı görüldü. Bu da bize, dışarıdan verilen bu kuvvetli antioksidanın vücutta antioksidan defans sistmini destekler nitelikte etki sergileyerek, antioksidan enzim aktivitesini artırdığını göstermektedir.
- hHcy'nin önemli bir endojen antioksidan olan GSH düzeylerini azalttığı, lipoik asidin ise eritrosit GSH düzeylerini artırmanın yanı sıra, kontrol grubuna ait düzeylerden daha yüksek seviyelere ulaştırdığı görüldü.
- Hcy'nin Vitamin A, E ve C düzeylerini etkilemediği; lipoik asidin ise Vitamin E ve C düzeylerini diğer iki gruba göre artırdığı belirlendi.
- hHcy grubunda Vitamin B₆, B₁₂ ve folik asit düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olduğu; hHcy ve hHcy+LA gruplarında plazma Hcy düzeyleri ile Vitamin B₁₂ ve folik asit düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunduğu görüldü.
- hHcy grubunda kolesterol, LDL-K, VLDL-K ve trigliserit düzeylerinin kontrol grubuna göre yükseldiği, HDL-K düzeylerinin ise değişmediği tespit edildi. Hcy'nin lipid profili üzerindeki olumsuz etkilerinin lipoik asit tarafından engellendiği görüldü.

- Hcy'nin aortta dejeneratif vasküler bozukluklara neden olduğu, lipoik asidin ise bu damar değişikliklerini önlediği görüldü.

Sonuç olarak; hHcy'nin oluşturduğu oksidatif stres ile plazma ve dokularda lipid peroksidasyonunu artırdığı, antioksidan enzim aktivitelerini ise azaltıcı yönde etki gösterdiği, bu etkilerine ilaveten lipid profilini de olumsuz yönde etkilediği ve damarlarda dejeneratif değişiklikler oluşturduğu görülmüştür. Yapılan ondan fazla çalışmanın ortak analizinde, günlük 0.5-5.7 mg folat verilmesinin yaklaşık 6 hafta sonunda Hcy düzeylerini anlamlı şekilde azalttığı görülmektedir. Homosistein metabolizmasında önemli düzenleyici role sahip folik asidin bu etkisi ile karşılaştırıldığında; bizim çalışmamızda 45 günlük deney süresinde lipoik asit uygulanmasının Hcy düzeylerinde meydana getirdiği bu azalmanın oldukça önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu önemli etkisine ilaveten; dışarıdan uyguladığımız lipoik asidin vücutta antioksidan defans sistemini destekler mahiyette bir özellik sergileyerek GSH-Px, CAT ve SOD aktiviteleri ile GSH, Vitamin E ve Vitamin C gibi enzimatik olmayan antioksidanların düzeylerini artırdığı, lipid peroksidasyonunu azalttığı, lipid profilini düzelterek damar lezyonlarını önlediği de gözden kaçırılmamalıdır. Bütün bu olumlu etkileri bir bütün olarak ele alındığında; diyabette rutin olarak kullanılır hale gelen α -lipoik asidin kardiyovasküler hastalıklarda da suplementasyon halinde kullanılabilme potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu ve bu bulgunun yapılacak yeni çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Aebi H. (1984). Catalase in vitro assay methods. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
2. Akkuş İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya Mimoza Yayınları, 1. Baskı. 1-84.
3. Aksoy M, Öç M, Aksoy N, Koldaş M, Mihmanlı MB, Yazıcıoğlu V, Gürsürer M, Emre A, Er A, Öz İ, Ersek B. (2000). Bir Türk Kohortunda Plazma Homosistein, Folat ve B₁₂ Vitamini Düzeylerinin Koroner Arter Hastalığı Risk Faktörü Olarak Önemi Türk Kardiyol Dern Arş. 28: 481-488.
4. Arivazhagan P, Juliet P, Panneerselyam C. (2000). Effect of dl-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aged rats. *Pharmacol Res.* 41: 299-303.
5. Arivazhagan P, Panneerselyam SR, Panneerselyam C. (2003). Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and lipids in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 58:788-791.
6. Arivazhagan P, Ramanathan K, Panneerselyam C. (2001). Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chem Biol Interact.* 138: 189-198.
7. Arivazhagan P, Thilakavathy T, Ramanathan K, Kumaran S, Panneerselyam C. (2002). Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and protein oxidation in various brain regions of aged rats. *J Nutr Biochem.* 13(10): 619-624.
8. Arner ESJ, Nordberg J, Holmgren A. (1996). Efficient reduction of lipoamid and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* 225: 268-274.
9. Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. (1996). Serbest radikaller. *Türkderm.* 30:116-122.
10. Balachandar AV, Malarkodi KP, Varlakshmi P. (2003). Protective role of DLalpha-lipoic acid against adriamycin-induced cardiac lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol.* 22(5): 249-254.

11. Balz F. (1994). Ischemia reperfusion injury. *British Journal of Surgery*. 81: 637-647.
12. Baydas G, Yilmaz O, Celik S, Yasar A, Gursu MF. (2002). Effects of certain micronutrients and melatonin on plasma lipid, lipid peroxidation, and homocysteine levels in rats. *Arch Med Res*. 33(6): 515-519.
13. Betteridge DJ. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49: 3-8.
14. Beutler E, Duron O, Kelly BM. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 61: 882-888.
15. Biewenga GP, Haenen GRMM, Bast A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmac*. 29: 315-331.
16. Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, Selhub J, D'Agostino RB, Wolf PA, Jacques PF, Wilson PW. (1999). Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Arch Intern Med*. 159(10): 1077-1080.
17. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JC, Koudstaal PJ, Grobbee DE. (1999). Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med*. 159(1): 38-44.
18. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, 274: 1049-1057.
19. Bulkley GB. (1993). Free radicals and other reactive oxygen metabolites: Clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery* 113: 479-483.
20. Bunout D, Petermann M, Hirsch S, de la Maza P, Suazo M, Barrera G, Kauffman R. (2000). Low serum folate but normal homocysteine levels in patients with atherosclerotic vascular disease and matched healthy controls. *Nutrition*. 16(6): 434-438.

21. Busse E, Zimmer G, Schopohl B, Kornhuber B. (1992). Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneimittel-Forschung*. 42: 829-831.
22. Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH. (1998). α -lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med*. 24: 1023-1039.
23. Capdevila J, Parhill L, Chacos N. (1981). The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P450-b5. *Biochem Biophys. Res Commun* 101: 1357.
24. Carr A, Frei B. (1999). Does vitamin C act as a prooxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13: 1007-1024.
25. Chai AU, Abrams J. (2001). Homocysteine: a new cardiac risk factor? *Clin Cardiol*. 24: 80-84.
26. Challem J, Dolby V. (1997). *Homocysteine the Secret Killer*. Keats Publishing, Inc New Canan, USA.
27. Cheeseman KH, Slater TF. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49: 481-493.
28. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. (1991). Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 324: 1149-1155.
29. Clarke R, Naughten E, Cahalane S, Sullivan KO, Mathias P, McCall T, Graham I. (1992). The role of free radicals as mediators of endothelial cell injury in hyperhomocysteinemia. *Ir J Med Sci*. 161: 561-564.
30. Cleophas TJ, Hornstra N, van Hoogstraten B, van der Meulen J. (2000). Homocysteine, a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis. *Am J Cardiol*. 86(9): 1005-1009.

31. Constantinescu A, Pick U, Handelman GJ, Haramaki N, Han D, Podda M, Tritschler HJ, Packer L. (1995). Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes. *Biochem Pharmacol.* 50: 253-261.
32. Çıkım G. (2002). Koroner kalp hastalarında homosistein ile bazı lipid parametrelerinin karşılaştırılması. Uzmanlık tezi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
33. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies JM. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324: 1-18.
34. Deaton CM, Marlin DJ. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice.* 2: 278-291.
35. den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, Rosendaal FR, Haak HL, Wijermans PW, Bos GM. (1995). Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet.* 345(8954): 882-885.
36. den Heijer M, Keijzer MB. (2001). Hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thrombosis. *Clin Chem Lab Med.* 39: 710-713.
37. den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. (1996). Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med.* 334(12): 759-762.
38. Durak I, Yurtarslan Z, Canbolat O, Akyol O. (1993). A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta.* 214: 103-104.
39. Eikelboom JW, Lonn E, Genest JJ, Hankey G, Yusuf S. (1999). Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med.* 131: 363-375.
40. El-Saleh SC, Al-Sagair OA, Al-Khalaf MI. (2004). Thymoquinone and Nigella sativa oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *Int J Cardiol.* 93(1): 19-23.

41. Erden M. (1992). Serbest radikaller. Türkiye Klinik Tıp Bilimleri Dergisi. 12: 201-207.
42. Evans J, Goldfine ID. (2000). α -lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. Diabetes Technology&Therapeutics. 2: 401-413.
43. Fairbank VF, Farias RN. (1986). Biochemical Aspects of Hematology. Ed. N.W. Tietz in: "Textbook of Clinical Chemistry". 2nd ed, W.B. Saunders Company. P: 1506-1507.
44. Fallest-Strobl PC, Koch DD, Stein JH, McBride PE. (1997). Homocysteine: a new risk factor for atherosclerosis. Am Fam Physician. 56: 1607-1610.
45. Finkelstein JD. (1990). Methionine metabolism in mammals. J Nutr Biochem. 1: 228-237.
46. Finkelstein JD. (2000). Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. Semin Thromb Hemost. 26: 219-225.
47. Finkelstein JD, Martin JJ. (2000). Homocysteine. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 32: 385-389.
48. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, Hess DL, Davis CE. (1998). Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Circulation. 98: 204-210.
49. Fowler B. (1997). Disorders of homocysteine metabolism. J Inherited Metab Dis. 20: 270-285.
50. Frang YZ, Yang S, Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition 18: 872-879.
51. Frei B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. Am J Med 97: 5-13.

52. Fridovich I. (1997). Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem.* 272: 18515-18517.
53. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. (1993). Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 13(9): 1327-1333.
54. Gauthier GM, Keevil JG, McBride PE. (2003). The association of homocysteine and coronary artery disease. *Clin. Cardiol.* 26: 563-568.
55. Genest JR, Malinow M. (1992). Homocysteine and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* 3: 295-299.
56. Girotti AW. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid Research.* 39: 1529-1542.
57. Guilliams TG. (2004). Homocysteine - a risk factor for vascular diseases: Guidelines for the clinical practice. *JANA.* 7(1): 11-24.
58. Gupta M, Sharma P, Garg G, Kaur K, Bedi GK, Vij A. (2005). Plasma homocysteine: an independent or an interactive risk factor for coronary artery disease. *Clin Chim Acta.* 352: 121-125.
59. Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *The Lancet* 344: 721-724.
60. Halliwell B. (1996). Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 25: 439-454.
61. Halliwell B. (1998). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.* 91: 14-21.
62. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). *Free radicals in biology and medicine.* 2nd ed, Clarendon Press, Oxford.

63. Hankey GJ, Eikelboom JW. (1999). Homocysteine and vascular disease. *The Lancet*. 354: 407-412.
64. Hernanz A, Fernandez-Vivancos E, Montiel C, Vazquez JJ, Arnalich F. (2000). Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci*. 67(11): 1317-1324.
65. Homocysteine Studies Collaboration. (2002). Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*, 288: 2015-2022.
66. Hong L, Avalyn L, Sergey B, Robert R, Iden C, Goligorsky M. (2001). Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vascular endothelial cells: A mechanism for development of atherosclerosis. *Am Heart Assoc Inc*. 105: 1037-1043.
67. Hopkins PN, Williams RR. (1989). Human genetics risk and coronary heart disease: a public health perspective. *Ann Rev Nutr*. 9: 303-345.
68. Huerta JM, Gonzalez S, Fernandez S, Patterson AM, Lasheras C. (2004). No evidence for oxidative stress as a mechanism of action of hyperhomocysteinemia in humans. *Free Radic Res*. 38(11): 1215-1221.
69. Hultberg B, Andersson A, Sterner G. (1993). Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol*. 40: 230-235.
70. İlhan N. (1998). Deneysel olarak karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan kobaylarda oksidan ve antioksidan sistemin incelenmesi - Doktora tezi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
71. Jacobsen DW. (1998). Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry*. 44: 1833-1843.
72. James DH, Rene LJ, Lori MS, Margaret EB, John TB. (1999). Regulation of homocysteine metabolism. *Avdan Enzyme Regul*. 39: 69-91.

73. Jones W, Li X, Qu ZC, Perriott L, Whitesell RR, May JM. (2002). Uptake, recycling and antioxidant actions of α -lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 33: 83-93.
74. Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. (2004). Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 25: 5-16.
75. Kagan V, Serbinova E, Packer L. (1990). Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem Biophys Res Commun.* 169: 851-857.
76. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L. (1992). Dihydrolipoic acid -a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol.* 44: 1637-1649.
77. Kalikiri PC. (2003). Hyperhomocysteinaemia - a risk factor worth considering. *JIACM.* 4(2): 147-151.
78. Kang SS, Wong PWK, Norusis M. (1987). Hyperhomocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 36: 458-462.
79. Kılınç K. (1986). Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksid dismutaz. *Biyokimya Dergisi.* 3: 59-76.
80. Klusmann A, Ivens K, Schadevaldt P, Grabensee B, Heering P. (2000). Is homocysteine a risk factor for coronary heart disease in patients with terminal renal failure? *Med Klin.* 95(4): 189-194.
81. Köse K, Doğan P. (1992). Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi Ek-1:* 340-350.
82. Kravchenko IV, Maltsev GL, Vasilev AV. (2004). Research of antioxidant defence system under alimentary induced oxidative stress. *Biomed Khim.* 50(5): 477-483.
83. Langman LJ, Cole DE. (1999). Homocysteine. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 36(4): 365-406.

84. Lentz SR. (1997). Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sciences*. 61: 1205-1215.
85. Lentz SR, Haynes WG. (2004). Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor? *Cleve Clin J Med*. 71: 729-734.
86. Lentz SR, Rodionov RN, Dayal S. (2003). Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atherosclerosis Supplements*. 4: 61-65.
87. Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C, Goligorsky MS. (2002). Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in vascular endothelial cells: a mechanism for development of atherosclerosis? *Circulation*. 105(9):1037-1043.
88. Li N, Chen YF, Zou AP. (2002). Implications of hyperhomocysteinemia in glomerular sclerosis in hypertension *Hypertension*. 39:443-448.
89. Li Y, Zhao Y, Yu W, Jiang S. (2004). Scavenging ability on ROS of alpha-lipoic acid. *Food Chemistry*. 84: 563-567.
90. Limpach A, Dalton M, Miles R, Gadson P. (2000). Homocysteine inhibits retinoic acid synthesis: a mechanism for homocysteine-induced congenital defects. *Exp Cell Res*. 260(1):166-174.
91. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. (1994). Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr*. 60(1): 2-11.
92. Lledias F, Rangel P, Hansberg W. (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem*. 273: 10630-10637.
93. Loscalzo J. (1996). The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 98 (1): 5-7.

94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
95. Lykkesfeldt J, Hagen TM, Vinarsky V, Ames BN. (1998). Age-associated decline in ascorbic acid concentration, recycling and biosynthesis in rat hepatocytes -reversal with (R)-alpha-lipoic acid supplementation. *FASEB J.* 12: 1183-1189.
96. Malarkodi KP, Balachandar AV, Varlakshmi P. (2003). The influence of lipoic acid on adriamycin-induced hyperlipidemic nephrotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem.* 247(1-2): 139-145.
97. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. (2003). Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 14(5): 288-294.
98. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience* 4: 339-345.
99. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. (1996). Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 27: 517-527.
100. Mccord JM. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stres. *Am J Med.*108: 652-659.
101. McCully KS. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia. *Am J Pathol.* 56: 111-128.
102. McCully KS. (1997). *The homocysteine revolution: Medicine in the new millennium.* Keats Publishing, USA.
103. McCully KS. (2001). The biomedical significance of homocysteine. *Journal of Scientific Exploration*, 15(1): 5-20.
104. Medina MA, Amores-Sanchez MI. (2000). Genetic basis of hyperhomocysteinemia. *Mol Genet Metab* 71: 478-480.

105. Miller AL, Kelly GS. (1996). Methionine and homocysteine metabolism and the nutritional prevention of certain birth defects and complications of pregnancy. *Alt Med Rev*, 1(4): 220-235.
106. Mineer SE, Evrovski J, Cole D. (1997). Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism. An Update. *Clin Bioch*. 30: 189-201.
107. Moat SJ, Bonham JR, Cragg RA, Powers HJ. (2000). Elevated plasma homocysteine elicits an increase in antioxidant enzyme activity. *Free Radic Res*. 32(2): 171-179.
108. Moat SJ, Lang D, McDowell IFW, Clarke ZL, Madhavan AK, Lewis MJ, Goodfellow J. (2004). Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 15: 64-79.
109. Moini H, Packer L, Saris NL. (2002). Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 182: 84-90.
110. Moretti R, Torre P, Antonello RM, Cattaruzza T, Cazzato G, Bava A. (2004). Vitamin B12 and folate depletion in cognition: A review. *Neurol India*. 52: 310-318.
111. Morrison HI, Schaubel D, Desmeules M, Wigle DT. (1996). Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA*. 275(24): 1893-1896.
112. Moselhy SS, Demerdash SH. (2004). Plasma homocysteine and oxidative stress in cardiovascular disease. *Dis Markers*. 19: 27-31.
113. Muda P, Kampus P, Zilmer M, Zilmer K, Kairane C, Ristimae T, Fischer K, Teesalu R. (2003). Homocysteine and red blood cell glutathione as indices for middle-aged untreated essential hypertension patients. *J Hypertens*. 21(12): 2329-2333.
114. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, et al. (1985). The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet*. 37: 1-31.

115. Murthy SN, Obregon DF, Chattergoon NN, Fonseca NA, Mondal D, Dunne JB, Diez JG, Jeter JR, Kadowitz PJ, Agrawal KC, McNamara DB, Fonseca VA. (2005). Rosiglitazone reduces serum homocysteine levels, smooth muscle proliferation, and intimal hyperplasia in Sprague-Dawley rats fed a high methionine diet. *Metabolism*. 54: 645-652.
116. Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C. (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 463-470.
117. Nordberg J, Arner ESJ. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology Medicine*. 31: 1287-1312.
118. Notarajan V. (1995). Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J Lab Clin Med*. 125: 26-37.
119. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. (1997). Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 337(4): 230-236.
120. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95: 351-358.
121. Onat A, Senocak MS. (1994). Relative risk of factors for coronary heart disease in population with low cholesterol levels. *Int J Cardiol*. 43(1): 51-60.
122. Ozdemir G, Ozden M, Maral H, Kuskay S, Cetinalp P, Tarkun I. (2005). Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann Clin Biochem*. 42: 99-104.
123. Packer L. (1998). α -lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF- κ B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab Rev*. 30: 245-275.
124. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17: 888-895.

125. Packer L, Tritschler HJ. (1996). Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 20: 625-626.
126. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 19: 227-250.
127. Paglia De Valentine W. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin Med.* 70: 158-159.
128. Perry DJ. (1999). Hyperhomocysteinaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 12: 451-477.
129. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. (1995). Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet.* 346(8987): 1395-1398.
130. Petri M, Roubenoff R, Dallal GE, Nadeau MR, Selhub J, Rosenberg IH. (1996). Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 348(9035): 1120-1124.
131. Pfaffly J.R. Lipoic acid: The antioxidant chameleon. 2001.
132. Rasouli ML, Nasir K, Blumenthal RS, Park R, Aziz DC, Bodoff MS. (2005). Plasma homocysteine predicts progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 181: 159-165.
133. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. (1998). Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 49: 31-62.
134. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. (1991). Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res.* 51(3): 828-835.
135. Rimm EB, Willet WC, Hu Fb, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, Hennekens C, Stampfer MJ. (1998). Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA.* 279(5): 359-364.

136. Robinson K, Mayer E, Jacobsen DW. (1994). Homocysteine and coronary artery disease. *Cleve Clin J Med*. 61(6): 438-50.
137. Rodgers GM, Conn MT. (1990). Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*. 75(4): 895-901.
138. Rodrigo R, Passalacqua W, Araya J, Orellana M, Rivera G. (2003). Homocysteine and essential hypertension. *J Clin Pharmacol*. 43(12): 1299-1306.
139. Ryter SW, Tyrrell RM. (1998). Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med*. 24: 1520-1534.
140. Sainz RM, Reiter RJ, Mayo JC, Cabrera J, Tan DX, Qi W, Garcia JJ. (2000). Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: effect of pinealectomy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 119: 143-149.
141. Satoh K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 90: 37-43.
142. Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. (1993). Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy. *Crit Care Med*. 21: 92-102.
143. Scholich H, Murphy ME, Sies H. (1989). Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on alpha-tocopherol. *Biochem Biophys Acta*. 1001: 256-261.
144. Selhub J. (1999). Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 19: 217-246.
145. Selhub J, Miller JW. (1992). The pathogenesis of homocysteinemia: Interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr*. 55: 131-138.
146. Seshadri N, Robinson K. (2000). Homocysteine, B vitamins and coronary artery disease. *Med. Clin North Am*. 84(1): 215-237.
147. Seven A, Candan G. (1996). Antioksidant defense systems. *Cerrahpaşa J Med*. 27: 41-50.

148. Shila S, Kokilavani V, Subathra M, Panneerselyam C. (2005). Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology*. 210(1): 25-36.
149. Skibinska E, Sawicki R, Lewczuk A, Prokop J, Musial W, Kowalska I, Mroczko B. (2004). Homocysteine and progression of coronary artery disease. *Kardiol Pol*. 60(3): 197-205.
150. Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP. (2000). Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol*. 86(5): 234-241.
151. Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biologies*. 327: 649-662.
152. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. (1986). Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded findings 356222 primary screeners of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA*, 256: 2823-2828.
153. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. (1993). Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*. 91(1): 308-318.
154. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH. (1992). A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA*. 268(7): 877-881.
155. Starkebaum G, Harlan JM. (1986). Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *Clin Invest*. 77(4): 1370-1376.
156. Stauffenberg MT, Lange RA, Hillis LD, Cigarroa J, Hsu RM, Devaraj S, Jialal I. (2004). Hyperhomocysteinemia measured by immunoassay: a valid measure of coronary artery atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med*. 128(11): 1263-1266.

157. Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. (1996). Apoptosis and free radicals. *Biochemical and Molecular Medicine*. 59: 93-97.
158. Sun Y, Oberley LW, Li Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 34: 497-500.
159. Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drozd M, Wieczorek M. (1995). Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. 115(2): 217-224.
160. Tokgozoglu SL, Alikasifoglu M, Unsal, Atalar E, Aytemir K, Ozer N, Ovunc K, Usal O, Kes S, Tuncbilek E. (1999). Methylene tetrahydrofolate reductase genotype and the risk and extent of coronary artery disease in a population with low plasma folate. *Heart*. 81(5): 518-522.
161. Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J. (2003). The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(25): 15089-15094.
162. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ. (1993). Vitamin B₁₂, Vitamin B₆, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr*. 57(1): 47-53.
163. Ueland PM, Refsum H. (1989). Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med*. 114: 473-501.
164. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. (2000). The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr*. 72(2): 324-332.
165. Ungvari Z, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A. (1999). Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19: 1899-1904.

166. Upchurch GR, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF, Loscalzo J. (1997). Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 272(27): 17012-17017.
167. Upchurch GR, Welch GN, Freedman JE. (1995). Homocysteine attenuates endothelial glutathione peroxidase and thereby patients peroxide mediated injury. *Circulation.* 92: 1-28.
168. Ventura P, Panini R, Verlato C, Scarpetta G, Salvioli G. (2000). Peroxidation indices and total antioxidant capacity in plasma during hyperhomocysteinemia induced by methionine oral loading. *Metabolism.* 49: 225-228.
169. Verhoef P, Kok FJ, Kruyssen DA, Schouten EG, Witteman JC, Grobbee DE, Ueland PM, Refsum H. (1997). Plasma total homocysteine, B vitamins, and risk of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(5): 989-995.
170. Voutilainen S, Morrow JD, Roberts LJ, Alfthan G, Alho H, Nyyssonen K, Salonen JT. (1999). Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 1263-1266.
171. Wald DS, Law M, Morris JK. (2002). Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ.* 325(7374): 1202.
172. Wang X, Quinn PJ. (2000). The location and function of vitamin E in membranes. *Mol Membr Biol.* 17: 143-156.
173. Welch GN, Loscalzo J. (1998). Homocysteine and atherothrombosis. *N Eng J Med.* 338: 1042-1050.
174. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. (2001). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest.* 107(10): 1263-1273.

175. Whittaker M, Whittaker JW. (1998). A glutamate bridge is essential for dimer stability and metal selectivity in manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 273: 22188-22193.
176. Wicken DEL, Dudman NPB. (1992). Homocystinuria and atherosclerosis. *Monogr Hum Genet.* 14: 311-324.
177. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 44: 275-295.
178. Wollin SD, Jones PJH. (2003). α -lipoic acid and cardiovascular disease. *J Nutr.* 133: 3327-3330.
179. Woo CW, Siow YL, Pierce GN, Choy PC, Minuk GY, Mymin D. (2005). Hyperhomocysteinemia induces hepatic cholesterol biosynthesis and lipid accumulation via activation of transcription factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288: 1002-1010.
180. Yagi K. (1984). Assay of lipid peroxidation in blood plasma or serum. *Methods Enzymol.* 105: 328-331.
181. Yalçın AS. (1998). Antioksidanlar. *Klinik Gelişim.* 11: 342-346.
182. Yamamoto M, Hara H, Adachi T. (2000). Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett.* 486(2): 159-162.
183. Yang F, Tan HM, Wang H. (2005). Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis. *Sheng Li Xue Bao.* 57: 103-114.
184. Yardim-Akaydin S, Ozkan Y, Ozkan E, Torun M, Simsek B. (2003). The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta.* 338(1-2): 99-105.

185. Young AJ, Lowe GM. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 385: 20-27.
186. Young PB, Kennedy S, Molloy AM, Scott JM, Weir DG, Kennedy DG. (1997). Lipid peroxidation induced in vivo by hyperhomocysteinaemia in pigs. *Atherosclerosis*. 129(1): 67-71.
187. Yu BP. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 74: 139-162.
188. Zhang R, Ma J, Xia M, Zhu H, WengHua Ling WH. (2004). Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes. *J Nutr*. 134(4): 825-830.
189. Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC, Falk E. (2003). Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 168: 255-262.

8. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1995 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde yüksek öğrenimime başladım ve 2000 yılında bu fakülteden mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.