

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARACİĞER FİBROZİSLİ RATLARDA
KUERSETİNİN HOMOSİSTEİN DÜZEYİ VE
KORONER DAMAR HASARI ÜZERİNE ETKİSİ

Rahime ÇİFTÇİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2013

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

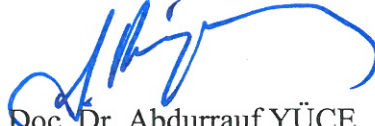


Prof. Dr. Mehmet ÇAY

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora

Tezi olarak kabul edilmiştir.

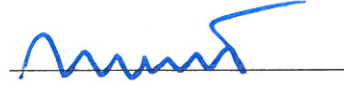


Doç. Dr. Abdurrauf YÜCE

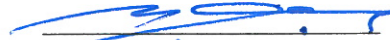
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL



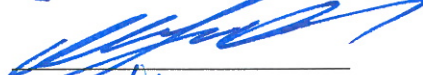
Prof. Dr. Mehmet ÇAY



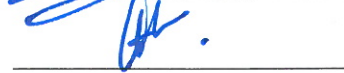
Doç. Dr. Abdurrauf YÜCE



Doç. Dr. Mustafa SÖNMEZ



Doç. Dr. Ali Osman ÇERİBAŞI



İTHAF SAYFASI

Bu tezi 11 Temmuz 2010 yılında aramızdan ayrılan çok saygıdeğer babam Kemal ÇİFTÇİ ve hayatta kalan tek varlığım annem Fatma ÇİFTÇİ'ye ithaf ediyorum.

TEŐEKKÖR

Bu çalıŐmayı bana yűksek lisans tezi olarak veren ve çalıŐmalarım sűresince hiçbir zaman desteęini esirgemeyen Fırat Ŭniversitesi Veteriner Fakűltesi Fizyoloji Anabilim Dalı Őđretim Ŭyesi Doç. Dr. Abdurrauf YŬCE'ye, araŐtırma sűresince yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Őđretim Ŭyeleri Prof. Dr. Mesut AKSAKAL'a ve Prof. Dr. Mehmet ÇAY'a, ArŐ. Gűr. Mehmet GŬVEN'e, Suni Tohumlama Anabilim Dalı Őđretim Ŭyeleri Doç. Dr. Mustafa SŬNMEZ'e ve Doç. Dr. Gaffari TŬRK'e, Patoloji Anabilim Dalı Őđretim Ŭyesi Doç. Dr. Ali Osman ÇERİBAŐI'na, Fırat Ŭniversitesi Saęlık Bilimleri Enstitűsű Műdűrű ve Personeline teŐekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
İTHAF SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	4
3.1. Karaciğer Hastalıklarından Başlıcaları.....	4
3.1.1. Karaciğer Yağlanması (Hepatosteatoz)	4
3.1.2. Kronik Parenkimal Karaciğer Hastalığı (Siroz)	5
3.1.3. Vasküler Karaciğer Hastalığı (Budd-Chiari Sendromu).....	6
3.1.4. Metabolik Karaciğer Hastalığı (Wilson).....	7
3.1.5. Konjenital Karaciğer Hastalığı (Kistik Fibrozis, Fibroz)	8
3.1.6. Enfeksiyöz Karaciğer Hastalığı (Hepatit)	9
3.2. Homosistein	10
3.2.1. Homosistein Metabolizması.....	12
3.2.1.1. Transmetilasyon.....	14
3.2.1.1.1. Remetilasyon.....	15
3.2.1.1.2. Transsülfürasyon.....	16

3.2.2. Homosisteinin Dokulardaki Dağılımı	16
3.2.3. Homosisteinin Regülasyonu.....	17
3.2.4. Plazma Homosisteini	18
3.2.5. Homosistein Formları	18
3.2.5.1. Homosistein-Sistein Karışımı Olan Disülfid.....	18
3.2.5.2. Total, Proteine Bağlı ve Serbest Homosistein.....	19
3.2.6. Homosistein Düzeyleri ve Ölçümü.....	20
3.2.7. Hiperhomosisteinemi Nedenleri.....	20
3.2.7.1. Genetik Nedenler	21
3.2.7.2. Edinsel Nedenler	22
3.2.7.2.1. Vitamin Eksiklikleri	22
3.2.7.2.1.1. Folik Asit Eksikliği	22
3.2.7.2.1.2. Vitamin B ₁₂ (Kobalamin) Eksikliği	23
3.2.7.3. Kronik Hastalıklar.....	24
3.2.7.4. Fizyolojik Nedenler	25
3.2.7.5. İlaçlar.....	26
3.2.8. Homosistein, Koroner Arter ve Vasküler Hastalıklar.....	26
3.2.9. Hiperhomosisteinemi ve Mekanizması.....	27
3.2.10. Hiperhomosisteinemi Tedavisi.....	29
3.3. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler	30
3.3.1. Fenolik Bileşikler	31
3.3.2. Kuersetin	32
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
4.1. Gereç.....	33

4.1.1. Yem Materyali.....	33
4.2. Yöntem	34
4.2.1. Örneklerin Toplanması	35
4.2.2. Plazma Homosistein Düzeyinin Belirlenmesi.....	35
4.2.3. Plazma Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyinin Tayini	36
4.2.4. Histopatolojik Metot.....	36
4.2.5. İstatistiksel Analizler	37
5. BULGULAR.....	38
5.1. Karaciğerde Histopatolojik Bulgular.....	37
5.2. Araştırma Gruplarında Plazma MDA Düzeyleri.....	37
5.3. Koroner Damarlarda Histopatolojik Bulgular.....	37
6. TARTIŞMA.....	43
7. KAYNAKLAR.....	49
8.ÖZGEÇMİŞ.....	58

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Ratlara Verilen Yemin Bileşimi.....	34
Tablo 2. Ratlarda MDA ve Homositein Düzeyleri	40
Tablo 3. Koroner Damarların Histolojisine Ait Bulgular.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Homosisteinin Yapısı.....	13
Şekil 2.	Metiyonin ve Homosistein Metabolizması	14
Şekil 3.	Homosistein formları (25).....	19
Şekil 4: A.	CCL ₄ uygulanan grupta hepatositlerde karyomegali (ok başı), safra kanal proliferasyonları (büyük oklar), postnekrotik fibrozis (küçük ok) ve hücre infiltrasyonları.....	40
Şekil 4: B.	CCL ₄ +K grubunda hafif şiddette fibrozis ve hepatositlerde karyomegali (ok başı) ve safra kanalı proliferasyonu (ok)	40
Şekil 4: C.	Kontrol grubuna ait karaciğerin histolojik görünümü	40
Şekil 4: D.	Kuersetin (K) uygulanan grupta karaciğerin histolojik görünümü.....	40
Şekil 5.	Kontrol grubunda koroner arterin görünümü, H-E.....	41
Şekil 6.	Kuersetin grubunda koroner arter kesitinin görünümü, H-E.	41
Şekil 7.	CCL ₄ grubunda muskuler tabakada şiddetli fibrinoid dejenerasyon ile birlikte kas hücrelerinde vakuoler dejenerasyon (ok başları), endotel hücrelerinde şişme (küçük ok) ve perivasküler bağ doku artışı (büyük ok), H-E.....	42
Şekil 8.	CCL ₄ +Kuersetin grubunda koroner arterin muskuler tabakasında hafif şiddette fibrinoid dejenerasyon ve kas hücrelerinde hidropik dejenerasyon (ok başı), H-E.	42

KISALTMALAR LİSTESİ

DM	: Diyabetes Mellitus
ALT	: Aminotransferaz
AST	: Aspartat Amino Transferaz
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
MRG	: Magnetik Rezonans Görüntüleme
USG	: Ultrasonografi
PV	: Polisitemia Vera
KKH	: Kronik Kalp Hastalığı
SAM	: S-Adenosilmetiyonin
SAH	: S-Adenosilhomosistein
NH₄	: Amonyum
TCA	: Trikarboksilik Asit Döngüsü
ATP	: Adenozin Trifosfat
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GCMS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi
ELISA	: Enzim-Bağlı İmmunosorbent Assay
MTHFR	: Metilen tetra hidrofolat
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
IF	: İntrensik Faktör
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
NO	: Nitrik Oksit
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit

CCl₄	: Karbon Tetra Klorür
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
MDA	: Malondialdehit
H-E	: Hemotoksilen-Eozin
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
MAT	: Methionin Adenosiltransferaz
BHMT	: Betaine-Homosistein Metiltrasferaz
CBS	: Sistationin β -Sentetaz
MI	: Miyokard İnfarktüsü
K	: Kuersetin

1. ÖZET

Bu çalışma, deneysel olarak karaciğer fibrozisi oluşturulan ratların plazma homosistein düzeyi ve koroner arterlerdeki yapısal değişimleri incelemek ve bu değişimler üzerine kuersetinin etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 40 Spraque-Dawley rat 4 grup olarak ayrıldı: **1. Grup:** (Kontrol grubu, n=10, zeytinyağı), **2. Grup:** [Karbon Tetra Klorür (CCl₄) grubu, n=10, 0.25 mg/kg CCl₄], **3. Grup:** [Kuersetin grubu (K), n=10, 150 mg/kg kuersetin], **4. Grup:** [Karbon Tetra Klorür (CCl₄)+Kuersetin (K) grubu, n=10]. Uygulamalar 10 hafta boyunca günlük olarak ratlara gavaj yoluyla yapıldı. Plazma malondialdehit (MDA) ve homosistein düzeyleri belirlendi, karaciğer ve koroner damarlardaki patolojik değişimler incelendi. Plazma MDA (P<0.05) ve homosistein (P<0.01) değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 2. grup'da önemli derecede artmış, 3. ve 4. grup'da azalmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 2. grup ratların koroner damarlarında fibrinoid ve vakuoler dejenerasyon, perivasküler bağ doku artışı ve endotel hücrelerinde ayrılmalar tespit edildi. 4. grupta ise 2. gruba göre dejeneratif değişimler ve perivasküler bağ doku artışının daha hafif olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, CCl₄ ün sebep olduğu MDA artışı karaciğerde hasara ve bu hasar da plazma homosistein düzeyinde artışa, koroner damarlarda patolojik lezyonlara neden olmuştur. Öte yandan CCl₄+K uygulaması plazma homosistein ve MDA düzeyleri ile koroner arterlerdeki patolojik lezyonların derecesini azalttı.

Anahtar Kelimeler: Aterosklerozis, Homosistein, Kuersetin, Rat.

2. ABSTRACT

EFFECT OF QUERCETIN ON HOMOCYSTEINE LEVEL AND CORONARY VASCULAR DAMAGE IN RATS WITH LIVER FIBROSIS

This study was conducted to investigate the changes in the levels of homocysteine and structure of coronary arteries in experimental liver fibrosis in rats and to investigate the effects of quercetin on these changes. For this purpose, 40 Spraque-Dawley rats were divided into 4 groups as; **Group 1:** (Control group, n=10, olive oil), **Group 2:** [Carbon tetra chlorur (CCl₄) group, n=10, 0.25 mg/kg CCl₄], **Group3:** [Quercetine (Q) group, n=10, 150 mg/kg quercetine], **Group 4:** [Carbon tetra chlorur (CCl₄)+Quercetine (Q) group, n=10]. Treatments were by gavage to rats daily for 10 weeks. The levels of plasma malondialdehyde (MDA) and homocysteine were determined and pathological changes in the liver and coronary arteries were examined. The levels of plasma homocysteine (P<0.01) and MDA (P<0.05) significantly increased in group 2, while they were significantly decreased in groups 3 and 4 compared to control group. Fibrinoid and vacuolar degeneration, perivascular connective tissue growth and detachment of endothelial cells were determined in the endothelium of coronary artery of group 2 rats compared to the control group. It was observed that degenerative changes and increase in perivascular connective tissue were milder in group 4 versus group 2.

In conclusion, CCl₄ induced increase in MDA level caused liver injury, leading to increse in plasma homocysteine level and pathological changes in coronary arteries. On the other hand, quercetine administration to CCl₄ treated rats

decreased the levels of plasma homocysteine and MDA and the degree of the pathological lesions in the coronary arteries.

Key Words: Atherosclerosis, Homocysteine, Quercetine, Rat.

3. GİRİŞ

Karaciğer, diyaframın hemen altında, sağ tarafta, koyu kırmızı renkte yumuşak bir organdır. Yaşamak için gerekli olan birçok kimyasal olay burada meydana gelir. Besinlerdeki karbonhidratların, lipitlerin, proteinlerin ve vitaminlerin işlenmeleri, portal dolaşımdaki parçacıkların fagositozu, serum proteinlerinin üretimi, kandaki metabolitlerin biyodönüşümlerinin sağlanması, endojen atıkların ve bazı eksojen zararlıların detoksifikasyonu ve safra üretimi karaciğerin başlıca görevleri arasındadır.

3.1. Karaciğer Hastalıklarından Başlıcaları

Karaciğer Yağlanması (Hepatosteatoz)

Kronik Parenkimal Karaciğer Hastalığı (Siroz)

Vasküler Karaciğer Hastalığı (Budd-Chiari Sendromu)

Metabolik Karaciğer Hastalığı (Hemakromatozis, Wilson)

Konjenital Karaciğer Hastalığı (Tirozinemi, Kistik fibrozis, Fibroz)

Enfeksiyöz Karaciğer Hastalığı (Kandidiazis, Hepatit)

3.1.1. Karaciğer Yağlanması (Hepatosteatoz)

Karaciğer yağlanmasının (Hepatosteatoz) sebepleri arasında obezite ve alkolden sonra Diyabetes mellitus (DM), özellikle tip 2 DM üçüncü sırada yer almaktadır. Hepatosteatoz diyabetli hastalar arasında sık olarak (%50) görülmektedir (1). DM, hepatosteatoz prevelansında 2.6 kat risk artışı ile

ilişkilidir (2). İnsülin direnci hem tip 2 diyabet hem de hepatosteatoz gelişiminde ana patolojik mekanizmadır (3, 4).

Hepatosteatozun spesifik bir klinik bulgusu yoktur. Çoğu hastada karın sağ üst kadranda bir ağrı ve dolgunluk hissi bulunabilir. Genellikle hepatomegali dışında bir muayene bulgusu saptanamaz (5). Hepatosteatoza transaminaz yüksekliği eşlik ediyorsa hastalık steatohepatit olarak adlandırılır. Steatohepatitte sık rastlanan laboratuvar bulgusu, normalin 2-5 kat üzerine çıkabilen alanin aminotransferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST) yüksekliğidir. Alkalen fosfataz %50 olguda normalden yüksektir. Bilirubin, albumin ve globulin düzeyleri normaldir. Enzim düzeyleri karaciğer histolojisi ile korelasyon göstermemektedir (5, 6). Hepatosteatoz değerlendirmesinde ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT), magnetik rezonans görüntüleme (MRG) ve radyonüklid tarama gibi noninvaziv ve karaciğer biyopsisi gibi invaziv yöntemler uygulanabilir. Bunlardan MRG ve BT pahalı olduklarından, radyonüklid tarama pratik olmadığından ve karaciğer biyopsisi de hasta için zahmetli olduğundan USG en önemli ve en yaygın ve spesifik tanı metodudur (1). Ultrasonografik incelemede yağlanma bulgusu, karaciğer ekojenitesindeki artıştır (7).

3.1.2. Kronik Parenkimal Karaciğer Hastalığı (Siroz)

Karaciğer sirozu çeşitli etyolojik faktörlerle oluşan karaciğer hastalıklarının nihai bir evresidir. Bu evrede etyolojiye bağlı olarak gelişen klinik tablodan çok karaciğer yetersizliği ve portal hipertansiyonun sebep olduğu belirti ve klinik bulgular ön plandadır (8). Etiyolojik ajanların başında hepatit B virüsü

gelmektedir. Bunu alkol izlemektedir. Bu arada serolojik çalışmalar geliştikçe hepatit C virüsünün de siroz etyolojisinde önemli yer tuttuğu ortaya çıkmaktadır.

Ailede siroz, hepatit, karaciğer tümörü hikâyelerinin de siroza eğilimi arttırdığı düşünölmektedir. Ayrıca dağılımı Wilson, galaktozemi, glikojen depo hastalıkları, hemokromotozis gibi metabolik hastalıklar da nadir görölen siroz sebeplerindedir. Sirozda etyoloji ne olursa olsun klinik tabloda çok farklı bir değişiklik görölmez. Hastalarda karaciğer yetmezliği bulguları (sarılık, ödem, koagölöpati, palmar eritem, spider angiom, jinekomasti, testiküler atrofi) veya portal hipertansiyon komplikasyonları (kollateral oluşumu, splenomegali, varis, gastrointestinal sistemde kanama, ensefalopati) görölebilir (9).

Karaciğer sirozu tanısı, morfolojik bir tanıdır. Morfolojik olarak ayırım mikronodöler, makronodöler ile mikro ve makronodöllerin birlikte bulunduğu miks tip olmak üzere üç şekilde yapılmaktadır. Öte yandan siroz tanısında kullanılan bir başka yöntem ise iğne biyopsisidir. Bu yöntem perkütan olarak yapılabileceği gibi peritinoskopi eşliğinde görerek de yapılabilir (10).

3.1.3. Vasköler Karaciğer Hastalığı (Budd-Chiari Sendromu)

Budd-Chiari sendromu hepatik venöz kan akımının, terminal hepatik venöllerden sağ atriüma kadar herhangi bir seviyede engellenmesi sonucunda meydana gelen nadir bir hastalıktır. Aort kapağı ile sağ atriyum arasında basınç artmasına neden olan hastalıklar da benzer şekilde hepatik venöz kan akımında bozulmaya ve hepatik konjesyona yol açarlar (Konjestif Hepatopati). En tipik örnekleri konströktif perikardit ve sağ kalp yetmezliğidir. Ayrıca değişik antineoplastik ilaçların kullanımı ve kemik iliği transplantasyonundan sonra

hepatik sinuzoidler ile hepatik venüllerde oluşabilen nontrombotik oklüzyon da (Hepatik Venö-Oklüziv Hastalık) benzer klinik tablolara neden olurlar (11, 12).

Budd-Chiari Sendromu hastalığına neden olan etkenlerin sıklığı coğrafik bölgelere göre belirgin farklılıklar gösterir. Batı ülkelerinde en sık karşılaşılan etyolojik neden hematolojik hastalıklar ve özellikle Polisitemia Vera (PV) iken, Doğu Asya ve Afrika ülkelerinde vena cava inferiorun membranöz obstrüksiyonu en sık neden olarak karşımıza çıkar (13). Yapılan çalışmalar hastalığın genellikle birden fazla trombojenik ve tetikleyici faktör tarafından karaciğerin venöz kan akımının bozulması sonucunda ortaya çıktığını düşündürmektedir (14, 15).

Rutin laboratuvar tetkikleri, Budd-Chiari Sendromunun tanısı ve değerlendirilmesinde nadiren yararlı olur. Karaciğer biyopsisinde tipik olarak belirgin sentrilobuler konjesyon olmasına rağmen, hastaların ancak %20-50'sinde AST – ALT değerlerinde yükselme görülür. Buna ilave olarak serum bilirubin ve alkalin fosfataz seviyeleri ile protrombin zamanı çoğu kez normal veya hafif yükselmiş olup hastalığa özgü değildir. Hastalığın teşhis ve değerlendirilmesinde sadece görüntüleme yöntemleri ve karaciğer biyopsisinin değeri vardır (11).

3.1.4. Metabolik Karaciğer Hastalığı (Wilson)

Wilson hastalığı nadir görülen ve otozomal resesif geçiş gösteren kalıtsal bir hastalıktır. Esas olarak bakırın tüm vücutta, özellikle karaciğer, beyin, böbrekler ve korneada birikmesi ile ortaya çıkar. Bakır genellikle safra ile atılır. Wilson hastalığında bu mekanizmada oluşan bir bozukluk nedeniyle bakır progresif şekilde özellikle karaciğerde olmak üzere vücutta birikir. Hastalık genellikle genç yaşta hastaları etkiler. Wilson hastalığı olan olguların yaklaşık

yarısında karaciğer hastalığı bulguları ortaya çıkar ve akut hepatit, kronik aktif hepatit ya da siroz şeklinde ortaya çıkar. Sonuç olarak tüm hastalarda siroz gelişir. Wilson hastalığının klasik tanı kriterleri: Kayser- Fleischer halkası, düşük serum seruloplazmin seviyesi (<20 mg/dl) ve karaciğerde ve idrarda bakır miktarında artış. Tanı konduğu zaman, semptomatik ya da asemptomatik olsa tüm hastalarda tedaviye en kısa zamanda başlanması gerekmektedir. Total semptomatik iyileşme, ancak erken dönemde önlem alınırsa sağlanabilmektedir. Tedavide kullanılan ilaç penisilamindir. Wilson hastalığında, MRG ile hepatik parankimal ve yapısal değişiklikler ortaya konur. MRG aynı zamanda hastalığın progresyonunun takibine ve medikal tedaviye yanıtı değerlendirmede de katkı sağlar (16-18).

3.1.5. Konjenital Karaciğer Hastalığı (Kistik Fibrozis, Fibroz)

Kronik karaciğer hastalıkları fibrozise yol açar. Fibrozis normal yapıya zarar verir ve portal hipertansiyona yol açar. Bu durum sirozda olduğu gibi sirkülasyonun yeniden düzenlenmesini geri dönüşsüz şekilde bozabilir. Fibrozis ve siroz arasında hassas bir yol vardır. Fibrozis sadece nekroz, skar formasyonu ve kollapsla sonuçlanmaz, aynı zamanda matriksin değişik komponentlerini sentez eden hasara uğramış mezenşimal hücrelerin azalması ve sentezinde düzensizliğe de yol açar. Fibrozis genellikle karaciğer biyopsisi ile saptanabilir. Fibroziste en sık ortaya çıkan klinik bulgu portal hipertansiyondur (19).

Ciddi sonuçları olan fibrozisi belirleme ve ölçmede bugün için altın standart olan uygulama, karaciğer biyopsisidir. Fakat bu işleme ait bazı mahzurların varlığı yeni arayışlara yol açmıştır. Görüntüleme yöntemleri, erken dönem fibrozisin tanısında henüz yeterli verime sahip değildir. Serolojik testler

arasında bugün için en faydalı belirteçler prokollajen III peptid, tip IV kollajen, hyaluronik asid, laminin ve YKL-40'tır. Fakat hiçbirisinin diğerine kesin bir üstünlüğü gösterilememiştir (20).

3.1.6. Enfeksiyöz Karaciğer Hastalığı (Hepatit)

Kronik hepatit klinikopatolojik bir tanımlamadır. Karaciğerdeki inflamasyon ve nekrozun 6 ay ile 1 yıl kadar sürdüğü klinik durumlara verilen genel bir isimdir. İnflamasyonda baskın olan hücreler lenfositlerdir. Sıklıkla bu histopatolojik tabloya değişik derecelerde fibrozis de eşlik etmektedir (21). Kronik hepatit tanımlaması 6 ay süreyle iyileşmeden devam eden hastalığı ifade etmektedir. Kronik hepatit nedenleri arasında kronik viral enfeksiyonlar (B, C ve D hepatitleri), otoimmün reaksiyonlar, ilaçlar ve toksinler yer alır. Bunların dışında kalan ve etyolojik bir neden bulunamayan kronik hepatitler ise idiyopatik olarak tanımlanmaktadır (22).

Kronik hepatitte en sık rastlanan bulgular halsizlik, güçsüzlük ve çabuk yorulmadır. Bunların dışında bulantı, eklem ve kas ağrılarına daha az sıklıkla rastlanmaktadır. İdrar renginde koyulaşma, kaşıntı, iştah azalması ve kilo kaybı gibi yakınmalar genellikle otoimmün hepatitler, viral hepatitlerin alevlenme dönemleri ve siroza gidiş sırasında görülür. Serum transaminaz düzeyleri kronik hepatit tanısı konmasında ve aktivitesinin belirlenmesinde en yararlı olan testlerdir (22).

3.2. Homosistein

Homosistein, sülfür içeren bir aminoasit olmakla birlikte, bütün proteinlerin yapısal bileşeni olarak görev yapan yirmi aminoasit arasında yer almayan, diğer aminoasitlerin aksine diyetle birlikte alınan metiyoninin metabolizması sonucu oluşan bir metabolik ara üründür (23).

Homosistein diyetle bulunmaz, fakat memelilerde metiyonin metabolizmasının esansiyel bir ara metabolitidir. Hem homosistein hem de metiyonin birbirlerinin prekürsörler olup birinin detoksifikasyonu diğerinin sentez aşamasını oluşturmaktadır. Bu ilişkinin temelini metiyonin metabolizması oluşturur (24). Bazı dokulardaki transsülfürasyon mekanizması homosisteinin sistein ve derivelerine dönüşümünü sağlar. Metiyonin veya homosistein metabolizması arasındaki ardışık reaksiyonlar, homosistein veya metiyoninin dengesiyle düzenlenir. Bu reaksiyonlardan transsülfürasyon yolu için pridoksin ve bazı vitamin derivesi kofaktörler, metiyonin metabolizması için de folat ve kobalamin gerekmektedir. Bu açıdan homosistein metabolizmasında önemli bir yeri olan metiyonin:

1-Protein sentezi

2-S-adenozil metiyonine bağımlı transmetilasyon reaksiyonları

3-Poliaminlerin sentezi

4-Sistatyonin, sistein ve transsülfürasyon yolağının diğer ürünlerinin oluşumu

5-Intrasellüler folatların metabolizması ve kolin katabolizması için gerekli olan homosisteinin sağlanması gibi başlıca biyolojik süreçlerde yer almasıyla memelilerin normal büyüme ve gelişimi için esastır.

Hiperhomosisteneminin koroner kalp hastalıklarına (KKH) sebep olduğu, 1962 yılında McCully (25) tarafından homosisteinürinin tanımlanmasıyla birlikte ortaya çıkmıştır. Günümüzde koroner kalp hastalıklarının önceden belirlenmesine yönelik birçok çalışma yapılmış, birçok parametre araştırılmıştır. Bu çalışmalarda hiperlipideminin, özellikle de kolesterolün başlıca sorumlu faktör olduğu öne sürülmesine rağmen son yıllarda bazı koroner kaynaklı ölümlerde serum lipid düzeylerinin normal olması, araştırmacıları başka faktörleri incelemeye yöneltmiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılmış olan bir çalışmada koroner kalp hastalığından (KKH) dolayı ölenlerin sadece %14'ünde kolesterol yüksekliği, %57'sinde ise serum homosistein düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (26). Daha sonra yapılan araştırmalarda KKH oluşumunda plazma homosistein düzeyi artışının kolesterolden çok daha önemli bir parametre olduğu fikri ileri sürülmüştür (27).

Homosistein kükürt içeren ve proteinlerin yapısına katılmayan bir amino asit olup ilk kez 1932 yılında tanımlanmıştır (28). Normal olarak diyetle alınmayıp, metiyonin metabolizması sırasında bir ara ürün şeklinde oluşan homosisteinin %70-80'i plazmada albumine bağlı olup diğer kısmı ise serbest halde bulunmaktadır (29). Serbest halde bulunan kısım stabil olmayıp hemen sistein-homosisteine dönüşmektedir (30). Total homosistein düzeyi, hem bağlı olan ve hem de serbest olan kısımları yansıtmaktadır. 1962 yılında mental geriliği bulunan iki kardeşte homosistinüri saptanmıştır (28). Aynı yıllarda anomalili doğan ve mental geriliği olan bir kısım bebeklerin idrarlarında homosistein tespit edilmiştir (31). Daha sonra araştırmacılar, araştırmalarını homosisteinüri üzerine yoğunlaştırmış ve bu araştırmaların sonucunda Skovby (32), homosisteinürili bir

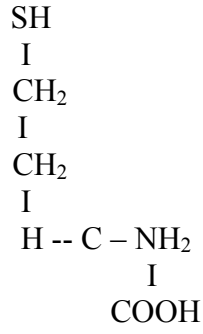
hastadan aldığı karaciğer doku biyopsisinde sistatyonin beta sentaz eksikliğini saptamıştır.

Araştırmacılar, homosisteinüride mevcut olan homosistein ile hastalığın kliniği arasında bir ilişki olup olmadığını araştırdıklarında bu hastalarda tromboembolizm, prematür ateroskleroz, mental gerilik gibi bulguların ortaya çıktığını ve bu bulgular ile serum homosistein düzeyleri arasında pozitif bir korelasyonun varlığını saptamışlardır (33). Daha sonraki yıllarda homosistein ölçümünde hassas tekniklerin geliştirilmesi ile homosistein serum düzeylerinin birçok hastalıkta gösterge olabileceği gösterilmiştir. Hafif ve orta derecedeki hiperhomosisteinemi günümüzde kardiovasküler hastalığı olanlarda sıkça gözlemlenmektedir (34). Hiperhomosisteinemi son yıllarda kalp damar hastalıkları için sigara, hipertansiyon, şişmanlık ve dislipidemi üzerine bağımsız bir risk faktörü olarak eklenmiştir (35, 36).

3.2.1. Homosistein Metabolizması

Homosistein, metiyonin metabolizması sırasında oluşmakta ve proteinlerin yapısına girmemektedir. Metiyonin esasiyel bir aminoasit olduğundan vücutta metiyoninden sentez edilen homosistein de kaynağı itibariyle esansiyel aminoasitler arasında sayılmaktadır.

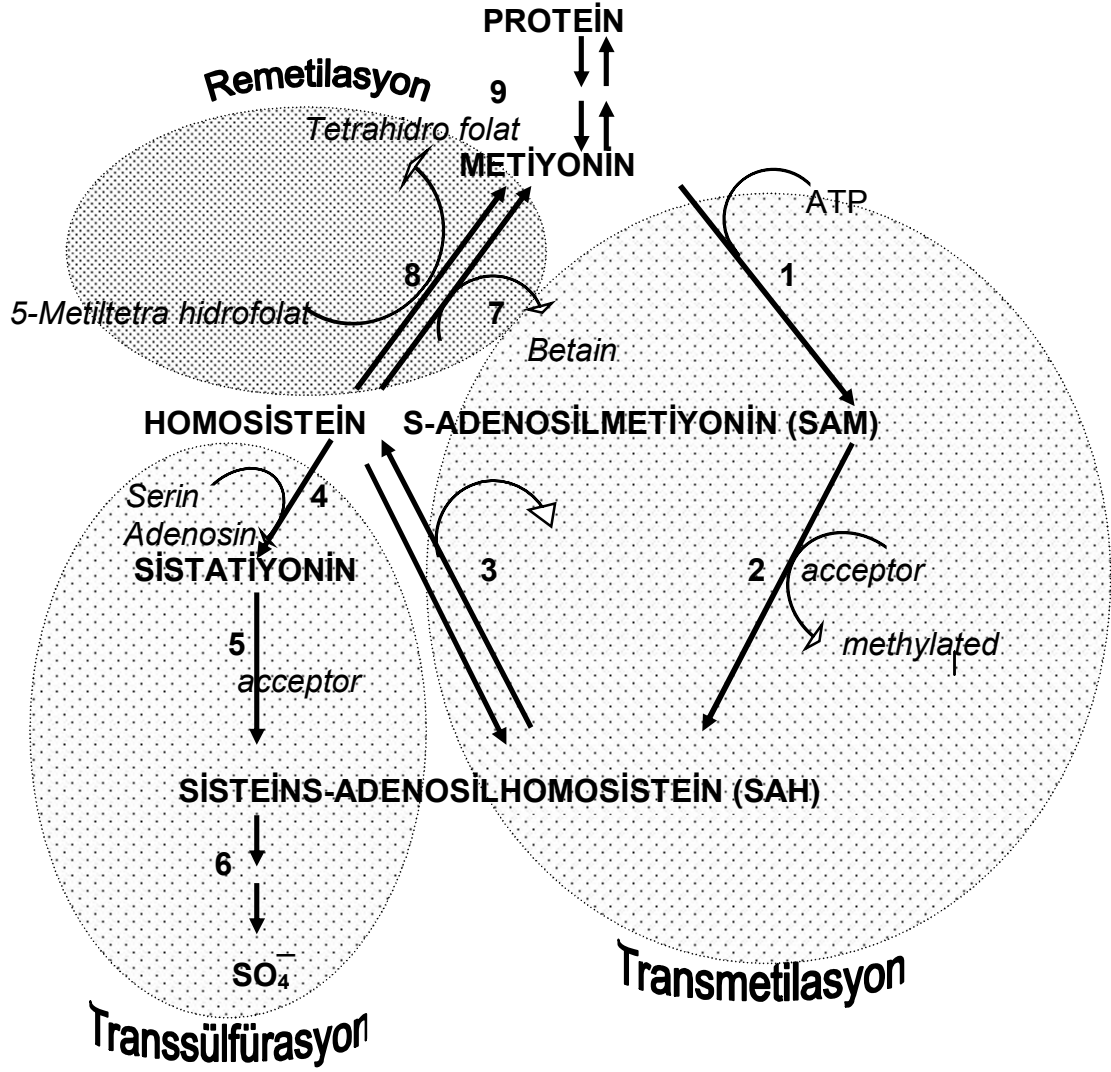
Metiyoninin demetilasyonu ile oluşmuş bir tiol olan Homosistein'in yapısı şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Homosisteinin Yapısı.

Homosistein metabolizmasında remetilasyon ve transsülfürasyon olmak üzere başlıca iki yol vardır (37).

Her iki yol da aynı öneme sahip olup aynı oranda kullanılmaktadır. Diyetle alınan metyoninin, metiyonin adenzil transferaz enzimi ile demetile olarak metil verici olan S-Adenosilmetiyonin'e (SAM), SAM ise yapısında bulunan metili, glisin gibi metil alıcılarına vererek çoklu transferaz enzimi ile S-Adenosilhomosistein'e (SAH) dönüştürmektedir (Şekil 2). S-Adenosilhomosistein hidrolaz enzimi tarafından homosistein ve adenosine ayrılmakta, meydana gelen homosistein ise hem metilasyona girerek metiyonine hem de serin ile birleşerek sistatyonine dönüşmektedir (38).



1- Metiyonin Adenzil Transferaz (Metiyonin ve ATP' den SAM sentezini katalizler). 2- Transmetilasyon Reaksiyonları. 3- S-Adenzilhomosistein Hidrolaz (SAH' ın dönüşümlü hidrolizi ile Adenzin ve Homosisteine dönüşümünü sağlar). 4- Sistatyonin β -sentez (Homosistein ve Serin' den Sistatyonin oluşumunu sağlar). 5- γ -sistatyonaz (Sistatyoninden sistein oluşumunu sağlar). 6- Sisteinin sülfata dönüşümü. 7-Betaine-homosisteine metiltransferaz (Betain gerektiren bir reaksiyonla Homosistein' den Metiyonin sentezini sağlar). 8- Metiyonin sentaz (Folat ve B₁₂ vitamininin normal düzeylerde olmasını gerektiren bir reaksiyonla Homosisteinden Metiyonin sentezini katalize eder). 9- Serbest metiyonin ve protein halindeki metiyonin arasındaki denge

Şekil 2. Metiyonin ve Homosistein Metabolizması

3.2.1.1. Transmetilasyon

Metiyonin metabolizmasının ilk aşamasını yüksek enerjili sülfonyumun aktivasyonu oluşturmaktadır. S-adenosilmetiyonin transferaz etkisiyle oluşan SAM guanidinoasetik asitten kreatinin sentezi, sarkosinden glisin metilasyonu, DNA ve RNA metilasyonu, norepinefrini de kapsayan nörotransmitterlerin sentezi gibi birçok transmetilasyon reaksiyonu için metil vericidir. Transmetilasyon reaksiyonunun bir ürünü olan SAH, SAH hidrolaz enziminin etkisiyle homosistein ve adenosine hidrolize olur. SAH hidrolaz reversible bir enzimdir. Homosistein ve adenosinin hızlı metabolizması SAH hidrolaz'ın invivo artışıyla dengelenmeye çalışılır. S-Adenosilhomosistein gibi önemli bir regülatör, transmetilasyonun kuvvetli bir inhibitörüdür (39-41). Bu yüzden homosisteinin SAH sentezinden sonra değişime uğraması gerekmektedir. Bu iki farklı yolla sağlanır;

- 1- Remetilasyonla metiyonine dönüşmesi
- 2- Transsülfürasyon yoluyla sistein formuna dönüşümü (40).

3.2.1.1.1. Remetilasyon

Homosisteinin metiyonine geri dönüşümü iki enzimden biri aracılığıyla olur;

- 1- Kobalamine bağlı metiyonin sentaz veya
- 2- Betaine-homosistein metiltransferaz

Metiyonin sentaz, 5-metiltetrahidrofolattan homosisteine metil grubunun transferini katalize eder ve metiyoninin şekillenmesini sağlar. Bu metil transferi enzime bağlı kobalamin parçasıyla başlar. Betaine-homosistein metiltransferaz benzer bir reaksiyonu katalize eder. Bununla beraber folat birikiminden

bağımsızdır. Bu işlem betaini faydalı biçime getirir. Metiyonin sentezi için bir metil verici olarak kolin metabolizmasının bir metaboliti kullanılır. Homosisteinin remetilasyonunda orijinal metiyonin bileşiğinin sülfür atomu ve karbon iskeletinin korunduğu gözlenir (40).

3.2.1.1.2. Transsülfürasyon

Metiyonin ve homosisteinin karbon ve sülfür gruplarının katabolizması transsülfürasyondaki oksidasyonlarla gerçekleşmektedir. Transsülfürasyon yolağının ilk basamağı, serin ve sistatyonin β -sentaz'ın etkisi ile homosisteinin sistatyonin formuna dönüşmesidir. Sistatyonin başka bir enzim olan γ -sistatyonaz'ın etkisi ile esasiyel olmayan aminoasit, sistein, sülfat, α -ketobütürat ve NH_4^+ formuna metabolize edilmektedir. Sistein, serinin karbon iskeleti ve metiyonin veya homosisteinin orijinal sülfür parçalarını içeren formu olup protein, glutatyon sentezi için kullanılır veya diğer katabolizma ürünlerine dönüştürülür. Metiyonin veya homosisteinin karbon iskeleti α -ketobütürat formunda, purüvat hidrogenaz veya ketoasit dehidrogenaz kompleksinin zincirlerinden birisiyle intramitokondrial olarak oksitlenir ve süksinil Co A ile TCA siklusuna girer (40, 42).

3.2.2. Homosisteinin Dokulardaki Dağılımı

Transmetilasyon, remetilasyon ve transsülfürasyon mekanizmalarının içerdiği enzimlerin tümü sitoplazmik komponentlerde bulunur (α -ketobütüratın oksidasyonunu kapsayan enzimler hariç). Bu enzimlerin dokulardaki dağılım profili oldukça geniştir (40, 43). Ratlarda belirtilen enzimlerin bütün önemli

aktivitesi karaciğerdedir. Tüm vücudun aminoasit ekonomisinde karaciğer rol oynar. Transmetilasyon ve transsülfürasyon mekanizmasının etkili tüm enzimlerin aktiviteleri özellikle bu dokuda zengindir. Karaciğerin haricinde pankreas ve böbreklerde bu enzim aktiviteleri görülebilir. Aksine metiyonin sentaz ve metilentetrahidrofolat redüktazın özel aktiviteleri bütün dokularda olmasa da çoğunda yüksektir. Homosisteinin remetilasyonundaki enzimlerin yapısı dokulardaki homosistein miktarının regülasyonu için özel bir ihtiyaç gösterebilir. Diğer remetilasyon enzimi (betaine-homosistein metiltransferaz) o kadar etkin değildir. Ratlarda sadece karaciğerde bu enzimlere rastlanabilir (40, 43). Bununla birlikte domuz ve insan gibi diğer türler böbreklerinde bu enzimlerin ölçülebilir aktivitelerine sahiptirler (44).

3.2.3. Homosisteinin Regülasyonu

Homosistein metabolizmasının düzenlenmesi arametabolitlerin miktarı, diyet içeriği gibi birçok faktörün etkisi ile gerçekleşmektedir. Örneğin remetilasyon ve transsülfürasyon yollarıyla homosistein değişiminin SAM ve SAH gibi etkili metabolitler tarafından düzenlendiği görülür. Metiyonin içeren bir öğünün tüketimini takiben hepatik SAM düzeyi artar, bu sistatyonin- β -sentaz aktivasyonu ile SAM fonksiyonunu artırır ve metilentetrahidrofolat redüktazı inhibe ederek homosisteinin remetilasyonu sınırlandırılır (40, 43). Bu aşamalar fazla miktardaki metiyoninin sistein sentezine doğru değiştirilerek yeter miktardaki metiyonini sağlamaya yardımcı olur. SAH, sistatyonin- β -sentazın bir aktivatörü olduğundan transsülfürasyon yoluyla homosistenin değişimini sağlamak için SAM ile sinerjik olarak çalışır. SAH tarafından sistatyonin β -

sentazın aktivasyonu transmetilasyonun inhibisyonu ve aşırı derecede SAH birikimini kontrol etmek için çalışır (45).

3.2.4. Plazma Homosisteini

Plazma konsantrasyonunu etkileyecek olan dokulardaki homosistein metabolizmasıdır. Plazma homosisteini dokular tarafından homosisteinin alınması ve dokulardan homosisteinin uzaklaştırılması arasındaki denge ile yönetilir. Her iki kademede veya birindeki bozukluk homosisteinin plazma konsantrasyonunun değişmesine yol açmaktadır. Plazma homosisteini üzerine etkili olan önemli faktörler geniş bir şekilde sınıflandırılabilir; farmakolojik, beslenme, hormonal dengesizlik, yaşam şekli ve genetik faktörler gibi (37, 46). Bu faktörleri birkaç başlık altında toplamak mümkündür.

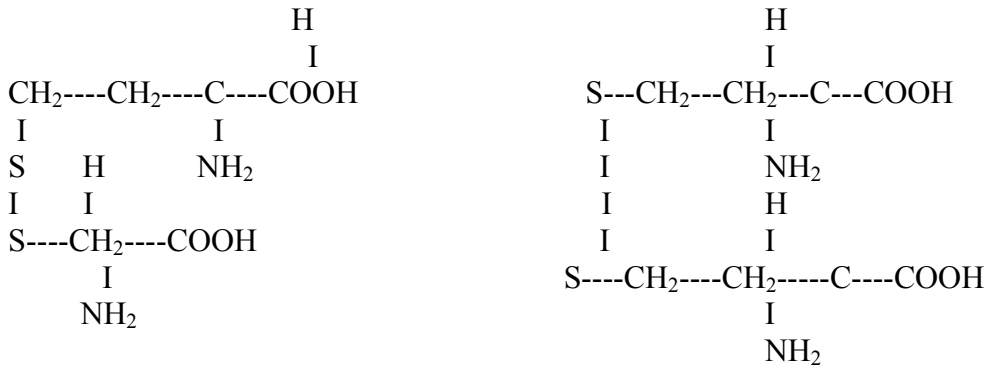
3.2.5. Homosistein Formları

3.2.5.1. Homosistein-Sistein Karışımı Olan Disülfid

Bu form ilk kez 1978 yılında Wicken ve Dudman (47) tarafından açlıkta erkeklerin plazmasında asit ile deproteinize edilerek saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda erkeklerde kadınlara oranla homosistein düzeyinin yüksekliği ve bu formun varlığına ait bulgular kanıtlanmıştır (48, 49). Jousilathi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (50), premenapozal kadınlarda açlık sonrası ve metiyonin yüklemesi yapıldıktan sonra ölçülen homosistein-sistein karışımının erkeklerin ve postmenapozal kadınların homosistein düzeylerine oranla daha düşük bulmuşlardır.

3.2.5.2. Total, Proteine Bağlı ve Serbest Homosistein

Proteine bağlı homosistein formu ilk kez Kang ve arkadaşları tarafından (51) saptanmıştır. Bu form yaklaşık olarak total homosisteinin %70'ini oluşturmaktadır. Daha sonra yapılan çeşitli çalışmalarda serbest olmayan homosisteinin büyük çoğunlukla albumine bağlandığı belirlenmiştir. Taze hazırlanmış plazmanın asit ile deproteinizasyonu sonucu prespite olan kısım proteine bağlı olan homosisteini yansıtmakta, çözünür olan kısım ise serbest homosisteini oluşturmaktadır. Bu kısım homosistein-sistein disülfid, homosistin ve homosistein içermektedir. Proteine bağlı olan kısım ile çözünür olan kısmın bileşimi total homosisteini oluşturmaktadır.



Homosistein sistein disülfid

Homosistin

Şekil 3. Homosistein formları (25).

3.2.6. Homosistein Düzeyleri ve Ölçümü

Homosistein düzeyleri genel olarak total plazma homosisteini ya da total serum homosisteini olarak ölçülmektedir. Bu ölçüm serbest ve proteine bağlı olan kısmı içermektedir. İnsanlarda normal total plazma homosistein düzeyi 5-15 µmol/L arasında olmasına rağmen bazı araştırmacılar tarafından 12-15 µmol/L olan düzeyleri sınır olarak kabul edilmektedir (34). Ancak homosisteinin normal

düzelelerini belirlerken bazı parametrelerin göz önüne alınması gerekmektedir. Yapılan bir araştırmada plazma homosistein düzelelerinin yaşlanma ve cinsiyet (erkeklerde) ve postmenapozal kadınlarda artış gösterdiği saptanmıştır (50). Sağlıklı bireylerde homosistein artışından şüphede edildiğinde oral metiyonin yükleme testi yapılabilmektedir. Bu test oral metiyonin verilmesini müteakiben hücre içi homosistein üretimi ve kullanımı arasındaki dengeyi araştırılmasını amaçlamaktadır. Kişiye metiyonin 100 mg/kg dozunda verilmeden önce ve verildikten sonra 6. ve 8. saatlerde plazma homosistein ölçümü yapılmaktadır. Metiyonin yüklemesinden sonra ölçülen oran, açlık düzeyine göre 2 standart deviasyondan daha fazla ise test anlamlıdır (47). Bu durum homosistein metabolizmasındaki muhtemel bir defekti göstermektedir.

Homosistein ölçümü için kullanılan yöntemlerden bazıları, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (52), aminoasit kromatografisi (29), gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GCMS) (30), ELISA ve radyoenzimatik ölçümdür (53).

3.2.7. Hiperhomosisteinemi Nedenleri

İnsanlarda plazma homosistein düzelelerinin 15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde olması "hiperhomosisteinemi" olarak kabul edilmektedir (34). Plazma homosistein düzeleleri hem genetik hem de besinsel olarak düzenlenmektedir. Hiperhomosisteinemini oluşumunda yer alan besinsel nedenler arasında homosisteinin metabolize edilebilmesinde kofaktör olarak görev yapan folik asit, vitamin B₆ ve vitamin B₁₂'nin kısmi ya da tam eksikliği sayılabilmektedir. Genetik nedenler arasında ise homosisteinin metabolize olmasında görevli

enzimlerin genetik olarak yetersizliği sonucu, plazma homosistein düzeylerinin yükselmesi bulunmaktadır. Birçok araştırmacı hiperhomosisteinemiye sınıflandırmışlar ve bu sınıflandırmada çeşitli faktörleri göz önüne almışlardır. Bunlardan biriside Fallest-Strobl ve arkadaşlarının yaptığı sınıflandırmadır (35). Bu sınıflandırma yapılırken edinsel, genetik, kronik hastalıklar ve ilaç kullanımına bağlı nedenler ana başlıklar olarak kullanılmıştır. Bu sınıflandırmaya ek olarak hiperhomosisteineminin nedenleri arasında çeşitli fizyolojik nedenler de ilave edilmiştir. Ayrıca akut lenfoblastik lösemi, hipogonadizm, kronik atrofik gastrit, malabsorbsiyon sendromları, gastrointestinal sistem cerrahileri, patolojik gebelikler ile ilaçlardan niasin, siklosporin ve steroidler de nedenler arasında yer almaktadırlar (54).

3.2.7.1. Genetik Nedenler

Homosistinüri idrarla fazla miktarda homosistein çıkışı ile karakterize bir hastalıktır (33, 55). Doğumsal metabolik bir bozukluk olan homosisteinürinin toplumda görülme sıklığı 1/200.000 olup, İrlanda ve İsveç gibi bazı ülkelerde daha sık bir oranda rastlanmaktadır. Homosisteinüri görülen kişilerde sistationin β -sentaz ve metilentetrahidrofolat (MTHFR) eksikliği vardır. Homozigot ve heterozigot formları tanımlanmış olup en yaygın ve en ağır görülen formu homozigot olan formudur. Homosistinüride enzim aktivitesi %0-2 arasındadır. Bu enzim geni 21. kromozomda bulunmaktadır. Çok farklı mutasyonları olup plazma homosistein düzeyleri, mutasyonların farklılığına göre değişim göstermektedir. Genel klinik bulgular arasında mental gerilik, prematüre vasküler hastalık, ektopia lentis, iskelet deformiteleri ve tromboembolizm sayılmaktadır (47).

Tanıda plazma ve idrar homosistein düzeylerinin yüksekliği önemlidir. Sistationin β -sentaz eksikliğinde plazmada yüksek metiyonin ve düşük ya da normal sistationin düzeyleri bulunmaktadır (32).

Yapılan bir çalışmada (56) kongenital kalp defektli çocuklara sahip annelerde plazma homosistein düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiş ve oluşan bu defektlere hiperhomosisteineminin neden olabileceği düşünülmüştür.

3.2.7.2. Edinsel Nedenler

3.3.7.2.1. Vitamin Eksiklikleri

Hiperhomosisteineminin etiolojisinde en sık rastlanan neden vitamin eksikliğidir. Bu nedenle hiperhomosisteinemi tanısı konulan şahıslara ilk uygulanan tedavi yönteminde vitamin takviyesini içermektedir (57).

3.2.7.2.1.1. Folik Asit Eksikliği

Folik asit birçok besinde özellikle ıspanak, marul, pırasa gibi yeşil yapraklı sebzelerde, meyvelerde ise en fazla limon, muz ve kavunda bulunmaktadır (58). Günlük ihtiyaç 50 μ g olup toplam vücuttaki miktarı ise 5 mg kadardır. Folik asitin günlük alımı günlük ihtiyacın onda birine düşerse 4 ay içerisinde megaloblastik anemi gelişmektedir. Folik asit gereksinimi hemolitik anemilerde, alkolizmde, büyüme çağında, gebelikte ve laktasyonda artmaktadır (59).

Folik asit, homosistein metabolizmasında çok önemli bir yere sahiptir. Homosisteinin metiyonine dönüşümünde vitamin B₁₂ ile birlikte remetilasyon basamağında görev almaktadır. Eksikliğinde ise plazma homosistein düzeylerinin

yükselmesi neticesinde periferik vasküler bozukluklar ve son yıllarda önemle üzerinde durulan doğumsal nörolojik rahatsızlıklar meydana gelmektedir.

Morrison ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (60), 5056 kişiye 15 yıl süreyle klinik takip uygulamışlar ve folat eksikliği olanlarda koroner arter hastalığını folat seviyesi yüksek olanlara oranla 1.69 kat daha yüksek bulmuşlardır. Rimm ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada (61), kadınlarda koroner kalp hastalığı risk faktörlerini kontrol altına alarak 14 yıllık bir izleme sonunda, yeterli miktarlarda folik asit ile B₆ vitamini kullananlarda, KKH ve buna bağlı olarak miyokard infarktüsü gelişiminde bu vitaminleri almayanlara oranla bir azalma tespit edilmiştir.

Birçok çalışmada, folik asitin eksikliğinde homosistein düzeyinin yükseldiği gözlenmiştir (49, 57). Plazma folik asit miktarı normal olmasına rağmen bazı durumlarda doku folik asit eksikliği de oluşabilmektedir.

3.2.7.2.1.2. Vitamin B₁₂ (Kobalamin) Eksikliği

B₁₂ vitaminin etkin 4 formu bulunmaktadır;

Siyankobalaminler: Vücutta çok az bulunan formudur.

Hidroksikobalaminler: Vücutta en fazla bulunan formudur.

Adenozilkobalaminler: Kobalamin amid türevidir. Koenzim fonksiyonu görmektedir.

Metilkobalaminler: İnsan plazmasının en fazla bulunan formudur. Erişkinlerde günlük gereksinim miktarı 5 µg dır. B₁₂ vitamini özellikle homosisteinin metiyonine dönüşümündeki remetilasyon basamağında etkilidir. Metiltetrahidrofolat, homosistein metiltransferaz enzimi ve B₁₂ vitamini etkisi ile

homosisteini metilleyerek metiyonine dönüştürmektedir. Diğer görevli olduğu basamak ise propiyonatın metabolizması sonucu oluşan metil malonil CoA' nın süksinil CoA' ya dönüşümüdür (62).

Vitamin B₁₂'nin taşınmasını sağlayan transkobalaminin yokluğu da eksikliğe yol açmaktadır. Yapılan birçok çalışmada B₁₂ vitaminin eksikliğinde homosistein düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (30, 62).

3.2.7.3. Kronik Hastalıklar

Homosisteinin atılımı böbreklerden olmaktadır. Bu nedenle böbrekleri etkileyen hastalıklar homosistein düzeylerini yükseltmektedir. Özellikle akut ve kronik böbrek yetmezliklerinde plazma homosistein düzeyleri artış göstermektedir (63, 64). Çeşitli malign hastalıklarda (lösemi, lenfoma, over, meme, pankreas kanserleri) hücrelerin yeterince olgunlaşmadan kana salınımları, homosisteinin metabolizmasında görev alan enzimlerin yeterince gelişmemesi, ayrıca transforme hücrelerin endojen homosisteini metabolize edememelerinden dolayı homosistein düzeyleri yükselmektedir (65). Psöriasisli vakalarda ve diyabetlilerde de plazma homosistein düzeyleri artmakta olup nefropati, retinopati ve koroner kalp hastalığı olan komplikasyonlu diyabetik hastalarda düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada (66), diyabetik hastalarda plazma homosistein düzeyinin glomeruler filtrasyon hızıyla ters orantılı, serum kreatin düzeyleri ve sigara içimi ile ise doğru orantılı olarak arttığı bulunmuştur. Hipotroidili hastalarda da plazma homosistein düzeyinin yükseldiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda hipotroidik kişilerde glomerular filtrasyon hızının düşüklüğü ve buna bağlı olarak homosisteinin yeterince atılmadığı, ayrıca homosisteinin metabolize olmasını

sağlayan metiltetrahidrofolatreduktaz (MTHFR) enziminin gereksinim duyduğu kofaktörü flavin adenin dinükleotid (FAD) bileşiğinin yapısal bozukluğu hiperhomosisteineminin nedeni olarak gösterilmektedir (67). Gastrointestinal cerrahilerde mideye yapılan girişimlerde pariyetal ve diğer mide bezleri hasara uğramakta, vitamin B₁₂'nin emilimini sağlayan intrinsik faktör (IF) salınımı bozulmakta ve böylece hiperhomosisteinemi meydana gelmektedir. Ayrıca bağırsakların yapısını bozacak olan cerrahi girişimlerde homosistein metabolizmasında görevli olan vitaminlerin emiliminin gerçekleşmemesi sonucu olarak da serum homosistein düzeyleri yükselmektedir. Nöral tüp defektli fötüs taşıyan annelerde de homosistein düzeyleri yüksek bulunmuştur (68). Homosisteinin sentezinde ve metabolizmasında karaciğer merkezi bir rol oynar. Metiyoninin büyük çoğunluğu bu organda metabolize olur. Karaciğer, metiyonin ve homosistein metabolizmasında görev alan genlerin ekspresyonunda özel bir yapıya sahiptir. Metiyonini SAM'a dönüştüren 2 tür MAT geninden biri olan MAT1A sadece karaciğerde exprese olur. Öte yandan betaine-homosistein metiltransferaz (BHMT) ve Systationin β-Sentetaz (CBS)'nin sentezi de temelde karaciğer ile sınırlıdır. Bu nedenlerden dolayı karaciğer hasarı olduğunda homosistein metabolizmasında önemli değişiklikler meydana gelmektedir (69-71). Nitekim yapılan birçok çalışmada da karaciğer hastalıklarında (Siroz, hepatit gibi) homosistein düzeyleri yüksek bulunmuştur (69, 70, 72).

3.2.7.4. Fizyolojik Nedenler

Erkeklerde kadınlara oranla homosistein düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (73). Bu fark özellikle menapozdan önce daha anlamlı iken menapoz

ve sonrasında aradaki fark kapanmaktadır. Postmenapozal dönemdeki kadınlarda homosistein düzeyleri ile östradiol düzeyleri arasında ters orantılı bir ilişki mevcuttur. Bu durumdaki kadınlara uygulanan hormon replasman tedavisi ile homosistein düzeyleri azaltılabilmektedir (74). Ayrıca yaşlanma da plazma homosistein düzeylerinin artışına yol açan fizyolojik nedenler arasında gösterilmiştir (31).

3.2.7.5. İlaçlar

İlaç hiperhomosisteinemi gelişiminde oldukça önemli bir role sahiptir. Genel anesteziye kullanılan nitroz oksit çok kuvvetli metiyonin sentaz inhibitörüdür (75). Antiepileptik ilaçlardan karbamazepin, valproik asit, fenotionin ve metotreksat gibi ilaçlar vitaminlerin emilimini engelleyerek folat metabolizmasını bozmakta ve plazma homosistein düzeylerini yükseltmektedirler (76). Kolesterol düşürücü ilaçlardan bazıları olan kolestipol ve niasin de homosistein metabolizmasını etkilemektedirler (77). Atrovastatin ve fibrat türü kolesterol düşürücü ilaçları kullananlarda da plazma homosistein düzeylerinin yükseldiği tespit edilmiştir (71, 78). Astım tedavisinde bronkodilatör olarak kullanılan teofilin, pridoksal fosfat sentezini antagonize ederek hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır.

3.2.8. Homosistein, Koroner Arter ve Vasküler Hastalıklar

Homosisteinin koroner kalp hastalıkları (KKH) ve vasküler hastalıklar ile ilişkisi uzun yıllardan beri bilinmektedir. Birçok araştırma, koroner kalp hastalığı için plazma homosistein yüksekliğinin bağımsız bir risk faktörü olduğunu

göstermiştir (79, 80). MTHFR enzim eksikliği olanlarda koroner kalp hastalığı riski en az iki kat artmıştır (81). MTHFR enziminin popülasyonda görülme sıklığı %5 iken, koroner kalp hastalığı olanlardaki oranı %17'dir (44). Ayrıca koroner kalp hastalığı olanlarda homosistein düzeylerine bakılmaksızın vitamin B₁₂ ve folat düzeyleri araştırılmış, sağlıklı olan gruba oranla KKH olan grupta bu vitaminlerin serum düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (30, 82). Clark ve arkadaşları (83), metiyonin yükleme testleri yapılan koroner kalp hastalarının %30'unda ağır hiperhomosistenemi saptanmıştır. Robinson ve arkadaşları (84), yaklaşık 750 hasta grubunu 800 kontrol grubu ile karşılaştırmışlar ve plazma homosisteininin düzeylerini periferik, serebral ve koroner arter hastalıklarına sahip olanlarda yaklaşık %80 artmış olarak bulmuşlardır. Yapılan kapsamlı bir çalışmada (50), 5 yıl boyunca 15.000 hasta gözlemlenmiş ve bu hastalarda periyodik olarak homosistein düzeylerine bakılmıştır. Miyokard infarktüsü geçirme oranlarına bakıldığında serum homosistein düzeyleri 15 µmol/L den düşük olan hastaların sadece %5'inin miyokard infarktüsü (MI) geçirdikleri, 15 µmol/L den yüksek homosistein düzeyine sahip olan hastaların %90'ının MI geçirdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek homosistein düzeylerinin serebrovasküler olayları ve venöz tromboz riskini artırdığını gösteren birçok çalışma vardır (58, 80, 85). Tekrarlayıcı tromboembolik atakların %25'inde, ilk defa geçirenlerin ise %10'unda plazma homosistein düzeylerinde yükseklik saptanmıştır (86).

3.2.9. Hiperhomosisteinemi ve Mekanizması

Homosisteinüri nedenli ölümlerde yapılan incelemelerde arteriyel ve venöz tıkaçlar, odakal venöz patolojiler, koroner, serebral ve karotid arterlerde

aterosklerotik değişiklikler saptanmıştır. Daha sonra araştırmacılar bu değişikliklerin sadece homosisteinüride olduğu gibi genetik nedenli hastalıklarda değil, hiperhomosisteinemi olan diğer hastalıklarda da meydana geldiği gözlemlenmiştir (87). Hiperhomosisteinemi patogenezisine yönelik birçok çalışma yapılmış ve bu araştırmalar sonucunda genelde homosisteine bağlı aterojenik olaylar iki alanda toplanmıştır. Bunlar damar endotelindeki fonksiyonel anomaliler ile endotel hasarı ile başlayıp bunu takip eden trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu ve trombüs formasyonu sonucu endotel üzerine daha toksik etki göstermektedir (55).

Bu etkisini, homosisteinin taşıdığı sülfür gruplarının otooksidasyona uğraması, hidrojen peroksiti katalizlemesi ve endotelde fonksiyonel bozulmaya neden olması ile gösterdiği belirlenmiştir (88). Homosistein düzeylerinin artmasının bir sonucu da endotelde bulunan ve lipid peroksidasyonunu engelleyen glutasyon peroksidaz aktivitesinin baskılanmasıdır (89). Araştırmacılar yaptıkları bir çalışmada homosisteinin timidin alınımında ve siklik-mRNA düzeylerinde artışa yol açtığını bunun sonucunda damar düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olduğunu ve sonuç olarak endotel hasarı yaptığı saptamıştır (90). Ayrıca homosistein düzeylerinin artması, tromboksan B₂ sentezini ve tromboksan A₂ aktivitesini artırmakta bu da damarın endotel yapısında spazm ve iskemi oluşturmaktadır (91). Homosistein ayrıca düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonuna neden olarak LDL'nin plazmadan temizlenmesini sağlayan reseptörlere bağlanmasını engellemekte, okside LDL'nin serum düzeyini artırmakta ve endotelde köpük hücrelerine dönüşümlerini sağlayarak ateroskleroza zemin hazırlamaktadır. Homosisteinin yukarıda belirtilen tüm etkileri sonucunda

damar endoteli hasara uğramakta, yapısı bozulmakta, trombotik eğilim artmakta ve lipidler okside olmaktadır. Bu mekanizmalar sonucunda plazma kolayca koagüle olmakta, bu da koroner kalp hastalığı başta olmak üzere periferik arter hastalıklarına neden olmaktadır. Stampfer ve arkadaşları (88) yaptıkları çalışmada homosisteinin, vasküler endoteli koruyucu özelliği olan nitrik oksit (NO) salınımını azalttığını, salınan nitrik oksitle homosisteinin birleşerek S-nitroso-homosisteine dönüştüğünü ve bu bileşiğin antitrombosit ve endotele toksik etki gösterdiğini saptamışlardır. Koagülasyon sisteminde normalde trombomodülin protein C'yi aktif hale getirmekte, aktif protein C ise Faktör V ve Faktör VIII'ı inaktive ederek trombin oluşumunu önlemektedir. Ancak homosistein, trombomodülin bağımlı protein C aktivasyonunu engelleyerek trombotik etki yapmaktadır (88).

3.2.10. Hiperhomosisteinemi Tedavisi

Hiperhomosisteinemi tedavisinde ilk basamak, homosisteinin temel kaynağı olan metiyoninin kısıtlanmasıdır. Metiyoninin temel kaynağı ise hayvansal besinler özellikle kırmızı ettir. Bu nedenle homosistein düzeylerini düşürmede, kişisel beslenmenin düzenlenmesi büyük bir önem taşımaktadır (82).

Tedavide ikinci ve en önemli basamak ise homosisteinin metabolize olmasını sağlayan enzimlerin kofaktörü olan vitamin B₁₂, vitamin B₆ ve folik asit alınımıdır (64). Birçok çalışmada folik asit, vitamin B₁₂ ve vitamin B₆'nın yüksek homosistein düzeyleri ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (49, 62, 68, 79, 92). Yapılan bir çok çalışmanın ortak analizinde günlük 0.5-5.7 mg folat verilmesi homosistein düzeyini yaklaşık altı hafta sonunda %25 oranında azaltmaktadır.

Ayrıca vitamin B₁₂ verilmesi ile %7 daha azalmaktadır (62, 82). Sağlıklı bireylerde de folat uygulamasıyla homosistein düzeyleri azalmaktadır (93). Sistatyonin β -sentetaz aktivitesinin yokluğu ile karakterize homosisteinüride vitamin B₆ verilmesinin yüksek olan homosistein düzeyini azalttığı gösterilmiştir (32). Rimm ve arkadaşları (61) 14 yıl boyunca bireylerin beslenme alışkanlıklarını incelemişler, folat ve vitamin B₆ alan bireyleri aldıkları dozlara göre sınıflamışlar, günde 0.4 mg dan daha fazla folat, 3 mg dan daha fazla vitamin B₆ alan grupta homosistein düzeylerini ve koroner arter hastalığını en az, düşük dozda vitamin alan grupta ise en fazla bulmuşlardır.

Tek başına B₆ vitamini verilmesi plazma homosistein düzeyinde anlamlı düşüşler meydana getirmemektedir. Folat alımının günlük 100 μ gr artırılması ile homosistein düzeyinde bir ayda yaklaşık olarak %6'lık bir düşüş olacağı ve buna bağlı koroner kalp hastalığı riskinin %5 azalacağı saptanmıştır (31, 94).

Son yıllarda tedavi yaklaşımı, kombine olarak vitamin verilmesi yönündedir. Günlük olarak 400 μ gr folat, 5 mEq'dan daha az demir, 1-2 μ gr vitamin B₁₂, 10-40 mg B₆ vitamini içeren multivitamin kompleksi ve ek olarak 800 μ gr folat verilmektedir. Tedaviye 8-10 hafta devam edilerek homosistein düzeyleri önemli ölçüde düşürülmektedir (28).

3.3. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler

Bunlar bitkiler tarafından sentezlenen ikincil metabolizma ürünleri olup haberci olarak, mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar. Bu nedenle bunlar karbonhidrat, protein ve yağların sentezinden sonra “ikincil bitki ürünleri” veya “fitokimyasallar” diye adlandırılırlar (95).

3.3.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerin temel bileşenlerindedir. Bitkilerin ve onlardan türetilen ürünlerin besinsel ve organoleptik özelliklerinde önemli rol oynarlar (96-98). Fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidler diye ikiye ayrılırlar.

Fenolik asitler genellikle bitkinin taç kısmında yer alırlar ve antioksidan karaktere sahiptirler. Başlıcaları; gallik asit, protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit gibi hidroksibenzoik asitler ve ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asit gibi hidroksi sinnamik asitleri içermektedir.

Flavonoidler çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikinci metabolitlerin en yaygını olan fenolik bileşiklerdendir. Bunlar renk, tat ve organoleptik özelliklerden sorumludurlar. Flavonoidlerin en önemli biyolojik özelliği, antioksidatif etkiye sahip olmaları gösterilmektedir. Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleri olduğu, flavonoidlerin birçoğunun lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği, yapısındaki bazı grupların flavanoid radikallerinin stabilitesini ve

böylece antioksidan kapasitesini artırabildiği, flavonoidlerin bunların dışında metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir (99).

3.3.2. Kuersetin

Kuersetin bitkilerde en bol bulunan flavonoid olup serbest radikal temizleme açısından tüm doğru yapısal özelliklere sahip olduğu için potansiyel bir antioksidandır (100, 101). Flavonoid ailesine mensup kuersetin, 3 halka ve 5 hidroksil grubundan oluşur. Kuersetin aynı zamanda diğer flavonoidlerin yapı taşıdır. Kuersetin yiyeceklerde glukoz ile birleşmiş halde bulunur. Alınan kuersetinin ancak küçük bir bölümü kana karışır.

Kuersetinin kalp sağlığını koruyucu, kanser riskini azaltıcı, iltihap kurutucu ve anti allerjik etkileri bulunmaktadır. İltihap kurutucu etkisi lipoksijenaz enziminin salgılanmasını sağlamasından kaynaklanmaktadır. Öte yandan kuersetin ksantin oksidaz enzimini azaltarak ürik asit üretimini kısıtlar, gut rahatsızlığında faydalıdır. Kuersetin aynı zamanda hücrelere zarar veren serbest radikaller ile savaşıyor ve kötü kolesterolü düşürücü yönde etki gösterir (101).

Bu çalışma, deneysel olarak karaciğer fibrozisi oluşturulan ratların plazma homosistein düzeyi ve koroner arterlerdeki yapısal değişimleri incelemek ve bu değişimler üzerine kuersetinin etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

Çalışma Mart 2011-Haziran 2011 tarihleri arasında yapıldı. Araştırmada F.Ü. Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edilen ağırlıkları 200-300 gr arasında değişen 2 aylık 40 adet Spraque-Dawley rat kullanıldı. Deneme öncesi ratlar bir hafta boyunca adaptasyon sağlamaları açısından standart rat yemi ve su ile ad libitum olarak beslendi. Ratlar her grupta 10 adet olacak şekilde dört gruba ayrıldı.

4.1.1. Yem Materyali

Rat yemi olarak Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen rat yemi kullanıldı (Tablo 1). Ratlara yem ve su ad libitum verildi. Araştırma F.Ü. Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde yürütüldü. Araştırmada her birine beş adet rat konulabilen özel kafesler kullanıldı. Kafeslerin özel bir bölümüne uçlarında damlalık bulunan ve ratların sürekli taze su alabilmelerini sağlayan şişeler yerleştirildi. Kafesler düzenli olarak temizlendi.

Tablo 1. Ratlara Verilen Yemin Bileşimi, %

Yem Maddeleri	%
Buğday	10
Mısır	22
Arpa	15
Kepek	8
Soya Küspesi	26
Balık Unu	8
Et Kemik Unu	5
Melas	5
Tuz	5
Mineral Karması*	1.25
Vitamin Karması**	1.25

***Mineral Karması (2.500 gr):** Zink Basitrasin (100.000 mg), Mangan (80.000 mg), Demir (80.000 mg), Çinko (60.000 mg), Bakır (8000 mg), İyot (500 mg), Kobalt (200 mg), Selenyum (150 mg), kalsiyum (8000 mg) ve Antioksidan (10.000 mg).

****Vitamin Karması (2.500 gr):** Vitamin A (12.000.000 IU), D₃ (2.400.000 IU), E (30.000 mg), K₃ (2.500 mg), B₁ (3.000 mg), B₂ (7.000 mg), B₆ (4.000mg), B₁₂ (15 mg), Nikotin Amid (40.000 mg), Folik asit (1000 mg), Biotin(45 mg) ve Kolin Klorid (125.000 mg).

4.2. Yöntem

Hayvanlar her grupta 10 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Buna göre araştırma grupları şu şekilde oluştu.

1. Grup (Kontrol Grubu, n=10): 10 haftalık deneme süresince her gün diğer uygulama gruplarında oluşacak olan stresi bu grupta karşılamak için oral besleme sondası ile saf zeytin yağı verilmiştir.

2. Grup [Karbon Tetra Klorür (CCl₄) Grubu, n=10]: 10 haftalık deneme periyodunda her gün 1 ml saf zeytin yağı içerisinde 0.25 mg/kg dozunda CCl₄ oral besleme sondası ile verilmiştir.

3. Grup [Kuersetin (K) Grubu, n=10]: 10 haftalık deneme periyodunda her gün 1 ml saf zeytin yağına ilaveten 150 mg/kg dozunda kuersetin oral besleme sondası ile verilmiştir.

4. Grup [Karbon Tetra Klorür (CCl₄)+Kuersetin (K) Grubu, n=10]: 10 haftalık deneme periyodunda her gün 1 ml saf zeytin yağı içerisinde 0.25 mg/kg dozunda CCl₄ ile 150 mg/kg kuersetin oral besleme sondası ile verilmiştir.

4.2.1. Örneklerin Toplanması

On haftalık uygulama sonunda ratlar eter anestezisi altında dekapite edildi. Bu işlemin hemen ardından daha önceden EDTA ile yıkanmış enjektörlerle a. femoralis'in bifurkasyon bölgesinden girilerek yaklaşık 10-12 ml kan alındı. EDTA'lı kanlar 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan plazma kısmı polipropilen tüplere alınarak yapılacak analizler için -20 °C'deki derin dondurucuda muhafaza edildi.

4.2.2. Plazma Homosistein Düzeyinin Belirlenmesi

Plazma homosistein düzeyleri ELISA (Enzyme linked-immunosorbentassay) yöntemiyle ölçüldü.

Prensip: L-homosistein, enzimatik olarak S-adenozil-L-homosisteine dönüşümü sonucu oluşan anti-SAH antikorlarının ölçümüne dayanmaktadır. Ölçümler ELX800 (USA) cihazında yapılmış olup sonuçlar µmol/L olarak verilmiştir. Çalışmada Axis (biochemicals ASA, Normay) marka ticari kitler kullanılmıştır.

4.2.3. Plazma Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyinin Tayini

Plazma lipit peroksidasyon tayini (Malondialdehit) Placer ve ark. (102)'nin tanımladığı spektrofotometrik yöntemle göre belirlendi.

Prensip: pH'nın 3.4 olduğu aerobik bir ortamda TBA ile plazmanın 100°C'de inkubasyonu, lipit peroksidasyonun sekonder bir ürünü olan malondialdehiti (MDA) oluşturmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturur. Pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipit peroksidasyon saptanır. Belirlenen absorbanans değeri MDA standart eğrisinden ya da standart eğriden hesaplanan 0.0092 sabit rakamına bölünerek plazma MDA değeri nmol/ml olarak hesaplanır.

Standart eğri çizimi için, 1-1,3-3 Tetraethoxypropane'den 10 µl alınarak 10ml absolut etanolde çözdürülüp +4°C'de koyu bir şişede saklandı. Bu stok solüsyondan farklı konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlanarak standart eğri çizilir.

4.2.4. Histopatolojik Metot

Ratlardan alınan karaciğer ve kalp dokuları %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonu içerisine bırakılarak 24 saat süre ile tespit edildi. Bu süre sonunda kalbin koroner arterlerinin değerlendirilmesi amacıyla her rata ait kalp dokuları aynı kısımlarından geçecek şekilde transversal olarak küçültme işlemine tabi tutularak tekrar 48 saat süre tespit solüsyonuna bırakıldı. Tespit solüsyonundan alınan dokular 12 saat çeşme suyunda yıkandıktan sonra rutin klasik işlemlerden geçirilerek parafin blokları hazırlandı. Bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin-eosin (H-E) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi

(103). Oküler mikrometre yardımıyla her hayvana ait kalp kesitlerinde koroner damar çapı ve duvar kalınlıkları ölçüldü. Damar duvar kalınlığının damar çaplarına oranlaması yapıldı.

4.2.5. İstatistiksel Analizler

Araştırmada elde edilen verilerin istatistiksel analizinde SPSS for Windows paket programı yardımıyla çoklu grupların karşılaştırmasında varyans analizi ve Duncan testi kullanıldı (104). Araştırma sonuçlarına ait değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi.

5. BULGULAR

5.1. Karaciğerde Histopatolojik Bulgular

CCl_4 ve CCl_4+K gruplarında karaciğerde histopatolojik olarak bazı değişimler dikkati çekti. Tek başına CCl_4 uygulanan gruba ait karaciğerlerde periportal daha hafif şiddette ise periasiner ve postnekrotik fibrozis, periportal bölgede safra kanalı proliferasyonu ile birlikte oval hücre proliferasyonları ve rejeneratif nodül formasyonları baskın değişimlerdi (Şekil 4A). Periportal alanlarda daha yoğun olmakla birlikte tüm fibrotik alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonu mevcuttu. Ek olarak periportal bölgede belirgin Kupffer hücre aktivasyonları izlendi. Hepatositlerde tek hücre nekrozu, makroveziküler yağ dejenerasyonu, karyomegali, intranükleer inklüzyon cisimciği, apoptozis, asinüs formasyonları ile birlikte hidropik dejenerasyon dikkati çekti. Ayrıca periportal bölgedeki hepatositlerin çift çekirdeğe sahip olduğu görüldü. Periportal bölgede hepatosit sitoplazmalarında ve serbest halde sarı renkte safra pigment birikimleri mevcuttu.

CCl_4+K grubunda periportal alanlarda safra kanal proliferasyonu ve hepatositlerde hidropik dejenerasyon şiddeti tek başına CCl_4 uygulanan grup ile benzerdi. Ancak CCl_4 grubunda anılan diğer tüm lezyonların şiddeti CCl_4+K grubunda daha hafif olarak tespit edildi (Şekil 4B).

Kontrol grubunda karaciğerin normal histolojik görünümde olduğu saptandı (Şekil 4C). Tek başına kuersetin uygulanan grupta (K) ise hepatositlerde hafif şiddette hidropik dejenerasyon mevcuttu (Şekil 4D).

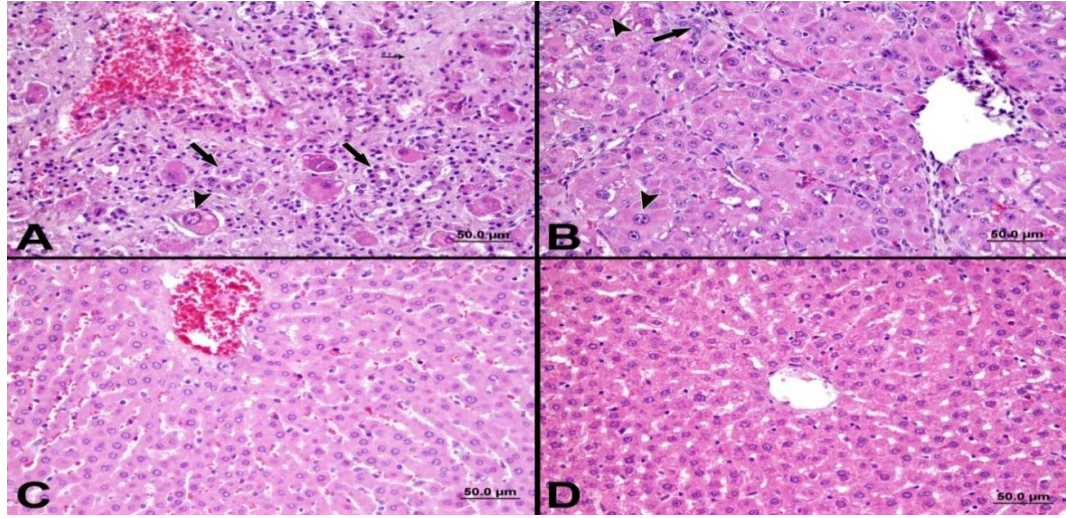
5.2. Araştırma Gruplarında Plazma MDA Düzeyleri

Araştırmada, tüm deneme gruplarına ait MDA ve homosistein düzeyleri Tablo 2’de verilmiştir. MDA düzeyleri bakımından en yüksek değer 2.29 ile CCl₄ grubunda belirlenirken (P<0.05), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık tespit edilmedi (P>0.05). Homosistein düzeyi bakımından en yüksek değer CCl₄ grubunda, en düşük değer ise Kuersetin grubunda tespit edildi (P<0.01).

5.1. Koroner Damarlarda Histopatolojik Bulgular

Tüm gruplara ait ortalama damar çapları ve damar duvarı kalınlıkları ile bunların birbirine olan oranları Tablo 3’de özetlendi. İstatistiksel açıdan anılan değerler arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (P>0.05).

Mikroskopik olarak kontrol ve K gruplarına ait koroner damarlarda herhangi bir değişim kaydedilmedi (şekil 5-6). En belirgin bulgular tek başına CCl₄ verilen gruba ait hayvanlarda kaydedildi. Bu grupta koroner damarların musküler katmanında fibrinoid dejenerasyon ile birlikte kas hücrelerinde vakuoler dejenerasyon tespit edildi. Ek olarak belirgin perivasküler bağ doku artışının şekillendiği dikkati çekti (şekil 7). Koroner arterlerin intima tabakasındaki endotel hücrelerinin bulanık şişme nedeniyle bazal membrandan ayrıldıkları saptandı. CCl₄ ile birlikte Kuersetin verilen grupta ise tek başına CCl₄ verilen gruba göre dejeneratif değişimlerin ve perivasküler bağ doku artışının daha hafif şiddette olduğu gözlendi (şekil 8). Bu grupta endotel hücrelerinde belirgin bir değişime rastlanmadı.



Şekil 4: A. CCl₄ uygulanan grupta hepatositlerde karyomegali (ok başı), safra kanal proliferasyonları (büyük oklar), postnekrotik fibrozis (küçük ok) ve hücre infiltrasyonları, HE x 20. B. CCl₄+K grubunda hafif şiddette fibrozis ve hepatositlerde karyomegali (ok başı) ve safra kanalı proliferasyonu (ok), HE x 20. C. Kontrol grubuna ait karaciğerin histolojik görünümü, HE x 20. D. Kuersetin (K) uygulanan grupta karaciğerin histolojik görünümü, HE x 20.

Tablo 2. Ratlarda MDA ve Homosistein Düzeyleri, (n=10) (X±Sx)

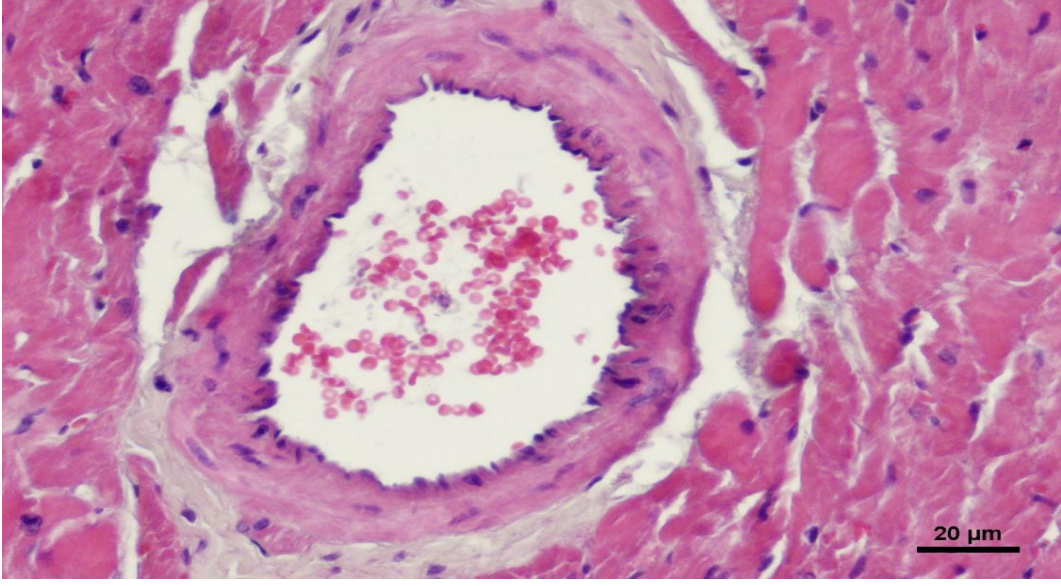
Parametreler	Kontrol	CCl ₄	K	CCl ₄ +K	P
MDA, nmol/ml	1.77 ±0.14 ^b	2.29 ±0.49 ^a	1.62 ±0.07 ^b	1.82 ±0.06 ^b	*
Homosistein, µmol/L	3.73 ±0.11 ^{bc}	4.64 ±0.29 ^a	3.33 ±0.18 ^c	3.93 ±0.19 ^b	**

*: P<0.05, **: P<0.01, ^{a-c}: Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark önemlidir.

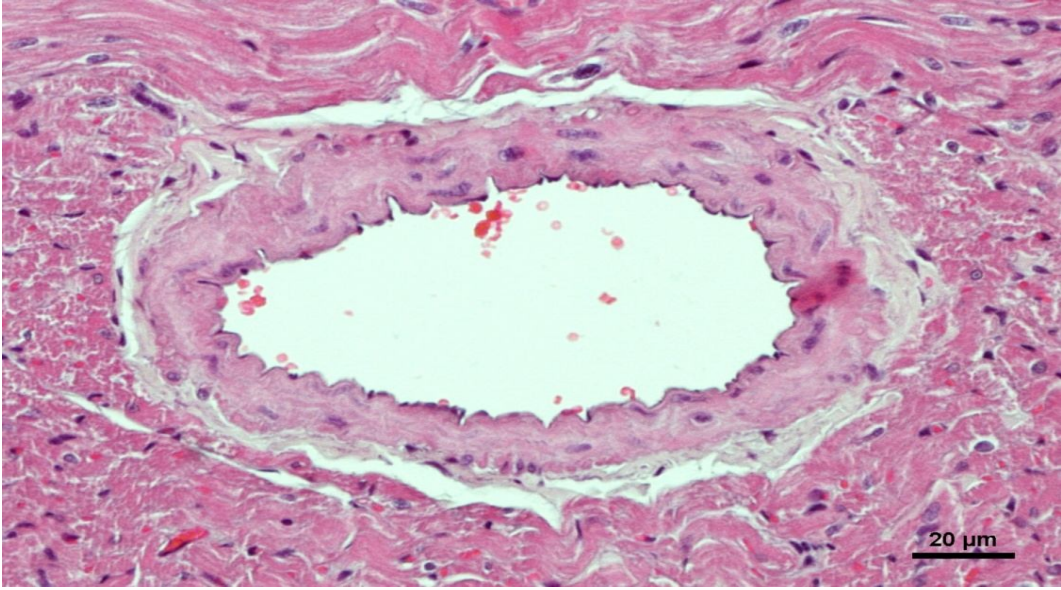
Tablo 3. Koroner Damarların Histolojisine Ait Bulgular, (n=10) (X±Sx)

Parametreler	Kontrol	CCl ₄	K	CCl ₄ +K	P
Ortalama Koroner Arter çapı (µm)	110.19 ± 6.92	109.81 ± 8.86	112.12 ± 9.18	105.19 ± 6.78	ÖD
Ortalama Koroner Arter duvar kalınlığı (µm)	24.04 ± 1.37	27.12 ± 2.37	25.58 ± 1.70	27.31 ± 1.85	ÖD
Çeper kalınlığı (µm) x 100/ Çap (µm)	22.21 ± 1.05	25.38 ± 1.98	24.66 ± 2.24	27.36 ± 1.96	ÖD

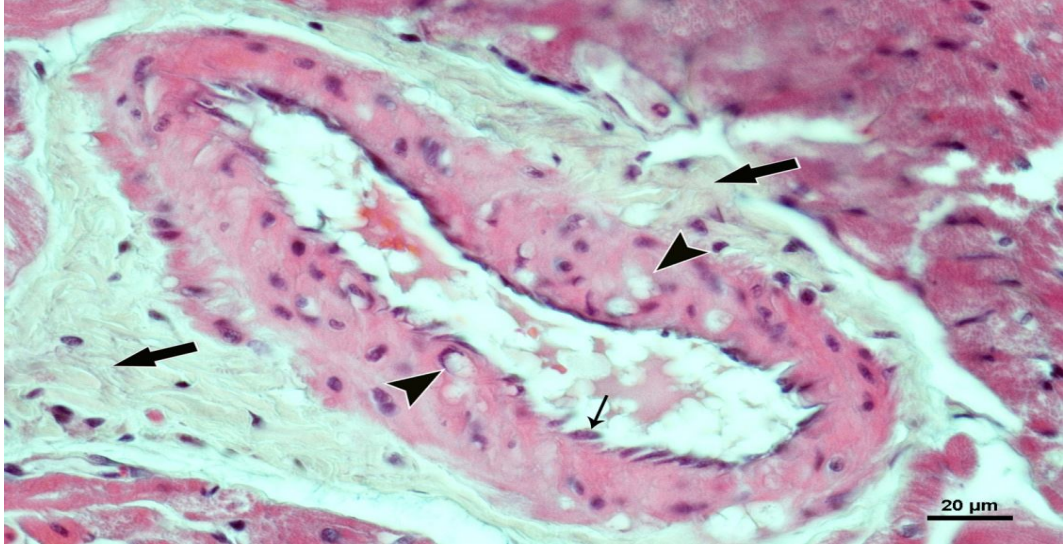
ÖD: P>0.05.



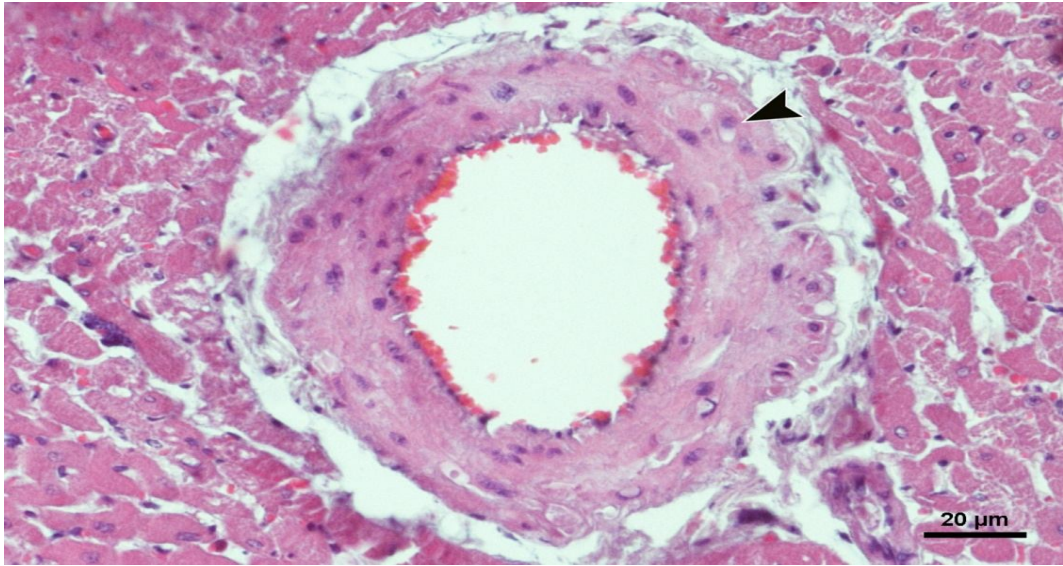
Şekil 5. Kontrol grubunda koroner arterin görünümü, H-E.



Şekil 6. Kuersetin grubunda koroner arter kesitinin görünümü, H-E.



Şekil 7. CCl₄ grubunda muskuler tabakada şiddetli fibrinoid dejenerasyon ile birlikte kas hücrelerinde vakuoler dejenerasyon (ok başları), endotel hücrelerinde şişme (küçük ok) ve perivasküler bağ doku artışı (büyük ok), H-E.



Şekil 8. CCl₄+Kuersetin grubunda koroner arterin muskuler tabakasında hafif şiddette fibrinoid dejenerasyon ve kas hücrelerinde hidropik dejenerasyon (ok başı), H-E.

6. TARTIŞMA

Kolesterol, diyabet, yüksek kan basıncı, alkol ve sigara kullanımı gibi kardiyolojik risk faktörleri bulunmadığı halde kalp damar rahatsızlığı oluşan kişilerde değişik nedenler üzerine yoğunlaşmış ve günümüzde özellikle homosistein düzeyleri damar tıkanıklığının oluşumu yönünden önem kazanmıştır (105-107). Homosistein, özellikle diyetle fazla et tüketimi ile birlikte kandaki seviyesi artan bir aminoasittir. Koroner arter ve periferel damarların iç yüzeyini döşeyen hücrelere zarar verir ve kanın pıhtılaşma mekanizmasını etkileyerek kalp krizi ve üreme riskini arttırır. Kandaki homosistein artışının, erken yaşta başlayan ve tekrarlayıcı nitelikte olan tromboembolik damar hastalıklarının zeminini “tek başına” oluşturduğunu göstermiştir. Homosistein seviyesinin hafif düzeyde bile artması bu tıkaçıcı mekanizmaları uyarabilmektedir. Homosistein normal plazma düzeyi 5-15 µmol/L olarak kabul edilmektedir. Bu düzey; gerek metabolizmadaki genetik bozukluklara (enzim defektleri gibi), kronik hastalıklar; yaş cinsiyet gibi kişisel özellikler, gerekse vitamin ve beslenme eksiklikleri ve bazı ilaçların alımından etkilenmektedir. Tıp dünyasında kolesterol kadar, hatta ondan daha tehlikeli görülen homosistein, vasküler hastalıkların oluşumunda gittikçe önem kazanmaktadır. Vasküler rahatsızlıkların da ölüm ve diğer hastalıkların oluşumunda en önemli risk faktörleri olduğu bilinmektedir (25, 108).

Canlılarda metiyonin metabolizmasının esansiyel bir ara metaboliti olan homosisteinin sentezinde ve metabolizmasında karaciğer merkezi bir rol oynamaktadır. Metiyoninin büyük oranda bu organda metabolize edilir. Karaciğer, metiyonin ve homosistein metabolizmasında görev alan genlere

sahiptir. Homosisteinin metabolizmasında rol oynayan MAT (Metiyonin adenziltransferaz) sadece karaciğerde bulunurken, BHMT (Betain-homosistein metiltransferaz) ve CBS (Sistationin β -sentetaz)'in büyük çoğunluğu karaciğerde sentezlenmektedir. Bu nedenlerle karaciğer hasarı homosistein metabolizmasını ileri derecede etkilemektedir (40, 43).

Bu bilgiler ışığında, karbontetraklorür (CCl_4) kullanılarak ratlarda karaciğer fibrozisi oluşturulmuştur. Karaciğer hasarına bağlı olarak homosistein düzeylerindeki ve kalp damarlarının morfolojik yapılarındaki değişimler incelenmiş ve antioksidan özelliği bilinen kuersetinin bu değişimler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

CCl_4 ün vücutta değişime uğradığı ve işlendiği en önemli organın karaciğer olduğu ve bu yüzden CCl_4 den en fazla karaciğerin etkilendiği birçok literatür bilgiyle desteklenmektedir (109-113). Karaciğerde CCl_4 ile aktif hale gelen sitokrom P450 enziminin etkisiyle triklormetil radikalinin olduğu ve oluşan triklormetil radikalinde oksijen ile reaksiyona girerek yüksek toksisiteye sahip ve karaciğer dokusuna zarar veren bir madde olan reaktif triklormetil peroksil radikaline dönüşerek etkiler oluşturduğu belirtilmiştir (79). Karaciğer dejenerasyonunun değişik şekilleri, oksidatif stres ve buna bağlı oluşan serbest radikallerle oluşmaktadır (114, 115). Oluşan bu zararlı maddelerin lipid peroksidasyonu artırdığı ve bu yolla hepatositlerin hücre membranlarının yıkımlanmasına sebep oldukları bilinmektedir (116). Çalışmamızda karaciğerin histolojik kesitleri incelendiğinde (Şekil 4), CCl_4 ve CCl_4 ile birlikte kuersetin uygulanan gruplarda karaciğerde histopatolojik olarak bazı değişimler belirlenmiştir. Tek başına CCl_4 uygulanan gruba ait karaciğerlerde periportal daha

hafif şiddette ise periasiner ve postnekrotik fibrozis, periportal bölgede safra kanalı proliferasyonu ile birlikte oval hücre proliferasyonları ve rejeneratif nodül formasyonları baskın değişimler olarak belirlenmiştir (Şekil 4A). Periportal alanlarda daha yoğun olmakla birlikte tüm fibrotik alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonunun mevcut olduğu ve ek olarak periportal bölgede belirgin Kupffer hücre aktivasyonları izlenmiştir. Hepatositlerde tek hücre nekrozu, makroveziküler yağ dejenerasyonu, karyomegali, intranükleer inklüzyon cisimciği, apoptozis, asinüs formasyonları ile birlikte hidropik dejenerasyon dikkati çekmiştir. Ayrıca periportal bölgedeki hepatositlerin çift çekirdeğe sahip olduğu görülmüştür. Periportal bölgede hepatosit sitoplazmalarında ve serbest halde sarı renkte safra pigment birikimleri belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgular CCl₄ uygulaması sonrası akut karaciğer toksisitesine ait literatür bildirimleriyle paralellik göstermektedir (117-119).

CCl₄ ün karaciğerde işlenmesi sırasında oluşan reaktif triklorometil peroksil radikali (79), özellikle doymamış yağ asitlerini içerenler başta olmak üzere membran lipidlerini etkileyerek, enerji metabolizmalarının ve protein sentezinin bozulmasına neden olarak karaciğer hasarının ilerlemesine sebep olmaktadır (103, 120). Lipid peroksidasyon, serbest radikallerin oluşturmuş olduğu en önemli etkidir (121). Hem deneysel hem de klinik çalışmalar lipid peroksidasyonun karaciğer fibrozis gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (122). Çalışmamızın sonuçları incelendiğinde (Tablo 2), CCl₄ uygulanan gruptaki MDA düzeylerinin, kontrol ve kuersetin gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmektedir (P<0.05). Elde ettiğimiz bu bulgular CCl₄ ün lipid

peroksidasyonu artırdığı yönündeki literatür bilgiler ile uygunluk göstermektedir (123-128).

Homosisteinin sentezinde ve metabolizmasında karaciğerin önemli bir yeri vardır. Çünkü homosisteinin metabolizmasında rol oynayan MAT (Metiyonin adenosiltransferaz) sadece karaciğerde bulunurken, BHMT (Betain-homosistein metiltransferaz) ve CBS (Sistationin β -sentetaz)'in büyük çoğunluğu karaciğerde sentezlenmektedir. Bu nedenlerle karaciğer hasarı oluştuğunda homosisteinin metabolizmasında önemli değişiklikler meydana gelmektedir (40, 43). Çalışma sonuçlarımız incelendiğinde (Tablo 2), plazma homosistein düzeyi, CCl₄ uygulanarak karaciğer hasarı oluşturulmuş gruplarında, kontrol ve kuersetin gruplarına kıyasla anlamlı şekilde ($P<0.01$) yüksek bulunmuştur. Karaciğer hasarı bulunan canlılarda homosistein düzeylerinin yüksek olduğunu belirten literatür bildirimleriyle bizim bulgularımızın benzer olduğu görülmektedir (69, 76, 129, 130).

Plazma homosistein düzeylerinin artışına bağlı olarak kardio vasküler sistemlerdeki değişimlerin incelendiği bazı çalışmalarda; karotid arterlerde intimal hiperplaziye ve hücre proliferasyonuna sebep olduğu (131), plazma total homosistein miktarları ile karotid arterlerin duvar kalınlığı arasında pozitif bir ilişkinin var olduğu (132), atheroskleroz riskinin ve lipit peroksidasyonun artmış olduğu (133), kardiovasküler hastalıkların artışı, plazma homosistein ve koagülasyon etmenleriyle birlikte olduğunu (134), homosisteinin endotelial hücrelerde yaşlanmayı önemli oranda hızlandırdığı (135) belirtilmiştir. Çalışmamızdaki damarlarının patolojik bulguları incelendiğinde (Tablo 3 ve şekil 7, 8) en belirgin bulguların sadece CCl₄ verilen gruba ait hayvanlarda kaydedildiği

ve koroner damarların musküler katmanında fibrinoid dejenerasyon ile birlikte kas hücrelerinde vakuoler dejenerasyon tespit edildiği, ayrıca belirgin perivasküler bağ doku artışının şekillendiği gözlenmiştir (Şekil 7). Aynı koroner arterlerin intima tabakasındaki endotel hücrelerinin bulanık şişme nedeniyle bazal membranda ayrılmaların olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu bulgular, plazma homosistein düzeyinin artışına bağlı olarak damar yapısında meydana gelen patolojik değişimlerin incelendiği çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (131-135).

Kuersetin antioksidan özelliğinden dolayı koroner arter rahatsızlıkları, yüksek tansiyon, ateroskleroz ve kalp krizleri gibi kardiovasküler sistem rahatsızlıkları üzerine olumlu etkileri olduğu ayrıntılı bir şekilde olmasa da birçok çalışmada belirtilmiştir (136-141). Homosistein MDA düzeyinin artması ve bunun sonucu oluşan oksidatif stresin farklı organlarda endotel hasarına yol açtığı belirtilmiştir (136, 137). Etkili bir antioksidan olan kuersetin, oksijen radikalleri süpürücüsü, lipid peroksidasyonu ve şelat metal iyonlarına karşı hücreleri koruması gibi özellikleriyle oksidan hasar ve hücre ölümlerini engellediği belirtilmiştir (142-144) Çalışma sonuçlarımız incelendiğinde (Tablo 2) CCl₄ uygulanan gruptaki ratların plazma MDA değerlerinin, kontrol ve kuersetin gruplarına kıyasla artış gösterdiği, buna karşılık kuersetin uygulanan gruplarda ise plazma MDA değerlerinin anlamlı bir azalış gösterdiği tespit edilmiştir. CCl₄ ile birlikte kuersetin verilen ratların damar patolojisine ait bulguların sadece CCl₄ verilerek karaciğer hasarı oluşturulan ratlar ile karşılaştırıldığında daha hafif şiddette olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 8).

Sonuç olarak; çeşitli sebeplerden dolayı lipit peroksidasyon oluşumunun artması karaciğer hasarına ve bu hasarında plazma homosistein düzeyinde artışa ve koroner damarlarda patolojik lezyonlara sebep olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan özelliği bulunan kuersetin maddesinin ise lipit peroksidasyon ürünleri üzerine indirgeyici bir etki gösterdiği ve ayrıca kalp damarlarında oluşabilecek dejeneratif değişiklikleri önleyebileceği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, Baijal R, Kulshrestha P, Pramanik S, Patel N, Madan A, Amarapurkar A. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 854-858.
2. Wanless I, Lentz J. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: An autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106–1110.
3. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173–94.
4. Sanyal AJ, Cambell-Sargent C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183–1192.
5. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, et al. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11: 74-80.
6. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003; 37: 1286-1292.
7. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005; 172: 899-905.
8. Sonsuz A, Caner M, Giirakar M. Fibrojenin hücresel temelleri ve karaciğer sirozu. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi* 1992; 23: 79-85.
9. Padolsky DK, Isselbacher KS. Cirrhosis of the liver. In: Wilson JD Breunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf R, Martin J, Focci SA, Root RK. (Editors). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th Edition, McGraw Hill: USA 1991: 1340-1350.
10. Scheuer PJ, Lefkowich JH. The normal liver. In: Scheuer PJ, Lefkowich JH. (Editors). *Liver Biopsy interpretation*. 5th Edition, London: WB Saunders 2000; 36-50.
11. Faust TW, Sorrell MF. Budd-Chiari Syndrome. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. (Editors). *Schiff's Disease of the Liver*. 8th Edition, Philadelphia: Lippincott Raven 1999: 1207-1213.
12. Neuschwander-Tetri BA. The Liver in Systemic Disease. In: Grendell JH, McQuaid KR, Friedman SL. (Editors). *Current Therapy in Gastroenterology*. 1st Edition, Appleton and Lange, Stamford CT 1996: 585-597.
13. Schafer DF, Sorrell MF. (1998). Vascular disease of the liver. In: Feldman M, Fridman LS, Sleisenger MH. (Editors). *Gastrointestinal and Liver Disease*. 7th Edition, WB Saunders Co, Philadelphia 2002:1364-1370.
14. Rosendaal FR. Venous thrombosis: A multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167-1173.
15. Scherlock S, Dooley J. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 11th Edition, Oxford, London: 2002: 192-199.

16. Ko SF, Lee TY, Ng SH. et al. Unusual liver MR findings of Wilson's disease in an asymptomatic 2-year-old girl. *Abdom Imaging* 1998; 23: 56-59.
17. Mergo PJ, Ros PR, Buetow PC, et al. Diffuse disease of the liver: Radiologicpathologic correlation. *Radiographics* 1994; 14: 1291-1307.
18. Runge VM, ClantonJA, Smith FW. Nuclear magnetic resonance of iron and copper disease states. *AJR* 1983; 141: 943-948.
19. Yılmaz F. Karaciğer fibrozisi patolojisi *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005; 1(16): 21-28.
20. Bağcı S. Karaciğer fibrozisinde tanı metodları. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005; 1(16): 29-43.
21. Hoofnagel JE, Alter HJ. Chronic viral hepatitis. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagel JH. (Editors). *Viral hepatitis and liver disease*. Grune and Stratton, New York 1984: 97-113.
22. Karagöz İ, Haktanır A. Kronik karaciğer hastalıkları. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2004; 2(2): 33-40.
23. Cooper AJL. Biochemistry of sulfur-containing Amino Acids. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 187-222.
24. James DF, John JM. Homocysteine. *Int J Biochem Cell B* 2000; 32: 385-389.
25. McCully KS. Vascular Pathology of Homocysteinemia. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
26. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded findings 356222 primary screeners of the multiple risk factor intervention trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256: 2823-2828.
27. Hopkins PN, Williams RR. Human genetics risk and coronary heart disease: A public health perspective. *Ann Rev Nutr* 1989; 9: 303-345.
28. Challem J, Doldy V. *Homocysteine the Secret Killer*. New Canaan: USA, 1997.
29. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, ve ark. Total homocysteine in plasma or serum methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-1779.
30. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. Quantitation of homocysteine, total cysteine and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography mass spectrometry. *Anal Biochem* 1987; 162: 185-196.
31. Frankel P, Madsen P. *Homocysteine through the methylation process*. Thousand Oaks: USA, 1998.
32. Skovby F. Homocystinuria clinical, biochemical and genetic aspects of cystathionine beta synthase and its deficiency in man. *Acta Pediatr Scand* 1985; 321: 1-21.
33. Brattstrom L, Israelsson B, Lingarde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than heterozygosity for homocystinuria due cystathionine beta-synthase deficiency. *Metab Clin Exp* 1988; 37: 175-178.
34. Gruba S, Fink L, Fanceso V. Hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Path* 1996; 106: 709-722.

35. Fallest-Strobl PC, Koch DD, Stein JH, McBride PE. Homocysteine: a new risk factor for atherosclerosis. *Am Fam Physician* 1997; 56: 1607-1610.
36. Lindgren F, Israelsson R, Lindgren L. Plasma homocysteine in acute myocardial infarction. *J Intern Med* 1995; 237: 381-386.
37. Miner SES, Evrovski J, Cole DEC. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: An update. *Clin Biochem* 1997; 30: 189-201.
38. Genest JJR, Malinow MR. Homocysteine and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 1992; 3: 295-299.
39. De La Haba G, Cantoni GL. The enzymatic synthesis of S-Adenosyl-L-Homocysteine from adenosine and homocysteine. *J Biol Chem* 1959; 234: 603-608.
40. James DH, Rene LJ, Lori MS, Margaret EB, John TB. Regulation of homocysteine metabolism. *Advan Enzyme Regul* 1999; 39: 69-91.
41. Zappia V, Zydek-Cwick R, Schlenk F. The specificity of S-Adenosyl-methionine derivatives in methyl transfer reactions. *J Biol Chem* 1969; 244: 4499-4509.
42. Paxton R, Scislowski PWD, Davis EJ, Harris RA. Role of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase in 2-oxobutyrate metabolism. *Biochem J* 1986; 234: 295-303.
43. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 228-237.
44. Mckeever PW, Weir DG, Molloy A, Scott JM. Betaine-homocysteine methyltransferase: Organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin Sci* 1991; 81: 551-556.
45. Finkelstein JD, Kyle WE, Harris BJ. Methionine metabolism in mammals: Regulatory effects of S-Adenosylhomocysteine. *Arch Biochem Biophys* 1974; 165: 774-779.
46. Malinow MR. Homocysteine and arterial occlusive disease (*Frontiers in Medicine*). *J Intern Med* 1994; 236: 603-617.
47. Wicken DEL, Dudman NPB. Homocystinuria and atherosclerosis (Review). *Monogr Hum Genet* 1992; 14: 311-324.
48. Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, Selhub J. Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly framingham men and women. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1077-1080.
49. Ubbink JB, Vermaak WJH, Von-der A, Becker PJ. Vitamin B12, vitamin B6 and folat nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 47-53.
50. Jousilahti P, Tuomilehto J, Vartiainen E, Pekkanen J, Puska P. Body weight, cardiovascular risk faktors, and coronary mortality. 15-year follow-up of middle-aged men and women in eastern Finland. *Circulation* 1996; 93: 1372-1379.
51. Kang S, Wong PWK, Curley K. The effect of d-penicillamine on protein-bound homocysteine in homocystinurics. *Pediatr Res* 1982;16: 370-372.

52. Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem Biochem* 1991; 29: 549-554.
53. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985; 31: 624-628.
54. Giral P, Bruckert E, Nelly J, et al. Homocysteine and lipid lowering agents. A comparison between atorvastatin and fenofibrate in patients with mixed hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2001; 154: 421-427.
55. Brattstrom L, Israelson B, Tengborn L. Homocysteine, factor VII, and antithrombin III in subjects with difference gene damage for cystathionine beta-synthase. *J Inherit Metab Dis* 1989; 12: 475-482.
56. Kapusta L, Haagmans M, Steegers E, Cuypers M. Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism. *J Pediatr* 1999; 135: 773-774.
57. Jacques P, Bostom A, Williams R. Relations between folat status a common mutation in MTHFR and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7-12.
58. Jacobsen DW. Determinents of hyperhomocysteinemia: A matter of all h and nurtune. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 641-642.
59. Halsted CH. Folate deficiency in alcoholism. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 2736 (Abstract).
60. Morrison HI, Schaubel D, Desmeules M, Wigle DT. Serum folate and risk of fetal coronary heart disease. *JAMA* 1996; 275: 1893-1896.
61. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannuci E. Dietary folat vitamin B6 and vitamin B12 intake and risk of CHD among a long population of men. *Circulation* 1996; 93: 625 (Abstract).
62. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalace of cobalamin deficiency in the framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 2-11.
63. Chauveau P, Chadeaux B, Coude M, Aupetit J. Hyperhomocysteinemia a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Arch Intern Med* 1993; 41: 72-77.
64. Hultsberg A, Anderson A, Sterner G. Plasma homocysteine and renal failure. *Clin Nephrol* 1993; 40: 230-235.
65. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukaemia changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991; 51: 828-835.
66. Nabila A, Olusegun AM, Aboyomi A. Homocysteine and endogenous markers of renal function in type 2 diabetic patients without coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 50: 177-185.
67. Morris M, Bostom G, Jacques P, Selhup J, Rosenberg I. Hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia associated with hypothyroidism in the thirt US national healthy and nutrition examination survey. *Atherosclerosis* 2001; 155: 195-200.

68. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency. *N Eng J Med* 1988; 318: 1720-1728.
69. Canoruç N, Canoruç F, Çetin A, ve ark. Karaciğer hastalıklarında (Siroz veya Hepatit) homosistein ve selenyum düzeyleri. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2006; 5: 26-30.
70. De La Vega MJ, Santolaria F, Gonzalez-Reimers E, et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: the importance of the thermolabile form of the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Alcohol* 2001; 25: 59-67.
71. Garcia-Tevijano ER, Berasain C, Rodriguez JA, et al. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: Mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 1217-1221.
72. Bosy-Westphal A, Petersen S, Hinrichsen H, Czech NJ, Muller M. Increased plasma homocysteine in liver cirrhosis. *Hepato Res* 2001; 20: 28-38.
73. Lussier S, Cacan S, Xhignesse M. Plasma total homocysteine in healthy subjects: Sex specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 587-593.
74. Öbek A. İç Hastalıkları. Bursa: Türkiye, 1990.
75. Ermens AAM, Refsum H, Ruprecht J. Monitoring cobalamin inactivation during nitrous oxide anaesthesia by determination of homocysteine and folate in plasma and urine. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49: 385-393.
76. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 473-501.
77. Garg R, Malinov M, Pettinger M, Upson B. Niacin treatment increases plasma homocysteine levels. *Am Heart J* 1999; 138: 1082-1087.
78. Frick MH, Elo O, Haapa K. Helsinki heart study: Primary-prevention trial with gemfibrozil in middle aged men with dyslipidemia: Safety of treatment, changes in risk factors and incidence of coronary heart disease. *N Eng J Med* 1987; 317: 1237-1245.
79. Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, et al. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 704-709.
80. Den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WBJ. Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 1995; 345: 882-885.
81. Morita H, Taguchi J, Kurihara H. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 1997; 95: 2032-2036.
82. Dalery K, Luise S, Selhup J, Latour Y. Homocysteine and coronary artery disease in French Canadian Subject: Relation with vitamins B12, B6, pyridoxal phosphate, and folat. *Am J Cardiol* 1995; 75: 1107-1111.
83. Clarke R, Daly L, Robinson K. Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular Disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-1155.

84. Robinson K, Arheart K, Refsum H. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. *Circulation* 1998; 97: 437-443.
85. Hugh SM, Nadira A, Swaminathan R, et al. A Common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke*. 1997; 28: 1739-1743.
86. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr* 1992; 12: 279-298.
87. Malinow M, Nieto F, Szklo M. Carotid artery intima medial wall thickening and plasma homocysteine in asymptomatic adults. *Circulation*. 1993; 87: 1107-1113.
88. Stampfer MJ, Osborn JA, Jaraki M. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91: 308-318.
89. Upchurch GR, Welch GN, Freedman JE. Homocysteine attenuates endothelial glutathione peroxidase and thereby patients peroxide mediated injury. *Circulation* 1995; 92: 1-28.
90. Tsai JC, Peralla MA, Yarkizumi M. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 6369-6373.
91. Di Minno G, Davi G, Margaglione M. Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria. *J Clin Invest* 1993; 92: 1400-1406.
92. Israelsson B, Brattström LE. Homocysteine and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1988; 71: 227-233.
93. Özcan N. Koroner Kalp Hastalıkları. *GATA* 1997; s: 31-58.
94. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocysteine, diet and cardiovascular disease; A statement for healthcare professionals from the nutrition committee. *American Heart Association* 1999; 99: 178-182.
95. Akyüz E. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* bitki ekstraktlarının kromatografik yöntemlerle kimyasal bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
96. Fabre N, Rustan I, Hoffmann DE, Quetin Leclercq J. Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001; 2: 707-715.
97. Borbalan AMA, Zorro L, Guillen DA, Barroso CG. Study of polyphenol content of red and White grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *J Chromatogr A* 2003; 1012: 31-38.
98. Fang Z, Zhang M, Wang L. HPLC-DAD-ESI-MS analysis of phenolic compounds in Bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.). *Food Chem* 2007; 100: 845-852.
99. Karakaya S, El SN. Flavonoidler ve sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi* 1997; 26: 54-60.
100. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035-1042.

101. Erkoç Ş, Erkoç F, Keskin N. Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *J Mol Struct* 2003; 631: 141-146.
102. Placer AZ, Linda LC, Johnson B. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
103. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Technigues*. 3th Ed. London, Churchill Livingstone, 1990; s:112-147, 245-269, 509-596.
104. SPSS, Inc. *SPSS for Windows Release 11.5* (6 Sep. 2002), Standard Version, Copyright SPSS Inc., 1989-2002. Chicago.
105. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 1995; 274: 1049-1057.
106. Chen P, Poddar R, Tipa EV, et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: Implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Advan Enzyme Regul* 1999; 39: 93-109.
107. Refsum H, Ueland P, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-62.
108. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 230-236.
109. Allison JM. (1984). *Microbiology of rumen and small and large intestines*. In: Swenson MJ. (Editor). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 10th Edition. Vail-Ballow: USA 1984: 262- 398.
110. Altunbaş Y, Güven M, İnce E, ve ark. The in vitro effects of captopril on the levels of lipid peroxidation and glutathion of erythrocytes in type II diabetics. *Tr J Med Sci* 1996; 26: 139-142.
111. Amatayakul K, Uttaravichai C, Singkamani R, Ruckphaopunt S. Vitamin metabolism and the effects of multivitamin supplementation in oral contraceptive users. *Contraception* 1984; 30: 179-196.
112. Aqel NM, Ball RY, Waldman H, Mitchinson MJ. Identification of macrophages and smooth muscle cell in human atherosclerosis using monoclonal antibodies. *J Pathol* 1985; 146: 197-200.
113. Arendt J, Deacon S, English J, Hampton S, Morgan L. Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res* 1995; 4: 74-79.
114. Brattin WJ, Glende EA, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1985; 1: 27-28.
115. Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53: 599-623.
116. Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transitions metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.

117. Hu YY, Liu P, Liu C, et al. Actions of salvianolic acid A on CCl₄-poisoned liver injury and fibrosis in rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1997;18: 478-80.
118. Natsume M, Tsuji H, Harada A, et al. Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 601-608.
119. Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, et al. Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: 200-207.
120. Arthur JR. Nutritional interrelationships between selenium and vitamin E. *Rep Rowett Inst* 1982; 38: 124-135.
121. Bast A, Haenen G, Daelman J. Oxidants and antioxidants. *State Art Am J Med* 1991; 91: 2-13.
122. Baydas G, Ercel E, Canatan H, Donder E, Akyol A. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell Biochem Funct* 2001; 19: 37-41.
123. Abraham P, Wilfred G, Cathrine SP. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clin Chim Acta* 1999; 289: 177-179.
124. Fadhel ZA, Amran S. Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver, kidneys and testes of rats. *Phytother Res* 2002; 16: 28-32.
125. Castilla-Cortazar I, Diez N, Garcia-Fernandez M, et al. Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: effect of insulin-like growth factor 1. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2529-2534.
126. Khan RA. Protective effects of *Launaea procumbens* on rat testis damage by CCl₄. *Lipids Health Dis* 2012; 11: 103.
127. Khan MR, Ahmed D. Protective effects of *Digera muricata* (L.) Mart. on testis against oxidative stress of carbon tetrachloride in rat. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 1393-1399.
128. Soliman AM, Fahmy SR. Protective and curative effects of the 15 KD isolated protein from the *Peganum harmala* L. seeds against carbon tetrachloride induced oxidative stress in brain, testes and erythrocytes of rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15: 888-899.
129. Stickel F, Choi SW, Kim YI, et al. Effect of chronic alcohol consumption on total plasma homocysteine level in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 259-264.
130. Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1699-1708.
131. Chen C, Surowiec SM, Morsy AH, Ma M. Intraperitoneal infusion of homocysteine increases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *Atherosclerosis*. 2002; 160: 103-114.

132. Tsai MY, Arnett DK, Eckfeldt JH, Williams RR, Ellison RC. Plasma homocysteine and its association with carotid intimal-medial wall thickness and prevalent coronary heart disease: NHLBI family heart study. *Atherosclerosis*. 2000; 151: 519-524.
133. Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drozd M, Wieczorek M. Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. 1995; 115: 217-224.
134. Kario K, Duell PB, Matsuo T, et al. High plasma homocysteine levels in elderly Japanese patients are associated with increased cardiovascular disease risk independently from markers of coagulation activation and endothelial cell damage. *Atherosclerosis* 2001; 157: 441-449.
135. Xu D, Neville R, Finkel T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Letters* 2000; 470: 20-24.
136. Lin R, Liu J, Gan W, Ding C. Protective effect of quercetin on the homocysteine-injured human umbilical vein vascular endothelial cell line (ECV304). *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 101: 197-202.
137. Gan WJ, Liu JT, Lin R. The protective effect of quercetin on the vascular endothelial cells injured by homocysteine in rabbits. *Chinese Pharmacol Bull* 2004; 20: 647-651.
138. Safari MR, Sheikh N. Effects of flavonoids on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 73-80.
139. Lin CM, Chen CT, Lee HH, Lin JK. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. *Planta Med* 2002; 68: 365-367.
140. Perez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo AL, et al. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 66-72.
141. Kempuraj D, Madhappan B, Christodoulou S et al. Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C phosphorylation in human mast cells. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 934-944.
142. Decharneux T, Dubois F, Beauloye C, et al. Effect of various flavonoids on lysosomes subjected to an oxidative or an osmotic stress. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1243-1248.
143. Erden IM, Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet induced oxidative stress in rats. *Toxicology* 2000; 154: 21-29.
144. Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 1398-402.

8.ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı Soyadı** : Rahime ÇİFTÇİ
- 2. Doğum Yeri ve Tarihi** : Hassa – HATAY 05.05.1971
- 3. Medeni Durumu** : Bekar
- 4. Yabancı Dili** : İngilizce
- 5. Eğitimi** :
- İlk Öğretim : 1983, Dervişpaşa İlk Öğretim Okulu,
Hassa-Hatay
- Lise Eğitimi : 1989, Hassa Lisesi, Hatay
- Yüksek Okul : 1998, YYÜ. Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü
- 6. Çalıştığı Kurumlar** : Hatay’ın Hassa ilçesindeki çeşitli
ilköğretim okullarında öğretmenlik