

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**HİPERKOLESTEROLEMİK VE HİPERHOMOSİSTEİNEMİK  
KOBAYLARDA NİTRİK OKSİT METABOLİZMASI VE APELİN  
DÜZEYLERİ: BETAİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Zeynep KÜSKÜ-KİRAZ**

**Tez Danışmanı:  
Prof. Dr. Sema GENÇ**

**İstanbul 2013**

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**HİPERKOLESTEROLEMİK VE HİPERHOMOSİSTEİNEMİK  
KOBAYLARDA NİTRİK OKSİT METABOLİZMASI VE APELİN  
DÜZEYLERİ: BETAİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Zeynep KÜSKÜ-KİRAZ**

**Tez Danışmanı:  
Prof. Dr. Sema GENÇ**

**İstanbul 2013**

## ÖNSÖZ

İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı gibi köklü bir kurumda, faydalı ve bir o kadar da keyifli bir uzmanlık eğitimi geçirmenin mutluluk ve onurunu taşıyarak;

Kendisiyle çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım **Prof. Dr. Sema GENÇ**'e,

Asistanlık eğitimim boyunca, bu güzel biyokimya ailesi içerisinde huzurla çalışmamı sağlayan, her zaman örnek aldığım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın **Prof. Dr. Müjdat UYSAL**'a,

Hiçbir zaman bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, akademik kimliğinin yanında çalışma ahlakı ve prensipleriyle de örnek aldığım değerli hocam **Prof. Dr. Figen Gürdöl**'e,

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen **Prof. Dr. Seldağ Bekpınar**, **Prof. Dr. Yeşim Ünlüçerçi**, **Prof. Dr. Semra Doğru-Abbasoğlu** ve Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki bütün hocalarıma,

Çalışmamın histopatolojik değerlendirmelerini yapan **Doç. Dr. Vakur Olgaç**'a,

Çalışmama yardımcı olan asistan arkadaşım **Dr. Coşkun Umut Oruç** ve sevgili **Sevilay Tahmisoğlu**'na,

Birlikte güzel günler geçirdiğim tüm asistan arkadaşlarım ve Anabilim Dalı'nın diğer çalışanlarına;

Ayrıca hayatıma anlam katan sevgili ailem, eşim ve oğlum Ümit'e en içten teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Zeynep Küskü-Kiraz

İstanbul, 2013

*Bu tez İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22342*

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>5</b>
2.1. Ateroskleroz ve endotel disfonksiyonu	
2.2. Nitrik oksit	
2.3. Aterosklerotik risk faktörleri ve endotel disfonksiyonu	
2.4. Apelin	
2.5. Betain	
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>29</b>
3.1. Gereçler	
3.2. Çalışma protokolü	
3.3. Serum veya plazmada yapılan ölçümler	
3.4. Karaciğer dokusunda yapılan ölçümler	
3.5. Karaciğer ve aortada histopatolojik incelemeler	
3.6. İstatistik incelemeler	
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>36</b>
4.1. Vücut ağırlığında değişiklikler	
4.2. Biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler	
4.3. Korelasyon analizleri	
4.4. Karaciğer ve aortada histopatolojik bulgular	
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>54</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>59</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>69</b>

## KISALTMALAR LİSTESİ

ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADMA	Asimetrik dimetilarginin
ALT	Alanin aminotransferaz
AMPK	Adenozin monofosfat- kinaz
APJ	Apelin reseptörü
AST	Aspartat aminotransferaz
BH <sub>3</sub> <sup>•</sup>	Trihidrobiopterin radikali
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiyopterin
BHMT	Betain homosistein metiltransferaz
CaM	Kalmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> / Kalmodulin bağımlı protein kinaz II
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
DDAH	Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz
DK	Dien konjugat
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FMN	Flavin mononükleotid
GSH	Glutatyon
GTP	Guanozin-5'-trifosfat
HO <sup>•</sup>	Hidroksil radikali
HS	Homosistein
MDA	Malondialdehit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-KB	Nükleer faktör-KB
NO	Nitrik oksit
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOS	Nitrik oksit sentaz
NT	Nitrotirozin
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Süperoksit radikali
ONOO <sup>-</sup>	Peroksinitrit
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PRMT	Protein arginin N-metiltransferaz
RO <sup>•</sup>	Alkoksil radikali
ROO <sup>•</sup>	Peroksil radikali
ROS	Reaktif oksijen türleri
SAM	S-adenozil metyonin
SDMA	Simetrik dimetilarginin
SH	Tiyol
SOD	Süperoksit dismutaz
tHS	Total homosistein
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör- $\alpha$

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1.** NOS'un yapısı ve katalitik işlevleri
- Şekil 2.2.** ADMA metabolizması
- Şekil 2.3.** Homosistein metabolizması
- Şekil 2.4.** Apelinin fizyolojik etkileri
- Şekil 2.5.** Betain ve homosistein metabolizması
- Şekil 3.1.** ADMA'nın floresan türevinin oluşum reaksiyonu
- Şekil 3.2.** ADMA, SDMA, L-arginin standartlarına ait kromatogram
- Şekil 4.1.** Serumda total kolesterol, trigliserit düzeyleri ve ALT, AST aktiviteleri
- Şekil 4.2.** Plazma NO, ADMA, SDMA ve L-arginin düzeylerindeki değişimler
- Şekil 4.3.** Serum/plazmada L-arginin/ADMA, NT, apelin ve homosistein düzeyleri
- Şekil 4.4.** Karaciğer dokusunda NO, NT düzeyleri ve DDAH aktivitesindeki değişimler
- Şekil 4.5.** Karaciğer MDA, DK ve GSH düzeylerindeki değişimler
- Şekil 4.6.** Korelasyon grafikleri

## TABLolar LİSTESİ

- Tablo 4.1.** Vücut ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları ve karaciğer indekslerindeki değişimler
- Tablo 4.2.** Serumda total kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile ALT ve AST aktiviteleri
- Tablo 4.3.** Plazmada NO, ADMA, SDMA ve L-arginin düzeylerindeki değişimler
- Tablo 4.4.** Serum/plazmada L-arginin/ADMA, NT, apelin ve homosistein düzeyleri
- Tablo 4.5.** Karaciğerde NO ve NT düzeyleri ile DDAH aktivitelerindeki değişimler
- Tablo 4.6.** Karaciğerde MDA, DK ve GSH düzeylerindeki değişimler
- Tablo 4.7.** NO metabolizması ile ilişkili göstergeler arasında korelasyon katsayıları
- Tablo 4.8.** Karaciğer dokularında histopatolojik değişimler

## RESİMLER LİSTESİ

- Resim 4.1.** Karaciğer dokularında histopatolojik görünüm
- Resim 4.2.** Aortada histopatolojik görünüm

## ÖZET

**Amaç:** Hiperkolesterolemik ve hiperhomosisteinemik olgularda, organizmada nitrik oksit (NO) biyoyararlanımının bozulduğu ve bu değişikliğin endotel disfonksiyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Bu çalışmada amaç, hiperkolesterolemi ve hiperhomosisteinemi oluşturulan koblarda nitrik oksit metabolizmasının incelenmesi, apelin düzeylerinin bu koşullardan etkilenip etkilenmediğinin saptanması ve diyetle eklenen betainin hiperkolesterolemik/ hiperhomosisteinemik koşullarda görülen metabolik değişikliklere herhangi bir etkisinin olup olmadığını incelenmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Kolesterolde zengin yem verilerek hiperkolesterolemi oluşturulan koblalar alt gruplara ayrılarak diyetlerine betain ve/veya metyonin eklendi. Uygun kontrol grupları oluşturularak NO metabolizması ile ilgili parametreler karaciğer ve plazmada ölçüldü. Veriler ANOVA veya Kruskal Wallis yöntemleriyle değerlendirildi.

**Bulgular:** Hiperkolesterolemik koblalarda plazma ALT, AST, asimetrik dimetilarginin (ADMA), homosistein (HS), nitrotirozin (NT) ile karaciğer malondialdehit (MDA), NT ve dien konjugat (DK) düzeyleri kontrol grubundan daha yüksekti. Plazma NO ve arginin düzeyleri değişmedi, apelin düzeyi ve arginin/ADMA oranı azaldı. Karaciğerde NO düzeyi ve DDAH aktivitesi azaldı. Diyetlerine metyonin eklenen hiperkolesterolemik koblalarda kolesterol, AST, ADMA, NT, HS, karaciğer MDA ve DK düzeylerindeki artış ile serum apelin ve arginin /ADMA oranındaki azalma daha belirgin olarak gözlemlendi. Betain uygulaması ile hiperkolesterolemik koblalarda ADMA, apelin düzeyleri ve DDAH aktivitesinde düzelme görüldü. Betain, hiperkolesterolemik/hiperhomosisteinemik hayvanlarda ek olarak kolesterol, ALT, AST, homosistein, MDA, DK ile DDAH aktivitesini de olumlu yönde etkiledi.

**Sonuç:** Hiperkolesterolemik ve hiperhomosisteinemik koşullarda artan oksidatif stres ve azalan DDAH aktivitesi nedeniyle ADMA düzeylerinin arttığı söylenebilir. Apelin düzeylerinin NO metabolizması ile bağıntılı olduğu, betainin olumlu etkilerini antioksidan etkiden ziyade homosisteini azaltarak gösterdiği sonucuna varılmıştır.

## ABSTRACT

**Title:** Nitric oxide metabolism and apelin in hypercholesterolemic and hyperhomocysteinemic guinea pigs: The protective effect of betaine.

**Objective:** This study aimed to examine the changes in nitric oxide (NO) metabolism and to observe the relation between apelin and NO in hypercholesterolemic guinea pigs. The additional effect of methionine feeding with or without betaine supplementation on NO metabolism was also searched.

**Materials and Methods:** Animals which were stratified to four groups were fed a high cholesterol or high cholesterol + methionine diet, with or without betaine supplementation. Matching controls were designed. At the end of ten weeks, they were sacrificed and aliquots of serum/plasma were used for the determinations of AST, ALT activities and asymmetric dimethylarginine (ADMA), L-arginine, homocysteine (HS), apelin and NO levels. Liver homogenates were used for the measurements of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) activity, nitrotyrosine (NT), NO, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels. The ANOVA and Kruskal-Wallis tests were used for the statistics.

**Results:** In hypercholesterolemic animals, plasma ALT, AST activities and ADMA, HS and NT levels were increased while apelin levels were decreased. In liver homogenates, NO levels and DDAH activities were decreased, whereas MDA, NT and dien conjugate (DK) were increased. Methionine load to these animals significantly enhanced the increments in AST, ADMA, NT and HS, as well as tissue MDA and DK levels. The additional effect of hyperhomocysteinemia was a profound decrease in apelin and arginin/ADMA ratio. Hypercholesterolemic-hyperhomocysteinemic animals exhibited significant recoveries in the altered parameters when betaine was added to their diet.

**Conclusion:** In hypercholesterolemic guinea pigs, ADMA levels are increased in circulation due to increased oxidative stress that causes the inhibition of ADMA metabolizing enzyme DDAH in the liver. Plasma apelin levels seem to be correlated to the NO levels, suggesting that apelin may take a part in preventing endothelial dysfunction. The administration of betaine to the methionine+cholesterol-fed animals partly ameliorated the disturbances in ADMA metabolism.

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Endotel fonksiyonlarında bozulma aterosklerozun başlangıç ve gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Nitrik oksit (NO) sentezinin azalması endotel disfonksiyonuna yol açan en önemli nedenlerden biridir. NO, endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin katalizlediği bir reaksiyonla L-argininden sentezlenmektedir. Asimetrik dimetilarginin (ADMA) ise metillenmiş proteinlerin yıkımı sonucunda oluşan bir metabolit olup NOS enziminin yarışmalı inhibitörüdür. ADMA, dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi ile karaciğerde metabolize olarak L-sitrulin ve dietilamine dönüşmektedir (103).

Yüksek ADMA düzeyleri ile kalp-damar hastalıkları arasındaki ilişki birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar koroner arter hastalığı, hipertansiyon, diabetes mellitus, periferik arter hastalığı gibi hastalıklarda ve bazı deneysel ateroskleroz modellerinde plazma ADMA düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (18,103). Artmış ADMA düzeyleri son yıllarda endotel disfonksiyonu, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, bozulmuş glikoz toleransı gibi kardiyovasküler risk faktörlerinden biri olarak değerlendirilmektedir (93).

ADMA yıkımından sorumlu olan DDAH enziminin endotel disfonksiyonunda baskılandığı bildirilmiştir (48). DDAH enzim aktivitesindeki azalmanın, plazmada ADMA birikimine yol açtığı ve ADMA birikiminin NOS inhibisyonu ile NO biyoyararlanımını etkilediği bildirilmektedir (19,37).

Plazma homosistein düzeylerinin artışı da kardiyovasküler bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (29). Hiperhomosisteineminin endotel disfonksiyonuna yol açtığı deneysel ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir (29,50). Bunun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, NO'nun oksidatif inaktivasyonu, endoplazmik retikulum stresi sonucu gelişen endotel hasarı ve ADMA düzeylerindeki artışın bu disfonksiyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir (16,96). Hiperhomosisteinemde ADMA düzeylerindeki artışa yol açan nedenler de henüz açıklık kazanmamıştır. Bazı araştırmacılar dokularda oksidatif stres artışının sülfidril içeren bir enzim olan DDAH'ı inhibe edebileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir (29,96).

Son yıllarda yağ hücrelerinin bilinenden daha kompleks fonksiyonlara sahip olduğu, kardiyovasküler fonksiyonları etkileyen çok sayıda hormon, peptid ve sitokinleri sentezlediği, otokrin ve parakrin etkileri olduğu bulunmuştur (71). Apelin ve reseptörünün (APJ) rodentler ve insanda yaygın olarak akciğer, kalp, beyin ve yağ dokularında eksprese edildiği gösterilmiştir (85). Apelin ve APJ, angiotensin II ve Anjiyotensin II reseptör tip 1 ile yapısal

ve anatomik dağılım açısından benzerlik taşımaktadır. Apelin ve APJ sisteminin kan basıncı, kalp hızı, hipofizer hormon salınımı, iştah kontrolü ve endotel hücre proliferasyonu üzerine etkileri gösterilmiştir (71,85). Apelin kan basıncını düşürücü etkisini nitrik oksit aracılığıyla gerçekleştirmektedir (54). Hiperkolesterolemik kişilerde serum apelin düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (100). Buna karşılık, literatürde hiperhomosisteinemi de apelin düzeylerine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır.

Betain (trimetilglisin) karaciğerde kolin oksidaz etkisiyle oluşan bir kolin metabolitidir. Bitkiler de betainin besinsel kaynağıdır (28). Betainin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahip olup, endotoksemi (9), alkolik ve alkolik olmayan karaciğer yağlanması (1,8) ile karaciğer sirozunda (33) koruyucu etkileri çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir. Betain, metil verici olarak homosisteinin metyonine dönüşmesini sağlar ve bu fonksiyonu ile homosistein düzeylerini düşürür (10). Betainin organizmada S-adenozil metyoinin (SAM) düzeylerinde de artışa yol açtığı bildirilmiştir (28,59). Öte yandan, SAM düzeylerindeki artışın, metilasyon ve transsülfürasyon reaksiyonlarını etkileyerek güçlü bir antioksidan olan glutatyon (GSH) düzeylerini artırıcı etkileri bildirilmektedir (24,41,79). Bu nedenle betain uygulamasının, SAM oluşumunu artırarak ve homosistein düzeylerini azaltarak oksidatif strese bağlı koşulları düzeltmede etkili olabileceği düşünülmüştür. Öte yandan, betain uygulamasının apo-E eksikliği olan sıçanlarda ve hiperhomosisteineminin transgenik fare modelinde antiaterojen etki gösterdiği bulunmuştur (70,92). Ancak bu çalışmalarda betainin serum ve doku lipitleri üzerine farklı etkileri gözlenmiştir. Bununla birlikte sağlıklı insanda betain tedavisinin nitrik oksit düzeylerini değiştirmediği bildirilmiştir (15,80).

Bu çalışmanın amaçları:

- 1- Kardiyovasküler risk faktörü olarak hiperkolesterolemi ile birlikte hiperhomosisteinemi oluşturulan koyalarda nitrik oksit metabolizmasının incelenmesi,
- 2- Vazodilatör etkisini NO aracılığı ile yapan apelinin plazma düzeylerinin bu koşullardan etkilenip etkilenmediğinin saptanması,
- 3- Diyete eklenen betainin hiperkolesterolemik/hiperhomosisteinematik koşullarda ortaya çıkan metabolik değişikliklere herhangi bir etkisinin olup olmadığını incelenmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Ateroskleroz ve Endotel Disfonksiyonu

Ateroskleroz, orta büyüklükteki musküler (koroner, brakial, femoral ve radial) arterlerin yavaş seyirli ilerleyici bir hastalığıdır. Ateroskleroz terimi, intima tabakasının kalınlaşmasını tanımlayan 'skleroz' ve lipidin birikmesini tanımlayan 'yulaflı ya da sütlü lapa' anlamına gelen 'atero' kelimelerinin birleşmesiyle oluşmaktadır. Hastalık, damar duvarının en iç tabakasında yağ depozitleri ve fibröz dokuyla kalınlaşma sonucu aterosklerotik plaklar oluşumuyla karakterizedir (23). Ateroskleroz, özellikle gelişmiş ülkelerde en önemli morbidite ve mortalite sebebidir (43). Çocukluk çağından itibaren gelişmeye başlar, ancak erken dönemde damar boşluğunu tıkamadığı için bulgu vermez. Klinik bulgular, plak iyice gelişip karmaşık hale geldikten sonra erkeklerde kırk, kadınlarda elli yaşın üstünde ortaya çıkar. Ateroskleroz gelişiminde dislipidemi primer bir risk faktörüdür. Dislipidemi ile birlikte genetik ve çevresel diğer risk faktörleri rol oynar. Aterosklerotik lezyonlar karakteristik olarak birden fazla arterde ve sıklıkla damarların dallanma bölgelerinde oluşur. Alt abdominal aorta, koroner arterler, popliteal arterler, inen torasik aorta, internal karotis arterler ve Willis Poligonu aterosklerotik plak oluşumunun en sık görüldüğü lokalizasyonlardır.

Musküler arterlerin duvarı üç tabakadan oluşur:

- İntima (iç kısım)
- Medya (orta kısım)
- Adventisya (dış kısım)

Endotel hücrelerinin yer aldığı intima, damar içerisinde dolaşan kan bileşenleri için bariyer görevi ve bununla birlikte daha pek çok önemli fonksiyonu olan ince tabakadır. Endotel hücreleri, musküler medyanın üstünde bulunan bir destek doku tabakasına (internal elastik lamina) dayanır. Medya, damarın en kalın tabakasıdır, intima ve adventisyadan internal ve eksternal elastik lamina ile ayrılır. Bu laminaların elastik lifleri arasında boşluklar yer alır. Buralardan hücreler ve diğer maddeler geçebilir. Medya, esas olarak kollajen, elastin ve proteoglikanlardan oluşan bir matrikse yerleşmiş olan kas hücrelerinden meydana gelir. Medyanın esas işlevi, damar duvarında kasılma ve esneklik meydana getirerek, kan akımının düzenlenmesini sağlamaktır. En dış tabaka olan adventisya ise arteri besleyen kan damarları (vazo vazorum), sempatik sinir uçları, yağ hücreleri, mast hücreleri ve lenfatikler ile birlikte fibroblastlar ve kollajenden oluşur.

Ateroskleroz, damar duvarının bir hastalığıdır. Damarın en iç tarafında bulunan endotel hasarı sonucunda ateroskleroz süreci başlamakta ve ardından gelişen inflamasyonla süreç hızlanmaktadır (104).

**Ateroskleroz Patogenezi:** Aterosklerozun ortaya çıkmasında ilk basamak endotel disfonksiyonudur. Seçici geçirgen bir engel olan normal endotel, trombüs oluşumuna dirençli bir yüzeydir. Aynı zamanda birçok vazoaaktif madde ile bağ dokusu yapılarının üretiminden sorumlu olan metabolik aktif bir dokudur. Endotel fonksiyonunu bozan metabolik, toksik, mekanik, genetik, immünolojik ve enfeksiyöz nedenler, endotelde oluşturdukları hasar ile endotelin geçirgenliğini bozarak normal hemostatik özelliklerini yitirmesine neden olurlar. Endotelin fonksiyonunun bozulması ile koruyucu bariyer karakterini yitirmesi yanında prokoagülan, proenflamatuvar ve vazokonstriksiyon özelliklerinin ön plana çıktığı bir klinik tablo gözlenir. Bu koşullarda lökosit ve trombositlerin endotele adezyonu artar, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) subendotelyal tabakaya geçişi hızlanır. Subendotelyal tabakada LDL'nin oksidasyona uğraması sonucunda damar duvarında immün reaksiyon ile inflamatuvar sitokinlerin, vasküler hücre adezyon molekülünün (VCAM) ve monosit kemoatraktan protein-1'in (MCP-1) salınması tetiklenir. VCAM ve MCP-1, monositlerin intimaya geçmesinde hızlandırıcı rol oynarlar. Sonuçta kemokin ve adezyon moleküllerinin salınımının artması, lökosit adezyonu, geçirgenliğin artması, LDL oksidasyonu, trombosit aktivasyonu, sitokin salınımı, vasküler düz kas hücre göçü ve proliferasyonu ile karakterize aterosklerotik lezyon ortaya çıkar (23).

### 2.1.1. Endotel ve Fonksiyonları

Endotel hücre tabakasının vasküler homeostazdaki önemi ilk kez 1980 yılında asetilkolinin vazodilatasyon oluşturabilmesi için endotel hücrelerinin varlığına gereksiniminin keşfedilmesiyle anlaşılmaya başlanmıştır (40). Endotel, vücudun en büyük organıdır. Stratejik olarak kan damar duvarı ve kan bileşenleri arasında yer alır. Basınç ve dokunma gibi mekanik ve hormonal uyarılara yanıt olarak vazomotor fonksiyonu düzenleyen, inflamasyonu tetikleyen ve hemostazı etkileyen ajanları sentezler.

Endotel tarafından üretilen vazodilatör maddeler:

- Nitrik oksit (NO)
- Prostaglandin
- Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörler
- C-tipi natriüretik peptid

Vazokonstriktör maddeler:

- Anjiyotensin II
- Endotelin-1
- Tromboksan A<sub>2</sub>
- Reaktif oksijen türleri (ROS)

İnflamatuar modülatörler:

- NO
- Hücrelerarası adezyon molekülü-1
- Vasküler adezyon molekülü-1
- E-selektin
- Nükleer Faktör Kappa B

Hemostazın sağlanması için salgılanan maddeler:

- Doku plazminojen aktivatörü
- Doku faktörü inhibitörü
- Von Willebrand faktör
- NO
- Prostatiklin
- Tromboksan A<sub>2</sub>
- Plazminojen aktivatör inhibitör-1
- Fibrinojen

Damar endoteli çok işlevli bir dokudur. Yarı geçirgen bir engel olarak arter, kapiller ve venüllerin duvarları arasından moleküllerin geçişlerini kontrol eder. Birçok bölgede hücrelerarası bileşke normalde böyle moleküllere geçirgen değildir, fakat endotel hücreleri arasındaki hareket edebilen bileşkeler, yüksek kan basıncı gibi hemodinamik faktörler ve inflamasyondaki histamin gibi vazoaaktif ajanlar etkisiyle genişleyebilir. Endotel hücrelerinin kan-doku bariyerinin korunmasında, kan akımı ve damar direncinin düzenlenmesinde, anjiyogenezde, sıvı dengesinde, hormonların metabolizmasında, immün ve inflamatuvar reaksiyonların ayarlanmasında, özellikle düz kas hücreleri olmak üzere diğer hücre tiplerinin çoğalmalarının kontrolünde önemli rolleri vardır. Bu sebeple endotel, kan ve dokular arasındaki etkileşimlerde parakrin, endokrin ve otokrin etkili vazgeçilmez bir organ olarak işlev görmektedir.

### **2.1.2. Endotel Disfonksiyonunun Tanımı ve Fizyopatolojisi**

Endotel disfonksiyonunu inceleyen çalışmalar, başta NO olmak üzere, endotelden üretilen vazodilatörlerin biyoyararlılığının azaldığını ve vazokonstriktör faktörlerin arttığını göstermiştir. Bunların sonucunda görülen endotel aracılı vazodilatasyonun bozulması, endotel disfonksiyonunun göstergesi olarak kabul edilmiştir. Bu koşullarda inflamasyon ve koagülasyonu tetikleyen mekanizmalar da aktiflenmektedir. Aterosklerozun gelişimi, ilerlemesi, plak oluşumu ve komplikasyonların gelişimde ilk basamak endotel fizyolojisinde oluşan zararlı değişiklikler, diğer adıyla endotel disfonksiyonudur. Endotel disfonksiyonu bireyin aterosklerotik hastalığa yakalanma eğilimini yansıtmakta ve bu nedenle olumsuz bir kardiyovasküler prognoz belirteci olarak düşünülmektedir.

Endotel, normal homeostatik koşullar altında, proinflamatuvar faktörleri çok az veya hiç ekspres etmeksizin normal vasküler tonüsü ve kan akışkanlığını sağlar. Bununla birlikte sigara, yaşlanma, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, hiperglisemi, hiperhomosisteinemi ve ailede erken aterosklerotik hastalık öyküsü gibi risk faktörleri endotel fonksiyonunda bozulmaya yol açarlar (42,67). Bu risk faktörleri, antitrombotik faktörlerde kayıp, vazokonstriktör ve protrombotik ürünlerde artış ile seyreden kronik inflamatuvar bir süreç oluşturur. Ayrıca şişmanlık, yüksek C-reaktif protein düzeyleri ve sistemik kronik enfeksiyon da endotel disfonksiyonu ile ilişkilidir (67, 86).

Endotel disfonksiyonunun fizyopatolojisinde birçok karmaşık mekanizma yer alır. Bunlardan oksidatif stres, NO biyoyararlılığının azalması, ADMA, hiperhomosisteinemi ve hiperkolesterolemi bu çalışma kapsamında incelenecektir.

### **2.1.3. Endotel Disfonksiyonu ve Oksidatif Stres İlişkisi**

Serbest radikaller, reaktif yapıları nedeniyle başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve onlara zarar verme özelliğindedir (107). Bu özellikleriyle, endotel disfonksiyonunun gelişmesinde önemli rol oynarlar. Serbest radikallerin lipitler üzerindeki en önemli etkileri lipit peroksidasyonunun uyarılmasıdır. Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $HO^{\cdot}$ ), peroksil radikali ( $ROO^{\cdot}$ ) ve alkoksil radikali ( $RO^{\cdot}$ ) lipit peroksidasyonunu başlatan başlıca radikallerdir.

Hücre membranlarında lipit peroksidasyonu sonucu transport sistemleri etkilenir, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar

ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur. Bu olaylar hücre hasarında etkin bir rol oynar. Ayrıca lipid peroksidasyonun son ürünü olan aldehitler de sitotoksik etkilere sahiptir.

Serbest radikaller proteinler üzerinde doğrudan veya dolaylı etki gösterebilir. Peptid bağları, prolin ve lizin gibi amino asitler serbest radikallerden oldukça kolay etkilenir. Protein oksidasyonu, özellikle histidin, tirozin, fenilalanin gibi amino asitlerde karbonil gruplarının oluşumuyla sonuçlanır. Lipid peroksidasyonunun aldehit yapıdaki ürünleri, sistenin sülfidril grubu, lizin ve histidin ile kovalent bağlar oluşturarak proteinlerde parçalanma ve çapraz bağlanmalara yol açar.

Serbest radikallerin etkisi ile DNA yapısında değişimler olur. Bu yapısal değişimler pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma, zincir kırılmaları, DNA denatürasyonu gibi çeşitli olayları kapsar.

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada güçlü bir savunma sistemi olmasına rağmen, bazı durumlarda savunma sistemi yetersiz kalmakta ve oksidatif stres gelişmektedir. Hasarın yerine bağlı olarak çeşitli organ ve sistemler etkilenmektedir.

Oksidatif stres çeşitli yöntemlerle saptanabilir. Lipitlerdeki hasarı göstermek için genellikle lipid peroksidasyonu, protein hasarını belirlemek için protein karbonil grupları ölçümü kullanılmaktadır (61,107).

**Nitrozatif stres**, organizmada süperoksit anyonu ile NO'nun birleşmesi ile oluşan peroksinitrit oluşumundaki artış sonucu gelişmektedir. Peroksinitrit anyonu elektron transport zincirini inhibe etmesi, proteinlerin sülfidril gruplarını oksitlemesi, lipid peroksidasyonunu uyarması ve tirozin gibi sinyal iletim yollarında etkin amino asitleri nitratlaması nedeniyle sitotoksiktir (12). Normal koşullarda hücre içi süperoksit dismutaz (SOD) konsantrasyonu mikromolar, NO ise nanomolar düzeylerinde olduğundan süperoksit anyonunun başlıca inaktivasyon yolu SOD reaksiyonudur. Ancak süperoksit anyonu veya NO'in konsantrasyonlarında artış olduğunda kendi aralarındaki reaksiyon hızı SOD ile süperoksit anyonu arasındaki reaksiyon hızına göre 6 kat fazla olduğundan peroksinitrit oluşumu artar (12,84).

Peroksinitrit, protein yapısındaki aromatik amino asitlerle reaksiyonlaşır. Tirozinin nitrasyonu sonucunda 3-nitrotirozin, 3,3-dinitrotirozin oluşur. Peroksinitrit dayanıklı bir bileşik olmadığından, in vivo peroksinitrit oluşumunun ve hasarının gösterilmesinde nitrotirozin ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

İnflamasyon ve hasar bölgesinden kaynaklanan ROS, düşük konsantrasyonlarda sinyal molekülü gibi davranarak hücre büyümesi ve adaptasyon yanıtlarını içeren temel hücre aktivitelerini düzenlemeye çalışır. Ancak daha yüksek konsantrasyonlarda hücre hasarı ve ölümüne yol açabilen mekanizmaları harekete geçirir. Makromoleküllerin ve dolaşımdaki diğer maddelerin kandan dokulara ulaştırılmasını düzenleyen damar endotelinin ROS için önemli bir hedef olması nedeniyle oksidatif stres pek çok vasküler hastalığın ve bozukluğun gelişiminde rol oynar. Özellikle oksidatif stres sonucu vasküler endotel permeabilite artar ve sinyal molekülleri ve redoksla düzenlenen transkripsiyon faktörlerinde değişiklikler oluşur. Bunun sonucunda damar duvarına lökosit adezyonu artar (69).

Hipertansif hastalarda oksidatif stres NO düzeylerini azaltır ve bu azalmanın derecesi endotele bağımlı vazodilatasyondaki bozukluk ve kardiyovasküler olaylar ile bağıntılıdır (89). Diyabet gibi prooksidanların arttığı kronik hastalıkların da endotel disfonksiyonu ile bağıntılı olduğu gösterilmiştir (91).

ROS'un, *anoikis* adı verilen, endotel hücrelerinde kopma ile karakterize apoptozis şekli ile endotel hasarına yol açtığı bildirilmiştir (99). Balık yağında bulunan doymamış bir yağ asidi olan eikosapentaenoik asidin endoteli *anoikis*den koruduğu gösterilmiştir (97).

## 2.2. Nitrik Oksit

İlk defa 1978'de endotel gevşetici bir faktörün varlığı anlaşılmış ve bu faktörün nitrik oksit (NO) olduğu 1986 yılında Robert F. Furchgott tarafından gösterilmiştir. 1988 yılında NO'nun vücutta haberci bir molekül olarak fonksiyonu, bundan bir yıl sonra da NO sentezleyen enzimin varlığı gösterilmiştir. NO sentezi için kullanılan öncü molekül L-arginin amino asididir. NO'in argininden sentezi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında L-arginin, guanidin grubunun azotundan NOS enzimi tarafından hidroksillenir. Bu ara ürün oldukça stabildir. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün ikinci aşamada sitrülün ve NO'e çevrilir. NO endotel hücre yüzeyine etki eden uyarıcılara yanıt olarak üretilir. L-argininden NO sentezi için NOS, moleküler oksijen ve kofaktör olarak tetrahidrobiyopterin (BH<sub>4</sub>), FAD, FMN ve NADPH gereklidir.

NO salınımı yapan uyarıcılar:

- Asetilkolin
- Kan akış gerilimi (*shear stress*)
- Bradikininler

- Serotonin
- Adenozin
- ADP, ATP
- Histamin
- Trombosit aktive edici faktör
- Trombin

Damarlarda kan akış hızının artması endotel hücreler üzerinde kan akış gerilimi (*shear stress*) oluşturarak NO'nun sentez ve salınımını artırır. Kan akış gerilimi potasyum kanallarının aktivasyonuna neden olarak hiperpolarizasyona, hiperpolarizasyon ise  $Ca^{2+}$  girişine neden olarak NO sentezini artırır. Bunun yanında epinefrin, norepinefrin, histamin, vazopressin, asetilkolin, bradikinin, ADP, ATP, trombin, insülin, endotelin ve 5-hidroksitriptamin gibi moleküller endotel hücre reseptörlerine bağlanarak fosfolipaz-C enzimini aktive ederek sonunda  $Ca^{2+}$  aracılığı ile eNOS enzim aktivasyonuna yol açar ve NO sentezini arttırmaları (58).

NO renksiz bir gaz olup serbest radikal özelliğine sahip bir moleküldür. Dış orbitalinde paylaşılmamış tek elektron, bu moleküle radikal özelliği kazandırır. NO diğer radikallerin aksine kendi reaktivitesini baskıladığından reaktivitesi son derece düşüktür. Sentezlendiği yerden daha uzak bölgelere difüzyonu kolaydır. Fizyolojik koşullarda dayanıksız olup hızla nitrit ya da nitrata oksitlenerek ortamdaki uzaklaşır.

### 2.2.1. Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

NOS enziminin, aktivitesini farklı hücrelerde gösteren çeşitli izoformları vardır. Bunlar sinir dokusunda ve bazı dokularda (akciğer, pankreas, mide, uterus ve vasküler düz kas hücreleri) bulunan **nöronal NOS (nNOS)**, immünolojik uyarımlarla indüklenen ve hemen hemen tüm çekirdekli hücrelerde bulunan **indüklenbilir NOS (iNOS)** ve endotel hücrelerinde bulunan **endotelyal NOS (eNOS)**'tur (39).

eNOS endotel hücre membranında bulunan ve ağırlıklı olarak NO sentezinden sorumlu olan formdur. nNOS, nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan NO sentezinden sorumludur. nNOS ve eNOS birlikte **yapısal NOS (cNOS)** olarak adlandırılır. iNOS enziminin ekspresyonu lipopolisakkaritler gibi çeşitli bakteriyel ürünler ile inflamatuvar sitokinler (INF- $\gamma$ , IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$  gibi) tarafından indüklenir. iNOS sadece fagositik lökositlere özgü olmayıp uygun indüksiyonla tüm çekirdekli hücreler tarafından sentezlenebilir.

NOS enziminin tüm formları, redüktaz ve oksijenaz domenleri içeren iki monomerden oluşmaktadır. NOS enzimlerinin aktivitesi koenzimlerine bağlıdır ve NO sentezini katalizlemeleri için dimer yapı oluşturmaları gerekir (39).

Fonksiyonel NOS enziminin her bir monomerinin karboksi terminallerinde redüktaz, amino terminallerinde oksijenaz domenleri, iki domen arasında kalmodulin bağlayan segmentler bulunur. Kalmodulinin bağlanmasıyla, elektronlar redüktaz domenine bağlı koenzimlerden oksijenaz domenindeki hem grubuna aktarılır. Oksijenaz domeninde hem yanısıra prostetik grup olarak  $BH_4$  de bulunur. Hem bölümünde elektronlar  $O_2$ 'yi indirgeyerek L-argininden L-sitrülin ve NO oluşumunu gerçekleştirir.  $BH_4$ , bir elektron vermek suretiyle moleküler oksijeni aktifler, kendisi  $BH_3^{\cdot}$  radikaline dönüşür. Bu radikal, flavinli koenzimler veya alternatif olarak askorbik asit gibi indirgeyici ajanlarla rejenere olur (110;Şekil 2.1).

NOS, nitrik oksit sentezini iki basamakta gerçekleştirir. İlk basamakta NOS, L-arginini  $N^0$ -hidroksi-L-arginine hidroksiller; ikinci basamakta  $N^0$ -hidroksi-L-arginini L-sitrülin ve NO'ya oksitler (39).

NOS'un bütün formları kalmodülün bağlar. nNOS ve eNOS'da kalmodülün bağlanması intrasellüler Ca artışı ile birlikte gerçekleşir ( $1/2 V_{max}$  değeri 200-400 nM). Kalmodulinin NOS'a afinitesinin artışı, elektronların redüktaz domenindeki NADPH'dan oksijenaz domenindeki hem'e akışını hızlandırır. iNOS'da kalmodulin bağlayıcı bölgedeki farklı amino asit dizisinden dolayı kalmodulin oldukça düşük intrasellüler Ca düzeylerinde de bağlanır (40 nM'in altında). Çinkonun ise NOS yapısında katalitik özellikten ziyade yapısal bir önemi vardır.

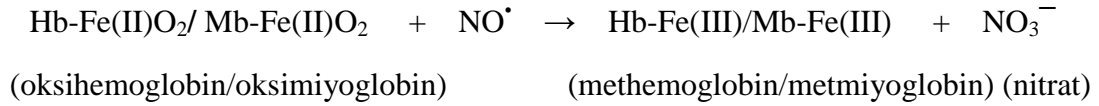


kültüründe ise esas ürün nitrittir. NO ayrıca proteinlerin ve amino asitlerin tiyol (-SH) grupları ile reaksiyona girer ve sonuçta sabit nitrozotiyoller oluşabilir (58).

Endotelde sentezlenen NO'nun vasküler etkileri şunlardır:

- 1- cGMP aracılı vazodilatasyon,
- 2- Trombosit agregasyonu ve adezyonunun engellenmesi,
- 3- Trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin salınımını engelleyerek düz kas hücrelerinde antiproliferatif etki ve fibröz plak oluşumunun engellenmesi,
- 4- MCP-1 ekspresyonunu azaltması ve lökosit adezyon moleküllerinin inhibisyonu ile anti-inflamatuar etki,
- 5- Anjiyotensin II ve ROS gibi aterosjenik faktörlerin yol açtığı endotel hücre ölümünün engellenmesi,
- 6- İskemi sonrasında yeni damar oluşumunun indüklenerek kollateral dolaşımın sağlanması (39).

NO, 3-5 saniye gibi çok kısa yarılanma ömrüne sahiptir. NO'nun çok kısa yarılanma ömrüne sahip olmasının iki nedeni vardır. Bunlardan birincisi otooksidasyon tepkimeleridir; NO, hızla okside olarak stabil son ürünleri olan nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) dönüşmektedir. İkincisi ise nitrik oksidin fizyolojik miktarını kontrol eden en önemli faktör olan NO ile oksihemoglobin ve oksimiyoglobin arasındaki tepkimedir. Oksihemoglobin ve oksimiyoglobin büyük bir hızla NO ile tepkimeye girerek nitrik oksidi nitrate oksitlemektedir (58).



### 2.2.3. Nitrik Oksit Sentezinin Düzenlenmesinde Etkili Faktörler

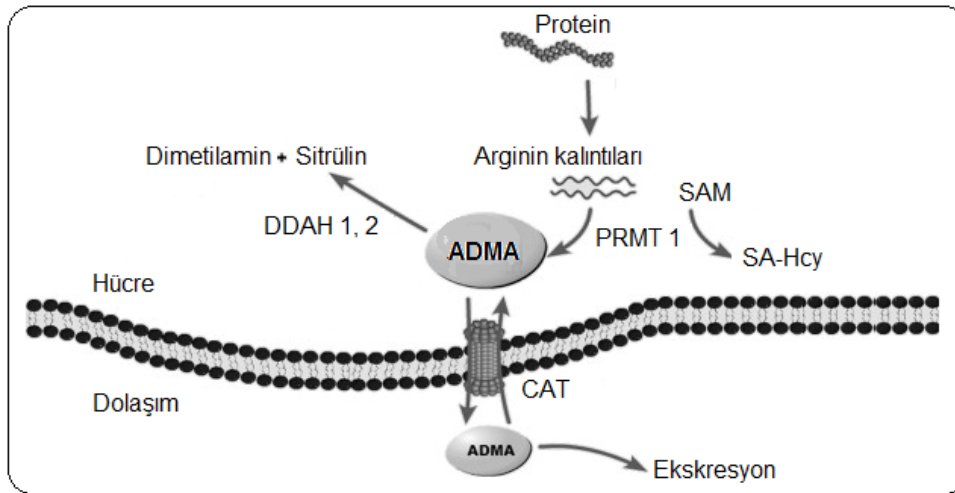
**Hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonunun artışı:** Kalmomodulinin NOS'a bağlanmasına neden olur. Böylece enzim üzerinde elektronların NADPH'dan *heme* akışı hızlanır.

**Fosforilasyon:** eNOS için önemli fosforilasyon bölgeleri Ser1177 ve Thr495'dir. İstirahat halindeki endotel hücresinde Ser1177 genellikle fosforile değildir. Hücrenin östrojenler, VEGF, insülin, bradikinin veya kan akış gerilimine maruz kalmasına yanıt olarak Akt1, AMPK, PKA ve CaMKII gibi kinazların aktiflenmesiyle Ser1177 fosforilasyonu gerçekleşir. Ser1177'in fosforile olması elektron akışını hızlandırarak enzim aktivitesini artırır. Thr495 fosforilasyonu ise muhtemelen *protein kinaz C* (PKC) tarafından gerçekleştirilmekte ve NOS aktivitesini inhibe etmektedir (39).

**Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>):** NO sentezinde gerekli bir kofaktördür. NOS substratı olan L-arginin ve BH<sub>4</sub>'ün yetmezliği; eNOS'un homodimer yapısının ayrışmasına yol açarak süperoksit (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) üretimiyle sonuçlanır. Bu etki '*NOS uncoupling*' olarak adlandırılır.

NO, arginin guanidin azotunun moleküler oksijenle oksitlenmesi sonucu oluşmaktadır. Optimal koşullarda eNOS bir homodimer yapısındadır. NADPH'dan gelen elektronlar FAD ve FMN üzerinden diğer monomerin oksijenaz domenine aktarılır. BH<sub>4</sub>'ün aktif bölgede *heme* sıkıca bağlı olarak her iki monomerdeki amino asit kalıntılarıyla etkileşimde olması, eNOS'un dimer oluşturmasını sağlar. BH<sub>4</sub> eksikliğinde elektronların flavinlerden L-arginine akışı bozulur (*uncoupling*). L-arginin oksitlenemez ve moleküler oksijenden süperoksit anyonu oluşur. Sağlıklı insanlarda BH<sub>4</sub> kullanımını NO üretimini arttırmazken, hiperkolesterolemik ve sigara içen kişilerde bozulmuş olan NOS aktivitesini düzeltebildiği gösterilmiştir (39).

**Asimetrik dimetilarginin (ADMA):** Endojen NOS inhibitörüdür. ADMA, simetrik dimetilarginin (SDMA) ve monometilarginin (L-NMMA), proteinlerdeki spesifik arginin kalıntılarının *S-adenozil metyonin:protein arginin metiltransferaz* (protein metilaz, PRMT) kataliziyle metilasyonu ile oluşur. PRMT, S-adenozil metyoninden metil grubunun arginine transferini katalizleyerek metilarginin ve S-adenozil homosistein (SAH) oluşumuna yol açar (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Proteinlerdeki arginin kalıntılarının S-adenozil metyonin (SAM) ile metilasyona uğraması sonucunda ADMA oluşur. Protein yıkımı ile serbestleşen ADMA katyonik amino asit taşıyıcı (CAT) ile hücreden dolaşıma geçer. Karaciğerde ADMA dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) tarafından yıkılır. PRMT: Protein-arginin metil transferaz; SA-Hcy: S-adenozil homosistein.

ADMA böbrekler yoluyla kandan temizlenir. Ancak % 90'dan fazlası *dimetilarginin dimetilaminohidrolaz* (DDAH) kataliziyle sitrulin ve sırasıyla dimetilamin veya monometilamine metabolize olur (76).

#### 2.2.4. Endotel Disfonksiyonu ve NO İlişkisi

Birçok çalışmada endotel disfonksiyonunda NO sentezinin etkilendiği, bundan endojen veya eksojen eNOS inhibitörlerinin veya L-arginin miktarındaki azalmanın sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında, sentezde bir değişiklik olmadığı halde NO biyoyararlanımının azalmış olması da mümkündür.

Endotel disfonksiyonunun moleküler temelinde biyoaktif NO'nun inaktivasyonu ve NOS '*uncouplinginin*' bulunduğu düşünülmektedir. Vasküler hastalıklardaki artmış oksidatif stres nedeniyle NO, süperoksit radikaliyle reaksiyona girerek ortamdan uzaklaştırılır. Ayrıca oksidatif stresin, eNOS'un fonksiyonunu etkileyerek onu  $O_2^{\cdot-}$  açığa çıkaran bir enzim haline çevirdiği gösterilmiştir. eNOS'un uncoupling'inde rol alan mekanizmalar  $BH_4$ 'ün oksidasyonu, L-arginin azalması ve endojen metilargininlerin birikimidir. Yakın zamanda eNOS'un S-glutatyonylasyonu (glutatyonun enzimdeki sisteinlerin -SH grubuna bağlanması) eNOS uncoupling'e yol açan başka bir mekanizma olarak öne sürülmüştür (39).

#### 5,6,7,8-Tetrahidrobiyopterin Hipotezi

Vasküler hastalıkların çoğunda damar duvarında NADPH oksidazların ekspresyon ve aktivitesi artar; çok miktarda  $O_2^{\cdot-}$  oluşur. SOD tarafından oluşturulan  $H_2O_2$ , eNOS ekspresyonunu uyarır. Oluşan NO, hızla  $O_2^{\cdot-}$  ile reaksiyona girerek ONOO<sup>-</sup> oluşturur. Peroksinitrit eNOS'un kofaktörü olan  $BH_4$ 'ü oksitleyerek onu trihidrobiyopterin radikali ( $BH_3^{\cdot}$ ) haline getirir. Sonuçta NOS'un, L-arginine olan ilgisini de azaltır. Böylece eNOS, NO üreten fonksiyonel bir enzim olmaktan çıkıp,  $O_2^{\cdot-}$  üreterek vasküler oksidatif strese katkıda bulunan bir enzim haline gelir. eNOS tarafından üretilen NO miktarının hücre içi  $BH_4$  miktarıyla doğru orantılı olduğu ve kardiyovasküler hastalıklarda  $BH_4$ 'ün azaldığı gösterilmiştir (110).

#### L-Arginin ve NOS

Hiperkolesterolemi ve hipertansiyon ile ilgili çalışmalarda L-arginin tedavisinin endotel disfonksiyonunu iyileştirebildiği gözlenmiştir. Endotel hücreleri tarafından eksprese edilen arginaz, eNOS ile substratı için yarışabilir. Bu nedenle L-argininin faydalı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca argininin guanidin azotunun direkt radikal tutucu özelliği ve NOS'a karşı ADMA ile yarışması da etkili olabilir (39).

## **ADMA ve NOS uncouplingi**

ADMA tüm kardiyovasküler mortalite nedenleri için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (3,4). ADMA, eNOS'un endojen inhibitörü olmakla birlikte NOS *uncouplingi* ile de ilişkilendirilmiştir (4). ADMA üretiminden sorumlu olan enzim protein arginin N-metiltransferaz (PRMT tip I) ve yıkımını gerçekleştiren DDAH, redoks duyarlı enzimlerdir. Oksidatif stresin PRMT'yi aktiflemek ve DDAH'yi inhibe etmek suretiyle ADMA konsantrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (68).

### **2.3. Endotel Disfonksiyonu ve Aterosklerotik Risk Faktörleri**

Aterosklerotik hastalıkların prevalansı ve şiddeti çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlardan yaş ve genetik faktörler dışındakiler kontrol edilebilir özelliktedir.

Aterosklerotik Risk Faktörleri:

- Yaş
- Cinsiyet
- Sigara kullanımı
- Hiperlipidemi
- Hipertansiyon
- Diabetes mellitus
- HDL-kolesterol düşüklüğü
- Aile öyküsü
- Obezite
- Hiperhomosisteinemi
- Lipoprotein (a)
- CRP yüksekliği
- Östrojen eksikliği
- Sedanter yaşam

Bu faktörlerden hipertansiyon, insüline bağımlı diyabet, insüline bağımlı olmayan diyabet, yaş, obezite, sedanter yaşam ve sigara kullanımı ile endotel disfonksiyonu arasındaki bağıntı çeşitli çalışmalarda ele alınmıştır. Hiperlipidemi ve hiperhomosisteineminin endotel disfonksiyonundaki rolleri ise bu tez kapsamında ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

### 2.3.1. Hiperkolesterolemi ve Endotel Disfonksiyonu

Hiperkolesteroleminin erken koroner arter hastalığı için en önemli risk faktörlerinden biri olduğu bilinmektedir. Kolesterol düzeyleri ile koroner arter hastalığı riski, güçlü ve doğrusal bir bağıntı gösterir. Hiperkolesterolemi ve artmış LDL-kolesterol, hem periferik, hem de koroner dolaşımında endotel fonksiyonlarını bozar. Çalışmalar sonucunda normal kolesterol düzeylerinin bile endotel kaynaklı vazodilatasyon ile negatif bağıntılı olduğu ve bu bulguların önemli klinik etkileri olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, kolesterol düşürücü ilaçların kolesterol normal sınırlarda olduğunda dahi endotel bağımlı NO üretimini ve salgılanmasını arttırabileceği ve dolayısıyla endotel fonksiyonlarını iyileştirebileceği savunulmuştur (73). Koroner arter hastalığı olan bireylerde ortalama kolesterol düzeylerinin düşürülmesi ile miyokard enfarktüsü geçirme riski azalır. Bu koruyucu etki kısmen endotel fonksiyonunda düzelmeye bağlı olabilir. Ailesel hiperkolesterolemi hastalarında NO üretiminde önemli bir kofaktör olan tetrahydrobiopterin tedavisi de NO aktivitesini geri kazandırmıştır (109).

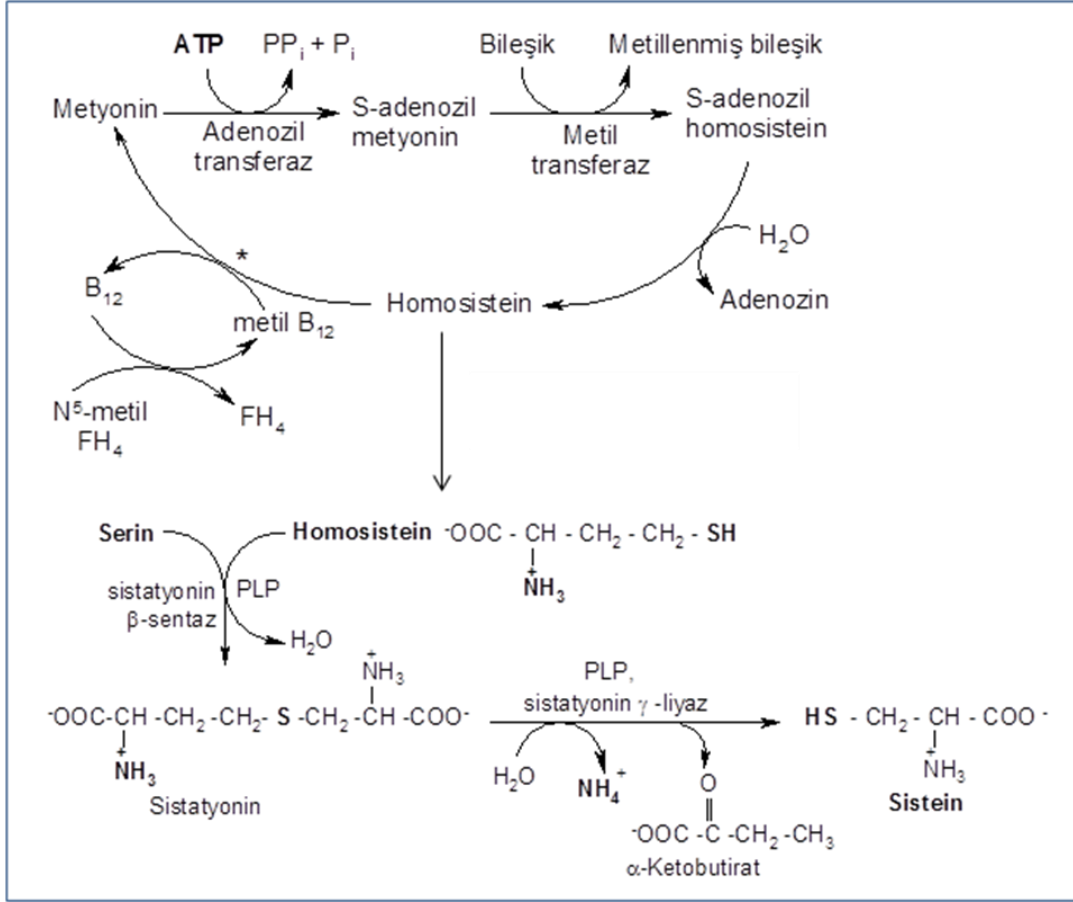
L-arginin/NO/siklik guanozin monofosfat (cGMP) yolağındaki sorunlar, vasküler endoteldeki proaterojenik değişiklikler için tetik mekanizmayı harekete geçirir. LDL-kolesterol düzeylerinin artması, endotel bağımlı vazodilatasyona şu mekanizmalar yoluyla etki edebilir (19,20,30,36,37):

- Peroksinitrit oluşumu nedeniyle NO biyoyararlanımının azalması
- PRMT I aktivasyonu ile ADMA üretiminin artışı
- DDAH'nin baskılanması sonucu ADMA birikimi
- eNOS ekspresyonunun azaltılması
- G<sub>i</sub> protein-bağımlı sinyal iletiminde ayrışma
- eNOS'un substratlarının azaltılması
- eNOS'un kaveolin proteini ile olan ilişkisinin etkilenmesi
- eNOS sentezinin baskılanması

### 2.3.2. Hiperhomosisteinemi ve Endotel Disfonksiyonu

Homosistein (HS) besinlerle alınmayan, protein yapısına katılmayan ve sülfidril grubu içeren bir amino asittir. Metyonin metabolizması sırasında oluşur. Metyonin, S-adenozil metyonin (SAM) şeklinde organizmada aktif metil grubu vericisi olarak görev alır ve metil

transferazlarla katalizlenen reaksiyonlarla metil grubunu kaybetmesiyle S-adenozil homosisteine dönüşür (SAH). Bu bileşikten adenzin grubunun ayrılmasıyla da HS oluşur.



Şekil 2.3. Homosistein Metabolizması (PLP: Piridoksal Fosfat, FH<sub>4</sub>: Tetrahidrofolat)

Metyoninin organizmadaki miktarına bağlı olarak HS, ya tekrar metyonine ya da transsülfürasyon yolu ile sistein üzerinden sülfatlara değişmektedir. Normal koşullarda, HS'nin büyük bir bölümü N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolattan gelen metil grubu ile metyonin sentaz (homosistein metil transferaz) tarafından tekrar metyonine dönüşmektedir (Şekil 2.3).

HS'den transsülfürasyon yolunda ise sistatyonin β-sentaz ve sistatyonin γ-liyaz etkisi ile sülfatlar oluşmaktadır. Bu iki enzimin de kofaktörü piridoksal fosfattır. Ancak bu yolun kapasitesi sınırlıdır ve aşırı miktarda metyonin alındığında organizmada HS birikmektedir.

HS'nin remetilasyon ve transsülfürasyon reaksiyonlarında folik asit, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> vitaminleri önemli rol oynamaktadır. Öte yandan, HS'in metyonine dönüşmesinde, N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolat yerine metil donörü olarak **betain** de kullanılabilir (50).

HS serumda iki şekilde bulunur:

1) Proteine bağlı HS: Albuminle homosistein disülfid köprüsü ile bağlanmıştır. Plazmadaki total HS'in %70-80'i bu şekilde bulunur.

2) Serbest HS: Plazmadaki total HS'in %30'unu oluşturur. HS fizyolojik pH'da oksidasyonlara duyarlı olduğundan genellikle oksitlenmiş şekildedir. Oksitlenmiş halde iki molekül HS, homosistin oluşturur veya sistein ile birleşerek homosistein-sistein karma disülfidleri şeklinde bulunur. Serbest HS fraksiyonunun sadece %1'lik kısmında HS indirgenmiş haldedir.

### **Hiperhomosisteinemi**

Sağlıklı kişilerde HS'nin plazma düzeyleri 10  $\mu$ M civarındadır. 15-30  $\mu$ M arasındaki düzeyler ılımlı hiperhomosisteinemi, 30-100  $\mu$ M'un arasındaki düzeyler orta dereceli hiperhomosisteinemi, 100  $\mu$ M'ın üstündeki düzeyler ciddi hiperhomosisteinemi göstermektedir (95).

Homosistinürili hastalarda tromboembolik olayların sık görülmesi üzerine hiperhomosisteinemi ile damar bozuklukları arasında bir ilişki olabileceği ileri sürülmüş ve bu ilişkinin niteliği klinik ve deneysel çalışmalarla araştırılmaya başlanmıştır. 1990'lı yıllardan itibaren bu alandaki çalışmalar giderek yoğunlaşmıştır. Günümüzde hiperhomosisteinemi, aterosklerotik kalp-damar hastalıklarında bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Hiperhomosisteinemiye bağlı olarak gelişen endotel hasarının ateroskleroz oluşumunda tetikleyici bir rol oynadığı kabul edilmektedir (49,95). HS düzeyleri arttığında otooksidasyon ile ROS'un oluştuğu, bunların doğrudan etkiyle endotel hasarını başlattığı (49), LDL otooksidasyonunu hızlandırarak ateroskleroz plakları oluşumunu arttırdığı ileri sürülmüştür (114). Günümüzde oksidatif stresin ve özellikle LDL oksidasyonunun ateroskleroz patojenezinde etkin rol oynadığı bilinmektedir (106). Bu nedenle hiperhomosisteinemide ROS ve oksitlenmiş LDL'deki artışlar, ateroskleroz oluşumunda çeşitli basamakları tetiklemektedir.

Öte yandan, metyoninden zengin diyet uygulanan deney hayvanlarında karaciğer yağlanması ve hepatit geliştiği bildirilmiştir (111). Aynı şekilde sistatyonin  $\beta$  sentaz eksikliği olan farelerde de yağlanma ve fibrozis geliştiği saptanmıştır (88). Karaciğerdeki bu lezyonların oluşumunda oksidatif ve nitrozatif stresin rol oynayabileceği ve apoptotik ve nekrotik olayların tetiklenebileceği ileri sürülmüştür (52). Farklı hayvan türlerinde, farklı doz ve sürelerde metyoninden zengin bir diyet uygulamasının karaciğerde prooksidan-antioksidan

denge ve nitrozatif stres üzerine etkileri araştırılmış, ancak bu çalışmalarda çelişkili sonuçlar bulunmuştur (7,111).

Hiperhomosisteinemiye bağlı olarak çeşitli dokularda saptanan hasarda oksidatif stres, nitrozatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve proinflamatuvar sitokinlerin rol oynadıkları bildirilmektedir (6,111). HS'nin nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) yi aktiflediği, IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin oluşumunu arttırdığı, süperoksit radikali ve peroksinitrit oluşumunu uyardığı ve endoplazmik retikulum stresine yol açarak proteinlerde hatalı katlanmalara yol açabileceği bildirilmiştir (6,46). Öte yandan homosisteinden oluşan *homosistein tiyolakton*, plazma proteinlerinde modifikasyonlara yol açmakta ve kalp-damar, karaciğer ve beyin üzerindeki toksisitede etkili olmaktadır (46,51). Bütün bu faktörlerin dokularda apoptotik ve nekrotik olayları tetiklediği ileri sürülmüştür (6).

Hiperhomosisteinemi günümüzde endotel disfonksiyonu risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir (6,16,29,49,50,96). HS düzeylerindeki artış damar endotelinde NO biyoyararlanımını da etkilemektedir. Endotelden salgılanan nitrik oksit, HS ile bağlanarak başlangıçta koruyucu rol oynamaktadır. Ancak aşırı ROS üretimi sonucunda NO oluşumu azalmakta ve böylece bu koruyucu mekanizma ortadan kalkmaktadır. Aksine, NO'nun süperoksit ile birleşmesi sonucu çok etkili bir radikal olan peroksinitrit radikali oluşmakta (NO'nun oksidatif inaktivasyonu) ve buna bağlı toksik etkiler gelişmektedir (51).

İnsanlarda ve deneysel çalışmalarda hiperhomosisteineminin ADMA düzeylerini arttırarak endotel disfonksiyonuna yol açtığı gösterilmiştir (29). Hiperhomosisteinemide ADMA düzeylerindeki artışa yol açan nedenler henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır. Homosisteinin DDAH'yi inhibe ederek ADMA birikimine neden olabileceğine ilişkin bulgular vardır (96).

PRMT'nin substratları proteinlerdeki arginin kalıntısı ile S-adenozilmetyonindir. Reaksiyon sonunda S-adenozilhomosistein ve metillenmiş arginin kalıntıları (SDMA ve ADMA) oluşur. Bu nedenle ADMA ve homosistein konsantrasyonları birbiriyle ilişkilidir. Homosistein ve ADMA'nın istenmeyen vasküler etkileri, nitrik oksit-bağımlı endotel disfonksiyonu oluşturmalarından kaynaklanmaktadır. Ancak, hiperhomosisteinemide uygulanan folik asit ve B<sub>12</sub> tedavisi, homosisteinin metyonine dönüşmesini sağlayarak yararlı olur. ADMA metabolizması ise büyük oranda DDAH aktivitesiyle düzenlendiğinden, folik asit ve B<sub>12</sub> tedavisinden etkilenmez ve homosistein/ADMA bağıntısı ortadan kalkar. Endotel

disfonksiyonunun düzelmesi, ancak ADMA düzeylerinin de normale dönmesiyle gerçekleşebilir.

Epidemiyolojik çalışmalarda plazma homosistein düzeylerindeki hafif yükselmelerin dahi ateroskleroz riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Deneysel bir çalışmada homosisteinin akut infüzyonunun doğrudan endotel hücre hasarına yol açtığı gösterilmiştir (6).

Hiperhomosisteinemi folat, piridoksin veya betain gibi alternatif ajanların diyetle eklenmesi sonucu düşürülebileceğinden, ateroskleroz için değiştirilebilir bir risk faktörü olarak düşünülebilir.

## **2.4. Apelin**

### **2.4.1. Apelin ve APJ Reseptör**

Apelin, ters farmakoloji ile keşfedilmiş bir peptiddir. Öncelikle reseptörü bulunmuş, ardından bu reseptörün endojen ligandı olarak apelin molekülü saflaştırılmıştır. O'Dowd ve arkadaşları 1992 yılında, anjiyotensin reseptör tip 1 (AT-1) geni ile homolog olan bir gen klonlamışlar, bu genin kodladığı reseptöre APJ adını vermişlerdir (77). Apelin proteini ise 1998 yılında Professor M. Fujino ve ekibi tarafından tanımlanmıştır (101). Apelin mRNA'sı endotel, miyokard, vasküler düz kas hücreleri, adipoz doku ve beyin dahil olmak üzere pek çok dokuda eksprese edilmektedir (85).

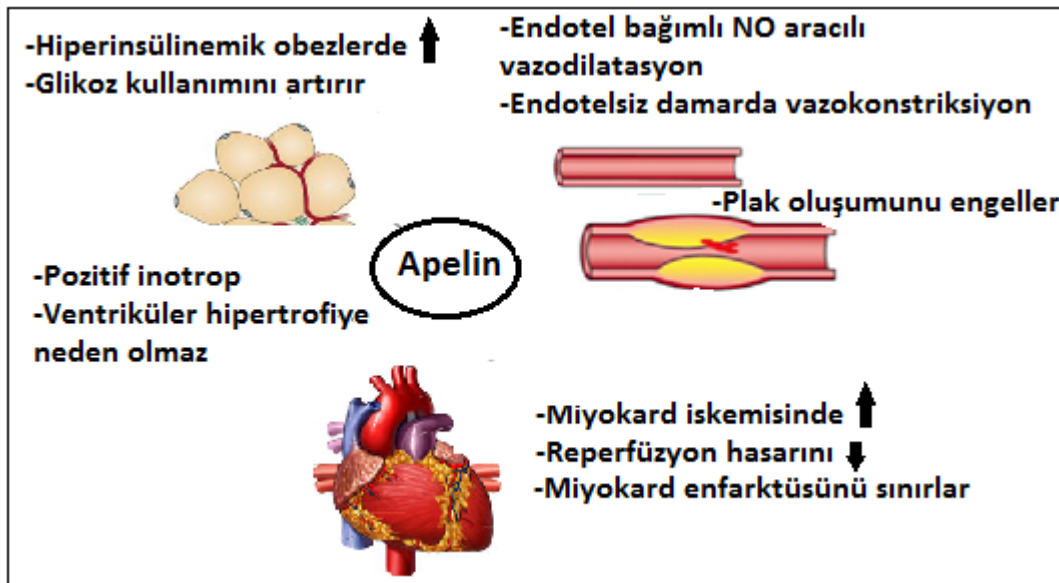
Apelin geni insanlarda Xq25-26.1 kromozomunda bulunur ve 77 amino asitlik bir prepropeptid kodlar. Prepropeptid, sinyal peptid dizisinin ayrılmasından sonra 55 amino asitlik propeptid haline dönüşür. Bu propeptidden oluşan aktif fragmanlardan en iyi bilinenleri apelin-36, apelin-17 ve apelin-13'dür. Günümüzde 46 farklı apelin türü gösterilmiştir (74). Peptid uzunluğu, biyolojik aktivite ile negatif bağlantı gösterir. Çeşitli apelin formlarında C-terminalinde yer alan 12 amino asitlik bir fragman idantik olup, reseptör-ligand etkileşimi için molekülde esas olan kısımdır (85).

Apelin molekülü, anjiyotensin dönüştürücü enzim-ilişkili karboksipeptidaz (angiotensin- converting enzyme-related carboxypeptidase; ACE-2; EC:3.4.17.23) ile metabolize edilir (63). ACE-2 aynı zamanda anjiyotensin 2'yi anjiyotensin 1-7'a dönüştürür. Anjiyotensin 1-7, anjiyotensin 2'nin aksine natriürezisi uyarır ve vazodilatasyona yol açar, vasküler hücrelerin büyüme ve proliferasyonunu inhibe eder.

Apelin reseptör (APJ) immünreaktivitesi; insanda başta dalak ve plasenta olmak üzere kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, mide, beyin, vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde gösterilmiştir (60).

#### 2.4.2. Apelin ve Fizyolojik Etkileri

Apelin plazmada pikomolar konsantrasyonda bulunur, genellikle lokal parakrin etki gösterir (85).



**Şekil 2.4.** Apelinin fizyolojik etkileri: Metabolik ve antiaterosklerotik etkilerinin yanı sıra farklı mekanizmalarla kalp kasını koruyucu etkisi de gösterilmiştir.

#### Kan Basıncı ve Vasküler Tonus Üzerine Etkileri

Apelin injeksiyonlarının ortalama arter basıncını %5-%25 arasında değişen oranlarda düşürdüğü ve bu molekülün kalsiyum antagonistleri, hidralazin ve nitrogliserinden daha potent bir venodilatatör ajan olduğu in vivo çalışmalarla gösterilmiştir (26). Apelinin hipotansiyona yol açan damar genişletici etkisi nitrik oksit (NO) aracılığıyla ortaya çıkmaktadır (54). Apelin, endotelsiz damar düz kasına uygulandığında endotelin-1'e yakın düzeyde kontraksiyona yol açmıştır (56). Bu sebeple, apelin hem endotel bağımlı NO ilişkili vazodilatasyon, hem de endotelden bağımsız vazokonstriksiyon oluşturabilmektedir. Bu sebeple apelin-APJ sisteminin, AT-II'nin indüklediği vazokonstriksiyonun dengelenmesinde önemli role sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

## **Anjiyogenez**

Apelin embriyonik damarların endotelinde yoğun miktarda eksprese edilir. Yeni damar oluşumu sürecinde APJ ekspresyonu uyarılır ve damar stabilizasyonu sonrası ekspresyon ortadan kalkar (55). Apelin-13, endotel hücre kültüründe proliferasyonu uyarır.

## **Miyokardiyal Kontraktilite**

Apelin, bilinen en potent inotropik ajanlardan biri olarak kabul edilmektedir. Apelin, sarkolemmadaki  $Na^+/H^+$  pompasını aktifler, hücre içi kalsiyumu arttırarak kontraktiliteyi arttırır. Pozitif inotropik etki yaratan diğer medyatörlerden farklı olarak apelin miyokard hipertrofisine yol açmaz (5).

## **Apelin ve Adipoinsülinler Sistem**

Apelin, subkutan yağ dokusunda eksprese edilir. Yağ dokusunda apelin ekspresyonunun düzenlenmesinde açlık, beslenme, insülin, hipoksi, büyüme hormonu ve  $TNF-\alpha$  etkilidir. İnsülin adipoz dokuda apelin ekspresyonunu arttırır, apelin ise insülin sekresyonunu inhibe eder (94). Apelin uygulamasında besin alımı değişmediği halde yağlanmanın azalması, enerji sarfinin artmış olabileceğini düşündürmüştür (11).

### **2.4.3. Apelinin Ateroskleroz Etiyolojisi ve Kardiyovasküler Hastalıklardaki rolü**

Apelinin damar sağlığı üzerinde yararlı etkileri vardır.

1- Apelin NO aracılığıyla vazodilatasyon yapar, anjiyotensin II'nin vazokonstriktif etkilerini dengelemede rol alır (27,54). Diyabetik farelerde nitrik oksit üretimini arttırarak endotel disfonksiyonunu düzelttiği gösterilmiştir (112).

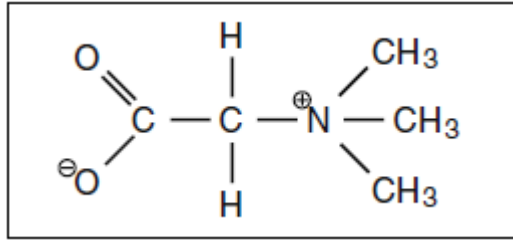
2- Aterosklerotik fare modelinde apelin infüzyonu, anjiyotensin II ile gelişen ateroskleroza, kan basıncından bağımsız olarak ortadan kaldırmıştır. Bu farelerde apelin geni eksikse ateroskleroz gelişir. Bu bulgular endojen apelinin aterojenezin önlenmesinde rolü olduğunu ve eksojen apelinin aterosklerozda potansiyel terapötik bir ajan olabileceğini göstermektedir (27). Başka bir çalışmada ise APJ reseptör ve ApoE geni olmayan farelerde aterosklerotik lezyonların azaldığı gösterilmiştir (45). Bu da APJ'nin ateroskleroz için gerekli olduğunu göstermektedir. Birbiriyle çelişen sonuçlar nedeniyle bu konuda daha fazla çalışma yapılmasını gerekmektedir.

3- Apelin uygulaması yapılan bir hayvan çalışmasında elastazla oluşturulan anevrizma gelişimi %50 oranında azalmıştır. Arter duvarındaki makrofaj infiltrasyonu ve makrofaj-koloni stimüle edici faktörün azalması nedeniyle, bu sonucun apelinin direkt antiinflamatuvar etkisi ile ortaya çıktığı düşünülmektedir (64).

Apelin, sağlıklı bireylerin damar duvarında nitrik oksit aracılı vazodilatasyona yol açmaktadır. Ancak hiperkolesterolemi ve diyabete bağlı gelişen endotel disfonksiyonuna etkisi tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca insanlarda antiaterojenik, antianevrizmal ve antiinflamatuvar rolüne ait bir kanıt yoktur. Dislipidemili ve koroner arter hastalığı olan bireylerde apelin konsantrasyonlarının azaldığı gösterilmiştir (66). Diyet veya statin tedavisi ile LDL kolesterolün düşmesi, plazma apelin düzeylerini yükseltir (100).

## 2.5. Betain

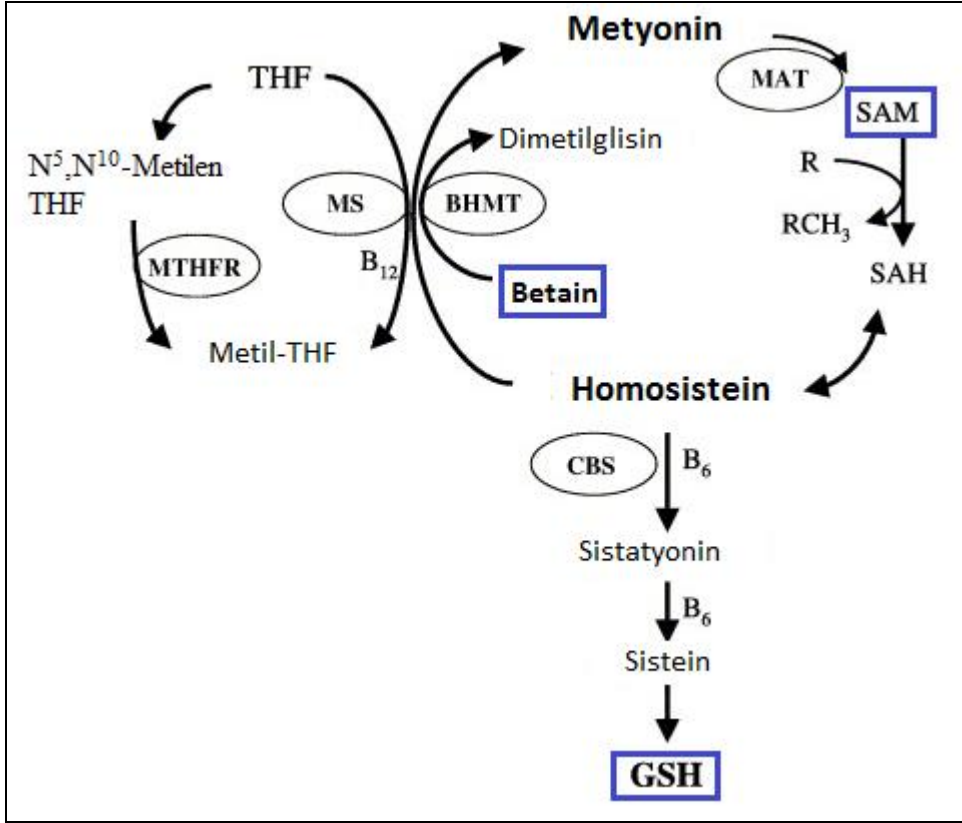
### 2.5.1. Betainin Yapısı ve Metabolizması



Trimetil glisin olarak bilinen betain, üç kimyasal reaktif metil grubu içerir. İlk kez 19. yüzyılda şeker pancarı suyunda keşfedilmiş ve sonraları diğer organizmalarda da bulunmuştur (28). Betain özellikle buğday, brokoli, ıspanak gibi bitkisel besinlerde ve kabuklu deniz ürünlerinde bulunmaktadır. Ayrıca karaciğer ve böbrekte kolinin oksidasyonu ile oluşur.

Betainin temel fizyolojik rolü hem bir ozmolit, hem de bir metil verici olmasıdır. Ozmolit olarak hücre, enzim ve proteinleri çeşitli streslerden korur. Metil verici olarak karaciğer ve böbrekte birçok kimyasal reaksiyona katılır. Bitki ve mikroorganizmalarda temel rolü, ozmotik değişikliklere karşı hücreleri korumaktır (105).

Betain karaciğer ve böbrek hücrelerinin mitokondrisinde katabolize olur. Homosisteinden metyonin oluşumunda görev alan N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolat yerine (Şekil 2.3) metil verici olarak betain kullanılabilir.



**Şekil 2.5.** Betain ve homosistein metabolizması (THF: Tetrahidrofolat, MTHFR: N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Metilen tetrahidrofolat redüktaz, MS: Metyonin sentaz, BHMT: Betain-homosistein metil transferaz, MAT: Metyonin adenziltransferaz, CBS: Sistatyonin β-sentaz, SAH: S-adenozil homosistein)

### 2.5.2. Betain ve Kardiyovasküler sistem

Hayvan deneylerinde betainin çeşitli mekanizmalarla yararlı olduğu gösterilmiştir. Apo-E defektli farelerde betain uygulaması doza bağlı anti-aterojenik etki göstermiş ve aortada inflamasyonu azaltmıştır (70). Başka çalışmalarda betainin HS düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (83). Ancak bunun yanında LDL-kolesterolün artmış olması ve bozulmuş vazodilatasyonda iyileştirici etkilerinin olmaması betainin koruyucu etkisinin sorgulanmasına yol açmıştır (80).

Betainin antiinflamatuvar etkisi deney hayvanlarında gösterilmiştir (41). Yeni bir çalışmada yüksek doz betain alan bireylerde plazma inflamatuvar belirteçlerinin (CRP, IL-6, TNF-α) daha düşük olduğu bulunmuştur (31). Ateroskleroz gelişiminde inflamasyon önemli bir belirteç olduğu için yüksek doz betainin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkisi

olabilir. Yine güncel bir prospektif çalışmada betain alımıyla kardiyovasküler hastalıklar arasında ilişki bulunmamıştır (14).

Betainin yaşam stili ve kardiyovasküler risk faktörleriyle ilişkisi 7074 sağlıklı erkek ve kadında araştırılmıştır. Betainin serum trigliserit, glikoz, vücut kütle indeksi ve yağ oranı, bel çevresi, HDL dışı kolesterol, sistolik ve diastolik kan basıncı ile negatif, HDL kolesterol ile pozitif bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir (62). Bu bulgular ışığında betain düşüklüğünün olumsuz bir kardiyovasküler risk faktörü olduğu düşünülebilir. Betain organizmada SAM düzeylerinde de artışa yol açmaktadır (28). SAM'ın güçlü antioksidan etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca SAM düzeylerindeki artışın, metilasyon ve transsülfürasyon reaksiyonlarını etkileyerek güçlü bir antioksidan olan GSH düzeylerini de arttırdığı ileri sürülmektedir (35). Betain uygulaması bir taraftan homosistein düzeylerini azaltmakta, diğer taraftan oksidatif strese bağlı koşulları düzeltmekte etkili olabilir.

### 2.5.3. Betainin Diğer Etkileri

**Hiperhomosisteinemi:** Uzun süreli yüksek doz betain, tek başına veya B vitaminleri ile beraber homosistinürili olgularda kullanılmıştır. Bu tedavi plazmada total homosistein (tHS) düzeyini azaltır, diğer biyokimyasal belirteçleri kısmen düzeltir ve klinik iyileşme sağlar. Sağlıklı bireylerde de betain ve fosfatidilkolin desteği açlık tHS düzeylerini azaltır (82). Betain, fosfatidilkolinden daha etkilidir ve bu etkisi daha hızlı ortaya çıkar (83).

Kardiyovasküler sistem hastalarında HS düzeyleri, plazma betain düzeyleri ile negatif bağıntılı bulunmuştur. 500 sağlıklı bireyi kapsayan geniş bir çalışmada metyonin yüklemesi sonrasında folat, kobalamin ve B<sub>6</sub> vitaminine göre betaininin tHS miktarına daha etkili olduğu bulunmuştur (80). Ancak tHS ve betain düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyen başka çalışmalarda birbiriyle uyumsuz sonuçlar elde edilmiştir (65). 10700 sağlıklı bireyi kapsayan geniş bir çalışmada folat, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> düzeylerine ve Metilen tetrahidrofolat redüktaz genotipine bağlı olarak betainin açlık tHS düzeyi ile ilişkisi incelenmiştir. Buna göre betain düşük serum folat düzeyi olan ve *Metilen tetrahidrofolat redüktaz TT* genotipli bireylerde açlık plazma tHS düzeylerinin güçlü bir belirleyicisidir. B vitaminlerinin eksik olduğu durumlarda, betain metil donörü görevini üstlenerek metyonin sentezini desteklemektedir (47).

**Karaciğer hastalıkları:** Betainin karaciğer yağlanması tedavisinde ve karaciğer sirozunun önlenmesinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (8,10,33). Alkol verilen

sıçanlarda betain desteği fosfatidiletanolamin metiltransferaz (PEMT) tarafından katalizlenen fosfatidilkolin sentezini arttırarak, VLDL sekresyonunu normalleştirmiş ve steatozu engellemiştir (57). Altta yatan mekanizma homosisteinin azalması, BHMT yoluyla metyonin sentezinin artması ve bu esnada PEMT aktivasyonuna yol ačan SAM/S adenzil HS oranının artması olabilir (10).

Non-alkolik karaciğer yağlanması (NAFLD), en sık gürülen karaciğer hastalığı olup metabolik sendromun yeni bir bileşeni olarak kabul edilmektedir. Betainin NAFLD tedavisinde kullanılması ile ilgili alışmalarda karaciğer fonksiyonlarının düzeldiği ve karaciğer yağlanması azaldığı gürülmüştür (2,87).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

1. HPLC cihazı (Waters, USA)
2. HPLC kolonu (Waters, USA)
3. HPLC vakum cihazı (Millipore, USA)
4. Hassas terazi (Scaltec, Germany)
5. Manyetik karıştırıcı (IKA Labortechnik RH Basic, USA)
6. Mikrotüp santrifüjü (Hettich, Germany)
7. Otomatik pipet (Eppendorf, USA)
8. pHmetre (Hanna Instruments, Portugal)
9. Santrifüj (Heraeus, Germany)
10. Spektrofotometre (Pharmaco Biotech, UK)
11. Vorteks karıştırıcı (IKA Work Inc. Minishaker, USA)
12. ELISA plak yıkayıcı (ESW 300 Medispec, US)
13. ELISA plak çalkalayıcı (IKA-Werke, USA)
14. ELISA plak okuyucu (Biotech, UK)
15. Sıcak su banyosu (Elektro-mag, USA)
16. Saf su cihazı (Millipore, USA)
17. Doku homojenizatörü (Heidolph, Germany)
18. Isıtıcı Blok (Techne, UK)
19. Örnek yoğunlaştırıcı (Azot evaporatör, Techne, UK)
20. Ultra turrax (Virsonic, USA)

#### 3.2. Çalışma Protokolü

Bu çalışmada 4-6 aylık Dunkin Hartley cinsi erkek kobaylar kullanıldı. Kobaylar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı ve her birinde 8 kobay olmak üzere altı gruba ayrıldı.

Aşağıda da belirtilen gruplara uygulanacak olan yemleri hazırlamak için toz halindeki kobay yemine belirtilen miktarlarda kolesterol (Alfa Aesar A11470), L-metyonin (Sigma M-925) ve betain hidrokloride (Alfa Aesar - A16122) katıldı ve Barbaros Denizeri firmasında (Gebze-Kocaeli) pellet haline getirildi.

**1. Kontrol grubu:** Normal kobay yemi verildi. Normal kobay yeminin kimyasal bileşimi % 10 nem, % 16.5 protein, % 50.9 karbonhidrat, % 8.59 selüloz, % 6 kül, % 3.5 yağ, % 3.5 mineral ve % 1 vitamin karışımından oluşmaktadır. Metabolik enerjisi ise 2600 kcal/kg'dir.

**2. Betain grubu (BET):** % 2.5 (w/w) oranında betain içeren yemle beslendi.

**3. Kolesterol grubu (KOL):** % 1.5 (w/w) oranında kolesterol içeren yem verildi.

**4. Kolesterol+betain grubu (KOL+BET):** % 1.5 (w/w) kolesterol ve % 2.5 (w/w) betain içeren yem uygulandı.

**5. Kolesterol+metyonin grubu (KOL+MET):** % 2 (w/w) L-metyonin ve % 1.5 (w/w) kolesterol içeren yem verildi.

**6. Kolesterol+metyonin+betain grubu (KOL+MET+BET):** Kobaylar % 2 (w/w) L-metyonin, % 1.5 (w/w) kolesterol ve % 2.5 betain içeren yemle beslendi.

Kobaylar bu diyetlerle 10 hafta süre ile beslendiler ve bir gece aç bırakıldıktan sonra sodyum tiyopental anestezisi altında kalplerinden kuru tüp ve Na-EDTA içeren tüplere kan alındı. Karaciğerlerive aortaları hızla çıkarılarak soğutulmuş % 0.9 NaCl ile yıkandı ve -80°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

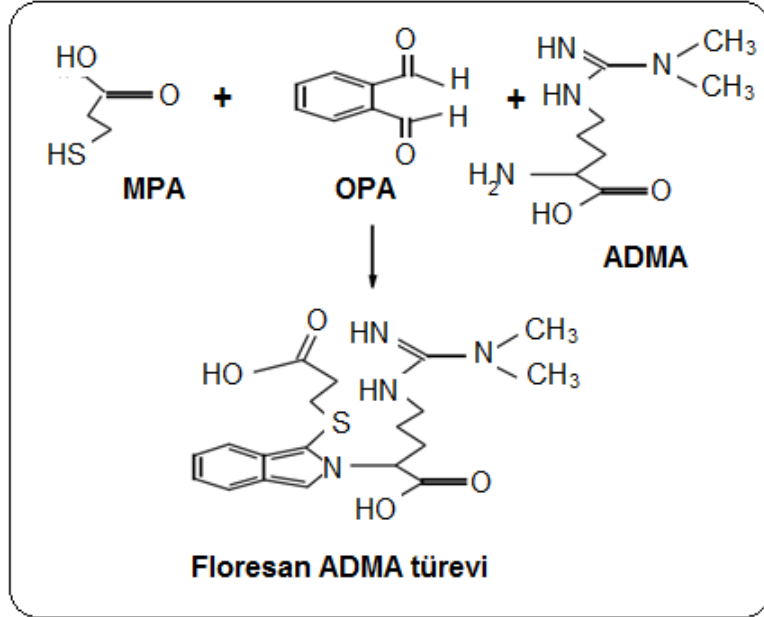
Kan örnekleri 1200xg'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma veya serumlar ayrıldı. Total kolesterol, trigliserit, alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aynı gün; homosistein, NO, ADMA, L-Arginin, NT ve apelin-12 düzeyleri -80°C'de saklanan örneklerde çalışıldı.

### 3.3. Serum veya plazmada yapılan ölçümler

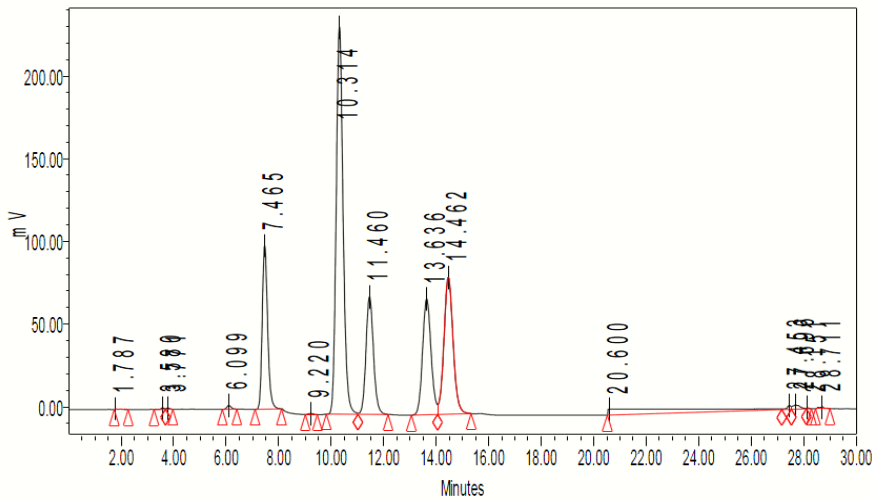
**a) Total kolesterol, trigliserit düzeyleri ile ALT ve AST aktiviteleri:** Serumda Roche (Mannheim, Almanya) firmasına ait moduler sistemde enzimatik kolorimetrik yöntemlerle ölçüldü.

**b) ADMA, SDMA ve L-arginin düzeyleri (102):** Tiyol grubu iceren merkaptopropiyonik asit varlığında, L-arginin ve metil türevlerinin orto-fitalaldehit ile florojen türevlerini oluşturmasına, bunların HPLC'de ayrışmasına ve floresan dedektörde saptanması prensibine dayanır (Şekil 3.1). 0.2 mL Na-EDTA'lı plazma veya 0.2 mL çalışma standardına (100 µM L-arginin, 10 µM homoarginin, ADMA, SDMA) 0.1 mL internal standart (100 µM mono-metilarginin) eklenerek bazik özellikteki L-arginin ve metillenmiş türevleri solid faz ekstraksiyonu ile ekstre edildi. Orto-fitalaldehit ayıracı (%5) ile fluoresan

türevlerine dönüştürüldü ve HPLC kolonuna (Symmetry C18 column, 3.9 x 150 mm, 5- $\mu$ m particle size) yüklendi. Metod protokolunda belirtildiği gibi mobil faz A, 50 mM potasyum fosfat tamponu, pH: 6.5, mobil faz B, su ve asetonitril karışımı (50/50) ve akış hızı: 1.1 mL/dakika olacak şekilde gradyan elüsyonu ile 30 dakika süreyle kromatografik olarak ayrıştırıldı. Eksitasyon dalga boyu 340 nm ve emisyon dalga boyu 455 nm’de ölçülen floresan yoğunluklarına ait pik alanları standartların pik alanlarıyla kıyaslandı (Şekil 3.2)



Şekil 3.1. ADMA'nın floresan türevinin oluşum reaksiyonu



Şekil 3.2. Standartlara ait kromatogram. Retansiyon zamanları; L-arginin: 7.46 dak, internal standart: 10.31 dak, ADMA:13.63 dak ve SDMA: 14.46 dak.

**c) NO (total nitrit+nitrat) düzeyinin ölçülmesi (90):** Plazmada NO tayini için ticari kit (Oxford Biomedical Research, Oxford, USA) kullanıldı. NO canlı organizmada katıldığı reaksiyonlar ile nitrit ( $\text{NO}^{2-}$ ) ve nitrat ( $\text{NO}^{3-}$ ) son ürünlerini oluşturmaktadır. Bu iki son

ürünün oranları değişkendir. Bu nedenle total NO üretiminin en iyi göstergesi  $\text{NO}^{2-}$  ve  $\text{NO}^{3-}$  'ün birlikte ölçülmesidir. Çalışmamızda plazma örneklerindeki nitrat, *nitrat redüktaz* enzimi aracılığıyla nitrite dönüştürüldü ve nitrit konsantrasyonu Griess reaksiyonu ile 540 nm'de kolorimetrik olarak ölçüldü.

**d) Nitrotirozin düzeyinin ölçülmesi:** Plazma nitrotirozin konsantrasyonları yarışmalı ELISA (enzym-linked immunosorbent assay) yöntemi ile tayin edildi. (OxiSelect, San Diego, USA).

**e) Apelin düzeyinin ölçülmesi:** Serum apelin konsantrasyonları yarışmalı ELISA yöntemi ile ölçüldü. (Novateinbio, Cambridge, USA)

**f) Total homosistein düzeyinin ölçülmesi:** Serumda kemilüminometrik yöntemle Immulite 2000 XPI (Siemens, Marburg, Almanya) sistemi ile ölçüldü.

#### 3.4. Karaciğer dokusunda yapılan ölçümler

Karaciğer dokusu tartıldı ve doku homojenizatörü ile soğuk 25 mM HEPES-NaOH tamponu (pH: 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, % 2 gliserol ve proteaz inhibitör kokteyli içeren ortamda % 30 (w/w) 'luk olacak şekilde homojenize edildi. Bu homojenat NO ve nitrotirozin ölçümlerinde kullanıldı.

**a) NO (total nitrit+nitrat) düzeyleri (90):** Karaciğer dokusunda nitrik oksit düzeylerinin ölçülmesi amacıyla % 30'luk (w/v) oranında hazırlanmış homojenatlar 5 dakika kaynatılarak proteinler uzaklaştırıldı ve 16.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlardan 85  $\mu\text{L}$  alınarak ortamda bulunan nitrat, nitrat redüktaz enzimi aracılığıyla nitrite dönüştürüldü. Bu aşamadan sonra plazmada nitrit tayini için kullanılan yöntem uygulandı. Proteinsizleştirilmiş süzüntüde  $\mu\text{M}$  olarak elde edilmiş olan sonuçlar, doku gramı başına hesaplanarak nmol/g doku olarak ifade edildi.

**b) Nitrotirozin düzeyi:** Bu homojenatlarda NT düzeyi, plazma nitrotirozin tayininde olduğu gibi yarışmalı ELISA yöntemi ile (OxiSelect, San Diego, USA) ölçüldü ve sonuçlar homojenatlarda bulunan protein miktarı tayin edilerek pmol NT/mg protein olarak hesaplandı.

**c) DDAH enzim aktivitesi (98):** DDAH enzim aktivitesinin ölçüm yöntemi; ortama eklenen ADMA'dan DDAH enzimi aracılığı ile sitrülin oluşumu prensibine dayanır. Oluşan sitrülin ise oksim/antipirin ayırıcı ile renklendirilir.

Karaciğer dokusu pH:6.5 fosfat tamponunda homojenize edildi ve 1000xg'de 10 dakika santrifüj edildi, elde edilen süpernatantların protein konsantrasyonu 20 mg/mL'ye ayarlandı ve 400 µL örneğe 400 µL 1 mM ADMA eklendi. Tüpler 45 dakika 37<sup>0</sup>C'de inkübe edildi. Reaksiyon 0.5 mL % 4'lük sülfosalisilik asit eklenerek durduruldu. 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Buz içinde soğutulduktan sonra 466 nm'de spektrofotometrede absorbanslar okundu. Sitrülin standart grafiği (0-100 µM) kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı. DDAH aktivitesi µmol sitrülin/g protein/dakika olarak belirlendi.

Oksim ayırıcı (% 0.8): 0.8 g diasetilmonoksim 100 mL % 52'lik asetik asitte çözülür. Antipirin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ayırıcı (% 0.5): 0.5 g antipirin 100 mL % 50'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de çözülür. 4 mL oksim ve 8 mL antipirin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> karıştırılarak renk ayırıcı hazırlanır.

**d) Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçülmesi (78):** Karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunu son ürünlerinden olan MDA konsantrasyonunun tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu kompleksin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir.

Doku homojenizatlarının hazırlanması: Karaciğer dokusu tartıldı ve Potter-Elvehjem doku homojenizatörü kullanılarak soğuk 0.15 M KCl çözeltisi içinde homojenize edildi ve %10'luk homojenatlar (w/v) hazırlandı.

**İşlem:** % 10'luk doku homojenatlarından 0.2 mL alınarak 0.2 mL % 8.1'lik sodyum dodesil sülfat, 1.5 mL %20'lik asetik asit, 1.5 mL % 0.8'lik tiyobarbitürik asit ve 0.6 mL distile su ilave edildi. Bu karışım kaynar su banyosunda 1 saat tutuldu. Karışımın soğutulmasını takiben üzerine 1 mL distile su ve 5 mL butanol/piridin (15:1) eklenerek karıştırıldı ve organik faz santrifüj edilerek ayrıldı. Tüpler ayıraç körüne karşı 532 nm spektrofotometrik olarak okundu.

#### **Ayıraçlar:**

- % 8.1'lik sodyum dodesil sülfat
- % 20'lik asetik asit (10 N NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı)
- % 0.8'lik tiyobarbitürik asit (TBA)
- Butanol/piridin (15:1)
- Stok 1,1,3,3-tetraepoksiopropan (TEP) standardı: 22 mg TEP tartıldı 10 ml'ye distile su ile tamamlandı. Bu stok standardı çalışılmadan önce 1000 kez sulandırılarak 10 nmol/mL'lik çalışma standardı hazırlandı.

**Hesap:** Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksiopropan kullanıldı. Sonuçlar nmol/g doku olarak ifade edildi.

**e) Dien konjugat düzeylerinin ölçülmesi (22,38):**

Bu ölçüm için karaciğer lipit ekstreleri hazırlandı. Bunun için %10'luk doku homojenatlarından 0.25 mL alınarak 3.75 mL kloroform: metanol (2:1) karışımı eklendi. İyiçe karıştırıldı, süzüldü ve son hacimleri 4 ml'ye kloroform-metanol karışımıyla tamamlandı. Örnekler kapaklı tüplerde deney yapıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

**İşlem:** Bu lipit ekstrelerinden 1 mL alınarak azot gazı altında uçuruldu. Kuru kalıntı 2 mL sikloheksana alındı. Spektrofotometrede 233 nm'de sikloheksan körüne karşı absorbanslar okundu.

**Hesap:** Düzeyler 233 nm'de ekstinksiyon katsayısı ( $2.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar  $\mu\text{mol/g}$  doku olarak ifade edildi.

**f) Glutasyon (GSH) düzeylerinin ölçülmesi (13):** GSH düzeyleri, Ellman ayırıcı (5,5'- ditiobis-2 nitro benzoik asit) kullanılarak tayin edildi. Bu ayırıcın dokulardaki serbest sülfidril (-SH) grupları tarafından indirgenmesi sonucunda, 1 mol SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiyobenzoik (DTNB) asit oluşmaktadır. Sarı renkli bu ürün spektrofotometrik olarak 412 nm'de absorbans vermektedir.

**İşlem:** Dokuların 0.15 M KCl'deki %10'luk homojenatlarından 0.5 mL alındı. 0.15 M KCl ile 2 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 3 mL proteinsizleştirme çözeltisi eklendi ve bu karışım  $1300 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. 0.5 mL süpernatant alınarak üzerine 2 mL 0.3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 0.5 mL Ellman ayırıcı eklendi. Oluşan renk 412 nm'de ayıraç körüne karşı okundu.

**Ayıraçlar:**

- Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA ve 30 g NaCl 100 ml distile suda çözüldü.
- 0.3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 42.6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1000 ml distile suda çözüldü.
- Ellman Renk Ayırıcı: 4 mg 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) 10 mL % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.
- GSH standardı: (0.1 mg/mL)

**Hesap:** GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı ( $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplandı; sonuçlar  $\mu\text{mol GSH/g}$  doku olarak tanımlandı.

### **3.5. Karaciğer ve aortada histopatolojik incelemeler**

Karaciğer ve aorta doku örnekleri tamponlanmış formole alındı ve elde edilen kesitler İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Patoloji Biriminde hematoksilin-eozin (H&E) boyasıyla boyanarak değerlendirildi.

### **3.6. İstatistik İncelemeler**

Yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak değerlendirildi. Bir parametrenin değerlerinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Gruplar arası karşılaştırmalar; normal dağılım gösteren değişkenlerde one-way ANOVA testi ve post-hoc Tukey/Tamhane testleri, normal dağılım göstermeyen değişkenlerde Kruskal-Wallis ve post-hoc Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı;  $p \leq 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İki parametre arasındaki korelasyonu belirlemede Pearson testi uygulandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Vücut ağırlığında değişiklikler

Çalışmamızda kontrol ve betain gruplarındaki kobaylarda 10. hafta sonunda başlangıç ağırlığına göre sırasıyla % 13.6 ve % 10.3 oranında anlamlı ağırlık artışları saptandı. KOL ve KOL+MET gruplarının vücut ağırlıklarında % 10.9 ve % 10.7 oranlarında anlamlı azalmalar saptandı. Buna karşılık, diyetlerine betain eklenmiş olan grupların vücut ağırlıkları aynı kaldı (KOL+BET ve KOL+MET+BET).

**Tablo 4.1.** Kolesterol (KOL) ve kolesterol + metyonin (KOL+MET) verilen kobaylarda betainin (BET) başlangıç ve deney bitimindeki vücut ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları ve karaciğer indeksleri üzerine etkisi (Ortalama  $\pm$  SD).

	Vücut ağırlığı (g) Başlangıç	Vücut ağırlığı (g) 10. hafta	Kc. Ağırlığı (g)	Karaciğer indeksi
<b>Kontrol (n=8)</b>	695 $\pm$ 38.6	790 $\pm$ 58.0**	25.5 $\pm$ 2.8	3.23 $\pm$ 0.2
<b>BET (n=7)</b>	724 $\pm$ 83.6	800 $\pm$ 57.9*	26.3 $\pm$ 2.6	3.29 $\pm$ 0.2
<b>KOL (n=8)</b>	731 $\pm$ 39.8	651 $\pm$ 88.7 <sup>a,*</sup>	54.5 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>	8.48 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>
<b>KOL+BET (n=8)</b>	736 $\pm$ 75.0	732 $\pm$ 110	56.0 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>	7.77 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
<b>KOL+MET (n=8)</b>	709 $\pm$ 68.1	633 $\pm$ 57.2 <sup>a,*</sup>	57.2 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	9.07 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
<b>KOL+MET+BET (n=7)</b>	741 $\pm$ 61.8	736 $\pm$ 56.4	49.8 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	6.78 $\pm$ 0.5 <sup>a,b,c</sup>

Karaciğer indeksi= (karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı) x100

<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; <sup>b</sup> p<0.05 KOL grubu ile karşılaştırıldığında;

<sup>c</sup> p<0.05 KOL+MET grubu ile karşılaştırıldığında (gruplar arası)

\*\* p<0.01; \* p<0.05 başlangıç ve 10. hafta karşılaştırıldığında (grup içi)

## 4.2. Biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler

### 4.2.1. BET grubu

Kontrol yeme eklenen betainle beslenen kobaylarda (BET grubu) incelenen serum/plazma ve karaciğer göstergelerinde kontrol grubuna göre bir değişiklik bulunmadı (Tablo 4.2- 4.6).

### 4.2.2. KOL ve KOL+MET grupları

a) KOL ve KOL+MET gruplarındaki kobaylarda, serum total kolesterol düzeyleri ile ALT ve AST aktivitelerinde *kontrol grubuna kıyasla* anlamlı artışlar saptandı. Ancak trigliserit düzeylerinde değişiklik bulunmadı.

KOL+MET grubunda serum total kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile AST aktivitesinin *KOL grubuna göre* daha yüksek olduğu, ALT aktivitesinin ise farklı olmadığı saptandı (Tablo 4.2, Şekil 4.1).

b) KOL ve KOL+MET gruplarında plazma NO düzeylerinde *kontrol grubuna kıyasla* sırasıyla % 18.1 ve % 25.9 oranında bir azalma görüldü. Ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu gruplarda SDMA düzeyleri bir değişiklik göstermediği halde ADMA , NT ve tHS düzeylerinde anlamlı artışlar saptandı. ADMA, NT ve tHS düzeylerinin, KOL+MET grubunda *KOL grubundan* da anlamlı yüksek olduğu görüldü. KOL grubunda plazma L-arginin düzeyleri değişmediği halde KOL+MET grubunda *kontrol grubuna kıyasla* anlamlı bir azalma bulundu (Tablo 4.3, 4.4, Şekil 4.2, 4.3). Bunun sonucu olarak plazma L-arginin/ADMA oranı, KOL+MET grubunda *KOL grubuna göre* daha belirgin olmak üzere her iki grupta da *kontrol grubuna kıyasla* azalmış bulundu.

c) Serumda apelin düzeyleri KOL ve KOL+MET gruplarında *kontrol grubuna kıyasla* anlamlı bir azalma gösterdi. Bu azalma KOL+MET grubunda *KOL grubuna göre* daha belirgindi (Tablo 4.4, Şekil 4.3).

d) Karaciğerde KOL ve KOL+MET gruplarında NT düzeylerinin *kontrol grubuna kıyasla* arttığı, NO düzeyleri ve DDAH aktivitelerinin ise azaldığı bulundu. Bu iki grup arasında karaciğer NO, NT ve DDAH düzeyleri farklılık göstermedi. (Tablo 4.5, Şekil 4.4).

e) KOL ve KOL+MET gruplarında MDA ve DK düzeyleri *kontrol grubuna kıyasla* arttığı, DK düzeylerindeki artışın KOL+MET grubunda *KOL grubuna göre* daha fazla olduğu saptandı. Gruplar arasında GSH düzeyleri değişmedi. (Tablo 4.6, Şekil 4.5).

#### 4.2.3. KOL ve KOL+BET grupları:

Hiperkolesterolemik hayvanlara ek olarak betain verilmesinin sonuçları incelendiğinde,

a) Serumda total kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile AST aktivitesi değişmedi. ALT aktivitesi normal değerlere yaklaştı (Tablo 4.2, Şekil 4.1).

b) Plazma NO, L-arginin, SDMA, NT ve HS düzeyleri ile L-arginin/ADMA oranında bir değişiklik bulunmadı. ADMA düzeylerinin azaldığı bulundu (Tablo 4.3, 4.4, Şekil 4.2, 4.3).

c) Serumda azalmış olan apelin düzeylerinin kontrol değerlere ulaştığı saptandı (Tablo 4.4, Şekil 4.3).

d) Karaciğerde NO ve NT düzeylerinin değişmediği, DDAH aktivitesinin ise kontrol değerlere yaklaştığı bulundu (Tablo 4.5; Şekil 4.4).

e) Karaciğerde MDA, DK ve GSH düzeylerinde anlamlı değişiklik saptanmadı (Tablo 4.6, Şekil 4.5).

#### 4.2.4. KOL+MET ve KOL+MET+BET grupları:

Hiperhomosisteinemik ve hiperkolesterolemik koşullara betainin etkisi incelendiğinde,

a) Kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile ALT ve AST aktiviteleri azalmış bulundu (Tablo 4.2; Şekil 4.1).

b) Plazmada NO, L-arginin, SDMA, L-arginin/ADMA oranı ve NT düzeylerinin değişmedi, buna karşılık ADMA ve HS düzeyleri azaldı. (Tablo 4.3, 4.4; Şekil 4.2, 4.3).

c) Apelin düzeylerinde anlamlı bir artış bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.3).

d) Karaciğerde NO ve NT düzeylerinde bir değişiklik bulunmadı, DDAH aktivitesinde anlamlı bir artış saptandı (Tablo 4.5; Şekil 4.4).

e) MDA ve DK düzeylerinde anlamlı bir azalma bulunurken, GSH düzeylerinde bir farklılık bulunmadı (Tablo 4.6; Şekil 4.5).

**Tablo 4.2.** Kolesterol (KOL) ve kolesterol + metyonin (KOL+MET) gruplarında betainin (BET) serumda total kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile ALT ve AST aktivitelerine etkisi (Ortalama  $\pm$  SD).

Gruplar	Kolesterol (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
<b>Kontrol (n=8)</b>	46 $\pm$ 11.4	69.0 $\pm$ 10.0	61.4 $\pm$ 12.7	121 $\pm$ 14.9
<b>BET(n=7)</b>	46.2 $\pm$ 8.70	67.6 $\pm$ 12.3	57.4 $\pm$ 13.3	126 $\pm$ 24.1
<b>KOL (n=8)</b>	246 $\pm$ 29.6 <sup>a</sup>	49.9 $\pm$ 14.5	113 $\pm$ 38.4 <sup>a</sup>	459 $\pm$ 97.2 <sup>a</sup>
<b>KOL+BET (n=8)</b>	247 $\pm$ 66.8 <sup>a</sup>	51.2 $\pm$ 16.9	74.5 $\pm$ 10.8 <sup>b</sup>	366 $\pm$ 66.3 <sup>a</sup>
<b>KOL+MET (n=8)</b>	288 $\pm$ 42.9 <sup>a,b</sup>	79.7 $\pm$ 23.6 <sup>b</sup>	134 $\pm$ 34.4 <sup>a</sup>	660 $\pm$ 122 <sup>a,b</sup>
<b>KOL+MET+BET (n=7)</b>	201 $\pm$ 52.8 <sup>a,b,c</sup>	49.7 $\pm$ 15.9 <sup>c</sup>	86.3 $\pm$ 27.3 <sup>c</sup>	401 $\pm$ 122 <sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; <sup>b</sup> p<0.05 KOL grubu ile karşılaştırıldığında;

<sup>c</sup> p<0.05 KOL+MET grubu ile karşılaştırıldığında

**Tablo 4.3.** Kolesterol (KOL) ve kolesterol + metyonin (KOL+MET) uygulanan koyalarda betainin (BET) plazmada NO (total nitrit+nitrat), asimetrik dimetil arginin (ADMA), simetrik dimetil arginin (SDMA) ve L-arginin düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama  $\pm$  SD).

Gruplar	NO ( $\mu$ M)	L-Arginin ( $\mu$ M)	ADMA ( $\mu$ M)	SDMA ( $\mu$ M)
<b>Kontrol (n=8)</b>	19.3 $\pm$ 2.99	65.8 $\pm$ 14.9	0.77 $\pm$ 0.08	2.24 $\pm$ 0.45
<b>BET(n=7)</b>	19.2 $\pm$ 3.51	55.7 $\pm$ 12.2	0.79 $\pm$ 0.10	2.24 $\pm$ 0.58
<b>KOL (n=8)</b>	15.8 $\pm$ 6.53	65.1 $\pm$ 12.4	1.46 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.86
<b>KOL+BET (n=8)</b>	15.0 $\pm$ 2.90	57.1 $\pm$ 12.2	1.06 $\pm$ 0.13 <sup>a,b</sup>	2.47 $\pm$ 0.66
<b>KOL+MET (n=8)</b>	14.3 $\pm$ 3.16	30.2 $\pm$ 10.9 <sup>a,b</sup>	1.96 $\pm$ 0.21 <sup>a,b</sup>	2.86 $\pm$ 0.97
<b>KOL+MET+BET (n=7)</b>	16.7 $\pm$ 5.11	34.3 $\pm$ 10.5 <sup>a,b</sup>	1.22 $\pm$ 0.19 <sup>a,c</sup>	2.72 $\pm$ 1.06

<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; <sup>b</sup> p<0.05 KOL grubu ile karşılaştırıldığında;

<sup>c</sup> p<0.05 KOL+MET grubu ile karşılaştırıldığında.

**Tablo 4.4.** Kolesterol (KOL) ve kolesterol + metyonin (KOL+MET) uygulanan koyalarda betainin (BET) serum/plazmada L-arginin/ADMA, nitrotirozin (NT), apelin-12 ve homosistein düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama  $\pm$  SD).

Gruplar	L-arginin/ADMA ( $\mu$ M/ $\mu$ M)	NT (nM)	Apelin-12 (ng/mL)	Homosistein ( $\mu$ M)
Kontrol (n=8)	84.8 $\pm$ 12.8	23.0 $\pm$ 2.17	68.5 $\pm$ 9.81	4.48 $\pm$ 1.02
BET(n=7)	69.9 $\pm$ 12.6	21.4 $\pm$ 5.28	68.0 $\pm$ 8.96	4.52 $\pm$ 1.09
KOL (n=8)	45.4 $\pm$ 9.77 <sup>a</sup>	30.3 $\pm$ 3.18 <sup>a</sup>	53.2 $\pm$ 8.62 <sup>a</sup>	6.30 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>
KOL+BET (n=8)	54.1 $\pm$ 13.7 <sup>a</sup>	29.2 $\pm$ 6.11 <sup>a</sup>	65.3 $\pm$ 9.30 <sup>b</sup>	6.10 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>
KOL+MET (n=8)	15.8 $\pm$ 7.03 <sup>a,b</sup>	46.9 $\pm$ 3.23 <sup>a,b</sup>	40.5 $\pm$ 5.01 <sup>a,b</sup>	22.2 $\pm$ 5.74 <sup>a, b</sup>
KOL+MET+BET (n=7)	28.3 $\pm$ 8.36 <sup>a,b</sup>	43.3 $\pm$ 3.74 <sup>a,b</sup>	64.7 $\pm$ 7.76 <sup>c</sup>	12.31 $\pm$ 3.05 <sup>a, b, c</sup>

<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; <sup>b</sup> p<0.05 KOL grubu ile karşılaştırıldığında;

<sup>c</sup> p<0.05 KOL+MET grubu ile karşılaştırıldığında

**Tablo 4.5.** Kolesterol (KOL) ve kolesterol + metyonin (KOL+MET) uygulanan koyalarda betainin (BET) karaciğerde NO (total nitrit+nitrat) ve nitrotirozin (NT) düzeyleri ile dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) aktivitesi üzerine etkisi (Ortalama  $\pm$  SD)

Gruplar	NO (nmol/g doku)	NT (pmol/mg protein)	DDAH (nmol/g protein/dk)
Kontrol (n=8)	17.5 $\pm$ 2.43	4.06 $\pm$ 0.34	12.4 $\pm$ 0.95
BET (n=7)	16.3 $\pm$ 1.33	3.77 $\pm$ 0.26	12.1 $\pm$ 2.53
KOL (n=8)	13.2 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	6.01 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	8.06 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>
KOL+BET (n=8)	14.9 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	5.22 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	11.4 $\pm$ 2.23 <sup>b</sup>
KOL+MET (n=8)	12.9 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup>	5.93 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	8.48 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>
KOL+MET+BET (n=7)	12.4 $\pm$ 2.56 <sup>a</sup>	5.68 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	11.9 $\pm$ 1.89 <sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; <sup>b</sup> p<0.05 KOL grubu ile karşılaştırıldığında;

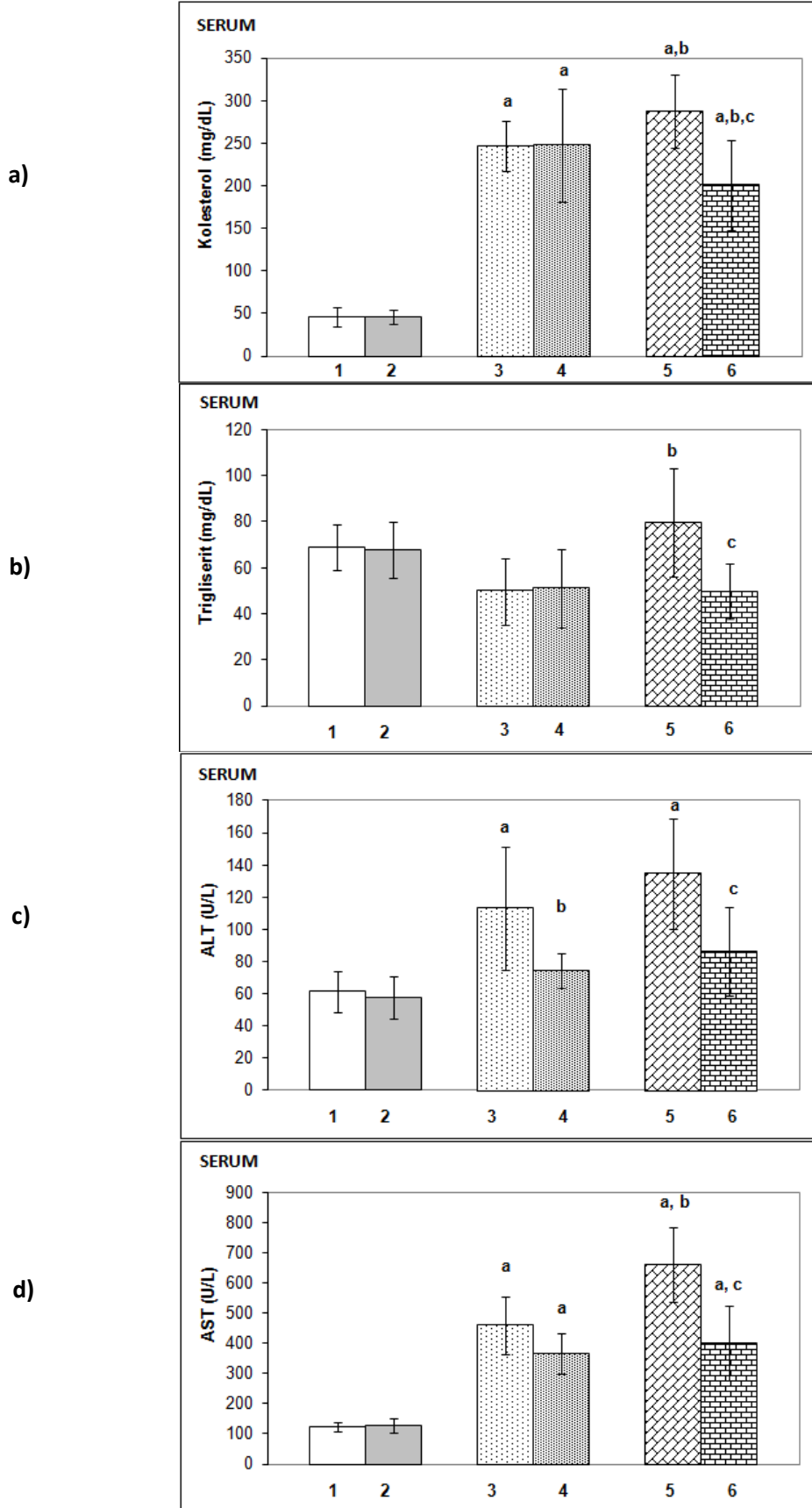
<sup>c</sup> p<0.05 KOL+MET grubu ile karşılaştırıldığında

**Tablo 4.6.** Kolesterol (KOL) ve kolesterol + metyonin (KOL+MET) gruplarında betainin (BET) karaciğerde malondialdehit (MDA), dien konjugatı (DK) ve glutatyon (GSH) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama  $\pm$  SD).

<b>Gruplar</b>	<b>MDA (nmol/g doku)</b>	<b>DK (<math>\mu</math>mol/g doku)</b>	<b>GSH (<math>\mu</math>mol/g doku)</b>
<b>Kontrol (n=8)</b>	459 $\pm$ 61.2	2.23 $\pm$ 0.21	7.14 $\pm$ 1.25
<b>BET(n=7)</b>	444 $\pm$ 74.9	2.08 $\pm$ 0.31	6.49 $\pm$ 1.30
<b>KOL (n=8)</b>	842 $\pm$ 161 <sup>a</sup>	4.43 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	6.99 $\pm$ 0.94
<b>KOL+BET (n=8)</b>	833 $\pm$ 169 <sup>a</sup>	3.94 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	7.18 $\pm$ 1.05
<b>KOL+MET (n=8)</b>	891 $\pm$ 153 <sup>a</sup>	5.24 $\pm$ 0.69 <sup>a,b</sup>	7.09 $\pm$ 1.36
<b>KOL+MET+BET (n=7)</b>	666 $\pm$ 113 <sup>a,b,c</sup>	4.28 $\pm$ 0.29 <sup>a,c</sup>	8.09 $\pm$ 1.37

<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; <sup>b</sup> p<0.05 KOL grubu ile karşılaştırıldığında;

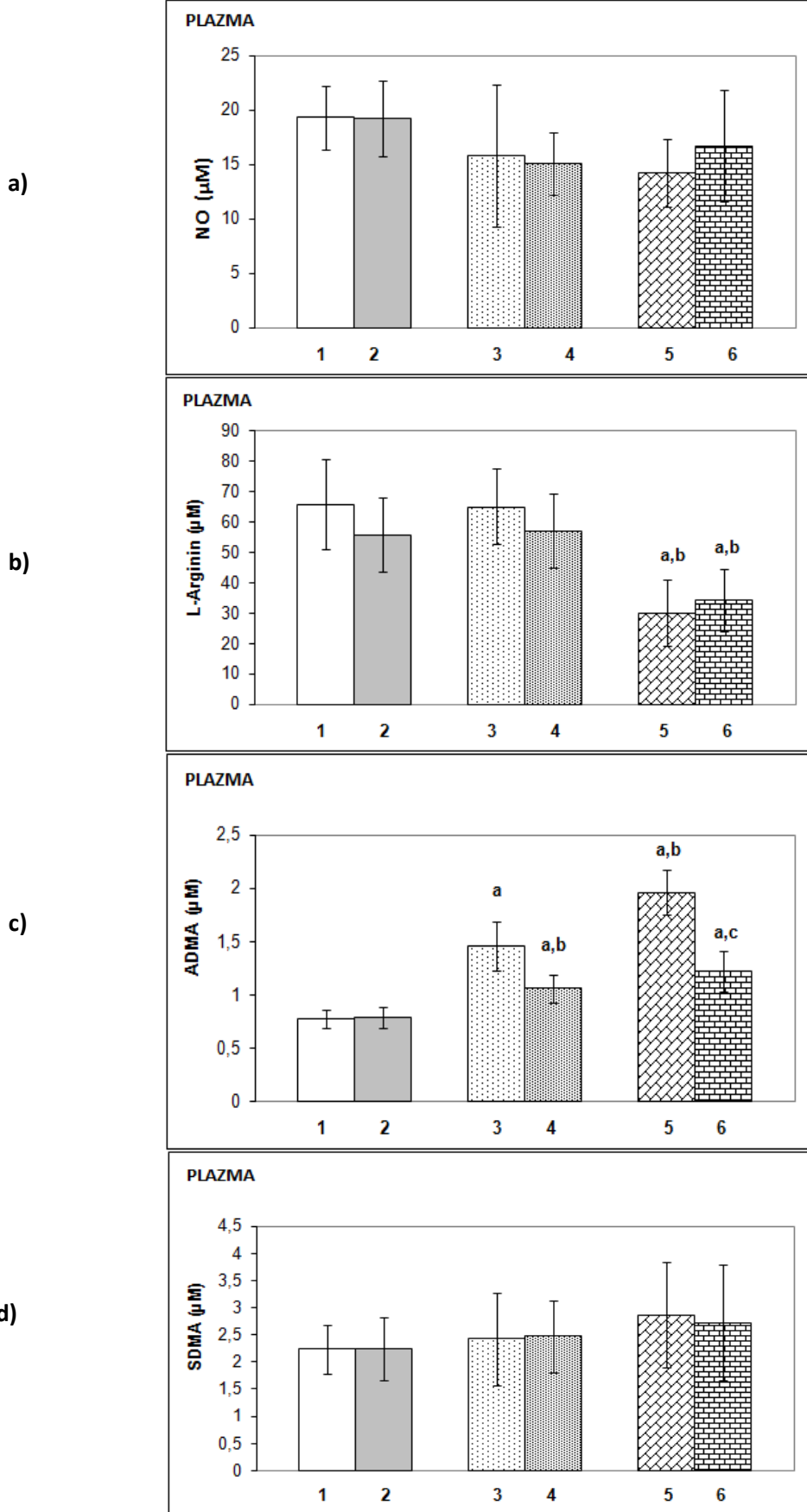
<sup>c</sup> p<0.05 KOL+MET grubu ile karşılaştırıldığında.



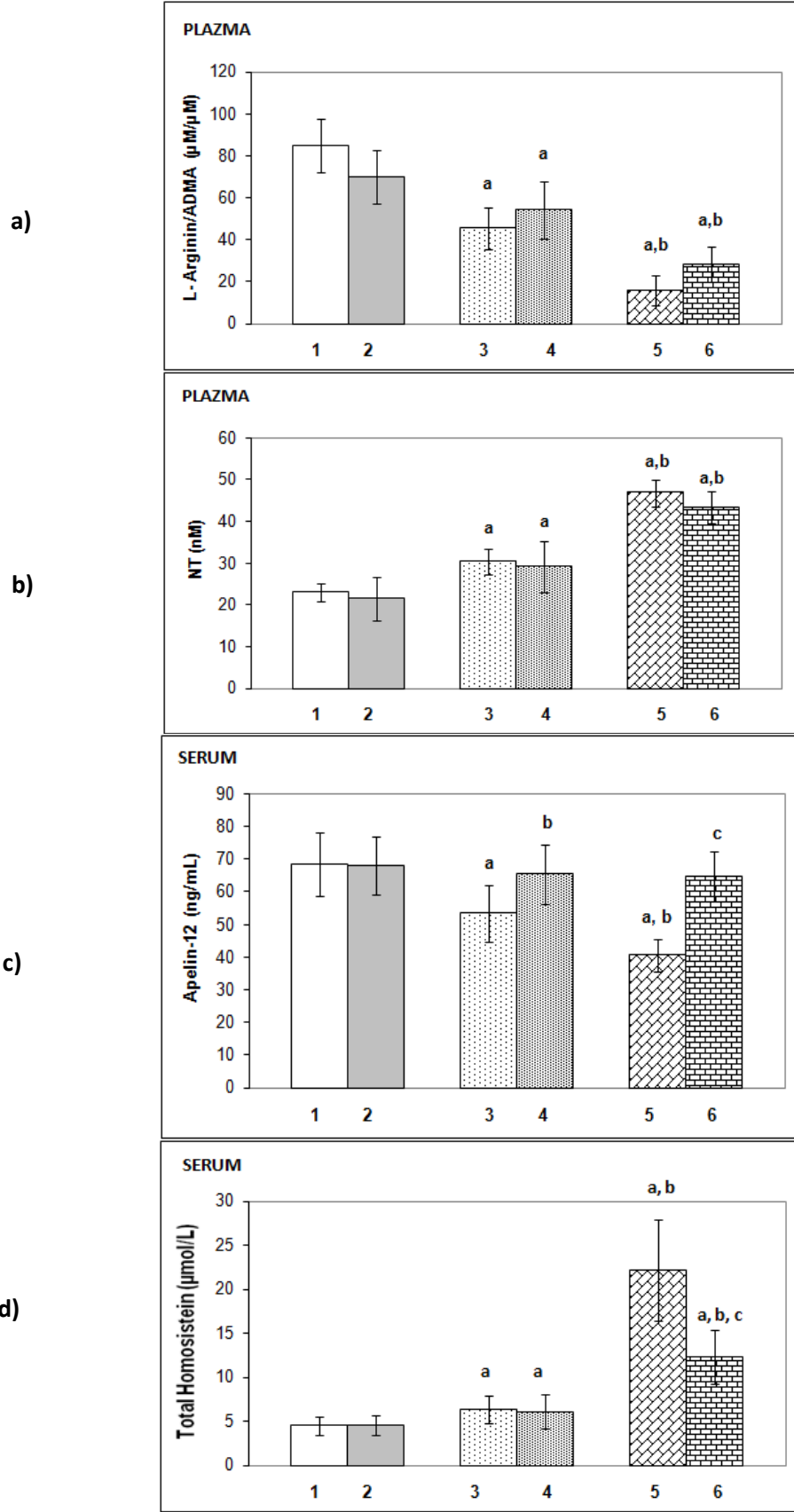
Şekil 4.1. Serumda total kolesterol (a), trigliserit (b) düzeyleri ve ALT (c), AST (d) aktiviteleri (Ortalama±SD).

Gruplar: (1) Kontrol, (2) BET,(3) KOL, (4) KOL + BET, (5) KOL + MET, (6) KOL + MET + BET.

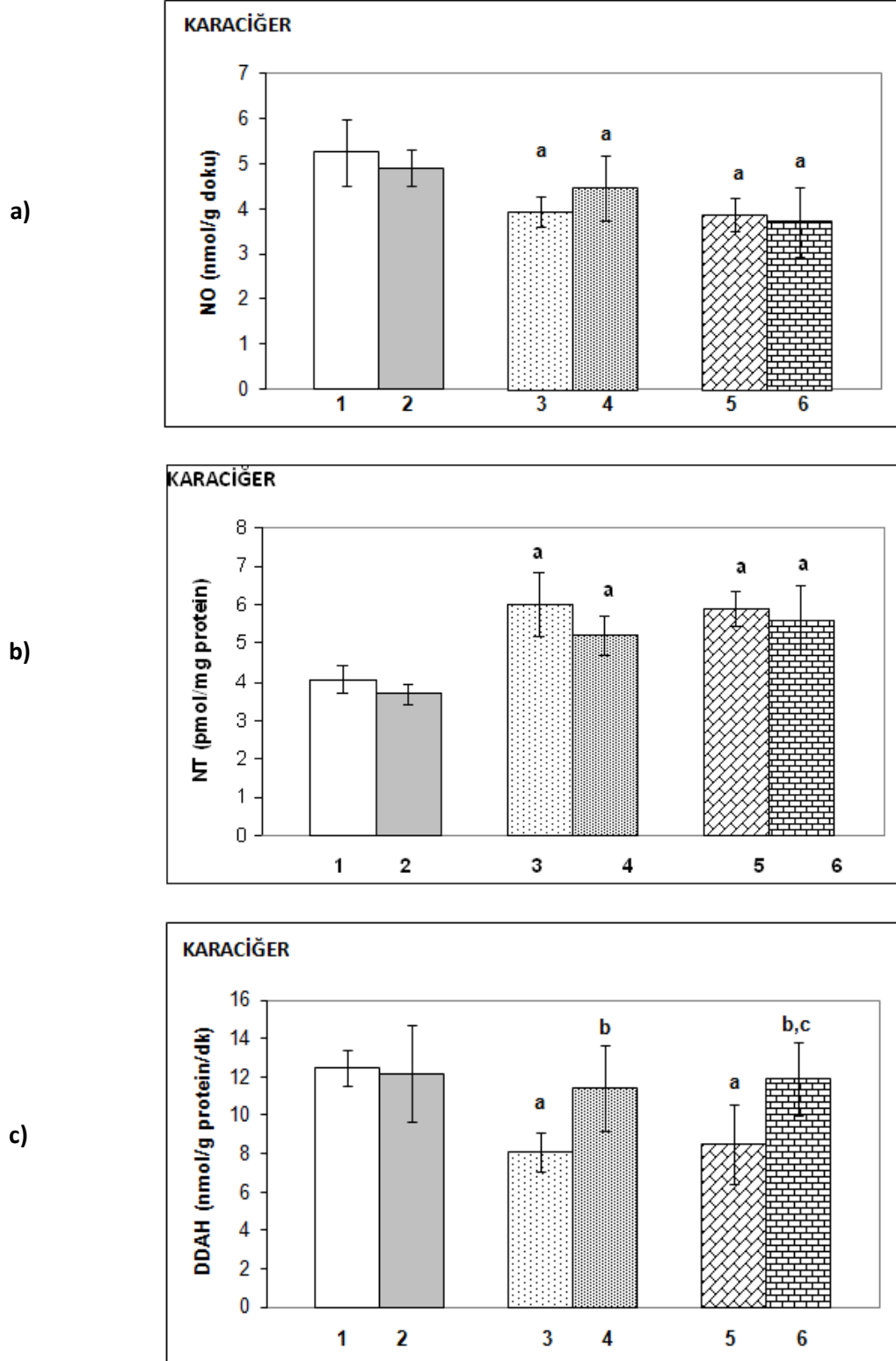
<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubuna göre; <sup>b</sup> p<0.05 KOL'a göre; <sup>c</sup> p<0.05 KOL+MET'e göre.



Şekil 4.2. Plazma NO (total nitrit+nitrat) (a), ADMA (b), SDMA (c) ve L-arginin (d) düzeyleri (Ortalama±SD). Gruplar: (1) Kontrol, (2) BET,(3) KOL, (4) KOL + BET, (5) KOL + MET, (6) KOL + MET + BET. <sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubuna göre; <sup>b</sup> p<0.05 KOL'a göre; <sup>c</sup> p<0.05 KOL+MET'e göre.



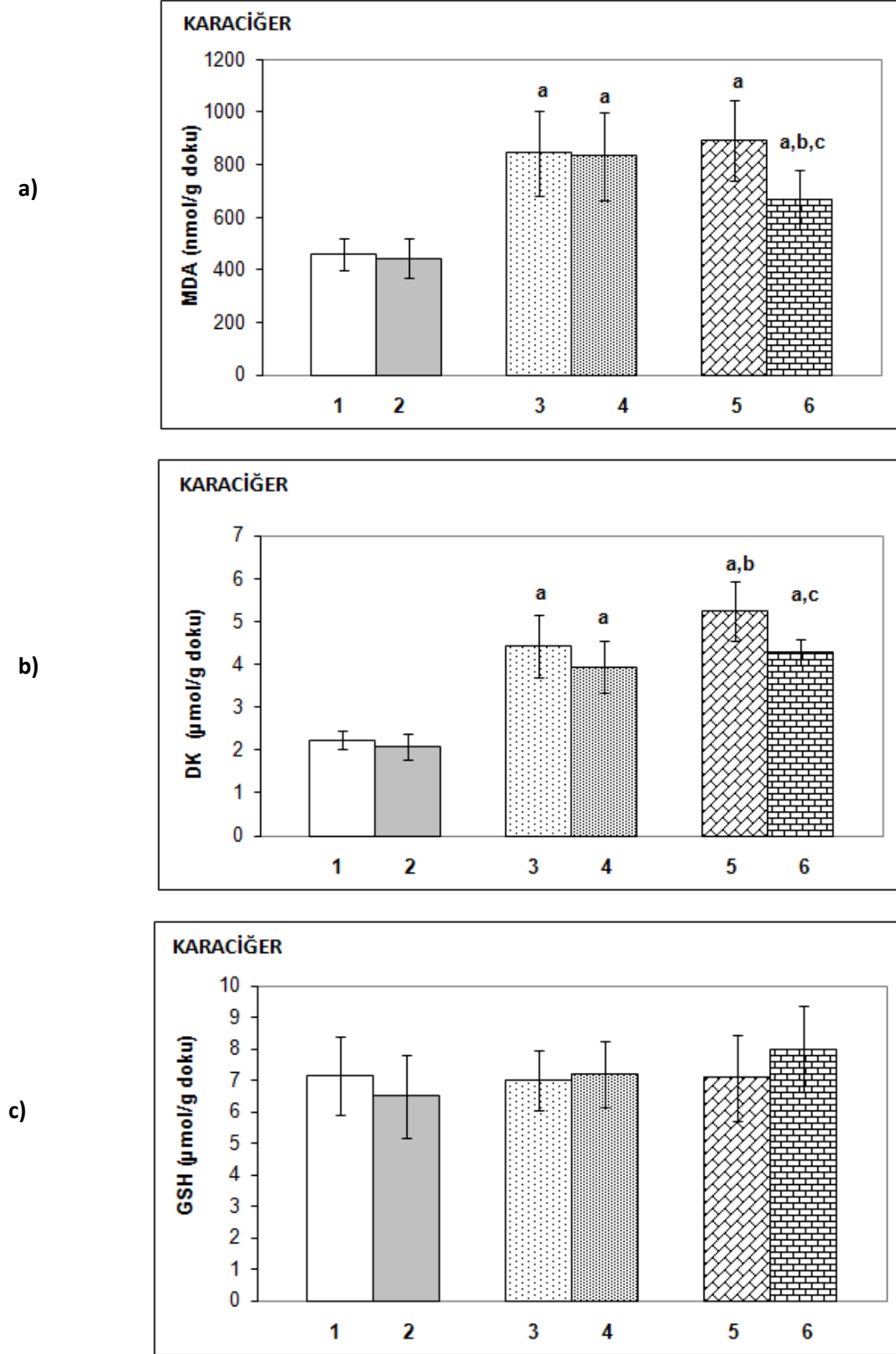
Şekil 4.3. Serum/plazmada L-arginin/ADMA (a), NT (b), apelin (c) ve homosistein (d) düzeyleri (Ortalama $\pm$ SD). Gruplar: (1) Kontrol, (2) BET, (3) KOL, (4) KOL + BET, (5) KOL + MET, (6) KOL + MET + BET. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  kontrol grubuna göre; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  KOL'a göre; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  KOL+MET'e göre.



**Şekil 4.4.**Karaciğerde NO(total nitrit+nitrat) (a), NT (b) düzeyleri ve DDAH aktivitelerindeki (c) değişimler (Ortalama±SD).

Gruplar: (1) Kontrol, (2) BET,(3) KOL, (4) KOL + BET, (5) KOL + MET, (6) KOL + MET + BET.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  kontrol grubuna göre; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  KOL'a göre; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  KOL+MET'e göre.



Şekil 4.5. Karaciğer dokusunda MDA (a), DK (b) ve GSH (c) düzeylerindeki değişimler (Ortalama±SD).  
 Gruplar: (1) Kontrol, (2) BET, (3) KOL, (4) KOL + BET, (5) KOL + MET, (6) KOL + MET + BET.  
<sup>a</sup>  $p < 0.05$  kontrol grubuna göre; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  KOL'a göre; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  KOL+MET'e göre.

### 4.3. Korelasyon Analizleri (Tablo 4.7, Şekil 4.6)

1- Karaciğer dokusunda NO düzeyi ile serumda total kolesterol, HS, ALT, AST, ADMA düzeyleri ile karaciğerde MDA, DK, NT düzeyleri arasında negatif, arginin/ADMA oranı ve karaciğer DDAH aktivitesi arasında pozitif bağıntı saptandı.

2- Plazma ADMA düzeylerinin serumda kolesterol, HS, ALT, AST, NT ve karaciğerde MDA, DK ve NT düzeyleri ile pozitif, DDAH aktivitesi ile negatif bağıntı gösterdiği bulundu.

3- Karaciğer DDAH aktivitesi kolesterol, HS, ALT, AST ve NT düzeyleri ve karaciğer MDA, DK ve NT ile negatif, arginin/ADMA oranı ve karaciğer NO düzeyleri ile pozitif bağıntı gösterdi.

4- Serum apelin düzeyleri ile kolesterol, HS, ADMA, ALT, AST, NT düzeyleri ve karaciğer MDA, DK ve NT düzeyleri arasında negatif, arginin/ADMA oranı, karaciğer NO ve DDAH aktiviteleri arasında pozitif bağıntı bulundu.

**Tablo 4.7.** Serum/plazma ve karaciğerde nitrik oksit metabolizması ile ilişkili göstergeler arasında korelasyon katsayıları (n=46).

	Serum Kol	Serum HS	Karaciğer NO	Plazma ADMA	Karaciğer DDAH	Serum Apelin
<b>Serum/Plazma</b>						
Kolesterol	-	0.53 <sup>a</sup>	-0.79 <sup>a</sup>	0.79 <sup>a</sup>	-0.51 <sup>a</sup>	-0.54 <sup>a</sup>
Trigliserit	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ALT	0.61 <sup>a</sup>	0.62 <sup>a</sup>	-0.49 <sup>a</sup>	0.77 <sup>a</sup>	-0.42 <sup>b</sup>	-0.57 <sup>a</sup>
AST	0.86 <sup>a</sup>	0.72 <sup>a</sup>	-0.69 <sup>a</sup>	0.89 <sup>a</sup>	-0.57 <sup>a</sup>	-0.70 <sup>a</sup>
ADMA	0.79 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	-0.57 <sup>a</sup>	-	-0.60 <sup>a</sup>	-0.76 <sup>a</sup>
NO	-0.42 <sup>b</sup>	ns	0.33 <sup>c</sup>	ns	ns	ns
NT	0.63 <sup>a</sup>	0.81 <sup>a</sup>	-0.56 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	-0.33 <sup>c</sup>	-0.55 <sup>a</sup>
Arginin/ADMA	-0.75 <sup>a</sup>	-0.72 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	-0.80 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.54 <sup>a</sup>
Homosistein	0.53 <sup>a</sup>	-	-0.48 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	-0.29 <sup>c</sup>	-0.62 <sup>a</sup>
<b>Karaciğer</b>						
MDA	0.68 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>	-0.68 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>	-0.53 <sup>a</sup>	-0.43 <sup>b</sup>
DK	0.84 <sup>a</sup>	0.66 <sup>a</sup>	-0.74 <sup>a</sup>	0.76 <sup>a</sup>	-0.50 <sup>a</sup>	-0.55 <sup>a</sup>
NO	-0.79 <sup>a</sup>	-0.48 <sup>a</sup>	-	-0.57 <sup>a</sup>	0.48 <sup>a</sup>	0.37 <sup>b</sup>
NT	0.75 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	-0.47 <sup>a</sup>	0.70 <sup>a</sup>	-0.55 <sup>a</sup>	-0.57 <sup>a</sup>
DDAH	-0.52 <sup>a</sup>	-0.29 <sup>c</sup>	0.36 <sup>c</sup>	-0.60 <sup>a</sup>	-	0.48 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p<0.001; <sup>b</sup> p<0.01; <sup>c</sup> p<0.05

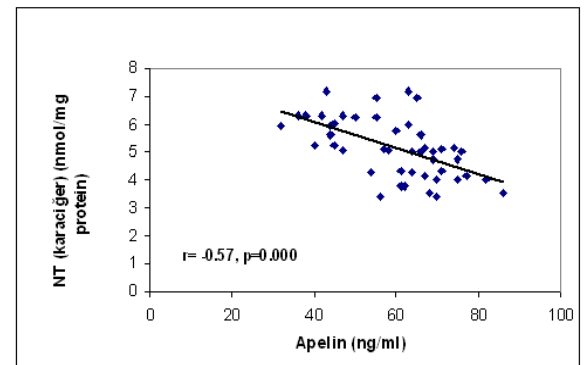
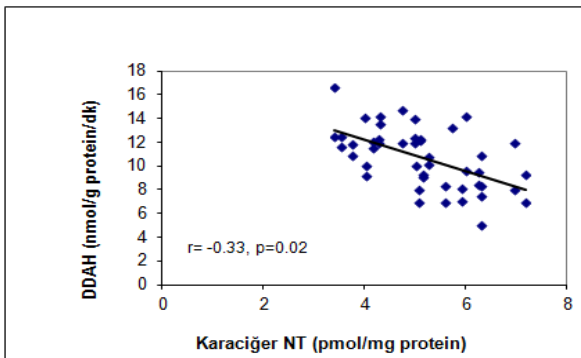
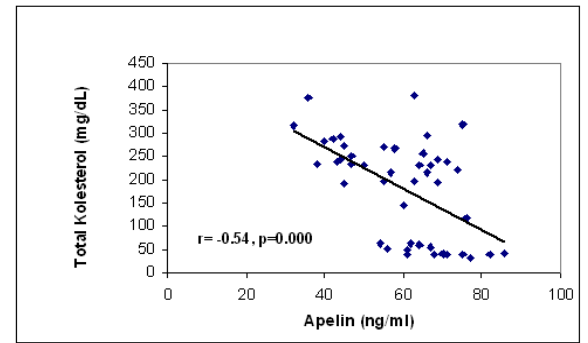
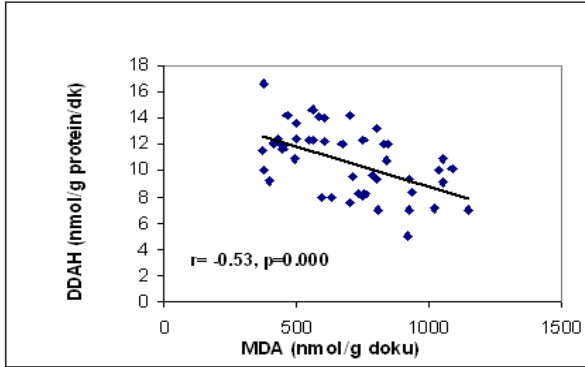
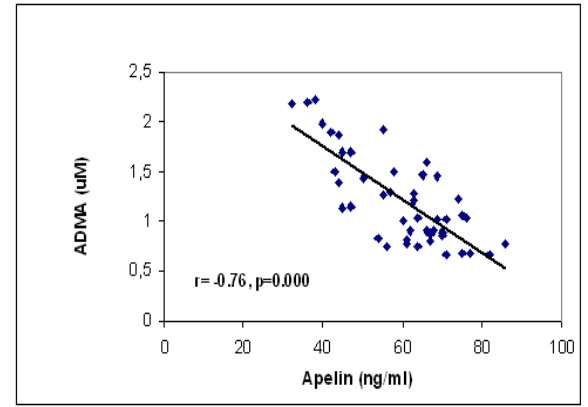
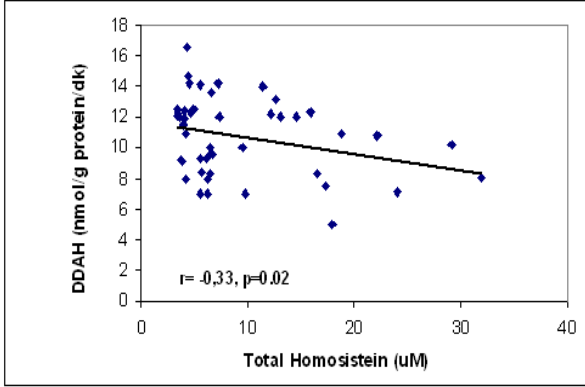
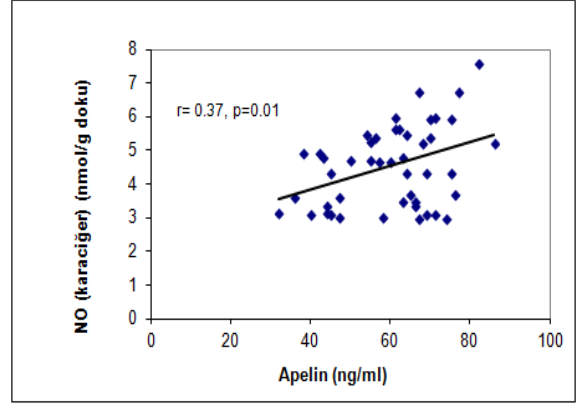
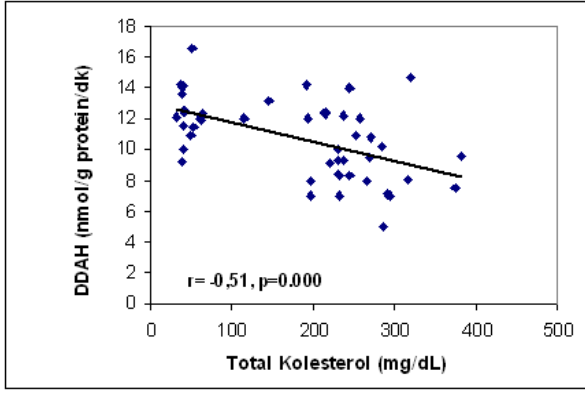
**Bu sonuçlara göre:**

a) ADMA düzeyindeki artışlar, oksidatif ve nitroztatif stres ile bağıntılıdır. Buna karşılık ADMA ile DDAH aktivitesi arasında negatif bağıntı vardır.

b) Serum apelin düzeyi, oksidatif ve nitroztatif stres arttıkça azalmaktadır. Apelin NO düzeyi ile pozitif bağıntılıdır.

c) Hiperhomosisteinemi ve hiperkolesterolemi; apelin, NO ve DDAH ile negatif, MDA, DK ve ADMA ile pozitif bağıntı göstermektedir.

d) Serum apelin ve ADMA düzeyleri arasında negatif bağıntı vardır. Apelin düzeyindeki artışın, NO biyoyaralanımını arttıran, ADMA artışının ise endotel disfonksiyonuna neden olan parametrelerle pozitif bağıntıları bulunmaktadır.



Şekil 4.6. Korelasyon grafikleri (n=46)

#### 4.4. Karaciğer ve aortada histopatolojik bulgular

Karaciğerde steatoz, inflamasyon, nekroz ve fibrotik değişimler incelendi (21).

1) **Steatoz** karaciğerde yağ içeren hücrelerin yüzdesine göre sınıflandırıldı. Buna göre;  $< \% 5 = 0$ ,  $\% 5-33 = 1$ ,  $\% 34-66 = 2$ ,  $> \% 66 = 3$  olarak belirlendi.

2) **İnflamasyon ve parankimal nekrozun** varlığı;

Yok = 0, İlimli = 1, Orta = 2, Ciddi = 3 olarak tanımlandı.

3) **Fibrozis** için değerlendirmede; fibroz bulgularının olmaması (0); bazı portal alanlarda olması (1); portal alanların çoğunda olması (2); portal-portal köprüleşmenin varlığı (3); portal-portal aşırı köprüleşme (4); “Incomplete” siroz (5); siroz (6).

Bu kriterlerle yapılan histopatolojik değerlendirmelerin sonuçları Tablo 4.8’de belirtildi. Sonuçlara göre; kontrol ve betain grubunda normal karaciğer yapısı gözlemlendi. Kolesterolde zengin beslenme karaciğerde makroveziküler yağlanmaya, ılımlı derecede nekroz, inflamasyon ve fibrotik değişikliklere yol açtı. KOL+MET grubunda ise kolesterol grubuna göre yağlanma, inflamasyon ve fibrotik değişikliklerin daha fazla olduğu saptandı.

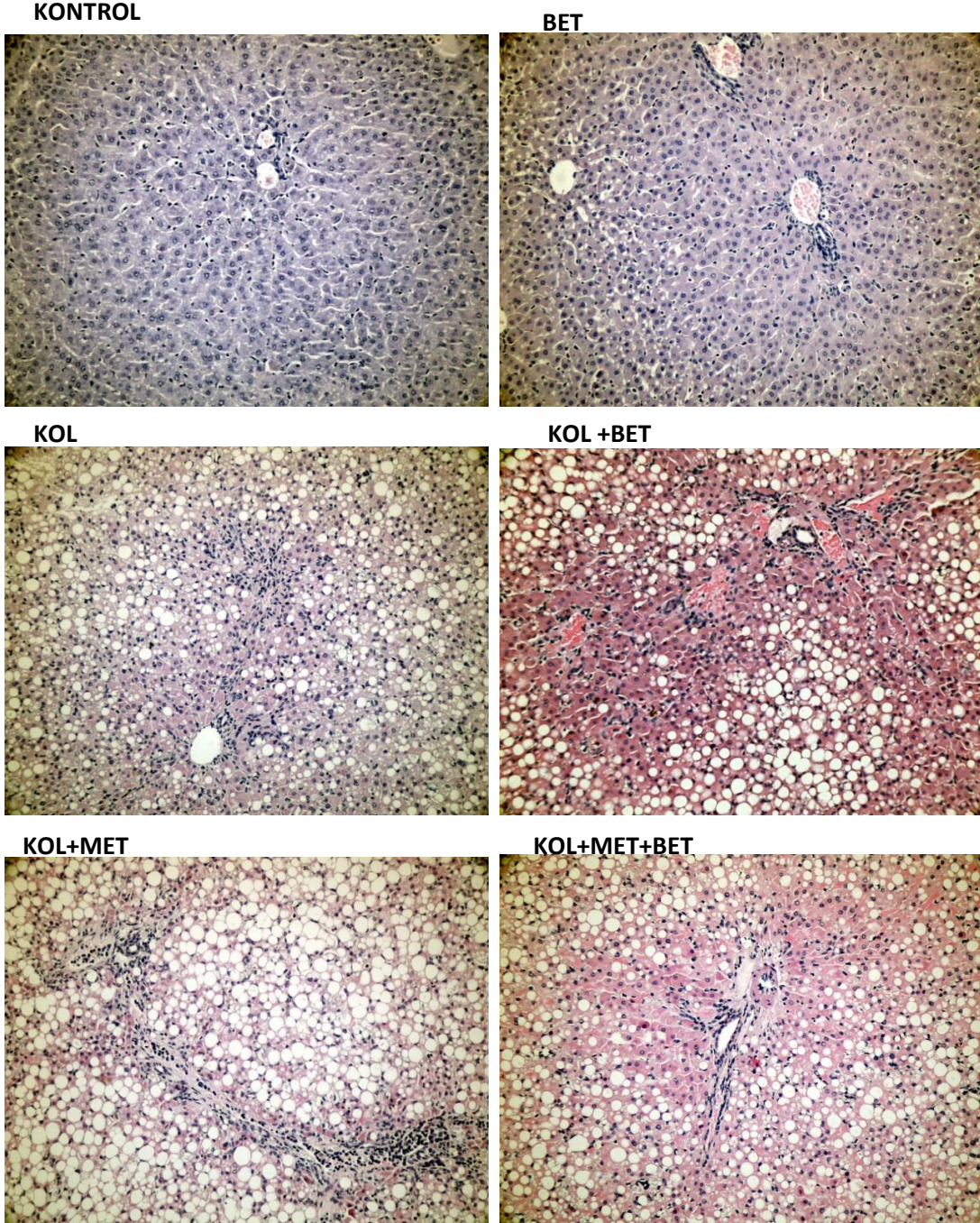
**Tablo 4.8.** Kolesterol (KOL) ve kolesterol + metyonin (KOL+MET) uygulanan koyalarda betainin (BET) karaciğerde histopatolojik değişiklikler üzerine etkisi.

	<b>Steatoz</b>	<b>Parankimal Nekroz</b>	<b>İnflamasyon</b>	<b>Fibrozis</b>
<b>Kontrol</b>	0	0	0	0
<b>Betain</b>	0	0	0	0
<b>KOL</b>	2	1	1	1
<b>KOL+BET</b>	2	1	0	1
<b>KOL+MET</b>	3	1	2	2
<b>KOL+MET+BET</b>	2	0	0	1

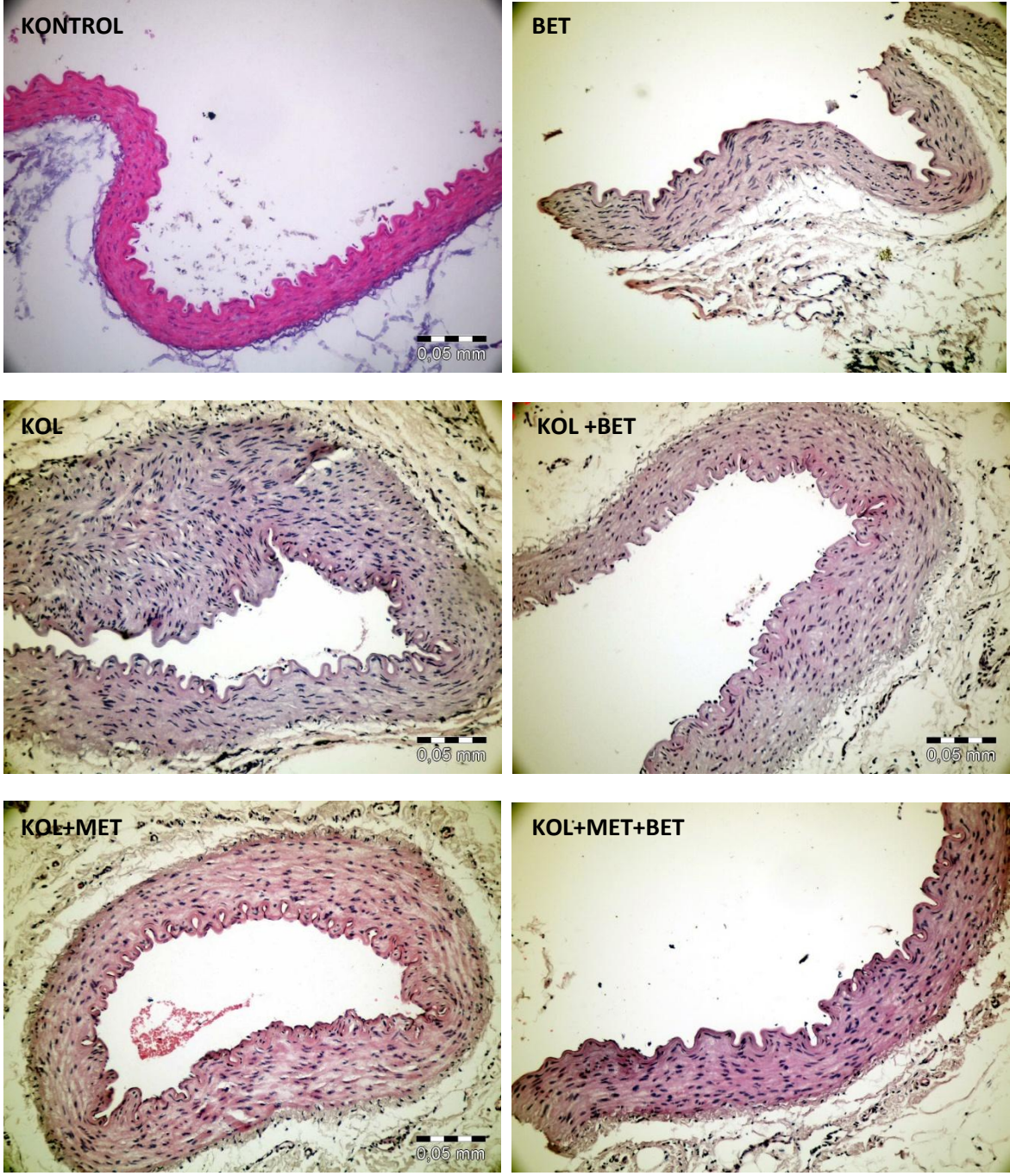
KOL+BET grubunun histopatolojik incelemesinde; kolesterol grubuna göre belirgin bir değişiklik bulunmadı. Buna karşılık KOL+MET+BET grubu KOL+MET grubu ile karşılaştırıldığında; yağlanmanın ve fibrotik değişikliklerin azaldığı görüldü. Bu grupta parankimal nekroz ve inflamasyon görülmedi (Resim 4.1).

Aortada yapılan histopatolojik incelemelerde, kontrol ve betain gruplarında normal yapı gözlendi. Kolesterol grubunda intima-media kalınlaşması, düz kas hücre proliferasyonu, yağ vakuelleri ve bazı alanlarda kolesterol kristallerini andırır yarıklanmalar görüldü. KOL+MET grubu ile kolesterol grubu arasında bir farklılık saptanmadı.

KOL+BET grubunda kolesterol grubuyla karşılaştırıldığında intima-media kalınlaşmasında ve düz kas hücre proliferasyonunda ılımlı bir azalma görüldü. Buna karşılık KOL+MET+BET grubunda KOL+MET grubuna göre aortik lezyonlarda belirgin bir iyileşme saptandı (Resim 4.2).



**Resim 4.1.** Karaciğer dokularında histopatolojik görünüm (H&E x200).



**Resim 4.2.** Aortada histopatolojik görünüm (H&E x200).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yüksek kolesterol düzeyinin koroner ve serebrovasküler hastalıkların gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu ve özellikle LDL-kolesterol artışının, aterosklerotik plak oluşumunu uyardığı bilinmektedir. Ateroskleroz patogenezinde inflamasyon, endotel disfonksiyonu ve bu olayları takiben adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve nitrik oksit metabolizmasında değişiklikler önemli rol oynamaktadır (44,72). ADMA, nitrik oksit biyoyararlığını etkileyen önemli bir endojen inhibitör olarak ateroskleroz patogenezinde yer almaktadır. Yağ dokusunda sentezlenen leptin, adiponektin, rezistin, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi hormon ve sitokinlerin dolaşımdaki düzeylerinin hiperkolesterolemide değiştiği ve aterosklerozla ilişkili bulunduğu bildirilmiştir (34). Son yıllarda endotel, miyokard, vasküler düz kas hücreleri ve yağ dokusunda sentezlendiği gösterilen apelinin de kan basıncı, kardiyak kontraktilite ve anjiyogenez üzerindeki etkileri önem kazanmıştır (26,55,63,101).

Çalışmamızda ADMA düzeyi ve onunla ilişkili olarak DDAH aktivitesi incelendiğinde, hiperkolesterolemik hayvanlarda plazma ADMA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı ve bununla uyumlu olarak karaciğer DDAH aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Oksidatif stres sonucunda dokuda biriken reaktif oksijen türlerinin (ROS) DDAH aktivitesini baskıladığı ve ADMA sentezini sağlayan PRMT ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (53,98). Bu nedenle ADMA'nın oksidatif stresin endojen bir belirteci olabileceği ileri sürülmüştür (76). Çalışmamızda oksidatif stres göstergeleri olan malondialdehit (MDA) ve dien konjugat ile nitrotirozin düzeylerinin kolesterolden zengin diyetle beslenmiş hayvanlarda yükseldiği, buna karşılık GSH düzeylerinin değişmediği bulunmuştur. Bu hayvanlarda saptanan plazma ADMA düzeylerindeki artışın, oksidatif stresten kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Oksidatif stres ile ADMA arasındaki ilişkiyi sağlayan DDAH enzimidir. ADMA'yı karaciğerde yıkan DDAH aktivitesindeki değişiklik, plazma ADMA düzeylerinin etkileyen en önemli faktördür. Bulgularımıza göre karaciğer DDAH aktivitesi ile MDA, dienkonjugat ve nitrotirozin düzeyleri arasında kuvvetli negatif bağıntı mevcuttur. Bütün bu bulgular, DDAH aktivitesindeki azalmanın nedenini açıklamaktadır.

Hiperkolesterolemik hayvanlarda ADMA artışına bağlı olarak karaciğerde NO düzeyleri azalmıştır. NO, argininin NOS tarafından metabolize olması ile ortaya çıkan, endotel fonksiyonunu düzenleyen bir maddedir. NO'nun obez ve hiperkolesterolemik hayvanlarda azaldığını gösteren çalışmalar vardır (32). NO düzeyindeki azalma, obez ve hiperkolesterolemik hayvanlarda eNOS ekspresyonunun azalması ve reaksiyonun koenzimi

tetrahidrobiyopterin yokluğunda NOS “uncoupling”i nedeniyle süperoksit oluşması ile açıklanmıştır (39). Buna ek olarak mevcut NO, süperoksitle etkileşerek peroksinitrit oluşturduğundan biyoyararlanımı ortadan kalkar. Peroksinitrit, ortamdaki protein moleküllerinde tirozin kalıntılarının nitrozilasyonu (nitrotirozin, NT) ile hasar oluşturur (12). Çalışmamızda karaciğer dokusu NO düzeyi ile NT arasında kuvvetli negatif bağıntı bulunmuştur. Serum ve karaciğer dokusu NT düzeylerinin kontrol grubuna göre artmış bulunması, *in vivo* peroksinitrit artışının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. NO düzeyindeki azalmadan sorumlu olan bir diğer faktör ADMA’dır. Bu çalışmada ADMA ile karaciğer NO düzeyleri arasında gözlenen kuvvetli negatif bağıntı, ADMA’nın NO metabolizmasındaki başlıca etkenlerden biri olduğunu doğrulamaktadır.

Hiperkolesterolemik deney grubunda kontrol grubuna göre serum ALT ve AST düzeylerinin artmış olması ve histopatolojik incelemeler, yüksek kolesterolü diyetle beslenme sonucunda karaciğer hasarının geliştiğine işaret etmektedir. Bu hayvanlarda serum apelin düzeyleri kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Apelin, NO metabolizmasında endotel kaynaklı NOS’un fosforilasyonunu arttırmak suretiyle NO sentezini hızlandırır (113). Buna göre çalışmamızda hiperkolesterolemik hayvanlarda azalmış bulunan apelinin karaciğer dokusundaki düşük NO düzeylerinden kısmen sorumlu olduğu ileri sürülebilir. Apelin ile NO arasındaki pozitif bağıntı, bu hipotezi desteklemektedir.

Daha önceki çalışmalarda apelin sentezinin insülin aracılığı ile düzenlendiği, insülinin yağ dokusundan apelin sekresyonunu uyardığı, buna karşılık apelinin pankreastan insülin sekresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (11, 94). Obezitede insülin düzeyleri ile ilişkili olarak plazma apelin konsantrasyonu yükselmektedir (17). Tip 1 diyabetik olgularda açlık apelin düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (17). Bir başka çalışmada ise, tip 2 diyabette serum apelin düzeylerinin sağlıklı olgulardan ve tip 1 diyabetiklerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (25). Hiperkolesterolemik koşullarda apelin düzeyi kontrol grubundaki değerlerden daha düşük bulunmuştur (100). Bizim sonuçlarımız, bu yayınla uyumludur. Çalışmamızın bir sonraki aşamasında insülin düzeylerinin ölçülmesi ve apelin ile bağıntısının araştırılması sonuçların değerlendirilmesinde yardımcı olacaktır.

Betainin lipit metabolizmasına etkisi konusundaki yayınlar çelişkilidir. Betainin trigliserit düzeylerini azalttığını, total kolesterol düzeylerini değiştirmeden HDL-kolesterolü arttırdığını gösteren bir çalışma olduğu gibi (92), LDL-kolesterol düzeyini arttırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (70, 81). Bizim çalışmamızda betainin total kolesterol ve

trigliserit düzeylerine herhangi bir etkisi saptanmamıştır. Bu lipit parametreleri üzerindeki olumlu etkisi sadece hiperhomosisteinamik hayvanlarda görülmüştür. ALT ve AST aktivitelerinde bir düzelme eğilimi oluşturduğu söylenebilir.

Hiperkolesterolemik hayvan modelinde betainin anti-aterojenik ve antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir (70). Ancak bu etkilerin mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Çalışmamızda kolesterolle beslenen grupta izlenen ADMA, apelin ve DDAH aktivitesindeki değişimlerin diyetle betain eklenmesiyle normal değerlerine yaklaşmış olması, ilk bakışta betainin NO aracılığıyla anti-aterojen olduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık, çalışmamızda betain ile ADMA düzeylerinde azalma ve DDAH aktivitesinde artma sağlandığı halde NO düzeyi göstergesi olarak ölçülen nitrit-nitrat düzeylerinde herhangi bir değişiklik bulunmamıştır. Ayrıca arginin/ADMA oranında da bir değişiklik oluşmamıştır. Nitrik oksit sentezinde tek başına ADMA düzeyinden çok, arginin/ADMA oranının önemli olduğu bilinmektedir. Bulgularımız da bunu doğrular niteliktedir. Bloomer ve Olthof'un sağlıklı insanda yaptıkları çalışmalarda betain tedavisinin nitrik oksit düzeylerini değiştirmedığı ve damar üzerinde vazodilatatör etkinin görülmediği bildirilmiştir (15,80). Sonuçlarımız, betainin NO aracılığıyla anti-aterojenik etkisini gösterdiği görüşünü desteklememektedir.

Çalışmamızda kolesterole ek olarak metyonin verilen hayvanlarda ADMA/DDAH ve NO metabolizmasında hiperhomosisteineminin etkisi incelenmiştir. Hiperhomosisteineminin kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (6,50). Hiperhomosisteinemiye bağlı en belirgin fonksiyonel bozukluk endotel kaynaklı NO'nun azalması sonucunda endotel bağımlı gevşemenin ortadan kalkmasıdır (6,96). Hiperhomosisteinemiye bağlı endotel disfonksiyonundan öncelikle NO'nun oksidatif olarak inaktivasyonu sorumludur. Hiperhomosisteinemide süperoksit oluşmakta; süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri endotel kaynaklı NO'nun oksidatif inaktivasyonuna katılmaktadır (4,6,50). Süperoksit oluşumu, vasküler NAD(P)H oksidazların veya eNOS'un NO sentezinden çok süperoksit sentezine yönelmesine bağlıdır (18). Diğer bir mekanizma ise; reaktif tiol grupları ile tiol değişim reaksiyonlarına katılan homosisteinin endoplazmik retikulumdaki (ER) protein biyosentezini bozarak ER stres yolunu başlatmasıdır (52). ER stresi dislipidemi, protein sentez bozuklukları ve inflamasyonla sonuçlanır (6). Son yıllarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, ADMA ve homosistein ilişkisini ortaya koymuştur. Homosistein DDAH enzimini, katalitik aktif bölgesindeki sisteinin -SH grubuyla etkileşmek suretiyle inhibe eder ve ADMA konsantrasyonunun artmasına yol açar (96). Bizim

çalışmamızda da hiperkolesterolemik /hiperhomosisteinemik hayvanlarda kontrol ve kolesterol grubuna kıyasla, ADMA'nın daha yüksek, DDAH enzim aktivitesinin ise daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca DDAH ile homosistein arasında bir negatif bağıntı bulunmuştur. Bu hayvanlarda oksidatif stres göstergesi olarak ölçülen dien konjugat düzeyleri kontrol ve kolesterol grubuna göre yüksektir. Serum NO düzeylerinde değişiklik olmamakla birlikte, karaciğer NO düzeyleri kontrollere göre düşük bulunmuş, nitrotirozin konsantrasyonu ise artmıştır. Hiperhomosisteineminin NO sentezi yerine süperoksit oluşumunu hızlandırdığı, bu radikalin de doku nitrotirozin konsantrasyonlarının artmasına yol açtığı bildirilmiştir (18). Bulgularımız, bu çalışma ile uyumludur.

Çalışma gruplarımızda serum homosistein ile ADMA arasında pozitif bağıntı vardır. PRMT enziminin substratı olan SAM, reaksiyon sonunda homosisteine dönüşürken diğer oluşan ürün ADMA'dır. Bu nedenle PRMT aktivitesinin arttığı hallerde ADMA ve homosistein birlikte artacaktır. Ancak bu artış, her zaman bağıntılı olmayabilir. Çünkü her ikisinin de plazmadan uzaklaştırılma yolları farklıdır. Nitekim hiperhomosisteineminin, folik asit ve B<sub>12</sub> tedavisi ile azaltılabildiği olgularda ADMA düzeyleri bundan etkilenmemiştir (108). Bizim çalışmamızda homosistein artışının DDAH enziminin katalitik aktif bölgesinde değişiklik yaparak enzimi inhibe ettiği ve ADMA artışına katkıda bulunduğu söylenebilir. Ancak DDAH aktivitesini azaltan oksidatif stres gibi faktörlerin rolü de akılda tutulmalıdır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre:

a) Hiperkolesterolemik hayvanlarda ADMA düzeyleri artmakta ve bunun sonucunda NO oluşumu azalmaktadır. Oluşan NO, peroksinitrit sentezine yönelmektedir. Bu nedenle, hem oluşumu, hem de biyoyararlanımı azalmış olmaktadır.

b) Hiperkolesterolemide karaciğer dokusunda oksidatif stres oluşmaktadır. Kısmen bunların etkisiyle DDAH aktivitesi azalmakta ve ADMA'nın yıkımı engellenmektedir.

c) Hiperkolesterolemik hayvanlarda apelin düzeyleri azalmaktadır. Bu azalma, NO düzeylerindeki değişiklik ile uyumludur.

d) Betain uygulamasının, hiperkolesterolemi ve oksidatif stres parametreleri üzerine herhangi bir etkisi saptanmamıştır. Ancak betain uygulaması sonucunda apelin düzeyleri ve DDAH aktivitesi normal değerlerine ulaşmakta, ADMA düzeylerinde de kısmen iyileşme görülmektedir. Betainin bu etkilerinin molekülün antioksidan özelliğinden ileri gelmediği söylenebilir.

e) Kolesterol yüklemesine ek olarak hiperhomosisteinemi oluşturulduğunda betain uygulaması, gerek homosistein, gerekse artan ADMA konsantrasyonu ve azalan apelin konsantrasyonu üzerinde etkili olmaktadır. Oksidatif stres parametreleri de normale dönmektedir. Bu durum betainin başlıca etkilerini homosisteini azaltarak gösterdiğini düşündürmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- 1- Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD. Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: Results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2711-2717.
- 2- Abdelmalek MF, Sanderson SO, Angulo P, Soldevila-Pico C, Liu C, Peter J ve ark. Betaine for nonalcoholic fatty liver disease: results of a randomized placebocontrolled trial. *Hepatology* 2009; 50: 1818–1826.
- 3- Alexiadou K, Kokkinos A, Liatis S, Perrea D, Katsilambros N, Tentolouris N. Differences in plasma apelin and visfatin levels between patients with type 1 diabetes mellitus and healthy subjects and response after acute hyperglycemia and insulin administration. *Hormones (Athens)* 2012; 11: 444-450.
- 4- Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T ve ark. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J* 2009; 30: 1142–1150.
- 5- Ashley EA, Powers J, Chen M, Kundu R, Finsterbach T, Caffarelli A ve ark. The endogenous peptide potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 73-82.
- 6- Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 2004; 11: 56-64.
- 7- Balkan J, Doğru-Abbasoğlu S, evikbaş U, Ayka-Toker G, Uysal M. Methionine supplementation did not augment oxidative stress, atherosclerotic changes and hepatotoxicity induced by high cholesterol diet in C57BL/6J mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 2004; 50: 258-264.
- 8- Balkan J, ztezcan S, Kk M, evikbaş U, Koak-Toker N, Uysal M. The effect of betaine treatment on triglyceride levels and oxidative stres in the liver of ethanol-treated guinea pigs. *Exp Toxicol Pathol* 2004; 55: 505-509.
- 9- Balkan J, Parıldar FH, Doğru-Abbasoğlu S, Ayka-Toker G, Uysal M. The effect of taurine or betaine pretreatment on hepatotoxicity and prooxidant status induced by lipopolysaccharide treatment in the liver of rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 917-921.

- 10- Barak AJ, Beckenhauer HC, Mailliard ME, Kharbanda KK, Tuma DJ. Betaine lowers elevated S-adenosylhomocysteine levels in hepatocytes from ethanol-fed rats. *J Nutr* 2003; 133: 2845-2848.
- 11- Barnes G, Japp AG, Newby DE. Translational promise of the apelin-APJ system. *Heart* 2010; 96: 1011-1016.
- 12- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: 1424-1437.
- 13- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882–888.
- 14- Bidulescu A, Chambless LE, Siega-Riz AM, Zeisel SH, Heiss G. Usual choline and betaine dietary intake and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *BMC Cardiovasc Disord* 2007; 7:20.
- 15- Bloomer RJ, Farney TM, Trepanowski JF, McCarthy CG, Canale RE. Effect of betaine supplementation on plasma nitrate/nitrite in exercise-trained men. *J Int Soc Sports Nutr.* 2011 ;8:5.
- 16- Bolayırılı İM, Aslan M, Balcı H, Altuğ T, Hacibekiroğlu M, Seven A. Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine. *Life Sci* 2007; 91: 121-127.
- 17- Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigné C, Mazzucotelli A ve ark. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 1764-1771.
- 18- Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 824-833.
- 19- Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1557-1564.
- 20- Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B ve ark. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000; 87: 99–105.

- 21- Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA; NASH Clinical Research Network (CRN). Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Activity Score and the Histopathologic Diagnosis in NAFLD: Distinct Clinicopathologic Meanings. *Hepatology*. 2011; 53: 810-820.
- 22- Buege JA, Aust JD. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 1978; 52: 302-310.
- 23- Businaro R, Tagliani A, Buttari B, Profumo E, Ippoliti F, Di Cristofano C ve ark. Cellular and molecular players in the atherosclerotic plaque progression. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1262: 134-141.
- 24- Caro AA, Cederbaum AI. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine in Fe<sup>2+</sup>-initiated oxidations. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1303-1316.
- 25- Cavallo MG, Sentinelli F, Barchetta I, Costantino C, Incani M, Perra L ve ark. Altered glucose homeostasis is associated with increased serum apelin levels in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2012;7:e51236.
- 26- Cheng X, Cheng XS, Pang CC. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan receptor in conscious rats. *Eur J Pharm* 2003; 470: 171-175.
- 27- Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y, Kundu RK, Sheikh AY, Agrawal R ve ark. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest* 2008; 118: 3343–3354.
- 28- Craig SA. Betain in human nutrition. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 539-549.
- 29- Dayal S, Lentz SR. ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2005; 10: 27-33.
- 30- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Modulation of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in cholesterol enriched endothelial cell membranes. *Biochem Pharmacol*. 1995; 49: 1589-600.
- 31- Detopoulou P, Panagiotakos DB, Antonopoulou S, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 424–430.
- 32- Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, Prewitt RL. Oxidative Stress in a Rat Model of Obesity-Induced Hypertension. *Hypertension* 2001; 37: 554-560.
- 33- Erman F, Balkan J, Çevikbaş U, Koçak-Toker N, Uysal M. Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication. *Amino Acids* 2004; 27: 199-205.

- 34- Eynatten M von, Hamann A, Twardella D, Nawroth PP, Brenner H, Rothenbacher D. Relationship of adiponectin with markers of systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, and heart failure in patients with coronary heart disease. *Clin Chem* 2006; 52: 853-859.
- 35- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-879.
- 36- Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999; 103: 897-905.
- 37- Fiedler L. The DDAH/ADMA pathway is a critical regulator of NO signalling in vascular homeostasis. *Cell Adh Migr* 2008; 2: 149-150.
- 38- Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
- 39- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function *Eur Heart J*. 2012; 33: 829-837.
- 40- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–376.
- 41- Go EK, Jung KJ, Kim JM, Lim H, Lim HK, Yu BP, Chung HY. Betaine modulates age-related NF-kB by thiol-enhancing action. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 2244-2249.
- 42- Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM ve ark. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 2002;105:1567–1572.
- 43- Gök H. Ateroskleroz. *Klinik Kardiyoloji*. Nobel Tıp Yayınevi, 2. baskı 2002; s204.
- 44- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695.
- 45- Hashimoto T, Kihara M, Imai N, Yoshida S, Shimoyamada H, Yasuzaki H ve ark. Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis. *Am J Pathol* 2007; 171: 1705–1712.
- 46- Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. Homocysteine potentiates amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem* 2001; 78: 249-253.

- 47- Holm PI, Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Grotmol T, Schneede J. Modulation of the homocysteine-betaine relationship by methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T genotypes and B vitamin status in a large-scale epidemiological study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1535–1541.
- 48- Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, 1999; 99: 3092-3095.
- 49- Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress. time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1182-1184.
- 50- Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1-18.
- 51- Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006; 136: 1741-1749.
- 52- Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1699-1708.
- 53- Jia SJ, Jiang DJ, Hu CP, Zhang XH, Deng HW, Li YJ. Lysophosphatidylcholine-induced elevation of asymmetric dimethylarginine level by the NADPH oxidase pathway in endothelial cells. *Vascular Pharmacology* 2006; 44: 143-148.
- 54- Jia YX, Lu ZF, Zhang J, Pan CS, Yang JH, Zhao J ve ark. Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Peptides* 2007; 28: 2023-2029.
- 55- Kasai A, Shintoni N, Oda M. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 395-400.
- 56- Katugampola SD, Maguire JJ, Matthewson SR, Davenport AP. A novel radioligand for localizing the APS orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1255-1260.
- 57- Kharbanda KK, Todero SL, Ward BW, Cannella JJ 3rd, Tuma DJ. Betaine administration corrects ethanol-induced defective VLDL secretion. *Mol Cell Biochem* 2009; 327: 75–78.
- 58- Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme yayıncılık 2003.
- 59- Kim SK, Kim YC. Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice. *J Hepatol* 2005; 42: 907-913.

- 60- Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the apelin receptor APJ to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept* 2005; 126: 233-240.
- 61- Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci* 1995; 25: 111-121.
- 62- Konstantinova SV, Tell GS, Vollset SE, Nygård O, Bleie Ø, Ueland PM. Divergent associations of plasma choline and betaine with components of metabolic syndrome in middle age and elderly men and women. *J Nutr* 2008; 138: 914–920.
- 63- Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 2005; 146: 231-236.
- 64- Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, Schultz GM, Kundu RK, Ashley EA ve ark. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: 1329–1335.
- 65- Lever M, George PM, Dellow WJ, Scott RS, Chambers ST. Homocysteine, glycine betaine, and N, N-dimethylglycine in patients attending a lipid clinic. *Metabolism* 2005; 54: 1–14.
- 66- Li Z, Bai Y, Hu J. Reduced apelin levels in stable Angina. *Intern Med* 2008; 47: 1951–5.
- 67- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135–1143.
- 68- Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H ve ark. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002; 106: 987–992.
- 69- Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001; 280: 19–41.
- 70- Lv S, Fan R, Du Y, Hou M, Tang Z, Ling W, Zhu H. Betaine supplementation attenuates atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice. *Eur J Nutr* 2009; 48: 205-212.
- 71- Maenhaut N, Van de Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocyt. *BMC Med* 2011; 16; 9: 25.
- 72- Mangge H, Schauenstein K Stroedter L, Griesl A, Maerz W, Borkenstein M. Low grade inflammation in juvenile obesity and type 1 diabetes associated with early signs of atherosclerosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004; 112: 378-382.

- 73- Masumoto A, Hirooka Y, Hironaga K, Eshima K, Setoguchi S, Egashira K, Takeshita A. Effect of pravastatin on endothelial function in patients with coronary artery disease (cholesterol-independent effect of pravastatin). *Am J Cardiol* 2001; 88: 1291–1294.
- 74- Mesmin C, Fenaille F, Becher F, Tabet JC, Ezan E. Identification and characterization of apelin peptides in bovine colostrum and milk by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Proteom Res* 2011; 10: 5222–5231.
- 75- Mori N, Hirayama K. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J Nutr* 2000; 130: 2349-2355.
- 76- Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MPC, Van Lambalgen AA, Rauwerda JA, VanLeeuwen PAM. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clin Nutr* 2003; 22: 17-22.
- 77- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL ve ark. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993; 136: 355-360.
- 78- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 79- Okada T, Kawakami S, Nakamura Y, Han KH, Ohba K, Aritsuka T, ve ark. Amelioration of D-galactosamine-induced acute liver injury in rats by dietary supplementation with betaine derived from sugar beet molasses. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75: 1335-1341.
- 80- Olthof MR, Bots ML, Katan MB, Verhoef P. Acute effect of folic acid, betaine, and serine supplements on flow-mediated dilation after methionine loading: a randomized trial. *PLoS Clin Trials* 2006;1:e4.
- 81- Olthof MR, van Vliet T, Verhoef P, Zock PL, Katan MB. Effect of homocysteine-lowering nutrients on blood lipids: results from four randomised, placebo-controlled studies in healthy humans. *PLoS Med.* 2005; 2: 446-456.
- 82- Olthof MR, vanVliet T, Boelsma E, Verhoef P. Low dose betaine supplementation leads to immediate and long term lowering of plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 2003; 133: 4135–4138.
- 83- Olthof MR, Verhoef P. Effects of betaine intake on plasma homocysteine concentrations and consequences for health. *Curr Drug Metab* 2005; 6: 15–22.
- 84- Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabo C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 302-310.

- 85- Pitkin SL, Maguire JJ, Bonner TI, Davenport AP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev.* 2010; 62: 331-342.
- 86- Prasad A, Zhu J, Halcox JP, Waclawiw MA, Epstein SE, Quyyumi AA. Predisposition to atherosclerosis by infections. Role of endothelial dysfunction. *Circulation*, 2002; 106: 184–190.
- 87- Purohit V, Abdelmalek MF, Barve S, Benevenga NJ, Halsted CH, Kaplowitz N ve ark. Role of Sadenosylmethionine, folate, and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 14–24.
- 88- Robert K, Nehmé Johnny, Bourdon E, Pivert G, Friguet B, Delcayre C ve ark. Cystathione synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology* 2005; 128:1405-1415.
- 89- Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38: 3-6.
- 90- Schmidt HH. Determination of nitric oxide via measurement of nitrite and nitrate in culture media. *Biochemica* 1995; 2: 22-23.
- 91- Schofield I, Malik R, Izzard A, Austin C, Heagerty A: Vascular structural and functional changes in type 2 diabetes mellitus: Evidence for the roles of abnormal myogenic responsiveness and dyslipidemia. *Circulation* 2002;106: 3037–3043.
- 92- Schwahn BC, Wang XL, Mikael LG, Wu Q, Cohn J, Jiang H ve ark. Betaine supplementation improves the atherogenic risk factor profile in a transgenic mouse model of hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis* 2007; 195:100-107.
- 93- Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rew* 2010; 6: 82-90.
- 94- Sörhede Winzell M, Magnusson C, Ahrén B. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept* 2005; 131: 12-17.
- 95- Steed MM, Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011; 15: 1927-1943.
- 96- Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104: 2569-2575.

- 97- Suzuki T, Fukuo K, Suhara T, Yasuda O, Sato N, Takemura Y ve ark. Eicosapentaenoic acid protects endothelial cells against anoikis through restoration of cFLIP. *Hypertension* 2003; 42: 342–348.
- 98- Tain Y-L, Baylis C. Determination of dimetilarginine dimethylaminohyrolase activity in the kidney. *Kidney Int* 2007; 72: 886-889.
- 99- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature. *Hypertension* 2003; 42: 1075–1081.
- 100- Tasci I, Erdem G, Ozgur G, Tapan S, Dogru T, Genç H ve ark. LDL-cholesterol lowering increases plasma apelin in isolated hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2009; 222-228.
- 101- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX ve ark. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 251: 471–476.
- 102- Teerlink T. Determination of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginin in biological samples by HPLC. *Methods Mol Med* 2005; 108: 263-274.
- 103- Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: Regulation and action. *Pharmacol Res* 2009; 60: 448-460.
- 104- Tokgözoğlu L. Aterosklerozda patoloji ve patogenez. *Türkiye Klinikleri Kardiyoloji Dergisi*; 2000: 29–37.
- 105- Ueland PM. Choline and betaine in health and disease. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 3-15.
- 106- Uysal M. Ateroskleroz, kalp-damar hastalıkları ve serbest radikaller. *Aktüel Tıp Dergisi* 2000; 5: 15-21.
- 107- Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 336-341.
- 108- van Guldener C, Nanayakkara PW, Stehouwer CD. Homocysteine and asymmetric dimethylarginine (ADMA): biochemically linked but differently related to vascular disease in chronic kidney disease. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45: 1683-1687.
- 109- Verhaar MC, Wever RMF, Kastelein JJP, van Loon D, Milstien S, Koomans HA, Rabelink TJ. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia: a randomized placebo-controlled trial. *Circulation*, 1999; 100: 335–338.

- 110- Werner ER, Gorren AC, Heller R, Werner-Felmayer G, Mayer B. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects. *Exp Biol Med* 2003; 228: 1291–1302.
- 111- Woo CWH, Prathapasinghe GA, Siow YL, Karmin O. Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: Protective effect of folic acid supplementation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 656-665.
- 112- Zhong JC, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Leung FP, Wong WT ve ark. The novel peptide apelin regulates intrarenal artery tone in diabetic mice. *Regul Pept* 2007; 144: 109–114.
- 113- Zhong JC, Yu XY, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Lin SG. Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res.* 2007; 74: 388-395.
- 114- Zhou J, Moller J, Danielsen CC, Bentzon J, Ravn HB, Austin RC, Falk E. Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-Deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1470-1476.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

### A. KİŞİSEL BİLGİLER

**Doğum Tarihi ve Yeri:** 05.10.1982, Kurşunlu

**Uyruğu:** TC

**Medeni Hali:** Evli, bir çocuk annesi

**Tel:** 0(212) 4142000-33224-32353

**E-mail:** zeynepkusku@gmail.com

### B. EĞİTİM, MESLEKİ VE AKADEMİK DENEYİMLER

**Tıpta Uzmanlık Eğitimi:** İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, 2007-2013

**Mesleki Deneyim:** Sağlık Bakanlığı Turgut Reis Sağlık Ocağı, Pratisyen Tabip, 2006-2007

**Lisans:** Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 2000-2006

**Orta Öğrenim:** Süleyman Demirel Anadolu Lisesi, Ankara, 1993-2000

**İlk Öğrenim:** Osman Ünyazıcı İlköğretim Okulu, Ankara, 1988-1993

### Uluslararası Yayınlar:

1. Ömer B, Genc S, Takmaz O, Dirican A, Küskü-Kiraz Z, Berkman S, Gürdöl F. The diagnostic role of human epididymis protein 4 and serum amyloid-A in early-stage endometrial cancer patients. *Tumour Biol.* 2013 Mayıs. [Epub ahead of print]
2. Aydın AF, Küskü-Kiraz Z, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Effect of carnosine treatment on oxidative stress in serum, apoB-containing lipoproteins fraction and erythrocytes of aged rats. *Pharmacol Rep.* 2010; 62: 733-739.
3. Vural P, Küskü-Kiraz Z, Doğru-Abbasoğlu S, Cil E, Karadağ B, Uysal M. Vascular endothelial growth factor +405 G/C,-460 T/C and -2578 A/C polymorphisms are not associated with insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Int J Immunogenet.* 2010; 37: 239-243.
4. Artun BC, Küskü-Kiraz Z, Güllüoğlu M, Cevikbaş U, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Hum Exp Toxicol.* 2010; 29: 659-665.
5. Aydın AF, Küskü-Kiraz Z, Doğru-Abbasoğlu S, Güllüoğlu M, Uysal M, Koçak-Toker N. Effect of carnosine against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rat. *Peptides.* 2010; 31: 67-71.

6. Küskü-Kiraz Z, Mehmetçik G, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M. Artichoke leaf extract reduces oxidative stress and lipoprotein dyshomeostasis in rats fed on high cholesterol diet. *Phytother Res.* 2010; 24: 565-570.
7. Vural P, Küskü-Kiraz Z, Doğru-Abbasoğlu S, Cil E, Karadağ B, Akgül C, Uysal M. Vascular endothelial growth factor -2578 A/C, -460 T/C and +405 G/C polymorphisms in polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 147: 57-60.

***Dr. Zeynep Küskü-Kiraz***

