



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-D-2015-0002**

**RATLARDA HİPERHOMOSİSTEİNEMİNİN ERİTROSİT
VE KALP DOKUSUNDA OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF
HASAR ÜZERİNE VİTAMİN C’NİN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Ali İhsan KIRTAŞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Funda KIRAL**

AYDIN-2015

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-D-2015-0002**

**RATLARDA HİPERHOMOSİSTEİNEMİNİN ERİTROSİT
VE KALP DOKUSUNDA OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF
HASAR ÜZERİNE VİTAMİN C'NİN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Ali İhsan KIRTAŞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Funda KIRAL**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora programı öğrencisi Ali İhsan KIRTAŞ tarafından hazırlanan “Ratlarda Hiperhomosisteineminin Eritrosit Ve Kalp Dokusunda Oluşturduğu Oksidatif Hasar Üzerine Vitamin C’nin Etkisi” başlıklı tez, 10/04/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

(Başkan) Prof. Dr. Funda KIRAL	ADÜ Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK	ADÜ Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ	ADÜ Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ferda BELGE	ADÜ Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Hasan AKŞİT	BAÜ Veteriner Fakültesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla/...../2015 tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Kükürtlü bir aminoasit olan homosistein proteinlerin yapısına katılmaz. Normal diyetle alınmaz ve vücuttaki tek kaynağı esansiyel bir amino asit olan metiyonindir. Metiyonin metabolizması sırasında bir ara ürün olan homosisteinin metabolize olmasında başlıca remetilasyon ve transsülfürasyon olmak üzere iki yol vardır. Homosisteinin metabolizmasında bu her iki yol da çeşitli vitaminler ile aktive edilmektedir. Sağlıklı insanlarda plazma homosistein düzeyi, remetilasyon ile metiyonine, transsülfürasyon yolu ile sistein aminoasidine dönüşümünü sağlayan bu iki yolla yaklaşık 5-15 µmol/L gibi bir seviyede tutulur.

Artan plazma homosistein düzeyi pek çok hastalık için risk faktörü oluşturmaktadır. Bu artış, kalıtım ve sonradan kazanılan olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir. Homosistein metabolizmasında görevli bir enzimdeki veya bir koenzimdeki anormallik sonucunda hiperhomosisteinemi oluşmaktadır. Hiperhomosisteineminin oluşumunda yer alan besinsel nedenler arasında ise homosisteini metabolize eden folik asit, vitamin B₆ ve vitamin B₁₂'nin kısmi ya da tam eksikliği yer almaktadır.

Endotel üzerinde hiperhomosisteineminin, hücre proliferasyonuna neden olma, antitrombotik fonksiyonlarını bozma ve endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe etme gibi etkileri bilinmektedir. Homosisteinle kültüre edilmiş endotel hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunun arttığı ve peroksitleri detoksifiye eden antioksidan enzimleri engellediği bildirilmektedir.

Büyük bir kısmını serbest radikallerin oluşturduğu bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeli taşımaktadır. Normal oksijen molekülüne göre kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır. Yüksek aktiviteye sahip olan bu serbest radikaller, molekül yapılarındaki dengesizlik sebebiyle bütün hücre bileşenleri ile tepkimeye girebilmektedirler.

Oksidatif denge olarak da bilinen serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı arasındaki denge durumu sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme olması bu dengeyi bozar. Oluşan bu dengesizlik durumu 'Oksidatif stres' olarak isimlendirilmektedir. Oksidatif strese neden olan tehlikeli reaktif

oksijen türleri, çeşitli biyolojik moleküllerle kolaylıkla etkileşebilmekte ve bu etkileşimin şiddetli olması hücre ya da dokularda hasar meydana gelmesine sebep olmaktadır.

Birçok hastalığın oluşumunda, serbest radikallerin anormal üretiminin, protein, lipid ve nükleik asitleri etkileme nedeni yatar. Serbest radikallerin oluşturacağı bu zararlı etkiler normal şartlar altında hücrelerin savunma sistemi ile kontrol edilir. Bu savunucu sistemler, vitamin E, Vitamin C, melatonin ve glutatyon etkinliği, enzimatik olan veya enzimatik olmayan koruyucu mekanizmalar olabilir.

Homosisteinin ana kaynağı metiyonin içeren hayvansal proteinlerin kısıtlanması hiperhomosisteinemi tedavisinde ilk uygulamadır. Kırmızı ette metiyonin yüksek düzeyde bulunur, bu yüzden kişisel beslenmenin düzenlenmesi, homosistein düzeylerinin azaltılmasında büyük önem arz etmektedir. Birçok çalışmada homosistein metabolizmasında görevli enzimlerin kofaktörleri olan folik asit, Vitamin B₁₂ ve Vitamin B₆ ile yüksek homosistein düzeylerinin miktarları arasında ters orantılı bir değişim olduğu gösterilmiştir. Vitamin eksikliği, hiperhomosisteineminin etiolojisinde en sık rastlanan nedenlerdendir. Hiperhomosisteinemi tanısı konulan kişilere antioksidan vitamin takviyesinin ilk uygulanan tedavi yöntemi olması bu nedene dayanmaktadır.

Bu çalışmada uzun süreli metiyonin uygulanan ratlarda, homosistein seviyesindeki artışın kalp dokusu ve eritrosit antioksidan sistem üzerine verdiği hasar ve vitamin C'nin oluşan bu hasarı ne oranda etkilediğinin araştırılması amaçlandı.

Araştırma "Ratlarda Hiperhomosisteineminin Eritrosit ve Kalp Dokusunda Oluşturduğu Oksidatif Hasar Üzerine Vitamin C'nin Etkisi" isimli ve VTF-10015 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi BAP komisyonu tarafından desteklenerek gerçekleştirildi.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
1.1.AMİNOASİTLER.....	3
1.1.1.KÜKÜRT İÇEREN AMİNOASİTLER.....	3
1.1.2.METİYONİN.....	4
1.1.3. HOMOSİSTEİN	5
1.1.3.1 Homosistein Metabolizması	7
1.1.3.1.1 Transmetilasyon	7
1.1.3.1.2. Remetilasyon	8
1.1.3.1.3. Transsülfürasyon	9
1.1.3.2. Homosisteinin Hidrolizi.....	10
1.1.3.3. Homosistein Metabolizmasının Regülasyonu.....	12
1.1.3.4. Homosistein Düzeyleri ve Ölçümü.....	13
1.1.3.5. Hiperhomosisteinemi	13

1.1.3.6. Hiperhomosisteineminin Nedenleri	14
1.1.3.7. Hiperhomosisteineminin Patofizyolojik Mekanizmaları.....	16
1.1.3.9. Hiperhomosisteineminin Tedavisi	21
1.1.4. SERBEST RADİKALLER.....	21
1.1.4.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	22
1.1.4.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri.....	24
1.1.4.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri.....	24
1.1.4.4. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri.....	24
1.1.4.5. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri.....	26
1.1.4.6. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	27
1.1.4.7. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri.....	27
1.1.5. OKSİDATİF STRES.....	28
1.1.6. ANTİOKSİDANLAR.....	29
1.1.6.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	31
1.1.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1).....	31
1.1.6.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9).....	33
1.1.6.1.3. Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2).....	34
1.1.6.1.4. Glutasyon S-Transferaz (GST).....	35
1.1.6.1.5. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz (EC 1.9.3.1).....	35
1.1.6.1.6. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6).....	35
1.1.6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	37

1.1.6.2.1. Vitamin C (Askorbik Asit: AA).....	37
1.1.6.2.2. Vitamin E (α -tokoferol).....	38
1.1.6.2.3. Vitamin A (β -karoten).....	39
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
2.1.Gereç.....	40
2.1.1.Kullanılan Deney Hayvanları.....	40
2.1.2.Deney Grupları Ve Uygulama Protokolü.....	40
2.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	41
2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	41
2.2. Yöntemler.....	42
2.2.1. Serum Homosistein Düzeyleri Ölçümü.....	42
2.2.2. Kalp Dokusu Homojenatının Hazırlanışı.....	44
2.2.2.1.Kalp Dokusunda Protein Analizi (Lowry Protein Metodu).....	45
2.2.3. Kalp Dokusu Homojenatlarında Malondialdehit Düzeyi Ölçümü.....	46
2.2.4. Plazma Malondialdehit Düzeyi Ölçümü	47
2.2.5. Eritrosit Hemolizati Hazırlanması.....	49
2.2.5.1.Eritrosit Hemolizatında Hemogloblin Düzeyi Ölçümü.....	49
2.2.6. Eritrosit Hemolizatında ve Kalp Dokusu Homojenatlarında Süperoksit Dismutaz Aktivitesi ölçümü.....	50
2.2.7. Eritrosit Hemolizatında ve Kalp Dokusu Homojenatlarında Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü.....	52
2.2.8. Eritrosit Hemolizatında ve Kalp Dokusu Homojenatlarında Katalaz Aktivitesi Ölçümü.....	54
2.2.9. İstatistik Değerlendirme.....	55

3.BULGULAR.....	56
3.1. Ratların Canlı Ağırlıkları.....	56
3.2. Ratların Serum Homosistein Düzeyleri.....	57
3.3. Ratların Kalp Dokusu Analiz Sonuçları.....	58
3.3.1. Ratların Kalp Dokusu MDA Sonuçları.....	59
3.3.2. Ratların Kalp Dokusu SOD Aktivitesi Sonuçları.....	60
3.3.3. Ratların Kalp Dokusu GSHPx Aktivitesi Sonuçları.....	61
3.3.4. Ratların Kalp Dokusu CAT Aktivitesi Sonuçları.....	62
3.4. Ratların Eritrosit Hemolizati Analiz sonuçları.....	63
3.4.1. Ratların Plazma MDA Sonuçları.....	64
3.4.2. Ratların Eritrosit Hemolizati SOD Aktivitesi Sonuçları.....	65
3.4.3. Ratların Eritrosit Hemolizati GSHPx Aktivitesi Sonuçları.....	66
3.4.4. Ratların Eritrosit Hemolizati CAT Aktivitesi Sonuçları.....	67
4. TARTIŞMA	68
5. SONUÇ	77
ÖZET	78
SUMMARY	80
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	103
TEŞEKKÜR.....	104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-MTHF	5-Metiltetrahydrofolat
ADMA	Asimetrik Dimetilarginin
BHMT	Betain-Homosistein Metiltransferaz
CAT	Katalaz
CBS	Sistatyonin Beta Sentaz
DDAH	Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz
EC-SOD	Ekstraselüler SOD
ELISA	Antikor Floresans Polarizasyon İmmunoassay
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	Glutasyon Disülfid (Yükseltgenmiş Glutasyon)
GST	Glutasyon S-Transferaz
Hcy	Homosistein; 2-amino-4-merkaptobutirikasit
HcyT	Homosistein-Tiyolakton
HHcy	Hiperhomosisteinemi
HRP-avidin	Avidin Konjugat Horseradish Peroksidaz
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
MAT	Metiyonin Adenozil Transferaz
MDA	Malondialdehit
Met	M; 2-amino-4-metiltiyotobütirik asit
MS	Metiyonin sentaz (5-metiltetrahydrofolat-sisteinmetiltransferaz)
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O ₂ ^{•-}	Süperoksit Anyon Radikali

OH •	Hidroksil Radikali
PBS	Salin Fosfat Tampon Çözeltisi
PRMT	Protein Arginin Metiltransferaz
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SAH	S-Adenozil Homosistein
SAM	S-Adenozil-L-Metiyonin
SDMA	Simetrik Dimetilarjinin
-SH	Sülfhidril Tiyol Grubu
SNOHcy	S-Nitrozo-Homosistein
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbütirik Asit
tHcy	Total Homosistein
THF	Tetrahidrofolat
TMB	3,3,5,5 Tetrametil-Benzidin

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Total plazma homosistein bileşenleri ve yüzdeleri	6
Çizelge 1.2. Hiperhomosisteinemi plazma homosistein düzeyleri	14
Çizelge 1.3. Hiperhomosisteinemi nedenleri	15
Çizelge 1.4. Reaktif oksijen türleri	23
Çizelge 1.5. Antioksidanların sınıflandırılması	31
Çizelge 3.1. Gruplardaki ratların canlı ağırlık değerleri	56
Çizelge 3.2. Gruplardaki ratların homosistein miktarlarına ilişkin sonuçlar	57
Çizelge 3.3. Kontrol, Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+Vit C gruplarına ait kalp dokusu MDA düzeyleri ve SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri	58
Çizelge 3.4. Kontrol, Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+VitC gruplarına ait plazma MDA düzeyleri ve SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Bir aminoasidin genel formülü	3
Şekil.1.2. Kükürt içeren aminoasitlerin yapıları	3
Şekil 1.3. Metiyoninin ve homosisteinin yapısı	4
Şekil 1.4. Homosistein kimyasal yapısı	5
Şekil 1.5. Homosistein'in oksitlenmesi sonucu homosistin oluşması	6
Şekil 1.6. Homosistein oluşumu	8
Şekil 1.7. Homosistein metabolizması	11
Şekil 1.8. Homosisteinin ADMA metabolizmasına etkileri	18
Şekil 1.9. Homosisteine bağlı vasküler hasar mekanizması	19
Şekil 1.10. Hiperhomosisteineminin hipertansiyon oluşumundaki rolü	20
Şekil 1.11. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu	23
Şekil 1.12. Protein karbonil oluşumuna primer modifikasyon reaksiyonları	26
Şekil 1.13. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı	28
Şekil 1.14. Oksidatif stres	29
Şekil 1.15. Antioksidan gruplar ve görevleri	30
Şekil 1.16. Glutasyon döngüsü	34
Şekil 1.17. Askorbik asidin kimyasal yapısı	37
Şekil 1.18 α -tokoferol	38
Şekil 1.19. β -karotenin kimyasal yapısı	39

Şekil 2.1. Kalp dokusu içeriğindeki % toplam protein miktarı hesaplanmasında kullanılan Lowry Protein Metodu standart grafiği	46
Şekil 3.1. Gruplardaki ratların canlı ağırlık miktarlarına ilişkin sonuçlar	56
Şekil 3.2. Serum homosistein düzeylerine ilişkin sonuçlar	57
Şekil 3.3. Kalp dokusu malondialdehit düzeylerine ilişkin sonuçlar	59
Şekil 3.4. Kalp dokusu Süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri	60
Şekil 3.5. Kalp dokusu glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri	61
Şekil 3.6. Kalp dokusu katalaz enzim aktiviteleri	62
Şekil 3.7. Plazma malondialdehit düzeyleri	64
Şekil 3.8. Hemolizat süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri	65
Şekil 3.9. Hemolizat glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri	66
Şekil 3.10. Hemolizat katalaz enzim aktiviteleri	67

1. GİRİŞ

Homosistein (2-amino-4-merkaptobutirik asit) metiyonin metabolizmasında bir ara ürün olarak oluşur. Kükürt taşıyan bir aminoasit olan homosistein insan vücudunda bilinen hiç bir proteinin yapısına katılmaz. İlk defa 1932 yılında Amerikalı biyokimyacı Vincent De Vigneaud tarafından keşfedilmiştir (De Vigneaud 1932). Hem homosistein hem de metiyonin birbirlerinin öncülüdür, birinin yıkımı diğerinin yapım aşamasını oluşturmaktadır. Bu ilişkinin temeli metiyonin metabolizmasındaki metiyonin döngüsüne dayanmaktadır (Freeman ve Crapo 1982, Finkelstein 1998).

Total plazma homosisteini (tHcy) plazmada bulunan serbest ve bağlı biyokimyasal homosistein türlerinin toplamını tanımlar. Hiperhomosisteinemi (HHcy), total Hcy düzeyinin 15 µmol/L değerinin üzerinde olması olarak tanımlanır (Kocabalkan ve ark 2000).

Hiperhomosisteinemi, homosistein metabolizması için gerekli olan sistatyon β sentetaz, ısıya duyarlı metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gibi bir enzimdeki veya bir koenzimdeki (folat, vitamin B₁₂ veya vitamin B₆) anormallik sonucunda oluşmaktadır. Metiyoninden zengin olan hayvansal gıda ağırlıklı beslenmenin hiperhomosisteinemi yaptığı bildirilmiştir. Sigara, alkol alımı, kahve tüketimi de yine hiperhomosisteinemi ile ilişkilidir. Genetik faktörler, bazı ilaçlar ve renal yetmezlik de nedenler arasındadır (McCully 1996, Emsley ark 1999).

Hiperhomosisteineminin endotelin hücre proliferasyonunu, antitrombotik fonksiyonlarını bozduğu ve endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ettiği de bilinmektedir. Üremik hastalarda homosisteinin özellikle okside formlarının birikimi sebebiyle serbest oksijen radikalleri aşırı miktarda üretilmektedir (Massy ve ark 2001).

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında oluşan biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir (Lunec ve Blake 1990). Serbest radikaller, pek çok hastalık sürecinde önemli rol oynarlar. Stres ve yaşlanma oluşumunda lipid peroksidasyonunda artışa, antioksidan enzim aktivitelerinde önemli değişikliklere sebep oldukları birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (Akkuş 1995, Baydaş ve ark 2002).

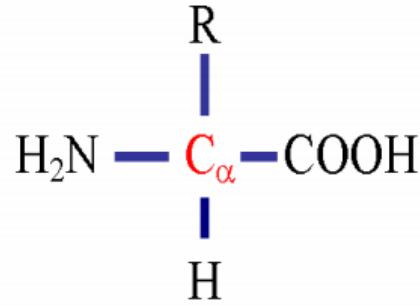
Serbest radikallerin anormal üretimi protein, lipid ve nükleik asitleri etkileyerek birçok hastalığın oluşumuna neden olur. Normal şartlar altında serbest radikallerin oluşturacağı zararlı etkiler hücrel koruma sistemi ile kontrol edilir. Bu koruyucu sistemler melatonin, vitamin E, vitamin C ve glutatyon gibi enzimatik olan veya enzimatik olmayan mekanizmalar olabilir (Jacques ve ark 1996).

Hiperhomosisteineminin etiolojisinde en sık rastlanan neden vitamin eksikliğidir. Bu nedenle hiperhomosisteinemi tanısı konulan şahıslara ilk uygulanan tedavi yöntemi antioksidan vitamin takviyesidir (Upchurch ve ark 1997).

Bu çalışmada, uzun süreli metiyonin uygulanan ratlarda homosistein düzeyindeki artışın kalp dokusu ve eritrosit antioksidan sistem üzerine verdiği hasar ve ekzojen bir antioksidan olan vitamin C'nin oluşan bu hasarı ne oranda etkilediğinin araştırılması amaçlandı.

1.1.AMİNOASİTLER

Proteinler tabiatta bulunan şekil, büyüklük, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal aktivite yönünden birbirilerinden farklı yirmi çeşit aminoasidi yapılarında bulundurlar. Aminoasitler α -karbonu adı verilen merkezi bir karbon atomuna, bir amino gurubu (-NH₂), bir karboksil grubu (-COOH), bir hidrojen atomu (-H) ve bir yan grubun (Radikal) (-R) bağlanmasıyla meydana gelen organik bileşiklerdir (Champe ve Harvey 1997).

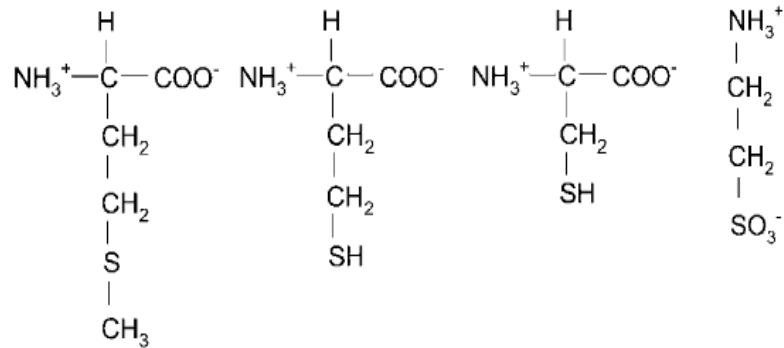


Şekil 1.1.Bir Aminoasidin Genel Formülü

Aminoasitlerin sınıflandırılmasında yaygın olarak R gruplarına göre yapılan sınıflandırma kullanılmaktadır (Brosnan ve Brosnan 2006).

1.1.1.KÜKÜRT İÇEREN AMİNOASİTLER

Kükürt içeren aminoasitler dört tane olup sistein, metiyonin, homosistein ve taurin olarak adlandırılırlar. Bunlardan metiyonin ve sistein protein sentezi sonucunda proteinlerin yapısına katılırlar (Cooper 1983, Brosnan ve Brosnan 2006).

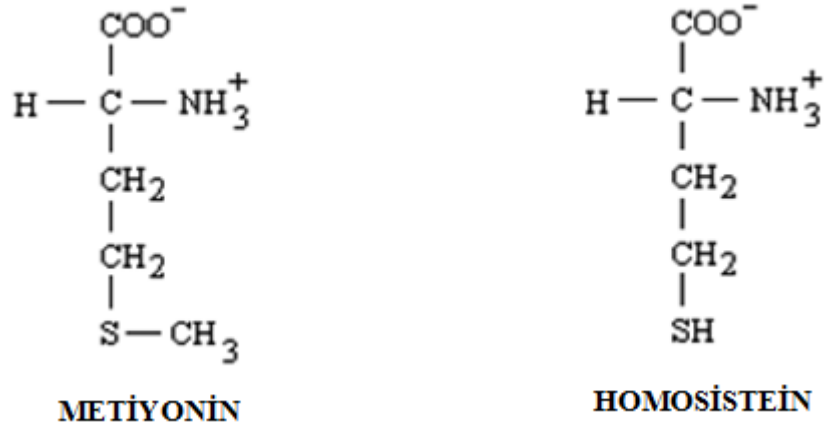


METİYONİN HOMOSİSTEİN SİSTEİN TAURİN

Şekil.1.2.Kükürt içeren aminoasitlerin yapıları (Brosnan ve Brosnan 2006)

1.1.2.METİYONİN

Genellikle diyetle hayvansal gıdalardan ekzojen olarak alınan bir aminoasit olan metiyonin (Met; M; 2-amino-4-metiltiyotobütirik asit), ayrıca vücutta endojen proteinlerin bozulması sonucu ya da homosisteinin remetilasyonu ile de oluşabilir. Metiyoninin homosisteinden farkı, 4.pozisyondaki kükürt atomuna bir metil (-CH₃) grubu bağlanmış olmasıdır.



Şekil 1.3. Metiyoninin ve homosisteinin yapısı (Davir ve ark 2001)

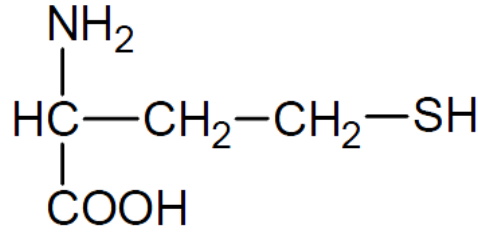
Metiyonin, standart genetik şifrede sadece bir kodona (AUG) sahiptir. Başlangıç kodonu olan bu AUG kodonunun özelliği, ribozomlarda mRNA'dan protein sentezleme işleminin (Translasyon) başlayabilmesi için başlangıç sinyalini vermesidir. Bu sebeple, ökaryotik hücrelerde proteinlerin N-terminalinde yer alan ilk aminoasit metiyonindir. Genellikle bu ilk metiyonin daha sonra proteinin yapısından çıkartılır. Metiyonin diğer aminoasitler gibi proteinlerin başka pozisyonlarında da yer alabilir (Davir ve ark 2001).

Metiyonin, transsülfürasyon yolu ile sistein aminoasidinin üretilmesini, ayrıca spermin ve spermidin gibi poliaminlerin meydana gelmesini sağlaması gibi biyolojik önemi olan esansiyel bir aminoasittir. S-Adenozilmetiyonine (SAM) çevrilerek protein yapısına katılan metiyonin, çeşitli biyolojik moleküller için metil kaynağı (-CH₃) olmasıyla önemlilik arz etmektedir. Ayrıca, homosistein metabolizmasında önemli bir role sahip olan metiyonin; intrasellüler folat metabolizması ve kolin katabolizması için gerekli homosisteinin sağlanması gibi biyolojik süreçlerde yer alır ve memelilerin normal büyüme ve gelişimi için gereklidir (Miller ve ark 1994, Finkelstein 2000).

1.1.3 HOMOSİSTEİN

İlk defa 1932 yılında Butz ve Du Vigneaud tarafından tanımlanan homosistein (Hcy) kükürt içeren 135,2 dalton ağırlığında bir aminoasittir (Nygard ve ark 1999).

Homosistein [Hcy; HSCH₂CH₂CH(NH₂)CO₂H, 2-amino-4-merkaptobutirik asit], sadece metiyonin metabolizmasının bir ara ürünü olarak vücutta oluşturulur. Diğer aminoasitlerin aksine diyetle birlikte alınan endojen proteinlerden sentezlenen metiyoninin metabolizması sonucu, metiyoninin metil grubu alınarak ortaya çıkan metabolik bir türevidir (Cooper 1983, Finkelstein 2000).



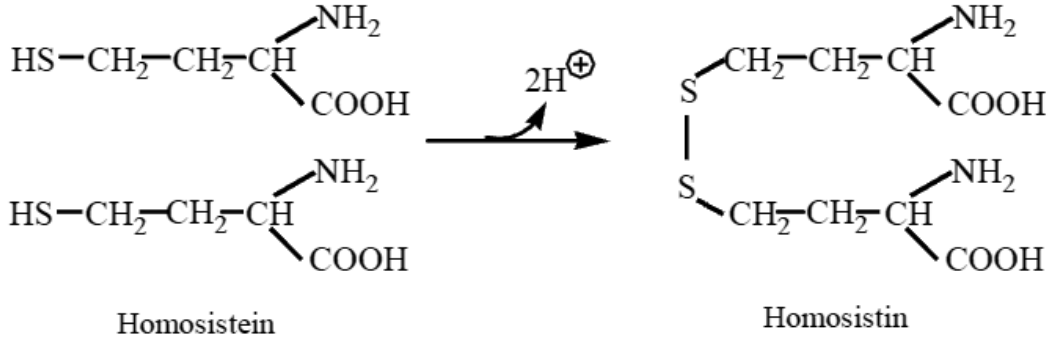
Şekil 1.4. Homosistein kimyasal yapısı (Nygard ve ark 1999)

1969 yılında, McCully, bir otopsi sonucunu değerlendirirken, yoğun arteriyel tromboz, ateroskleroza olan çocuklarda plazma ve idrarda yüksek homosistein düzeylerinin görüldüğünü bildirmiştir. Bu gözlemlerine dayanarak, yüksek plazma homosistein düzeyleri ile vasküler hastalıklar arasında bir ilişki olabileceği hipotezini ortaya atmıştır (McCully 2005).

Toplam plazma homosisteinin yaklaşık %80'i disülfid köprüleriyle albümine bağlıdır. Bağlı olmayan homosistein türleri ise başlıca 'homosistein-sistin' ve 'homosistein-homosistein' disülfidleri şeklinde bulunur. Kan dolaşımındaki toplam homosisteinin sadece %1'i serbest homosistein şeklindedir (Nygard ve ark 1995).

İnsan kan plazmasındaki homosistein, serbest veya proteine bağlı olarak hem indirgenmiş hem de yükseltgenmiş formda bulunur (Çizelge 1.1). Homosistein sıvı fazda çok dayanıksız olup miktarı artınca oksidasyonla homosistine dönüşür (Şekil 1.5). Normal sağlıklı kişilerin idrarındaki homosistein tespit edilemeyecek kadar eser miktardadır. Fakat sistatyon β-sentaz eksikliğinde homosisteinin sistatiyona dönüşümü azaldığından dolayı miktarı artmaktadır. Metiltetrahidrofolat transferaz eksikliğinde homosistinüri meydana

geliş sebebi ise, metiyonine geri dönüşümün azalmasından dolayıdır (Temel ve Özerol 2002).



Şekil 1.5. Homosistein'in oksitlenmesi sonucu homosistin oluşması (Temel ve Özerol 2002)

Homosisteinle ilgili yapılan araştırmalar sonucunda bazı kimyasal tanımlamalar belirlenmiştir. Bu kimyasal tanımlamalardan, birincisi sülfidriilli ya da redükte formdaki homosistein. İkinci tanımlama ise disülfidli ya da okside formdaki homosisteindir. Disülfidli formlar, reaktif sistein kalıntıları içeren proteinlerle ve sisteinle meydana gelir. Üçüncü bir tanımlama ise homosisteinin okside formları mikst disülfidler olarak da adlandırılır. Dördüncüsü sistinli homosistein yani homosistein-sistein kompleksidir. "Total homosistein" plazma ve serumdaki bütün homosistein formlarını belirtmek için kullanılan kavramdır. Bu, İndirgenmiş homosistein, proteine bağlı homosistein, serbest homosistein ve homosistein-sistein kompleksi gibi kavramlar için genel olarak kullanılmaktadır (Temel ve Özerol 2002).

Çizelge 1.1. Total plazma homosistein bileşenleri ve yüzdeleri (Temel ve Özerol 2002)

İndirgenmiş (redükte) Homosistein	Yükseltgenmiş (oksidize) Homosistin	Mikst disülfidler: Proteine bağlı homosistein	Sistinli homosistein
$ \begin{array}{c} \text{NH}_3^- \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{SH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{NH}_3^- \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\ \\ \text{NH}_3^- \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{NH}_3^- \\ \\ \text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\ \\ \text{Protein}-\text{S} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{NH}_3^- \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2-\text{S} \\ \\ \text{NH}_3^- \end{array} $
%1	%5-10	%80-90	%5-10

Homosisteinin metabolizmasının hücre içinde sıkı bir şekilde ayarlanması hayati önem taşır. Hücrelerde homosisteinin oluşumu çeşitli mekanizmalarla oksidatif strese ve toksik etkilere sebep olmaktadır. Bu nedenle Hcy üretildikten sonra meydana gelen bu etkilerin zararlarından remelitasyon ve transsülfürasyon olmak üzere iki yolla homosistein metabolize edilerek korunmaya çalışılır (Brosnan ve Brosnan 2006).

1.1.3.1 Homosistein Metabolizması

Homosistein metabolizmasında remetilasyon ve transsülfürasyon olmak üzere başlıca iki yol vardır (Finkelstein 1998).

Transmetilasyon yolu ile metiyonin homosisteine dönüşür. Bir kez homosistein meydana geldikten sonra ya remetilasyon yolu ile yeniden metiyonine dönüşür ya da transsülfürasyon yolu ile sistatyonin ve sisteine metabolize olur (Mineer ve ark 1997).

Stabil izotopla işaretleme yönteminin metiyonin metabolizmasına uygulanmasıyla transmetilasyon, remetilasyon ve transsülfürasyon yollarının insandaki dağılımı gösterilmiştir (Di Buono ve ark 2003). Bu dağılımda, insanlarda genç erişkinlerde 1-1,5 gr/kg/gün protein alındığında oluşan homosisteinin yaklaşık olarak % 43 remetile olurken, % 57'sinin transsülfürasyon yoluyla metabolize edildiği gösterilmiştir. Bu sonuç her iki yolun da yaklaşık olarak aynı öneme sahip olduğunu ve hemen hemen aynı oranda kullanıldığını göstermektedir (MacCoss ve ark 2001).

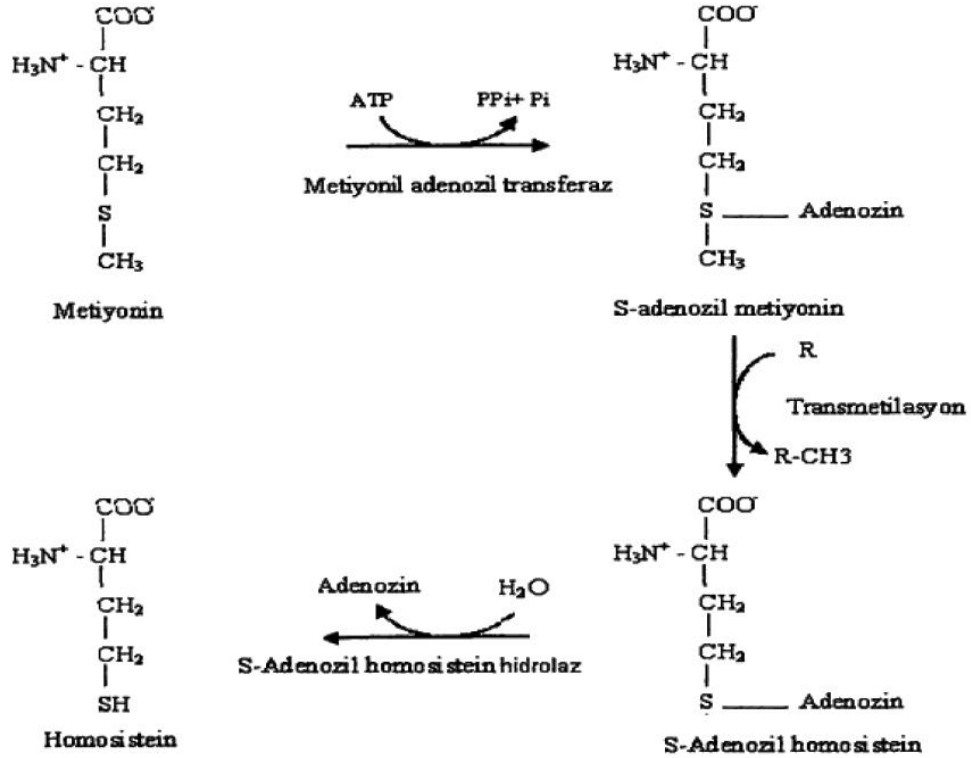
1.1.3.1.1 Transmetilasyon

Diyetle alınan metiyonin, metiyonin adenzil transferaz (MAT) enzimi ile kükürt atomuna ATP'den bir adenzil grubunun transferi sonucu metil vericisi olan ve oldukça reaktif bir metil grubuna sahip olan S-adenzil-L-metiyonine (SAM) dönüşmektedir. SAM, ilk defa 1953 yılında Catoni tarafından tespit edilmiştir (Catoni 1953).

S-adenzil-L-metiyonin'deki bu metil grubu; fosfolipidler, proteinler, miyelin, katekolaminler, polisakkaritler, kreatin, karnitin, DNA, RNA ve birçok nöromediyatöre transfer edilerek, metilasyon reaksiyonlarının devamlılığı sağlanır. SAM, organizmadaki en önemli tek biyolojik metil vericisidir (Moat ve ark 2004).

S-adenzil-L-metiyonin yapısında bulunan metil grubunu glisin gibi metil alıcılarına vererek çoklu transferaz enzimi ile S-Adenzil Homosisteine (SAH)

dönüşmektedir. SAH, S-adenozilhomosistein hidrolaz enzimi tarafından hidrolizi sonucu homosistein ve adenozeine parçalanmakta, oluşan homosistein remetilasyona girerek metiyonine, serin ile birleşerek sistatinyonine dönüşmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Homosistein oluşumu (Mineer ve ark 1997)

1.1.3.1.2. Remetilasyon

Homosisteinden yeniden metiyonin aminoasidinin sentezlendiği yoldur. Homosisteinin remetilasyon ile metiyonine dönüşümünde görevli olan enzimler:

- 1- Metiyonin sentaz (MS; 5-metiltetrahidrofolat-homosisteinmetiltransferaz)
- 2- Betain-homosistein metiltransferaz (BHMT),enzimleridir.

Betain-homosistein metiltransferaz temel olarak karaciğerde bulunmasına rağmen az miktarda da böbrekte bulunur ve metil vericisi olarak betain kullanılır. Metiyonin sentaz (MS) enzimi ise dokularda yaygın olarak bulunur, metil vericisi olarak 5-metiltetrahidrofolatı (5-MTHF), kofaktör olarak ise B₁₂ vitaminini kullanır (Stabler ve ark 1993). Bu yol kısa ve uzun olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir (Şekil 1.7).

Folat ve vitamin B₁₂'den bağımsız olarak çalışan küçük bir remetilasyon yolu olan bu kısa yol, başlıca karaciğerde daha az miktarda ise böbreklerde gerçekleşmektedir. Bu yolu katalizleyen betain homosistein metil transferaz (BHMT) enzimi, metil vericisi olarak kolinin oksidasyon ürünü olan betainin metil grubunu, homosisteine aktararak metiyonin oluştururken kendisi dimetilglisin'e (N,N-dimetilglisin) dönüşmektedir. Bu yol sayesinde folat ve/veya vitamin B₁₂ eksikliğinde S-adenozil metiyonin sentezi için gerekli olan metiyoninin doku konsantrasyonunun varlığı devam etmektedir (Finkelstein 1998).

Uzun yolu folik asidin plazmadaki bir formu olan 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF)'in, bir metil grubu vericisi olarak rol oynaması oluşturmaktadır. Folat, remetilasyon döngüsünde hem kofaktör hem de koenzim olarak 5-MTHF metil grubunu, metiyonin sentaz (MS) enzimi ile homosisteine aktararak metiyonin sentezini gerçekleştirir. Aynı zamanda diğer taraftan da tetrahidrofolat (THF) oluşur. THF ise daha sonra kofaktörü vitamin B₂ (riboflavin) olan 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktaz (5,10-MTHFR) enzimi ile 5,10- Metilentetrahidrofolat'a (5,10- MTHF) çevrilir. 5-MTHF'den metil grubunun homosisteine aktarılmasında vitamin B₁₂ aracı görevindedir. B₁₂ vitamini eksikliğinde 5-MTHF metabolizması etkisiz hale gelir ve birçok kimyasal tepkimelerde karbon birimi alıcısı konumunda olan THF'a dönüşemez (Seshadri ve Robinson 2000, Şen ve ark 2009).

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi, FAD bağımlı bir enzimdir. Bu sebeple homosistein metabolizması suda çözünen dört vitamene (folat, vitamin B₂, vitamin B₆ ve vitamin B₁₂) ihtiyaç duymaktadır. Bu dört vitaminin aktif koenzim formuna dönüşümlerinde bozulmaların olması veya herhangi bir eksikliklerinin görülmesi hiperhomosisteinemiye yol açmaktadır (Finkelstein 1998).

1.1.3.1.3. Transsülfürasyon

Homosisteini metiyonin döngüsünden alıp geri dönüşümsüz olarak önce sistatyonine daha sonra sırasıyla sistein ve glutatyona dönüştüren yolağa transsülfürasyon denir. Bu reaksiyonlar sırasında ayrıca α -ketobütirat, NH₄⁺, taurin, pirüvat, sülfat ve CO₂ de oluşur (Mattson ve ark 2002).

Hücre ortamında fazla miktarda metiyonin varlığında veya sistein sentezi gerektiği zaman, homosistein transsülfürasyon yoluna girer. Bu yolak homosistein'in katabolizması ile başlayan geri dönüşümsüz bir yolak olup akabinde sistatyon, sistein oluşur. Oluşan

sistein ya glutatyonun (GSH) yapısına girer ya da sülfata dönüşerek glikozaminlerin yapısına katılır. Bu yol karaciğerdeki glutatyonun en önemli temel kaynağıdır (Obeid ve Herrmann 2006).

Transsülfürasyonun ilk basamağında homosistein ve serin aminoasidi, Sistatyonin Beta Sentaz (CBS) enzimi tarafından katalize edilerek sistatyonini meydana getirmektedirler. Sistatyonin daha sonra gama-sistatyonaz enzimi ile α -ketobütirat, NH_4^+ ve sisteine metabolize edilir. Oluşan sistein sülfata çevrilerek glikozaminoglikanların (GAG: heparan, sülfat, kondraitin sülfat gibi) sentezinde kullanılır veya idrarla atılır. Diğer yandan, homosistein ile birleşerek sistein-homosistein disülfid bileşiklerini de oluşturabilmektedir (Finkelstein 1998).

Sistatyonin Beta Sentaz enzimi transsülfürasyon yolu için en önemli enzimdir. Bu enzime ait homozigot defektler sebebiyle homosistein düzeyleri ($>100 \mu\text{mol/L}$) artarak homosistinüriye neden olur. Heterozigot defektlerde ise parsiyel CBS eksikliği meydana gelir ve orta düzeyde hiperhomosisteinemi görülebilir. Metiyonin yüklenme testinden sonra hiperhomosisteineminin belirgin bir şekilde ortaya çıkması ile teşhisi konulabilir (Boztepe ve Altok 2002, Temel ve Özerol 2002).

Transsülfürasyon yolağı memeli dokularında yaygın olarak rastlanmaz; bu yol öncelikle karaciğer, böbrek ve pankreasta meydana gelir. Çünkü bu dokular glutatyon döngüsünün en hızlı olduğu dokulardır (Brosnan ve Brosnan 2006). Homosistein metabolizması Şekil 1.7’de görülmektedir.

1.1.3.2 Homosisteinin Hidrolizi

Homosistein sistein oluşumunda sülfidril grubu sağlayıcısıdır. Metiyoninden sistein oluşması sırasında α -ketobütirat oluşur; α -ketobütirat da propiyonil-CoA ve metilmalonil-CoA üzerinden süksinil-CoA’ya dönüşür. Sistein, serinin karbon iskeleti ve metiyoninin veya homosisteinin kükürlü parçalarını içeren formudur. Sistein ayrıca, protein sentezi, glutatyon sentezi için de kullanılır veya diğer katabolizma ürünlerine dönüştürülür. Metiyonin veya homosistein karbon iskeleti α -ketobütirat formunda, pirüvat hidrojenaz veya ketoasit dehidrojenaz kompleksinin zincirlerinden birisiyle mitokondri içine alınarak oksitlenir ve Süksinil CoA ile TCA döngüsüne girer (Paxton ve ark 1986, James ve ark 1999).

1.1.3.3 Homosistein Metabolizmasının Regülasyonu

Homosistein metabolizmasının düzenlenmesinde ara metabolitlerin miktarı, diyet içeriği gibi; birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir. Örneğin; homosistein oluşumunun S-Adenozilhomosistein ve S-Adenosilmetiyonin gibi etkili metabolitler tarafından remetilasyon ve transsülfürasyon yollarıyla düzenlendiği görülür. Metiyonince zengin bir öğünün tüketimini takiben hepatik SAM düzeyi artar. Bu durum sistatyonin- β -sentaz enziminin aktivasyonu ile SAM fonksiyonunun artmasına ve metilentetrahidroflat redüktazın inhibe olmasına neden olur. Bu nedenle homosistein remetilasyonu sınırlandırılır (Malinow 1994, James ve ark 1999).

Homosistein remetilasyonunu sınırlandıran bu aşamalar fazla miktardaki metiyoninin sistein sentezine doğru kaymasına ve yeter miktardaki metiyonini sağlamaya yardımcı olur. SAH, sistatyonin- β -sentazın bir aktivatörü olduğundan transsülfürasyon yoluyla homosistein değişimini sağlamak için SAM ile sinerjik olarak çalışır. SAH tarafından sistatyonin- β -sentazın aktivasyonu transmetilasyonun inhibisyonunu ve aşırı derecede SAH birikimini kontrol etmek için çalışır (Finkelstein ve ark 1974).

Ortamda sistein varsa, homosistein transsülfürasyon yolağına değil, transmetilasyon yolağına girdiği izotop çalışmalarından elde edilen verilere göre gösterilmiştir. Bu verilere göre sisteinin, metiyonin-homosistein metabolizmasında düzenleyici etkiye sahip olduğu ispatlanmıştır (Di Buono ve ark 2003).

Homosistein metabolizmasını düzenleyen enzimler metiyonini koruyan ve katabolize edenler olarak iki gruba ayrılabilir.

Birinci grup; metiyonini koruyan enzimler (MAT: Metiyonin Adenozil Transferaz izoenzimleri, SAM bağımlı transmetilazlar, BHMT: Betain Homosistein Metil Transferaz ve MS: Metiyonin Sentaz enzimi) kendi metabolitleri ve ürünleri tarafından inhibe edilmektedir. Bu enzimlerle beraber adenozilhomosisteinaz enzimi de metiyonin döngüsünün oluşmasını sağlar (Corrales ve ark 2002).

İkinci grup ise; metiyonini katabolize eden enzimler (Hepatik metiyonin S-adenozil transferaz, sistatyonaz, sistatyonin sentaz ve adenozilhomosisteinaz) olup, kendi metabolitleri tarafından aktive edilirler ve diyetle alınan metiyonin miktarının artması

sonucunda karaciğerdeki düzeyleri artış gösterir (Finkelstein 2000, Finkelstein ve Martin 2000).

1.1.3.4 Homosistein Düzeyleri ve Ölçümü

Homosisteinin ölçümü amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi kütle spektroskopisi (GC-MS), aminoasit kromatografisi, ELISA, antikor floresans polarizasyon immunoassay, elektrokimyasal ve radyoenzimatik ölçümdür (Perry 1999).

Homosistein düzeyleri genellikle total plazma homosisteini veya total serum homosisteini olarak ölçülmektedir. Bu ölçüm serbest ve proteine bağlı kısmı da içermektedir. Yapılan çalışmalarda plazma homosistein düzeylerinin yaşlanma ve cinsiyet (erkeklerde) ve postmenopozal kadınlarda değişebileceği saptanmıştır (Jousilahti ve ark 1996, Utku ve Çelik 2002).

Normal homosistein düzeyine sahip kişilerde homosistein artışında şüphe edildiğinde oral metiyonin yükleme testi yapılabilmektedir. Bu test oral metiyonin verilmesine takiben hücre içi homosistein üretimi ve kullanımı arasındaki dengenin araştırılması amacıyla yapılır. Metiyonin yükleme testi yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra 6. ve 8. saatlerde plazma homosistein ölçümü yapılmaktadır. Kullanılan oran 100 mg/kg olup oral olarak verilmektedir. Metiyonin yüklemesinden sonra ölçülen oran, açlık düzeyine göre 2 standart sapmadan daha fazla ise hiperhomosisteinemiden bahsedilir (Bostom ve ark 1999).

1.1.3.5 Hiperhomosisteinemi

İnsanda plazma total homosistein düzeylerinin 15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerine çıkması "*hiperhomosisteinemi*" (HHcy) olarak tanımlanmaktadır. Total plazma homosistein düzeyine göre hafif, orta ve ağır hiperhomosisteinemi olarak değerlendirilmektedir (Çizelge 1.2) (Robinson ve ark 1995, Jacobsen 1998).

Çizelge 1.2.Hiperhomosisteinemi plazma homosistein düzeyleri (Temel ve Özerol 2002)

<i>Hafif Hiperhomosisteinemi</i>	15-25 µmol/L
<i>Orta Hiperhomosisteinemi</i>	25-50 µmol/L
<i>Ağır Hiperhomosisteinemi</i>	50-500 µmol/L

Şiddetli hiperhomosisteineminin arteriyoskleroz ve serebral tromboemboli sebebi, orta hiperhomosisteineminin ise vasküler risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür (Kocabalkan ve ark 2000, Turgut ve ark 2004, Gezici ve ark 2008). Hafif hiperhomosisteineminin ise kontrol altında tutulması ileriki dönemlerde hipertansiyon ve koroner hastalıkların gelişiminin önlenmesi açısından önemlidir. Hiperhomosisteineminin genel popülasyondaki prevalansı % 5-30 arasındadır (Dal ve ark 2006).

Sağlıklı yetişkinlerde homosistein düzeyi 5-15 µmol/L olarak ölçülmüşse de, bunu normal olarak değerlendirirken dikkatli olunmalıdır; çünkü 10 µmol/L düzeyinden sonra homosistein ile ilişkili sağlık riskleri artmaktadır. Uygun beslenme ve tedavi ile homosisteinin 10 µmol/L düzeyinde tutulması mümkündür (Robinson ve ark 1995, Jacobsen 1998).

1.1.3.6 Hiperhomosisteineminin Nedenleri

Plazma homosistein düzeylerini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; demografik, genetik, edinsel, yaşam stili ve fizyolojik faktörler ile bazı kronik hastalıklar olmak üzere sınıflandırılabilir. Ayrıca birçok ilaç homosistein düzeyini değiştirebilir (Jacobsen 1998, Hankey ve Eikelboon 2001).

Homosistein düzeylerini etkileyen ve hiperhomosisteinemiye neden olan faktörler Çizelge 1.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Hiperhomosisteinemi nedenleri (Hankey ve Eikelboon 2001)

<p>1-Homosistein Metabolizmasındaki Genetik Bozukluklar</p> <ul style="list-style-type: none">• Transülfürasyon yolunda Sistasyonin β-sentaz enzim eksikliği• Remetilasyon yolunda N5,N10-metilen-tetrahidrofolat redüktaz eksikliği Metiyonin sentaz eksikliği
<p>2- Kronik Hastalıklar</p> <ul style="list-style-type: none">• Kronik böbrek yetmezliği• Diyabet• Hipotiroidizm• Ciddi psöriazis• Maligniteler (Akut lenfoblastik lösemi, over, meme, pankreas kanseri)• Transplant alıcıları
<p>3- Edinsel Nedenler</p> <ul style="list-style-type: none">• Vitamin B₁₂ eksikliği• Folik asit eksikliği• Vitamin B₆ eksikliği• Metiyonin alımının artması (Hayvansal protein alımı)
<p>4- Fizyolojik Nedenler</p> <ul style="list-style-type: none">• İleri yaş• Erkek cinsiyet• Sigara kullanımı• Fiziksel inaktivite• Menopoz
<p>5- İlaçlar</p> <ul style="list-style-type: none">• Metotreksat (Dihidrofolat redüktaz inhibitörü)• Fenitonin ve karbamezapin (Folat antagonistleri)• Nitröz oksit (Vitamin B₁₂ antagonisti)• 6-azouridin triasetat (Vitamin B₁₂ antagonisti)• Metilksantin (Vitamin B₆ inhibitörü)

1.1.3.7 Hiperhomosisteineminin Patofizyolojik Mekanizmaları

Hiperhomosisteinemi ile ilişkili aterojenik olaylar endotel hasarı, bunu takip eden trombosit aktivasyonu ile trombus oluşumunu kapsamaktadır. Çalışmalarda, homosistein aracılı endotel hasarının subendotelyal matrikste başladığı ve takibinde trombosit aktivasyonu olduğu gösterilmiştir (Kuch ve ark 2001, Pfanzagl ve ark 2003).

Ayrıca yüksek homosistein seviyeleri ile reaktif oksijen türleri oluşumu, endotelyal toksisite, trombositlerin artmış adezyonu, pıhtılaşma faktörlerindeki modifikasyonlar ve azalmış adenozin üretimi de görülmektedir (Miner ve ark 1997, Riksen ve ark 2003).

Homosistein, prooksidan bir molekül olarak düşünülmektedir. Homosistein plazmaya geçerse okside olur. Homosisteinin homosistin ve hidrojen peroksit otooksidasyonu potansiyel sitotoksik pek çok reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Homosisteinin tiyol (-SH) grubu hızlı bir şekilde okside olur. Bu oksidasyon esnasında süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) meydana gelir. Aterojenik olayların başlangıç basamağı oksidasyon sırasında açığa çıkan bu reaktif oksijen türevlerinin oluşumu ile indüklenir. Bu reaktif oksijen türevlerinin oluşumu da endotelyal hücre bütünlüğünü bozarak endotel hasarına sebep olur ve etkilenen damarlar ateroskleroz gelişimine predispoze duruma gelir. Ayrıca bu radikaller endotel hücrelerinin yüzeyinde, plazmadaki lipoprotein parçacıklarının içindeki gibi lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Loscalzo 1996).

Homosistein, vasküler hücrelerin biyokimyasal ve biyosentetik fonksiyonlarını etkileyerek vasküler matrikse de doğrudan zarar vermektedir. Homosistein oksidasyonunun oldukça reaktif bir ürünü olan homosistein tiolaktonun, intimal makrofajlar tarafından alınan agregatları oluşturmak üzere düşük dansiteli lipoproteinle (LDL) ve olgunlaşmamış ateromatoz plak içinde köpük hücreleriyle birleştiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Ayrıca LDL kolesterolün oksidasyonuna yol açarak LDL'nin plazmadan temizlenmesini sağlayan reseptörlere bağlanmasını engel olmakta, okside LDL'nin serum seviyesini artırmakta ve endotelde köpük hücrelerine dönüşümü sağlayıp ateroskleroza zemin hazırlamaktadır (Welch ve Loscalzo 1998).

Homosistein ile indüklenen vasküler hasara ait diğer bir mekanizma ise nitrik oksit (NO) ile ilişkilidir. NO, nitrik oksit sentaz tarafından katalize edilen bir reaksiyon sonucu

L-argininden oluşan, birçok biyolojik etkiye sahip bir moleküldür. Endotelyum-bağımlı bir vazodilatör olan NO, antitrombotik ve antiproliferatif bir molekül olup, kardiyak kontraktileti de düzenlemektedir (Lentz 1997, Seshadri ve Robinson 2000).

Normal endotel hücrelerinin NO üretmekle homosisteini detoksifiye ettikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Normal plazma konsantrasyonlarında homosistein, oksijen varlığında NO ile birleşerek S-nitroso-homosisteini (SNOHcy) oluşturmaktadır. S-nitroso-homosistein aynı zamanda kuvvetli bir trombosit inhibitörü ve vazodilatör etkiye sahip olup, trombosit agregasyonu ve trombosit-aracılı vazokonstriksiyonu inhibe ederek; NO'nun damar-koruyucu etkilerini artırmaktadır (Stamler ve ark 1993, Lentz 1997, Seshadri ve Robinson 2000).

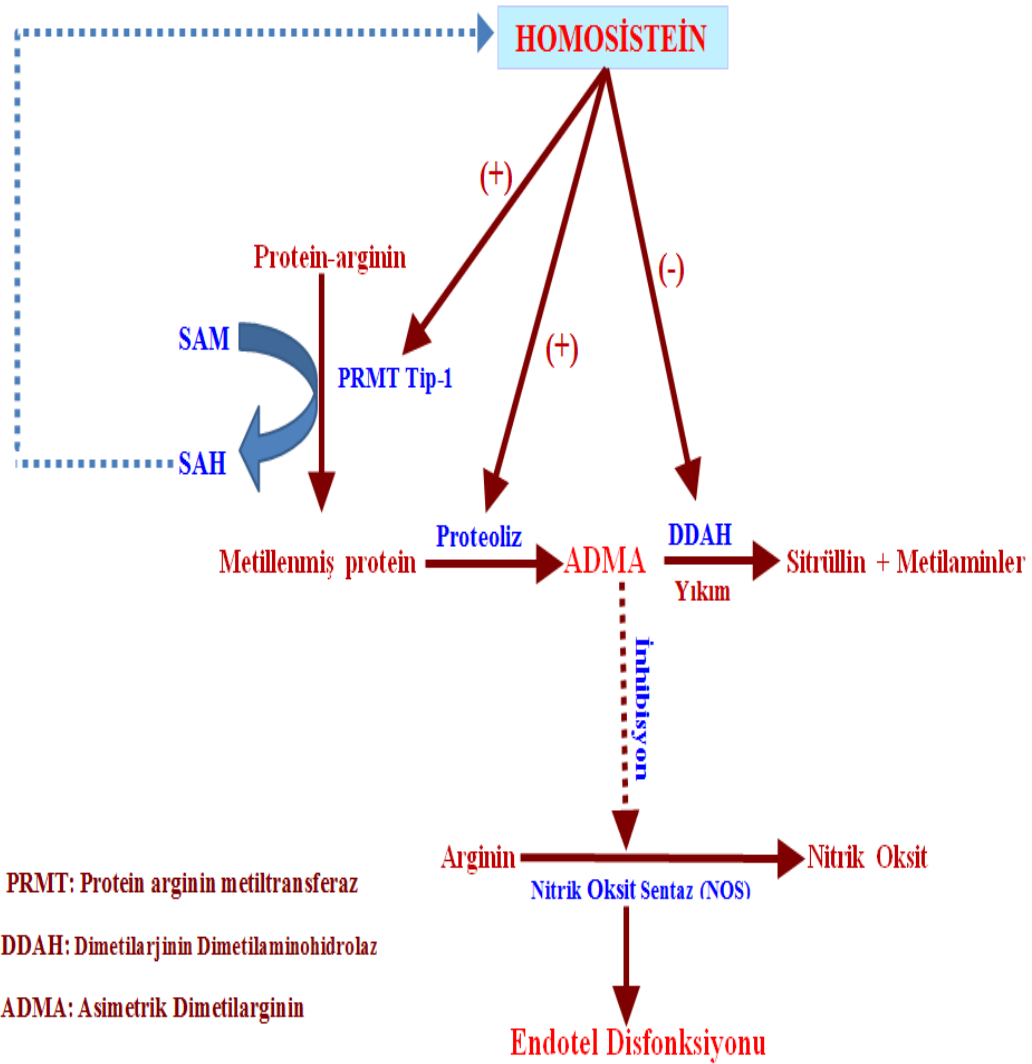
Homosisteinin NO sentezini bozarak da NO miktarını azalttığı bildirilmiştir. Rocha ve arkadaşları (2012), yapmış oldukları çalışmada, hiperhomosisteiminin nitrik oksit biyoyararlanımını azalttığını ve bu yüzden vasküler hastalık ve endotelial disfonksiyonda bağımsız bir risk faktörü olarak düşünülebileceğini belirtmişlerdir.

NO'nun biyoyararlanımının azalmasındaki diğer bir muhtemel mekanizması ise; endojen inhibitörü olan asimetrik dimetilarginin (ADMA) tarafından Endotelial Nitrik Oksit Sentetazın'ın (eNOS) baskılanmasıdır (Lentz ve ark 2003). ADMA, özellikle endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO yolağının önemli bir endojen düzenleyicisidir. ADMA düzeyindeki artışın endotel disfonksiyonunun yeni bir belirteci olabileceği ileri sürülmektedir (Akkiprik ve ark 2007). ADMA, çoğunlukla endotel hücrelerde ve böbrekte bulunan Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) tarafından L-sitrüline ve dimetilamine metabolize olur. ADMA düzeyinin artmasının önemli bir sebebi DDAH fonksiyon yetersizliğidir (Ito ve ark 1999).

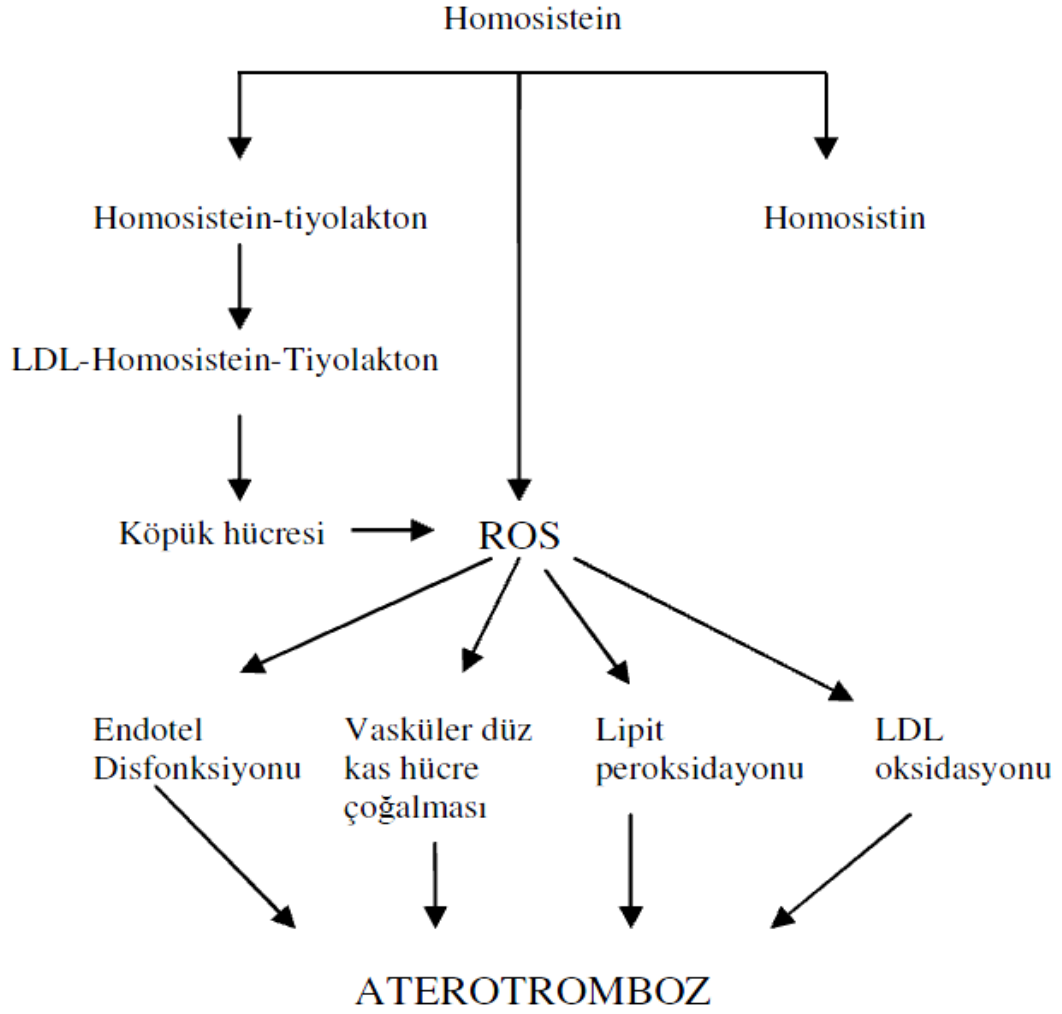
Homosisteinin ADMA seviyesini artırarak NO sentezini azalttığı ve bu yolla endotel fonksiyonlarını bozduğu bildirilmektedir. Homosisteinin DDAH enzim aktivitesini azalttığı, Protein arginin metiltransferaz (PRMT) enzim aktivitesini ve proteolizi artırdığı ve bu yolla ADMA düzeyini artırdığı son yıllarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Markus ve ark 2003).

ADMA ve homosisteinin oluşum mekanizmaları akla geldiğinde aralarında metabolik bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Bu iki molekül birbirleriyle metil transferaz

reaksiyonları sırasında karşılaşmaktadır (Dayal ve Lentz 2005). ADMA oluşumu, PRMT enzimleri tarafından metillenmiş proteinlerin proteolizinden oluşmaktadır. PRMT'ler ise bu metilasyon işlemlerini SAM'ın metil donörlüğünde yapmakta ve SAM'ın metil grubu vermesiyle SAH (ve sonuçta homosistein) meydana gelmektedir (Cynober 2002, Böger ve ark 2009, Pope ve ark 2009). Ayrıca homosisteinin DDAH inhibisyonuna da sebep olabileceği söylenmektedir (Doshi ve ark 2005). Homosisteinin, ADMA arasındaki muhtemel ilişki ve homosisteinin ADMA metabolizmasına etkileri Şekil 1.8.'de gösterilmiştir.

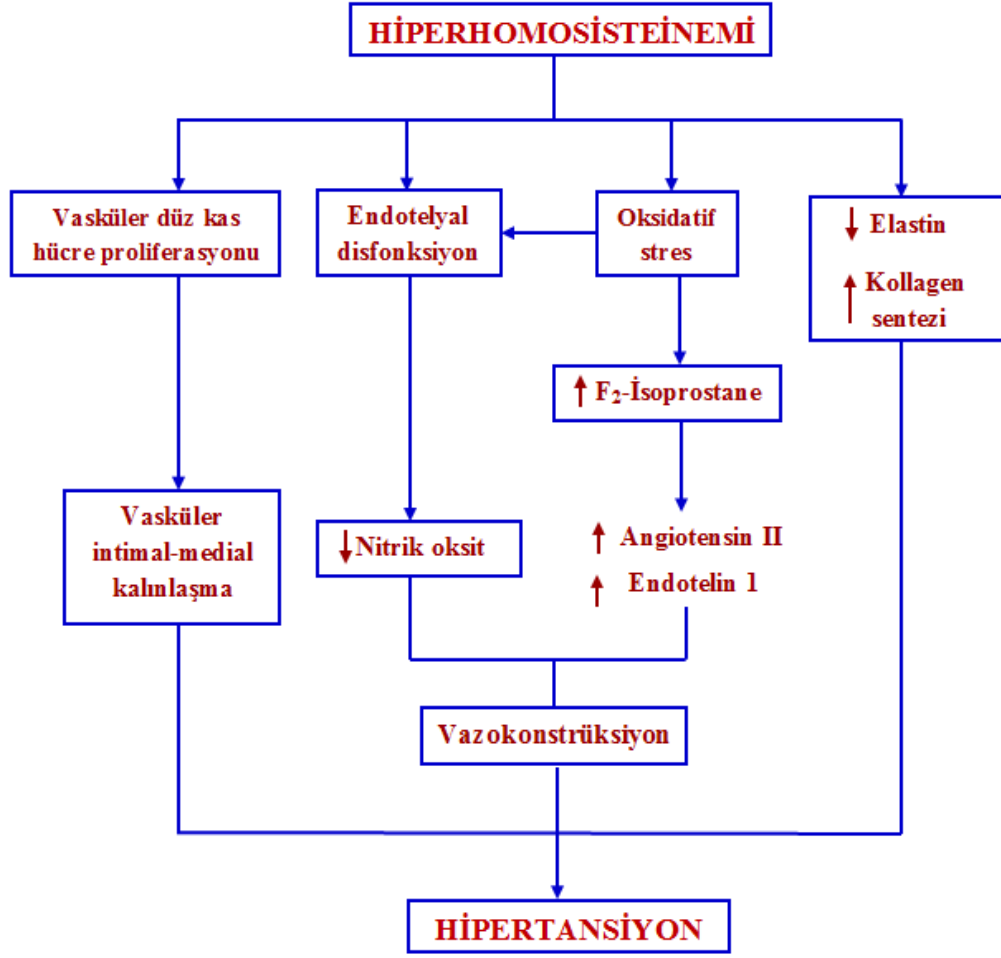


Şekil 1.8. Homosisteinin ADMA metabolizmasına etkileri (Wanby ve ark 2003)



Şekil 1.9. Homosisteine bağlı vasküler hasar mekanizması (McCully 1996)

Hiperhomosisteineminin hipertansiyon oluşumunda da etkili olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 1.10). Hiperhomosisteineminin vasküler hastalık için sigara ve arterial hipertansiyon gibi bağımsız bir risk faktörü olduğu bulunmuş ve sigara içen ve hipertansif hastalarda risk katlanmasına yol açmıştır. Özellikle bu yüzden araştırmacılar hiperhomosisteinemili hastalarda sigarayı bırakmanın ve arteriyel hipertansiyonu kontrol etmenin önemini vurgulamaktadırlar (Yapıcı 2004).



Şekil 1.10. Hiperhomosisteineminin hipertansiyon oluşumundaki rolü (Bulmuş 2006)

Hiperhomosisteineminin patofizyolojisinde yüksek homosistein düzeylerinin etkilerini özetlersek:

- ✓ LDL-kolesterolü okside eder
 - ✓ Endotelyal fonksiyonları bozar
 - ✓ Damar duvarına monosit adezyonunu artırır
 - ✓ Lipid alımını ve birikimini artırır
 - ✓ İnflamatuvar yolları uyarır
 - ✓ Düz kas proliferasyonunu uyarır
 - ✓ Platelet disfonksiyonuna neden olur
 - ✓ Koagülasyon faktörlerini aktive ederek tromboza eğilim oluşturur
- (Kaul ve ark 2006).

1.1.3.8. Hiperhomosisteineminin Tedavisi

Homosisteinin temel kaynağı olan metiyonin içeren hayvansal proteinlerin kısıtlanması hiperhomosisteinemi tedavisinde ilk basamaktır. Bu sebeple homosistein düzeylerinin düşürülmesinde kişisel beslenmenin düzenlenmesi büyük önem taşımaktadır (Dalery ve ark 1995). Tedavideki ikinci ve en etkili basamak ise homosistein metabolizmasında görevli enzimlerin koenzimleri olan folik asit, Vitamin B₁₂ ve Vitamin B₆'nın yeterli miktarda alınmasıdır (Israelsson ve Brattström 1988, Lindenbaum ve ark 1988, Ubbink ve ark 1993, Arnesen ve ark 1995, Perry 1999).

Hiperhomosisteineminin tedavisinde folik asitle desteklenmiş besinlerle beslenmenin tavsiye edilmesi gerektiği günümüzde klinik deneyler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Günlük diyete 0,5-5,7 mg folik asit eklenerek total homosistein seviyesi yaklaşık altı hafta sonunda %25 oranında azaltılabilmektedir. Ayrıca Vitamin B₁₂ ilavesi ile bu oran %7 oranında daha da azalmaktadır (Lindenbaum ve ark 1988, Dalery ve ark 1995, Andreotti ve ark 2000).

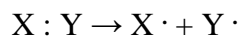
Hiperhomosisteinemide genel tedavi yaklaşımı, kombine olarak vitamin verilmesi şeklindedir. Bu kombine, günlük olarak 400 mg folik asit, 5 mEq'dan az demir, 122 µg vitamin B₁₂, 10-40 mg B₆ vitamini içeren multivitamin karışımını içermektedir. Ayrıca bu karışıma ilaveten 800 µg folat verilmektedir. Bu tedaviye 8-10 hafta devam edilerek plazma homosisteinin düzeyleri önemli oranda azaltılmaktadır (Challem ve Dolby 1997).

1.1.4. SERBEST RADİKALLER

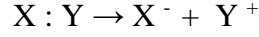
Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron bulunduran, yüksek enerjili, stabil olmayan, atom veya moleküllerdir (Bast ve Goris 1989, Lohr 1991, Akkuş 1995, Diplock 1998).

Serbest radikaller üç yolla ortaya çıkabilir (Halliwell ve Gutteridge 2001) :

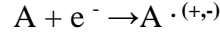
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan bir tanesi kalır).



2. Bir molekülden bir tane elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile meydana gelirler. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Bir moleküle bir tane elektronun eklenmesi ile ortaya çıkabilirler.



Serbest radikaller biyolojik sistemlerde en fazla elektron alışverişi sırasında üretilir (Akkuş 1995).

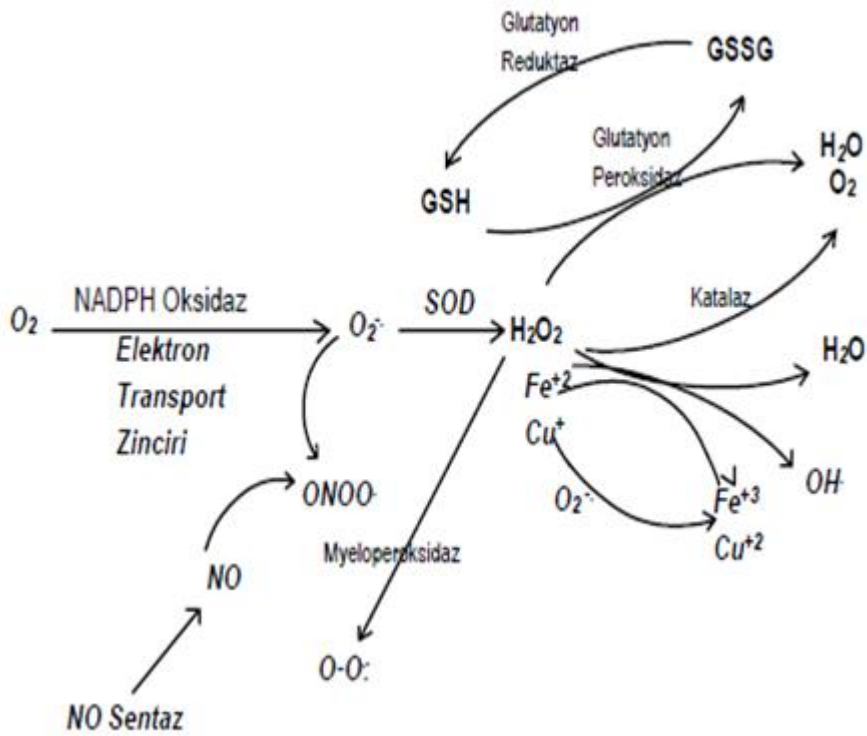
1.1.4.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksijen insan hayatı için çok elzem olmasına rağmen, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda oldukça zarar verme potansiyeline sahiptir (Diplock 1998). Çoğunu serbest radikallerin meydana getirdiği ROT normal oksijen molekülüyle kıyaslandığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır (Nawar 1996).

Bu bileşiklerin organizmada yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen, yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapıda olan serbest radikaller bütün hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir (Uysal 1998).

Çizelge 1.4. Reaktif oksijen türleri (Sözmen 2002)

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



Şekil 1.11. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu (Vincent ve ark 2004)

1.1.4.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir:

- a) DNA' nın tahrip olması,
- b) Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı,
- c) Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- d) Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler,
- e) Protein ve lipidlerle kovalan bağlantılar yapması,
- f) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- h) Proteinlerin tahrip olması ve protein “turnover” nin artması,
- i) Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değişmesi,
- j) Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması,
- k) Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir (Uysal 1998).

1.1.4.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

Serbest radikaller, biyomoleküllerin bütün sınıflarından karbonhidrat, lipid, protein, DNA ile etkileşme özelliğine sahip olduğu gibi aynı zamanda bütün hücre komponentleri ile de etkileşme özelliği gösterirler. Hücre yapısında ve metabolizmasında değişikliklere sebep olurlar. Bu değişiklikler sırasıyla ayrı ayrı başlıklar altında açıklanmaktadır (Gutteridge 1995).

1.1.4.4. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri

Hücre membranı kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Bu reaksiyon, otokatalitik olabilir ve lipid peroksit, lipid alkol ve aldehitik yapıda ürünler verebilir. Lipid peroksidasyonu sırasında, poliansatüre yağ asitleri (PUFA) hidrojenini kaybeder ve moleküler oksijenle reaksiyona girer. Hücre membranındaki yağ asitlerinin kaybı, lipid peroksitlerin oluşumu ve lipidler

tarafından oksijen alımı peroksidasyonun varlığını gösterir. Serbest radikallerin daha önce sözü edilmiş bütün kaynakları tarafından plazma membranında ve organelde lipid peroksidasyonu uyarılabilir ve metal varlığında peroksidasyonun şiddeti artabilir. Bu metaller, redoks katalistleri gibi davranırlar ve süperoksit radikali, hidrojen peroksitin güçlü oksidanlara dönüşümünü katalize ederler (Svingen ve ark 1979).

Lipid peroksitler de oksijenin serbest radikalleri gibi benzer hücre bileşenleri üzerinde toksik etkilerini gösterirler. Lipid radikallerin hidrofobik yapıları nedeni ile reaksiyonların büyük çoğunluğu membrana bağlı moleküller ile meydana gelecektir. Membran yağ asitlerinin peroksidasyonundan sonra ortamda kısa zincirli yağ asitlerinin varlığı membran permeabilitesini ve mikroviskoziteyi ciddi boyutlarda etkileyebilir. Lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehit, membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açar. Bunun sonucu olarak malondialdehit, esneklik, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyi determinantlarının agregasyon durumu gibi intrinsik membran özelliklerine sahip olduğu için DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir. Bu özellikleri ile malondialdehit, mutajenik, kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Mukai ve Goldstein 1976).

Lipid peroksidasyonu; fosfolipid, gliserid glikolipid, ve steroidlerin yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidan maddeler aracılığıyla aldehit, alkol, hidroksi asit, pentan ve etan gibi ürünlere yıkılmasını kapsayan bir zincir reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan bu ürünlerin potansiyel olarak yıkıcı etkileri vardır. Bu şekilde oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA kan plazmasında kolaylıkla saptanmakta ve oksidatif stres ölçümlerinde kullanılabilir (Akkuş 1995, Yerer ve Aydoğan 2000).

Serbest radikallerden etkilenen membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda gelişen malondialdehit, oksidatif hasarın, sistematik dolaşımda düzeyi saptanabilen dolaylı göstergesidir ve oksidatif stresin bir indikatörü olarak kullanılmaktadır (Koca 2007).

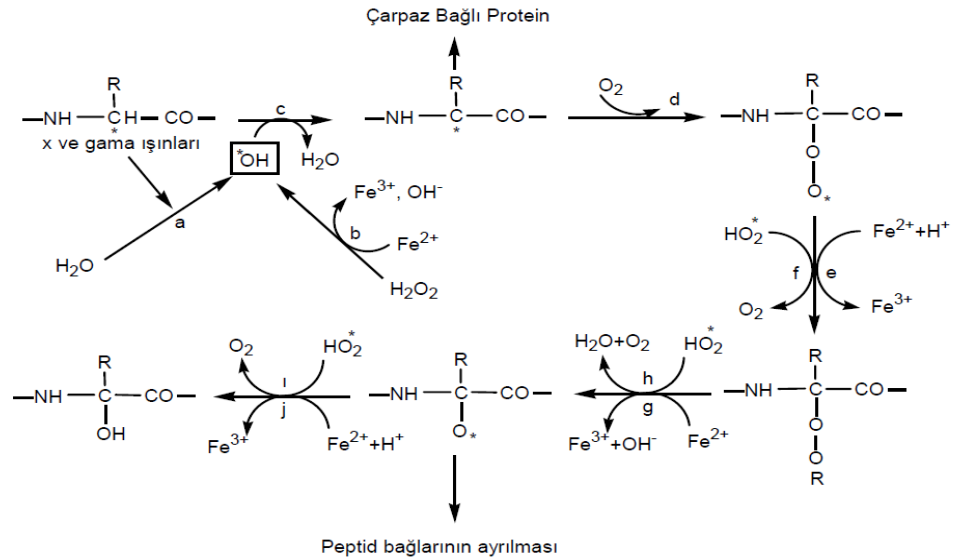
Malondialdehid yükselmesi, serbest oksijen radikallerinin etkisi ile artmış lipid peroksidasyonunu gösterir. Lipid peroksidasyon, organik yapılar ve membranların fonksiyonları üzerine çok zararlı etkilerine bağlı olarak, hücre ölümüne kadar ilerleyen değişiklikler oluşturur (Ming ve ark 2002).

1.1.4.5. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme derecesi aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağlar ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip olan proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur (Burtis ve Ashwood 1999).

Proteinlerin reaktif oksijen türleri veya oksidatif stres ürünleriyle kovalent modifikasyonu sonucu protein oksidasyonu meydana gelir (Shacter 2000). Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde moleküler oksijenle birlikte süperoksit anyon radikali ve süperoksitin protonlanmış formu olan hidroperoksil (HO_2^-)'in varlığı da gereklidir. Bu reaktif oksijen türleri aminoasitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile protein fragmentasyonuna neden olurlar (Berlett ve Stadman 2003, Stadtman ve Levine 2003).

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları, enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (Deby ve Pincemail 1988, Akkuş 1995, Mathers ve ark 2004).



Şekil 1.12. Protein karbonil oluşumuna primer modifikasyon reaksiyonları (Kayalı ve Çakatay 2004)

1.1.4.6. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

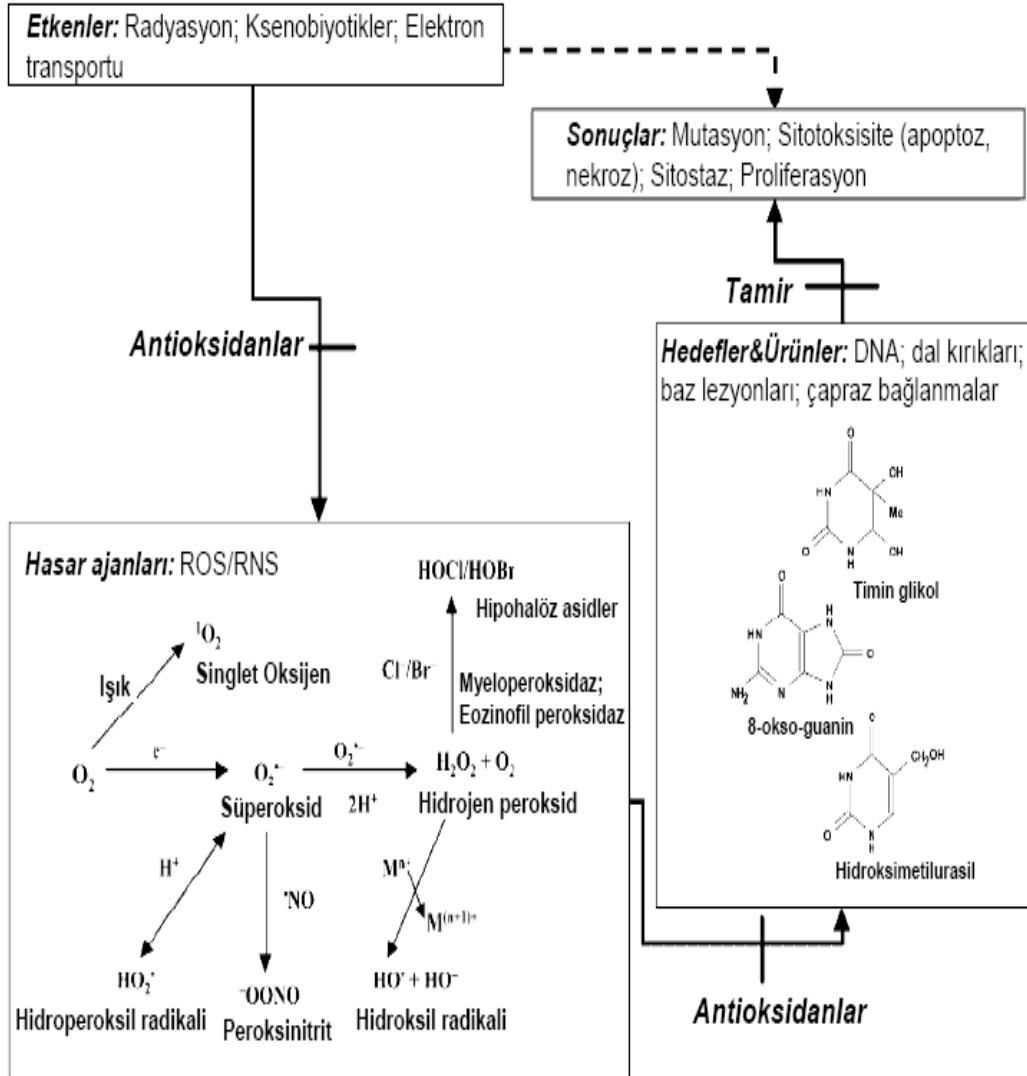
Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Monosakkaritler ve deoksişekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak süperoksit, hidrojen peroksit, peroksitler ve oksoaldehitleri meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agrege olmalarına sebep olduğu gibi bazal membran kalınlaşmasına ve sonuçta katarakt, mikroanjyopati gelişimine de sebep oldukları ileri sürülmektedir (Burtis ve Ashwood 1999, Yanbeyi 1999).

1.1.4.7. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen türleri oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve DNA onarım enzimlerinde defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (Burçak ve Andican 2004).

Hidroksil radikali (OH^\cdot), deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girmesi sebebiyle DNA'da farklılaşmalara neden olur. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında oluşursa pürin ve pirimidin bazlarını etkiler ve mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde, çift bağlara hidrojenin katılma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer veya doymuş karbon atomlarından hidrojeni uzaklaştırır. Süperoksit anyonu da güçlü bir oksitleyici olması nedeniyle, guanin gibi yüksek elektron yoğunluğu bulunan moleküllerle daha kolay tepkimeye girer (Yanbeyi 1999, Kayalı ve Çakatay 2004).

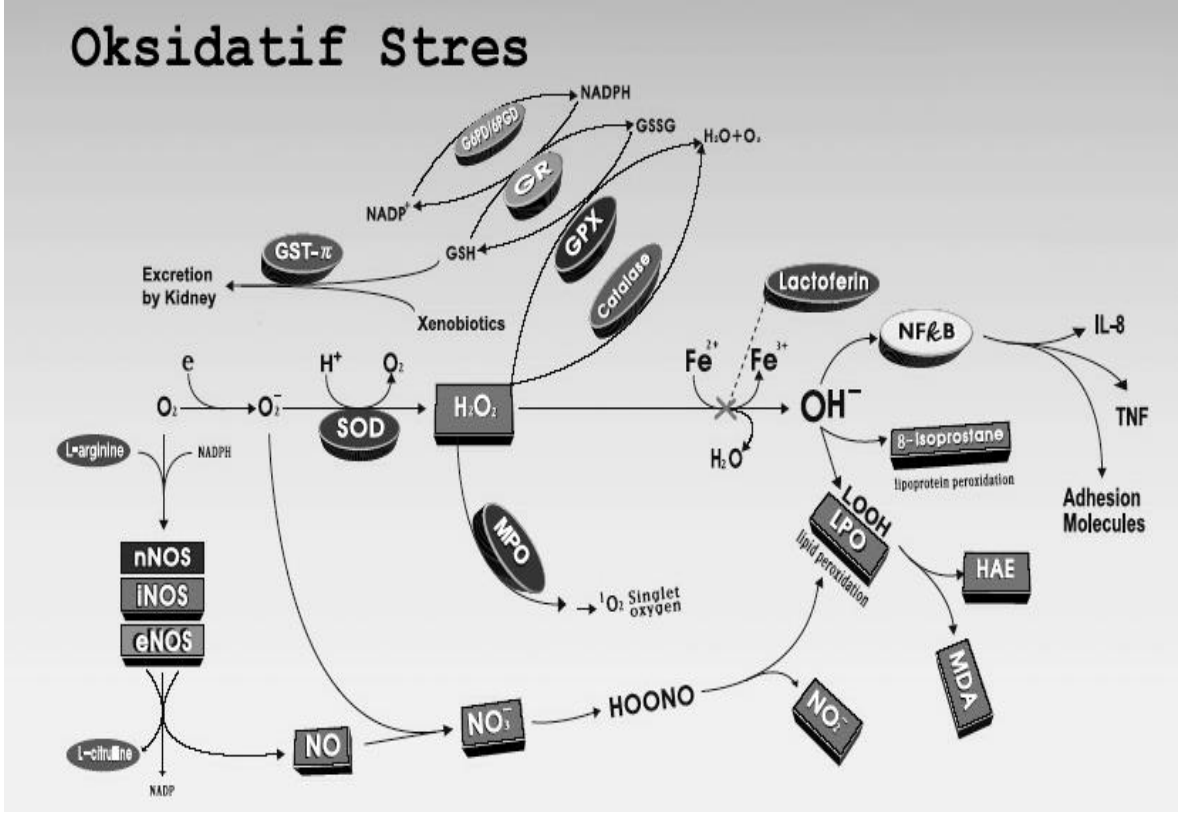
Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine gelerek DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta ölümüne yol açabilir. DNA üzerine olan oksidatif hasar hastalıklar ve yaşlanmanın patogeneğine etkilidir (Yanbeyi 1999).



Şekil 1.13. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı (Cooke ve ark 2003)

1.1.5. OKSİDATİF STRES

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde. Oksidatif denge olarak adlandırılan bu durumda denge sağlandığı müddetçe organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına sebep olur. Serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği gösteren bu durum '**Oksidatif stres**' olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.15) (Halliwell ve Gutteridge 1990, Luft 1994, Evans ve Cooke 2004, Serafini ve Del Rio 2004).



Şekil 1.14. Oksidatif Stres (Altan ve ark 2006, Anti aging biomarkers www.woongbee.com).

Oksidatif stres; ateroskleroz, iskemik hastalıklar (Kalp hastalığı, inme, barsak iskemisi), hipertansiyon, preeklampsi, nörolojik hastalıklar (Multiple skleroz, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, müsküler distrofi), infamatuvar hastalıklar (Vaskülit, artrit, glomerulonefrit) gibi birçok patolojik duruma sebep olmaktadır (Berliner ve Heinecke 1996).

1.1.6. ANTİOKSİDANLAR

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek amacıyla kullanılan birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalarla oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidanlar denir (Memişoğulları ve ark 2003, Memişoğulları ve Bakan 2004).

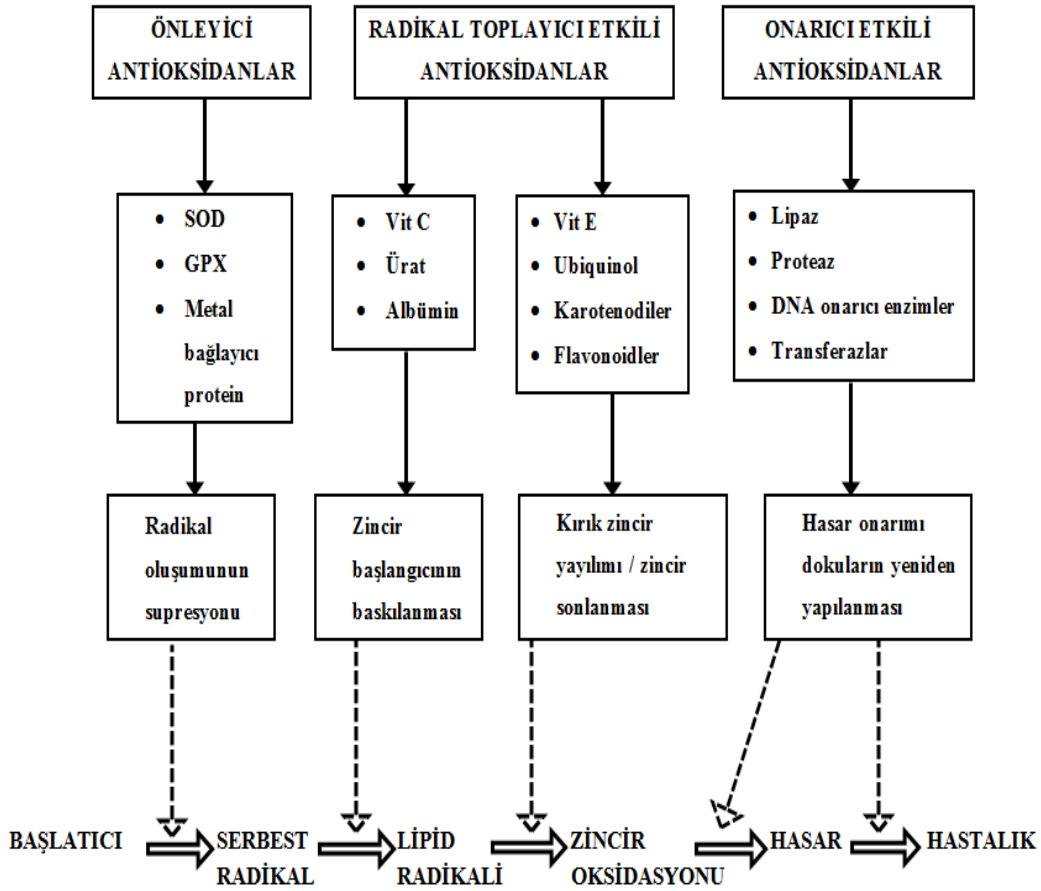
Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (Schiller ve ark 1993, Akkuş 1995) :

1. Serbest Radikal Oluşumunun Önlenmesi:

- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2. Oluşan Serbest Radikallerin Etkisiz Hale Getirilmesi:

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



Şekil 1.15. Antioksidan gruplar ve görevleri (Willcox ve ark 2004)

Antioksidanlar, endojen kaynaklı olabildikleri gibi eksojen kaynaklı da olabilirler. Oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlarken eksojen antioksidanlar ise vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılırlar (Akkuş 1995, Altan ve ark 2006).

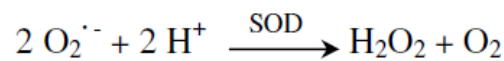
Çizelge 1.5. Antioksidanların sınıflandırılması (Akkuş 1995)

Endojen Kaynaklı Antioksidanlar		
Enzim olanlar	Enzim olmayanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD).	Melatonin	Ferritin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Seruloplazmin	Bilirubin
Glutasyon S-Transferazlar (GST)	Transferin	Glutasyon
Katalaz (CAT)	Miyogloblin	Sistein
Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi	Hemoglobin	Metiyonin
Hidroperoksidaz	Albümin	Ürat
		Laktoferrin
Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar		
Vitamin Antioksidanlar	İlaç Antioksidanlar	Gıda Antioksidanları
α -tokoferol (vitamin E)	Allopürinol, Oksipürinol,	Butylated
β -karoten	Pterin aldehit, Tungsten,	hydroxytoluene
Askorbik asit (vitamin C)	Adenozin, Lokal Anestezikler,	(BHT), Butylated
Folik asit (folat)	Diphenyline idonium,	hydroxyanisole
	Barbitüratlar, Mannitol,	(BHA),
	Albümin, Sitokinler v.b.	Sodium benzoate,
		Ethoxyquin,
		Propylgalate,
		Fe-superoxyde
		dismutase

1.1.6.1. Enzimatik Antioksidanlar

1.1.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)

Süperoksit Dismutaz (SOD), süperoksit anyonunun H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüştürülmesini katalize eden bir metaloenzimdir (Seven ve Candan 1996, Çavdar ve ark 1997, Tekkeş 2006).



Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalının anyon ve katyon formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8 de kendiliğinden de gerçekleşir. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH 7,35- 7,45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş yürür. SOD enzimi varlığında pH en az 7,4 olduğu koşullarda bu reaksiyon 4 kat daha hızlıdır (Cherubini ve ark 2005).

Süperoksit dismutaz enzimi, McCord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. SOD'un 3 çeşidi vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dır (Young ve Woodside 2001, Taysi ve ark 2002a, Taysi ve ark 2002b, Cherubini ve ark 2005).

Cu-Zn SOD molekül ağırlığı yaklaşık 32000 Daltondur. Birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşur. Her subünitede bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetilenmiş terminal amino grubu bulunduğu tespit edilmiştir (Freeman ve Crapo 1982, Fırat 1997).

İkinci izomer ise mitokondriyel matrikste ve kısmen sitoplazmada fonksiyon gösteren mitokondriyel Mn-SOD'dur (Çakar 2005).

MnSOD; prokaryotik hücrelerde molekül ağırlığı 40000 olan, birbirinin aynı iki alt birimden meydana gelir. Enzim alt birimi başına birer atom Mn bağlı olan bir dismutaz içerir. Mitokondri dismutazı da diğer prokaryotik hücrelerdeki dismutaza benzer, fakat 80000 molekül ağırlığında tetramer yapıdadır. Mitokondri ve diğer prokaryotların dismutazlarının pek çok ortak özelliği gibi primer yapıları da birbirine çok benzer. Mitokondri dismutazın bu özelliği, mitokondrinin prokaryotik orijinli olup, ökaryotik hücre içine girerek simbiyotik bir yaşam oluşturduğuna kanıt olarak kabul edilir. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur (Halliwell ve Gutteridge 1990, Yanbeyi 1999).

Ayrıca, Marklund tarafından 1982'de Ekstraselüler SOD (EC-SOD), tanımlanmıştır. CuZn-SOD'dan farklı olarak bakır ve çinko taşıyan salgısal SOD'dur. EC-SOD, sadece fibroblast ve endotelial hücreler tarafından sentez edilir. Sonra heparan sülfatlara bağlı olarak hücre yüzeyinde eksprese edilir. Damar endotelinden salınan endotelial heparin gevşetici faktör plazmada süperoksit tarafından nötralize edildiği için EC-SOD damar tonusunun düzenlenmesinde muhtemel rol oynar (Marklund 1982).

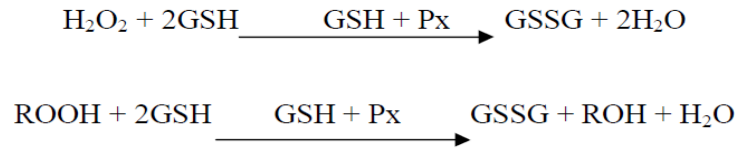
Süperoksit dismutaz, ROT'lerden süperokside bir elektron vererek H₂O₂'ye indirgerken; katalaz ve selenyum-bağımlı glutatyon peroksidaz ise H₂O₂'yi suya indirger. SOD'un antioksidan etkisi süperoksit ile Fe³⁺'ün, Fe²⁺'ye indirgenmesi sonucunda hidroksil radikali oluşumunun engellenmesi şeklindedir (Baskin ve Salem 1997a).

1.1.6.1.2. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9)

Glutatyon tarafından hidroperoksitlerin (ROOH ve H₂O₂) ve lipid peroksitlerin indirgenmesini katalizleyen, Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) enzimidir. İlk olarak 1957 yılında hayvan dokularında bulunmuştur (Onat ve ark 2002). Her birinde selenosistein içeren dört alt birimden oluşan ve memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyan selenyum içeren bir enzimidir. Redükte glutatyonu yükseltirken H₂O₂'i de suya çevirir ve böylece membran lipitlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (Mates ve Sanchez-Jimenez 1999).

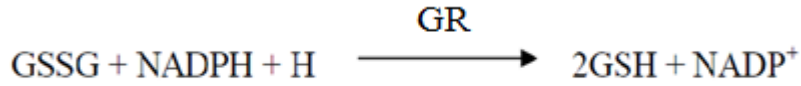
Glutatyon peroksidaz enziminin selenyum bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki izomer formu vardır. Selenyuma bağlı izoenzim selenosistein formunda olup; hem H₂O₂'i hem de organik peroksitleri (örneğin, kümen hidroperoksit) kullanabilmektedir. Selenyuma bağımlı olmayan form ise hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olup; sadece lipid hidroperoksitlerin yıkımında görev alır (Seven ve Candan 1996).

Hidrojen peroksit suya indirgenirken, GSH GSSG'e yükseltgenir. Antioksidan savunma sisteminin normal işleyişi sırasında indirgenmiş GSH, hidrojen peroksidi GSH-Px ile detoksifiye eder (Taysi ve ark 2002a).

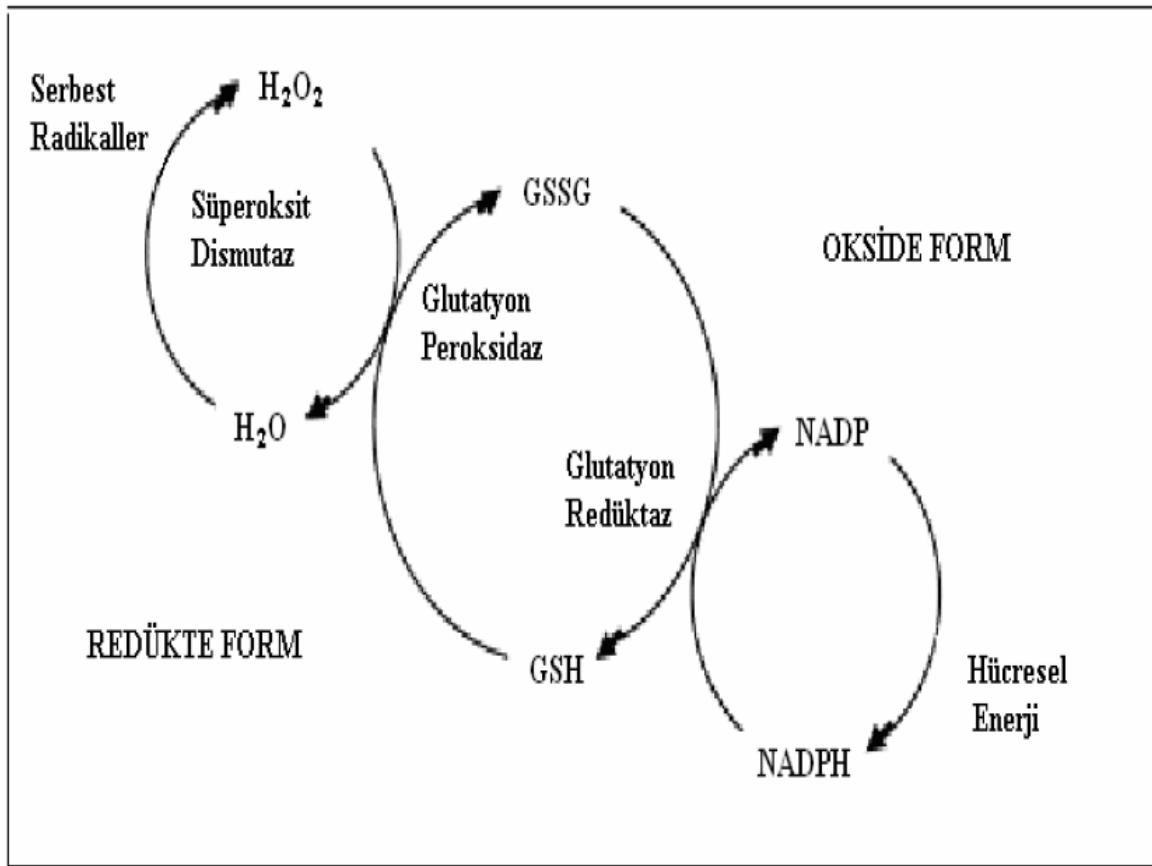


Bu enzimin aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (Fırat 1997). E vitamini yetersizliğinde GSH-Px membranı peroksidasyona karşı korur. Düşük konsantrasyonlarda H₂O₂'i glutatyon peroksidaz parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz aktivite kazanır (Memişoğulları 2005).

1.1.6.1.3. Glutatyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2)



Yükseltgenmiş glutatyonu indirgenmiş hale çeviren iki alt üniteden oluşmuş bir dimerdir. Her bir alt ünite NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve ara yüz alan olmak üzere 3 yapısal alan içerir. Okside glutatyonun bir alt ünitenin FAD alanı ve diğer alt ünitenin ara yüz alanından oluşan bir bağlanma bölgesi vardır. Glutatyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektron NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra alt ünitelerdeki iki sistein arasında bulunan iki disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyonla aktarılmış olur (Dayal ve ark 2002, Memişoğulları 2005).



Şekil 1.16. Glutatyon döngüsü (Urso ve Clarkson 2003)

1.1.6.1.4. Glutasyon S-Transferaz (GST, EC 2.5.1.18)

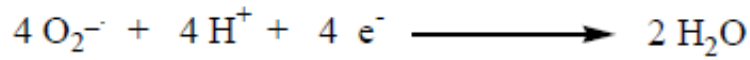
Toksik metabolitlerle glutasyonun konjugasyonunu katalizleyen GST enzimi de toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna sebep olan başka bir antioksidan enzimdir (Van Haaften ve ark 2001). GST, potansiyel toksik kimyasallara maruz kalan canlı organizmalarda savunma görevini üstlenmiştir (Siliğ ve ark 2000).

GST glutasyonun tiyol grupları ile alkilasyon ajanlarının reaksiyonunu katalizleyerek onların elektrofilik alanlarını ortadan kaldırır. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroksiperoksitleri olmak üzere lipid hidroksiperoksitlere (ROOH) karşı GST, Se-bağımsız glutasyon aktivitesi gösterir (Cervello ve ark 1992).



1.1.6.1.5. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz (EC 1.9.3.1)

Süperoksidi detoksifiye eden mitokondriye ait olan sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir.

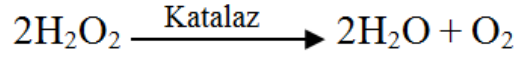


Bu tepkime fizyolojik koşullarda sürekli oluşan normal bir reaksiyondur. Bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve böylece bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır (Akkuş 1995, Dawn ve ark 1996).

1.1.6.1.6. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

Hayvansal organizmaların; başta karaciğer ve eritrosit hücrelerinde yoğun olarak bulunmasına rağmen, bütün organlarda bulunan katalaz, hücrelerde özellikle peroksizomlarda yer alan antioksidan bir enzimdir. Beyin, kalp, iskelet kasları ise düşük miktarlarda CAT içermektedir. CAT ve GSH-Px, hidrojen peroksidi su ve atomik oksijene indirgemektedirler (Garewal 1997).

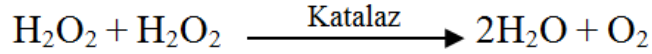
Sumner ve Dounce tarafından 1937'de kristalize halde saflaştırılmıştır. Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe^{+3} bulduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir (Sumner ve Dounce 1937). 240 kDa moleköl ağırlığında her molekölde 4 adet ferriprotoporfirin içerir. Katalaz, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler (Mates ve Sanchez-Jimenez 1999).



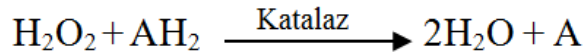
Belirtilen reaksiyona göre toksik hidroksil radikallerinin sentezlenmesi ve H_2O_2 'nin vücutta birikimi engellenmiş olur. Katalaz enzimi iki önemli reaksiyonu katalize etmektedir:

- 1-Hidrojen peroksitin dismutasyonu
- 2- Alifatik alkollerin peroksidasyonu

Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda katalitik tepkime ile etkir,



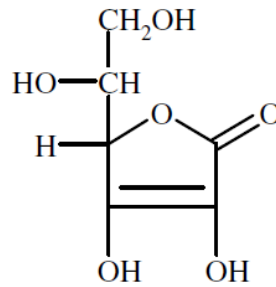
Katalaz düşük hızlarda hidrojen peroksitin oluştuğu veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğ durumlarda ise peroksidatif tepkime ile hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır (Seven ve Candan 1996, Sözman 2002).



1.1.6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1.1.6.2.1. Vitamin C (Askorbik Asit)

Askorbik asit; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine sebep olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahip suda eriyen bir vitamindir. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan savunmayı oluşturur (Cherubini ve ark 2005).



Şekil 1.17. Askorbik asidin kimyasal yapısı

Bir ketolakton olan vitamin C, kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit gibi iki aktif formu vardır ve iyi bir indirgeyicidir. Aynı zamanda askorbik asit, radikal süpürücü olup ve reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu etkiye sahiptir. Vitamin C süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidandır. Bunun yanı sıra, tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesini sağlamasıyla E vitamininin rejenerasyonunda önemli bir görevi vardır (Yanbeyi 1999).

Suda çözünebilen-zincir kıran bir antioksidan olması nedeniyle özellikle detoksifikasyon metabolizması esnasında oluşan serbest radikalleri ve ROT'leri etkisiz hale getirir (Carr ve ark 2000).

C vitamini doza bağımlı olarak paradoksal bir etki göstermektedir. C vitamini yüksek ve fizyolojik konsantrasyonlarda antioksidan etki gösterir. Bu antioksidan etkiye örnek olarak, Alul R.H. ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir çalışmada; C vitamininin fizyolojik konsantrasyonları, demir varlığında meydana gelen homosistein aracılı oksidasyondan LDL'yi koruduğu gösterilmiştir. Bu koruma ya demirin redoks kimyası ya

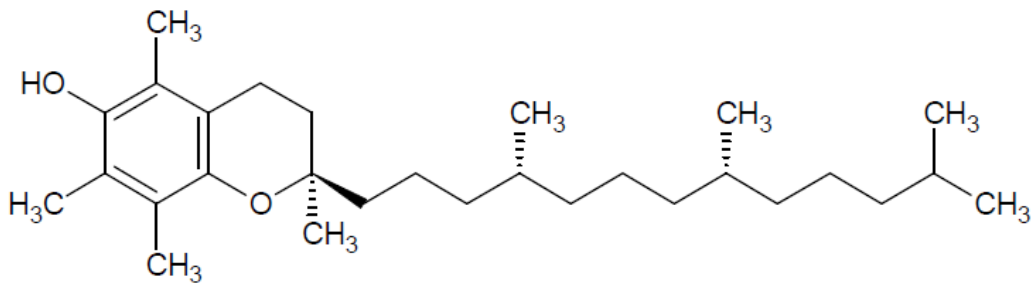
da E vitamininin geri dönüşümüne bağlı bağımsız bir mekanizma ile daha çok dehidroaskorbik asit ve lipoprotein kovalent değişikliğini içermektedir.

C vitamini E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde LDL'yi oksidasyona karşı korumaktadır. C vitamininin yüksek ve fizyolojik konsantrasyonlarda antioksidan etkisinin aksine, düşük konsantrasyonlarında ise Na^+K^+ -ATPaz aktivitesini azaltır ve membran fosfolipid yapısını değiştirerek lipid peroksidasyonunu artırır (Halliwell 1996, Seven ve Candan 1996).

C vitamininin düşük plazma (0.2 mmol/L'den düşük) seviyeleri oksidan etki de gösterebilir. Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyebilen süperoksit dışında başka bir ajan olup demiri Fenton reaksiyonuna girmeye uygun hale getirir. Bu uygunluğun hemen ardından, vitamin C'nin plazmada seviyeleri düşük olduğu zaman süperoksit üretimine katkıda bulunur (Van Haften ve ark 2001, Chao ve ark 2002, Cherubini ve ark 2005).

1.1.6.2.2. Vitamin E (α -tokoferol)

1925 yılında Evans ve Bishop isimli araştırmacılar bazı lipitlerin eksikliğine bağlı olarak üreme yetersizliği olduğunu keşfetmişlerdir. 1936 yılında ise Evans tarafından buğday tohum yağından ekstrakte edildikten sonra tokoferol olarak tanımlanmıştır. Laboratuvar denemelerinde E vitamini ile beslenmeyen fareler dünyaya canlı yavru getiremediklerinden dolayı tocopherol kelimesi tocos: çocuk, phero: doğurtan, ol: alkol kelimelerinden türetilmiştir (Tekkeş 2006).



Şekil 1.18. α -tokoferol (Landvik ve ark 1998)

E vitamini, membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. En aktif formu α -tokoferoldür ve zincir kırıcı antioksidan olarak görev yapar. Hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen -OH grubu bağlıdır. Bu sebeple lipid peroksidasyonu

sırasında meydana gelen peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine α -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur.

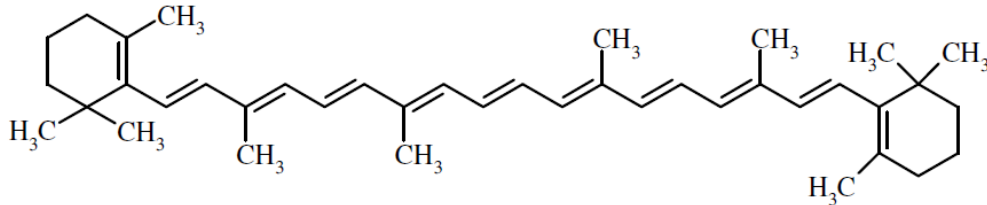


Böylece α -tokoferol yeni bir radikal olan α -tokoferol-O $^{\cdot}$ 'e dönüştürülür. Bu radikalın başka bir yağ asidiyle birleşebilme aktivitesi düşüktür. Sonuç olarak zincir reaksiyonunu durdurur. Oluşan bu tokoferoksil radikali membran yüzeyinde askorbik asitle reaksiyona girerek yeniden tokoferole dönüşmektedir (Murray ve ark 1998).

Glutasyon peroksidaz ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı bir etkiye sahiptir. Vitamin E peroksitlerin sentezini engellerken glutasyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırır (Beutler ve ark 1963, Akkuş 1995, Yanbeyi 1999).

1.1.6.2.3. Vitamin A (β -karoten)

Karotenoidler isimlerini ilk kez izole edildikleri havucun Latince isminden (*Daucus carota L.*)'dan almışlardır. Karotenoidler, metil grupları eklenmiş, konjuge çift bağları bulunan doymamış, alifatik zincir yapısındadır (Çalıklı 2003, Şanal ve ark 2004).



Şekil 1.19. β -Karotenin kimyasal yapısı (Payan 2007)

β -karotenin antioksidan etkisi singlet oksijeni yakalaması, serbest radikalleri temizlemesi ve hücre membranı lipidlerini oksidatif dejenerasyona karşı korumasıdır. β -karoten yüksek konsantrasyonlarda prooksidan olarak davranmakta ve proteazları aktive etmektedir. Ayrıca β -karoten diğer ROT'lerini de etkisiz hale getirmektedir. β -karotenin düşük oksijen basıncında peroksil radikali ile doğrudan reaksiyona girmesi bu radikallerinin yakalanmasında görev yaptığını göstermektedir. Yüksek oksijen basıncında ise, vitamin E'nin aynı yönde etkisi ile peroksit radikallerinin dokularda yakalanmasından sorumlu bir antioksidan etki göstermektedir (Baskin ve Salem 1997b).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

2.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmada, ortalama 200–250 gram ağırlıklarında 36 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (22° C)'da yeteri kadar su ve yem ile toplam 6 hafta süreyle beslendiler ve çalışmaya başlamadan bir ay önce alınarak ortama adaptasyonları sağlandı. 12 adet rat kontrol grubu olarak seçilirken kalan 24 adet rat ise deney grubu olarak iki gruba ayrılarak çalışıldı. Çalışma boyunca deney hayvanlarına yapılacak tüm müdahaleler, ADÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar çerçevesinde 02/09/2009 tarihli, 2009/62 sayılı araştırma kapsamında ADÜ Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.1.2.Deney Grupları ve Uygulama Protokolü

Grup I:Kontrol grubu, (n=12)

Her gün normal pelet yem ve çeşme suyu ile ad libitum beslendi.

Grup II: Hiperhomosisteinemi grubu (n=12)

Hiperhomosisteinemi sağlamak için L-metiyonin suda çözülerek Grup II'deki ratlara 6 hafta boyunca her gün 1 g/kg dozunda oral gavaj yoluyla verildi. Ratlar her hafta tartılarak verilecek metiyonin dozu haftalık hesaplandı.

Grup III: Hiperhomosisteinemi + Vitamin C grubu (n=12)

Bu gruptaki ratlara her gün 1 g/kg dozunda L-metiyonin yanında 150 mg/kg vitamin C gavaj yoluyla verildi. Grubun ortalama ağırlıklarının haftalık ölçümleri ile verilen doz ayarlandı.

Hayvanlar öldürülmeden önce kan örnekleri alındı ve elde edilen plazma örneklerinde malondialdehit (MDA) düzeyleri hemen ölçüldü. Plazma örnekleri elde edilirken glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerinin tayini için eritrositler ayrıldı ve salin fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde analizler gerçekleştirilinceye kadar -20°C de derin dondurucuda saklandı. Enzim

aktivite tayinleri 10 gün içerisinde gerçekleştirildi. Gruplardaki ratların ağırlıkları her hafta kaydedildi. 6 haftalık denemenin sonunda tüm gruplardaki hayvanlara hafif eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı ve kalp dokusu örnekleri alınarak analizlerin yapıldığı güne kadar -80°C de muhafaza edildi. Elde edilen doku homojenatında MDA düzeyleri ölçülürken SOD, GSH-Px, CAT antioksidan enzim aktiviteleri analizleri hem doku örneklerinde hem de eritrosit hemolizatında gerçekleştirildi. Ayrıca serum homosistein düzeyleri ticari Rat Homosistein Kiti kullanılarak ELİSA cihazında ölçüldü.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan; -80°C'lik derin dondurucu (Glacier ultralow temperature freezer, Japonya), -20°C'lik derin dondurucu (Bosch, Türkiye), ELISA okuyucusu (Optic İvymen System 2100-C, İspanya) ve çalkalayıcısı (Insel Hamble S03 8DH, İngiltere), santrifüj (Nüve NF800R, Türkiye), homojenizatör (Yellow Line Ost Basic, Almanya), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Avusturalya), vorteks (Velp, İtalya), manyetik karıştırıcı (Velp, İtalya), etüv (Memmert, Almanya), hassas terazi (Sartorius, Almanya), pH metre (pH 211, Hanna, Amerika) ve otomatik pipetler (İsolab 2-20 µl, İsoTerm 20-200 µl, Brand 5-50 µl, İsoTerm 100-1000 µl), kullanıldı.

2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler sırasında Triklorasetikasit (TCAA) (Merck, K36929507), Tiyobarbitürik Asit (TBA) (Merck, L55063680), Bütanol (Merck K37211388), NaCl (Sodyum klorür) (Merck, 6400), Potasyum klorür (KCl) (Sigma- P9333), Disodyumhidrojenfosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, 6580), Potasyumdihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck-4871), Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck-K40027400), Eter (Carlo Erba, 447522), Etil alkol (Smyras, 2050500), Glutasyon Redüktaz (Sigma G-4751) , NADPH+H (Sigma N-6505) , Ksantin (Sigma X-0626), Ksantin Oksidaz (Sigma X-1875), Amonyum Sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Sigma-A4418), Nitroblue Tetrazolium (NBT) (Serva 30550), Potasyum siyanür (KCN) (Sigma-60178), Sodyum hidrojen karbonat (Sigma-401676), Redükte Glutasyon (GSH) (Sigma-Aldrich-G4251), EDTA (Sigma EDS), Sodyum Azid (Sigma-S2002), t-bütül hidrojen peroksit (Sigma- 416665), Kloroform (Sigma-Aldrich-C2432), Sodyum Hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich-S8045), Sodyum Karbonat (Na_2CO_3) (Sigma-Aldrich-S7795), Sığır

albumini (Sigma-A2153), Bakır Klorür (CuCl_2) (Sigma-Aldrich-751944), Disodyumhidrojenfosfat (Sigma-Aldrich S7907), L-Metiyonin (Sigma-Aldrich-M9625), Potasyumferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (Sigma-Aldrich-702587), Rat Homosistein ELISA kiti (CUSABİO BİOTECH-CSB-E13376r) kullanıldı.

2.2.Yöntemler

2.2.1. Serum Homosistein Düzeyi Ölçümü

Serum homosistein düzeyleri Rat Homosistein ticari kiti kullanılarak (CUSABİO BİOTECH-CSB-E13376r) manuel olarak ELİSA cihazında çalışıldı.

Analizin Prensipleri:

Kitin içinde gelen plaka, önceden homosisteine spesifik antikor ile kaplanmış olarak sunulmaktadır.

Daha sonra bu şekilde hazırlanmış uygun plate üstüne standartlar veya örnekler, biyotin-konjugatlı poliklonal antikor (homosisteine spesifik) ve avidin konjugat horseradish peroxidaz (hrp) eklenerek inkübasyona bırakıldı.

TMB (3,3,5,5 tetrametil-benzidin) substrat çözeltisi her bir kuyucuğa ilave edildi ve buna bağlı olarak renk değişimi gözlenmesi gerekir ki enzim substrat reaksiyonu sülfürik asit solüsyonu eklenmesiyle sonlandı ve meydana gelen bu renk 450 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Örneklerdeki homosistein konsantrasyonu örnek ve standardın optik dansite eğrisinin kıyaslamasıyla hesaplandı.

Analiz Aralığı:

Standart eğri için kullanılan konsantrasyonlar: 50, 25, 12,5 6,25 3,13 1,56 ve 0,78 nmol/ml olarak hesaplandı.

Reaktif Hazırlığı:

1-Yıkama Çözeltisi: 20 ml yıkama tamponundan alınıp deiyonize veya distile su ile 500 ml yıkama çözeltisi hazırlandı.

2-Biyotin Antikor: Biyotin antikor dilüent ile 1:100 oranında seyreltildi.

3-HRP-avidin: Aynı şekilde HRP-avidin dilüent ile 1:100 oranında seyreltildi.

4-Standart: Standartlar 6000-10000 rpm de 30 sn boyunca santrifüj edildi. Standart 1 ml sample dilüent ile sulandırıldı ve meydana gelen stok solüsyon 50 nmol/ml oldu. Standartın içine 1 ml dilüentten koyulduktan sonra (50 nmol/ml) bu stoktan hazırlamak üzere 6 adet ependorfa 200 µl dilüent ilave edildi ve ilkinden 200 µl alınıp bir diğerine boşaltıldı.

ANALİZ PROSEDÜRÜ

1- Her bir kuyucuğa 100 µl standart, blank veya örnek eklendi ardından yapışkan bant ile plate kaplandı 37 °C’de 2 saat inkübe edildi.

2- Her bir kuyucuğun ıslaklığı giderildi.

3- Her bir kuyucuğa 100 µl Biotin antibody çalışılan çözeltisinden ilave edildi ve 1 saat 37 °C’de inkübe edildi.

4- Kuyucuklar aspire edildi ve yıkandı. 3 yıkama için bu proses 3 kez tekrarlandı.

5- Her bir kuyucuğa 100 µl HRP-avidin çalışma solüsyonundan ilave edildi. Plate yeni bir yapışkan bant ile kaplandı ve 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

6- Beş kez yıkama ve kurutma işlemi uygulandı.

7- Her bir kuyucuğa 90 µl TMB substrat solüsyonundan eklendi. 10-30 dakika arası 37 °C’de inkübe edildi.

8- İlk dört kuyucuk en yüksek konsantrasyona ulaştığında bu mavi rengin gözlenmesiyle anlaşıldı. Her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonundan ilave edildi.

9- Mikroplaka okuyucuda her bir kuyucuğun optik dansitesi 450 nm de ölçüldü.

2.2.2. Kalp Dokusu Homojenatının Hazırlanışı

Doku homojenatının hazırlanışı:

1 g doku tartıldı

↓

Distile su ile iyice yıkandı

↓

10 ml'lik homojenatör tüplerine aktarılarak 2,5 ml PBS ilave edildi

↓

2000 devirde 2 dakika homojenize edildi

↓

Ependorflara aktarıldı (1 doku için 3-4 ependorf)

↓

Homojenatlar + 4 °C'de 10 dakika 8000 devirde santrifüj edildi

↓

Üstteki süpernatantlar ayrılarak analize alındı.

2.2.2.1. Kalp Dokusunda Protein Analizi (Lowry Protein Metodu)

Kalp dokusu homojenatında protein miktarı ölçümü için Lowry (1951) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

Hazırlanışı:

Solüsyon A → %1 Bakır Sülfat (w/v) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Solüsyon B → %2 Sodyum Potasyum Tartarat (w/v)

Solüsyon C → 0,2 M NaOH

Solüsyon D → %4 Sodyum karbonat (Na_2CO_3 , (w/v))

49 ml Solüsyon D
49 ml Solüsyon C
1 ml Solüsyon A
1 ml Solüsyon B

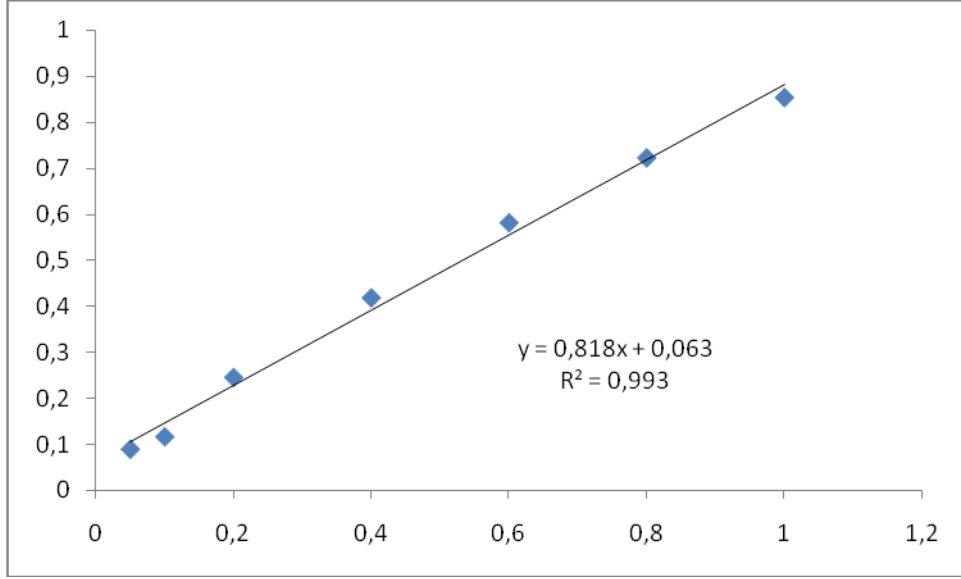
} Lowry Ayıraç 1

Folin-Ciocalteu reaktifi iki kat sulandırılır.
(Eşit hacim su ile dilue edilir.)

} Ayıraç 2

Yapılışı:

2,5 ml ayıraç 1'den alındı üzerine 0,5 ml homojenat eklendi iyice karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda ısısında bekletildi. Sonra 0,25 ml ayıraç 2'den eklenip hemen iyice çalkalanıp 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda okutuldu. (Blank 0,5 ml sudan oluştu). Örneklerin UV ölçümleri alındı ve bu ölçüm sonuçlarından kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalp dokusu içeriğindeki % toplam protein miktarı kalibrasyon eğrisi (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1) standardına göre hesaplandı.



Şekil 2.1. Kalp dokusu içeriğindeki % toplam protein miktarı hesaplanmasında kullanılan Lowry Protein Metodu standart grafiği

2.2.3. Kalp Dokusu Homojenatlarında Malondialdehit Düzeyi Ölçümü

Doku homojenatlarında MDA düzeyi Ohkawa ve arkadaşları (1979) tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü.

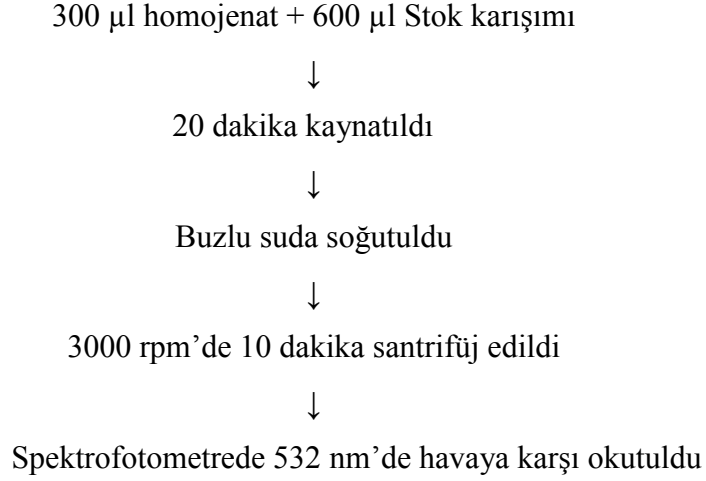
Kullanılan ayıraçlar:

Stok solüsyonu hazırlanışı:

%30'luk HCl	= 2,07 ml	} 100 ml distile suda karıştırılarak hazırlandı.
Tiyobarbitürikasit (TBA)	= 0,37 g	
Triklorasetikasit (TCAA)	= 15 g	

Testin yapılışı:

Kalp dokusunda MDA düzeyi ölçümü aşağıda ok yönünde gösterilen basamaklar takip edilerek yapıldı.



Hesabı:

Spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri ekstinksiyon katsayısı [$\Sigma_{\Delta 535} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (nmol/mg)}$] ile çarpılarak hesaplandı. Değerler $\mu\text{M/g}$ doku olarak verildi. (0,156 = 1 μM karşılık gelmektedir.)

2.2.4. Plazma Malondialdehit Düzeyi Ölçümü

Plazma malondialdehit düzeyi ölçümünde Yoshioka ve arkadaşları (1979) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

Testin Prensibi:

Tiyobarbütirik asit tepkimesinde; lipid içerik, düşük pH'da, tiyobarbütirik asit varlığında ısıtılarak 532-535 nm'de maximum pik oluşturan stabil kırmızı-pembe renk elde edilir. Bu rengi malondialdehit (MDA) molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojen verir. MDA'nın bir kısmı peroksidasyon sırasında açığa çıkarken, büyük çoğunluğu ortam asitleştirildikten sonra uygulanan ısıtma aşamasında lipit peroksitlerin yıkımına bağlı olarak oluşmaktadır.

Kullanılan ayıraçlar:**%20 Triklorasetik asit:**

200 g Triklorasetik asit (TCAA) (CCl_3COOH) bidistile su ile çözülerek hacim bir litreye tamamlandı.

%0,67 Tiyobarbitürik asit:

1,675 g Tiyobarbitürik asit (TBA)(4,6-Dihidroksi-2-tiyoprimidin) bidistile suda çözülerek hacim 250 ml'ye tamamlandı.

Tetraetoksipropan standart çözeltisi (20 mmol/L):

0,494 ml 1.1.3.3. Tetraetoksipropan ($C_{11}H_{24}O_4$) 100 ml absolut etanolde eritilerek 20 mmol/L'lik stok standart çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden 0,1 ml alınarak tridistile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 20 μ mol/L'lik çalışma standart çözeltisi elde edildi.

n-Butanol: Analiz saflığında kullanıldı.

Testin Yapılışı:

Kör ve test olarak işaretlenen iki adet kapaklı deney tüpü alındı. Test tüpüne 0,5 ml plazma konuldu. Daha sonra kör tüpüne 3 ml, test tüpüne de 2,5 ml % 20'lik TCAA ilave edildi. Her iki tüpe de 1'er ml TBA konulduktan sonra ağızları kapatılarak 30 dakika 95 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda tüpler buz banyosunda hemen soğutuldu. Üzerlerine 4'er ml n-bütanol konularak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra n-bütanol tabakası başka bir tüpe aktarılarak spektrofotometrede 535 nm dalga boyunda köre karşı testin absorbansı okundu.

Hesabı:

20 μ mol/L'lik 1.1.3.3. Tetraetoksipropan çalışma standart çözeltisi ile 1, 2, 4, 5, 10 μ mol /L'lik dilasyonlar hazırlanarak kalibrasyon grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak hesaplanan MDA değerleri μ mol/L olarak verildi.

2.2.5. Eritosit Hemolizati Hazırlanması

Enzim analizleri için kullanılan eritrositlerin hazırlanmasında Winterbourn (1975) tarafından bildirilen bir yöntemden faydalanıldı.

Kullanılan Ayıraç:

Salin fosfat tampon çözeltisi (PBS):

8,06 g sodyum klorür (NaCl) (138 mM), 0,201 g potasyum klorür (KCl) (2,7 mM), 1,15 g disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) (8,1 mM) ve 0,2 g potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) (1,47 mM) bir beherde çözüldükten sonra bidistile su ile bir litreye tamamlandı ve pH'si 7,4'e ayarlandı.

Yapılışı:

Kontrol ve deneme grubundaki ratlardan heparinli tüplere alınan kan örnekleri önce 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki plazma ve lökosit tabakası otomatik pipetle alınıp uzaklaştırıldıktan sonra, tüpün dibine çökmüş olan eritrositler pastör pipeti yardımıyla PBS ile üç kez yıkandı. Her defasında 5'er dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Son yıkama ve santrifüj sonrası tüpte bulunan eritrositlerden 0,4 ml alınıp 1,5 ml hacmindeki kapaklı polietilen tüplere aktarıldı. Üzerlerine aynı miktar PBS ilave edilerek tüpler alt üst edildi ve analiz yapılincaya kadar derin dondurucuda - 20 °C saklandı. Bu şekilde hazırlanan ve muhafaza edilen eritrositler analiz öncesi 5 ml hacmindeki deney tüplerine aktarılarak üzerlerine 3,2 ml buz soğukluğunda bidistile su konularak hemoliz edildi.

2.2.5.1 Eritrosit Hemolizatında Hemoglobin Düzeyi Ölçümü

Enzim aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılan hemoglobin düzeyleri ferrosiyanomethemoglobin metoduyla ölçüldü (Tietz 1987).

Testin prensibi:

Hemoglobindeki Fe⁺², ferrisiyanür ile Fe⁺³'e oksitlenir ve potasyum siyanür eklenmesiyle stabil siyanmethemoglobine dönüşür. Siyanmethemoglobinin 540 nm'de ölçülen absorbansı hemoglobin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kullanılan ayıraç:

Drabkin Çözeltisi: 0,198 g potasyum ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$), 0,052 g potasyum siyanür (KCN), 1 g sodyum hidrojenkarbonat ($NaHCO_3$) bir litre bidistile suda çözülerek hazırlandı.

Testin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 5 ml Drabkin çözeltisi konuldu. Üzerine 20 µl hemolizat eklendi. İyice karıştırıldı ve 10 dakikalık bekleme süresi sonunda Drabkin çözeltisine karşı spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okundu.

Hesabı:

Elde edilen absorbansların karşılık geldiği hemoglobin konsantrasyonları aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{Hb konsantrasyonu (g/dl)} = \frac{\text{Absorbans} \times \text{Hb standardının konsantrasyonu} \times \text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Hb standardının absorbansı} \times 1000}$$

2.2.6. Eritrosit Hemolizatında ve Kalp Dokusu Homojenatlarında Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü

Eritrosit hemolizatlarında ve kalp dokusu homojenatlarında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Sun ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen yöntem ile ölçüldü.

Testin prensibi:

Reaksiyon ortamında enzimatik bir reaksiyon ile üretilen süperoksit radikallerinin, ortamda bulunan nitrobluetetrazolium'u indirgemesinin örnekteki SOD tarafından engellenmesi prensibine dayanır. Yöntemde süperoksit radikali üretimi ksantin-ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile sağlanır. Bu şekilde üretilen süperoksit radikallerinin, NBT ile reaksiyona girerek bu maddeyi indirgemesi sonunda maksimum absorbansını 560 nm'de veren formazon oluşur. Ortama ilave edilen enzimin, üretilen radikalleri dismutasyona uğratması oranında, NBT redüksiyon reaksiyonu yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorbans değerleri düşer. Dolayısıyla formazon

oluşumunun inhibisyonunun tayin edilmesiyle SOD miktarı indirekt olarak saptanmaktadır.

Kullanılan ayıraçlar:

Kloroform: Analiz saflığında kullanıldı.

Absolut Etanol: Analiz saflığında kullanıldı.

Ksantin stok çözeltisi (3 mmol/L): 23 mg ksantin ($C_5H_4N_4O_2$) 50 ml'lik balon joje içerisinde 5 ml 0,1 N NaOH ile çözüldü ve distile su ile hacim 50 ml'ye tamamlandı ve + 4 °C'de saklandı. Çözelti kullanılacağı zaman 10 kat seyreltildi.

Ksantin oksidaz enzim çözeltisi (EC. 1.1.3.22): 20 U/ml aktiviteye sahip ksantin oksidaz enzim çözeltisinden 20 µmol alınarak 2 ml 2 M amonyum sülfat çözeltisi ile karıştırıldı.

Etilendiamintetraasetik asit çözeltisi (EDTA) (0,6 mmol/l): 0,233 g EDTA bidistile su ile çözümlenerek hacim bir litreye tamamlandı ve + 4 °C'de saklandı.

Nitrobluetetrazolium çözeltisi (NBT) (0,15 mmol/L): 30,75 mg NBT tridistile su ile çözümlenerek hacim 250 ml'ye tamamlandı ve + 4 °C'de saklandı.

Sodyum karbonat çözeltisi (400 mmol/L): 10,5 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) bidistile su ile çözümlenerek hacim 250 ml'ye tamamlandı ve + 4 °C'de saklandı.

Sığır albümini çözeltisi (1,0 g/L) : 100 mg sığır albümini bidistile suda çözümlenerek hacim 100 ml'ye tamamlandı ve + 4 °C'de saklandı.

Bakır klorür çözeltisi: (0,8 mmol/L) 26,75 mg bakırklorür ($CuCl_2$) bidistile suda çözümlenerek hacim 250 ml'ye tamamlandı ve + 4 °C'de saklandı.

Amonyum sülfat çözeltisi (2 M) : 26,428 g amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) bidistile suda çözümlenerek hacim 250 ml'ye tamamlandı ve + 4 °C'de saklandı.

Reaktif karışımı: 20 tüplük bir seri analiz için 20 ml 10 kat seyreltilmiş ksantin stok çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml sodyum karbonat çözeltisi ve 3 ml sığır albümini çözeltisi 100 ml'lik bir erlen içerisinde karıştırıldı.

Testin Yapılışı:

Kör ve test işaretli deney tüplerine 2,45 ml reaktif karışımı doku homojenatından test tüplerine 0,5 ml ilave edildi. Kör tüpüne 0,5 ml bidistile su ilave edildi. Eritrosit hemolizatından 1 ml alınıp üzerine 0,3 ml kloroform ve 0,5 ml etanol ilave edilerek 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan berrak kısımdan 0,5 ml alınarak test tüpüne

konuldu. Daha sonra tüplere 50 µl ksantin oksidaz enzim çözeltisi konularak karıştırıldı. 20 dakika 25 °C'lik su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüplere 1 ml CuCl₂ eklenerek reaksiyon durduruldu. Oluşan rengin absorbanası spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda köre karşı okundu.

Hesabı:

SOD enzim aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formülden yararlanılarak yüzde inhibisyon hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Körün Absorbansı} - \text{Testin Absorbansı}}{\text{Körün Absorbansı}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi, NBT redüksiyonunu %50 inhibe eden aktivite olarak kabul edildiğinden reaksiyon ortamında bulunan enzim aktiviteleri, bu ünite cinsinden hesaplandı ve eritrositler için U/gHb doku homojenatlarında U/g doku olarak değerlendirildi.

2.2.7. Eritrosit Hemolizatında ve Kalp Dokusu Homojenatında Glutatyon

Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü

Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve Valentine (1967) tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü.

Testin prensibi:

Deney ortamında bulunan Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin kataliziyle H₂O₂'nin H₂O ve singlet oksijene (*O₂) çevrilmesi ve bunun da Redükte Glutatyonu (GSH) Okside Glutatyona (GSSG) çevirmesi prensibine dayanmaktadır. GSSG'nin oluşum hızı deney ortamındaki NADPH + H⁺'in NADP⁺ 'ya çevrilmesi nedeni ile optik dansitede meydana gelen azalmanın spektrofotometrede 340 nm'de takibiyle hesaplanır.

Kullanılan ayıraçlar:

1- Sodyum Fosfat-Buffer (pH=7,0 ve 50mM, Fosfat Tamponu):

A: Disodyumhidrojenfosfat (Na_2HPO_4) = 7,1 g/L

B: KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat) = 6,8 g/L

600 ml A çözeltisi, 400 ml B çözeltisi 2,08g Na_2EDTA olacak şekilde hazırlandı.

2- Redükte Glutasyon (GSH) :

50 mg GSH hazırlanan 1 ml tamponda çözüldü. GSH çözeltisi 150 mM olacak şekilde hazırlandı.

3- Sodyum Azid (1M NaN_3):

130 mg NaN_3 2 ml hazırlanmış olan fosfat tamponunda çözüldü.

4- Hidrojen Peroksit (2 mM H_2O_2):

30 μl H_2O_2 10 ml fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlandı.

5- Amonyum Sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) : 4,22 g alındı 10 ml' distilede çözüldü.

6- Glutasyon Redüktaz: Amonyum Sülfatta çözümlenerek hazırlandı. 500 IU hazırlamak için 3 ml 3,2 M Amonyum sülfat çözeltisine 100 μl eklendi.

7- Redükte NADPH :

8 mM redükte NADPH fosfat tamponunda hazırlandı. Prosedür gereği 6,66 mg NADPH 1 ml fosfat tamponunda çözüldü. Analiz için on kat artırılarak 66,6 mg NADPH 10 ml fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlandı.

Testin yapılışı:

Reaktif Karışımı :

Fosfat Tamponu = 2,650 ml

Redükte Glutasyon = 0,100 ml

NADPH = 0,100 ml

GSH Redüktaz = 0,010 ml

Sodyum Azid (NaN_3) = 0,020 ml

Önceden hazırlanan yukarıda adı geçen ayıraçlar karşılıklarında belirtilen hacimlerde alınarak karıştırıldı. Sonra, ilk olarak 25 μl H_2O_2 ve en son 25 μl doku homojenatı ya da eritrosit hemolizatı eklendi, spektrofotometrede 340 nm'de zaman takibiyle okundu.

GSH-Px {
Abs 0 (0. Dakika)
Abs 1 (1. Dakika)
Abs 2 (2. Dakika)

Hesabı:

$$IU = \left\{ \left[(Abs_0 - Abs_2) \times 10^6 \times 2,99 \right] / (6,22 \times 1000 \times 2 \times 0,02) \right\}$$

Glutasyon peroksidaz aktivitesi kalp dokusu homojenatlarında IU/g doku, eritrosit hemolizatlarında IU/gHb olarak hesaplandı.

2.2.8. Eritrosit Hemolizatında ve Kalp Dokusu Homojenatlarında Katalaz Aktivitesi Ölçümü

Eritrosit hemolizatında ve kalp dokusu homojenatlarında katalaz aktivitesi ölçümü için Luck (1965) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı.

Testin Prensibi:

Hidrojen peroksit ışık spektrumunun UV alanında dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorbanans verir. Uygun bir tampon içerisinde bulunan H₂O₂'in örnekteki katalaz enziminin etkisiyle yıkılması sonucunda bu maddenin 240 nm'de neden olduğu absorbansta azalma meydana gelir. Absorbansta gözlenen azalma hızı katalaz enzim aktivitesi ile orantılıdır.

Kullanılan Ayıraçlar:

Fosfat tamponu (pH=7,0) (1/15 mmol/L): 3,522 g potasyumdihidrojenfosfat (KH₂PO₄) ve 7,268 g disodyumhidrojen fosfat (Na₂HPO₄.2H₂O) distile suda çözüldü ve bir litreye tamamlandı. Daha sonra pH'sı 7'ye ayarlandı.

Fosfat tamponda hidrojen peroksit çözeltisi: %30 H₂O₂ çözeltisinden 0,16 ml alınarak daha önce hazırlanmış olan fosfat tamponun 100 ml'sinde seyreltili. Bu karışımın 240 nm'deki absorbanansı H₂O₂ ile 0,5'e ayarlandı.

Testin Yapılışı:

Kör işaretli kuvartz küvete 2,95 ml fosfat tamponu konuldu ve üzerine 50 µl eritrosit hemolizati ya da kalp dokusu homojenati ilave edildi. Test işaretli kuvartz küvete ise 2,95 ml fosfat tampon içinde hazırlanmış H₂O₂ çözeltisi konuldu ve 50 µl eritrosit hemolizati ya da kalp dokusu homojenati eklendi. Küvetler alt üst edilerek karıştırıldı. Spektrofotometre 240 nm'de kör küvete göre sıfırlandı ve ilk okuma yapıldı. 15 saniye sonra ikinci bir okuma yapılarak birincisi A₁ ikincisi A₂ olarak kaydedildi.

Hesabı:

Absorbanstaki azalma tespit edildi ve aşağıdaki formülden yararlanılarak katalaz aktivitesi hesaplandı. Enzim aktiviteleri eritrosit hemolizatlari için k/gHb, doku homojenatları için k/g doku cinsinden değerlendirildi.

$$k = \frac{2.3}{\Delta t} \times \log \frac{A_1}{A_2} \text{ sn}^{-1}$$

2.2.9. İstatistik Değerlendirme

İstatiksel analizlerde parametrelerin dağılımı Shapiro-Wilk, varyans homojenitesi Levene's testi ile belirlendi. Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeler için, verilerin normal dağılıma uygunluğuna göre Kruskal-Wallis veya one-way ANOVA uygulandı. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Duncan's testi veya Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 17.0) programında değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Ratların Canlı Ağırlıkları

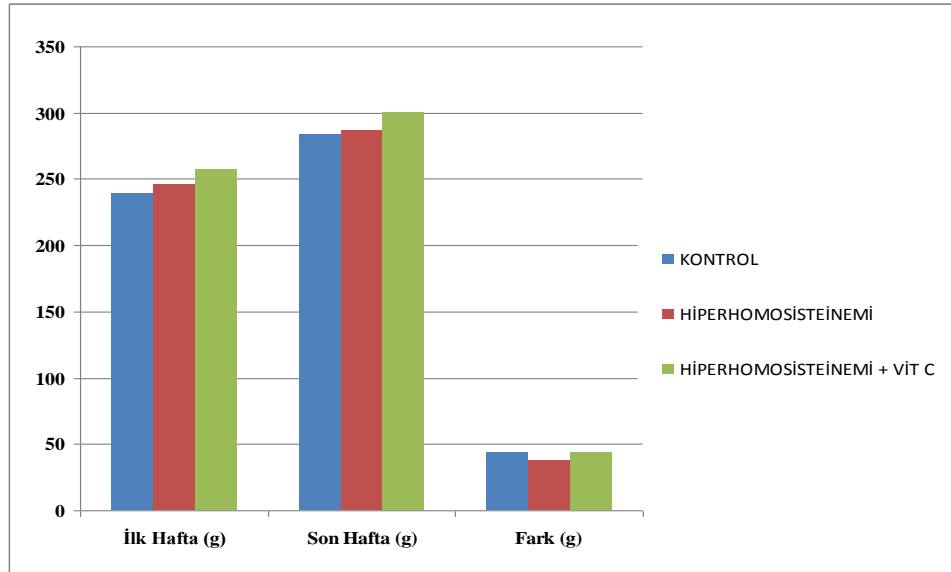
Çalışmanın başlangıcında ve sonunda ratların canlı ağırlıkları ölçülmüştür. Canlı ağırlıklara ait istatistik Çizelge 3.1’de ve ilgili grafik Şekil 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Gruplardaki ratların canlı ağırlık değerleri (g)

GRUPLAR	İLK HAFTA (g)		SON HAFTA (g)		FARK (g)
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
KONTROL	12	239.86±3.256	12	283.76±3.781 ^b	43.90±5.211
HİPERHOMOSİSTEİNEMİ	12	245.86±5.859	12	287.42±5.349 ^{ab}	37.83 ±7.853
HİPERHOMOSİSTEİNEMİ + VİT C	12	257.00±6.230	12	300.87±7.039 ^a	43.20±10.187
Önemlilik	Ö.D.		*		Ö.D.

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Canlı ağırlık yönünden çalışmanın başlangıcında gruplar arası fark saptanmazken çalışma sonunda kontrol grubuna göre Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+VitC gruplarındaki ratların canlı ağırlıklarında istatistiksel açıdan önemli bir değişimin gözlenmediği, fakat kontrol grubu ile Hiperhomosisteinemi+VitC grubu kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli bir değişimin gözlemlendiği görülmektedir (Çizelge 3.1, Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Gruplardaki ratların canlı ağırlık miktarlarına ilişkin sonuçlarının grafiği

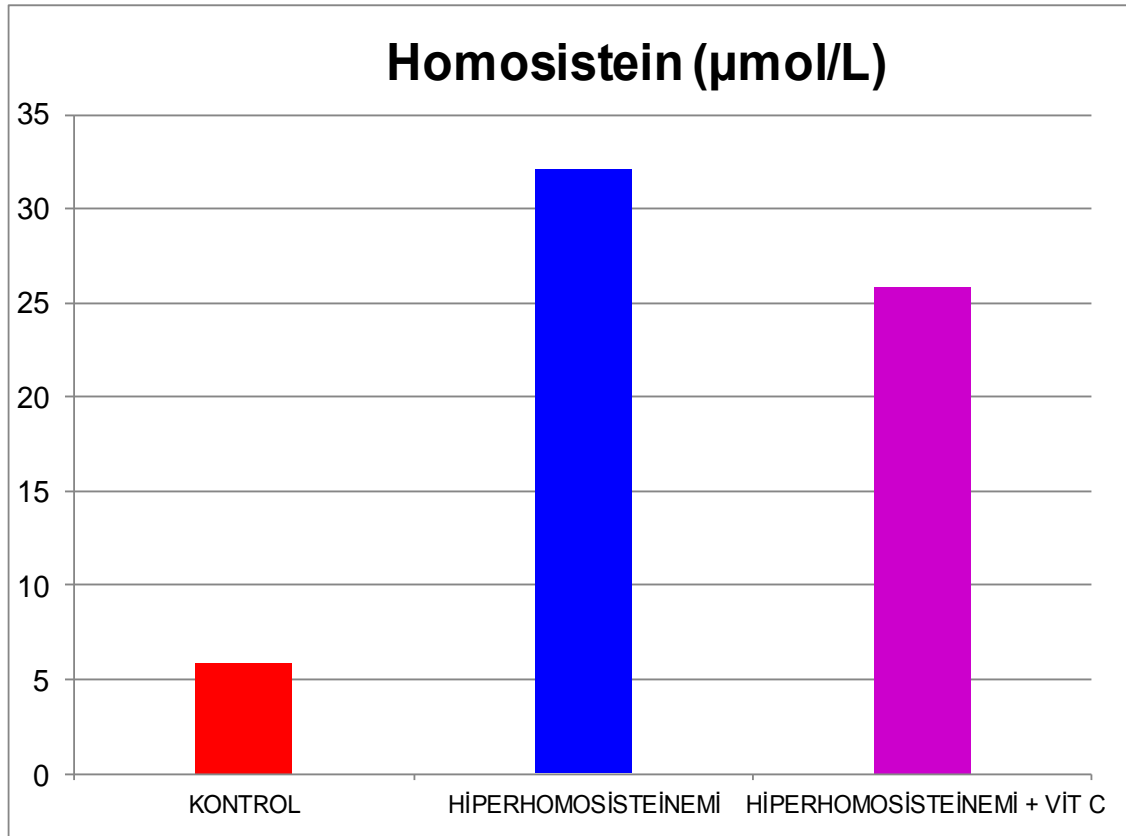
3.2.Ratların Serum Homosistein Düzeyleri

Kontrol ve uygulama gruplarının serum homosistein düzeylerine ilişkin sonuçlar sırasıyla çizelge 3.2 ve şekil 3.2’de verilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel anlamda farklılık olduğu ($p<0.001$) görülürken Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+Vit C grupları arasında ise serum homosistein düzeyleri bakımından belirgin bir farklılık saptanmamıştır.

Çizelge 3.2. Gruplardaki ratların homosistein miktarlarına ilişkin sonuçlar ($\mu\text{mol/L}$)

	KONTROL		HİPERHOMOSİSTEİNEMİ		HİPERHOMOSİSTEİNEMİ + VİT C		Önemlilik
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	
Homosistein ($\mu\text{mol/L}$)	12	5.91 \pm 0.49 ^a	12	32.15 \pm 1.28 ^b	12	25.80 \pm 2.06 ^b	***

a,b, Aynı satırda farklı harfler istatistiksel yönden anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.001$).



Şekil 3.2. Serum homosistein düzeylerine ilişkin sonuçların grafiği

3.3. Ratların Kalp Dokusu Analiz Sonuçları

Deneme sonunda Kontrol, Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+Vit C gruplarına ait kalp dokusu MDA düzeyleri ve sırasıyla SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri belirlendi. Bu değerler yardımıyla her grup için hesaplamalar yapılarak ortalama değerler ve standart hataları bulundu. Çalışma gruplarına ait bulgular Çizelge 3.3'de görülmektedir.

Çizelge 3.3. Kontrol, Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+ Vit C gruplarına ait kalp dokusu MDA düzeyleri ve SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri

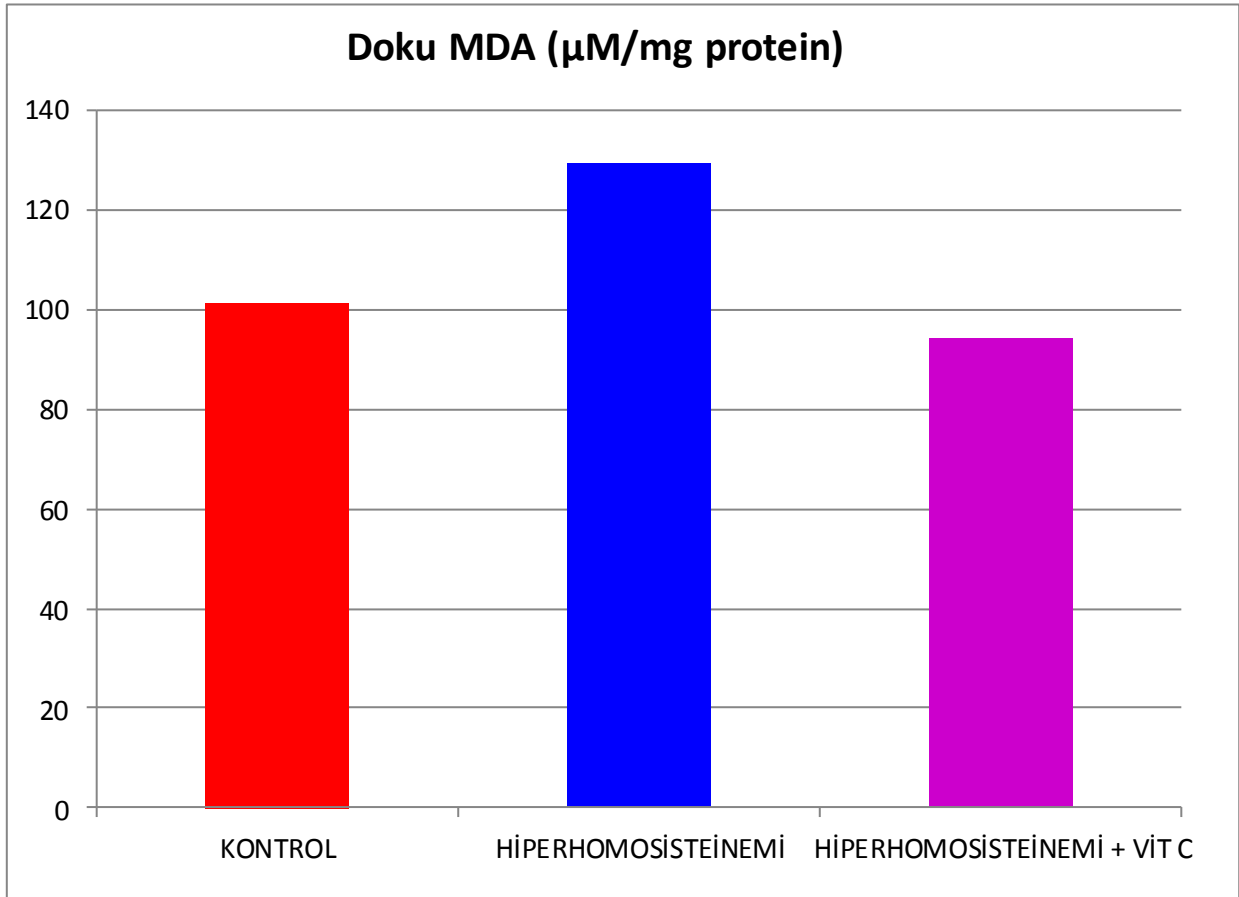
GRUPLAR	MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein)		SOD (U/mg protein)		CAT (k/mg protein)		GSH-Px (IU/mg protein)	
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$
KONTROL	12	101.24 \pm 2.46 ^b	12	14.36 \pm 0.89 ^a	12	39.24 \pm 3.98 ^a	12	1091.66 \pm 53.31 ^a
HİPERHOMOSİSTEİNEMİ	12	129.24 \pm 7.67 ^a	12	7.54 \pm 1.27 ^b	12	21.28 \pm 1.20 ^b	12	896.55 \pm 41.05 ^b
HİPERHOMOSİSTEİNEMİ + VİT C	12	94.25 \pm 7.91 ^b	12	11.95 \pm 0.75 ^a	12	48.92 \pm 5.51 ^a	12	884.18 \pm 36.43 ^b
Önemlilik		**		***		***		*

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

(* $p < 0.05$ ^{a,b}, ** $p < 0.01$ ^{b,a}, *** $p < 0.001$, ^{a,b}: İstatistiksel olarak anlamlı)

3.3.1. Ratların Kalp Dokusu MDA Sonuçları

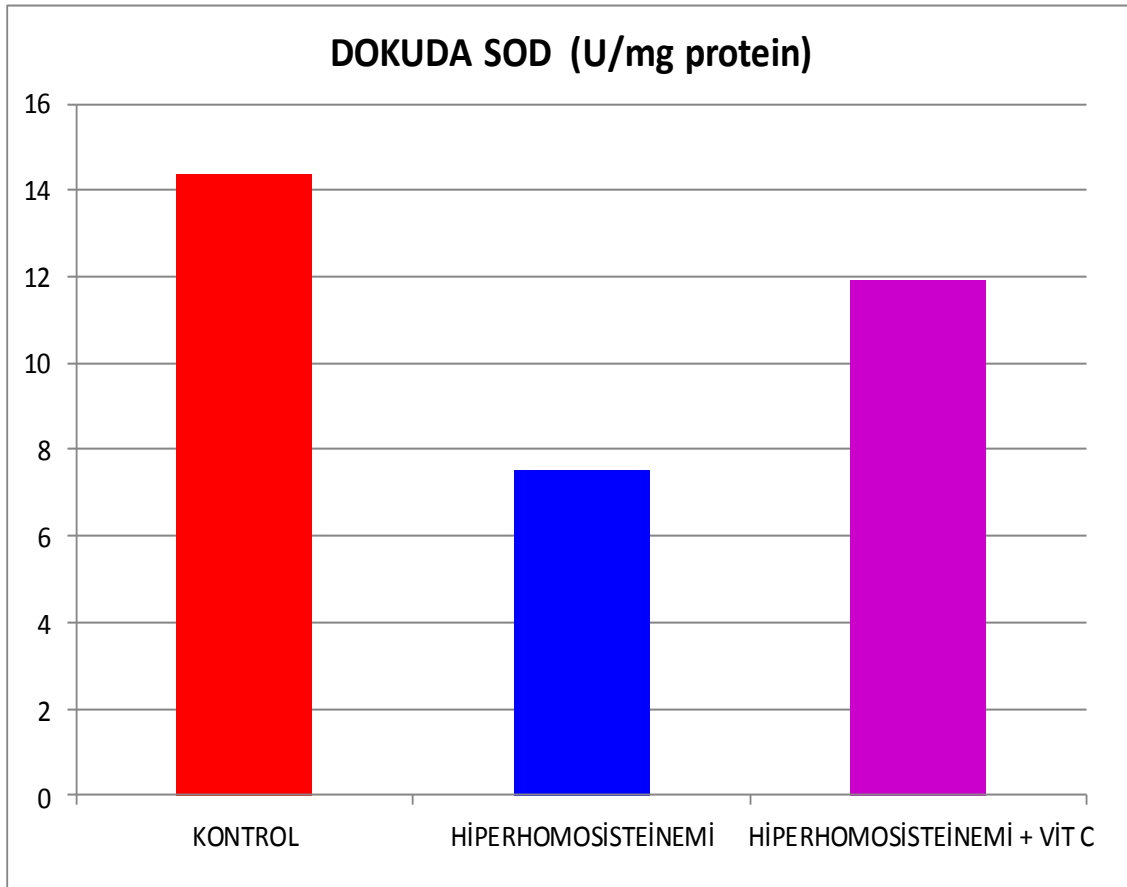
Kalp dokusu MDA düzeyleri kontrol grubundaki ratlarda ortalama 101.24 ± 2.46 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, Hiperhomosisteinemi grubu ratlarda ortalama 129.24 ± 7.67 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, Hiperhomosisteinemi+ Vit C grubundaki ratlarda ise ortalama 94.25 ± 7.91 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki bu farklılığın $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı olduğu saptandı (Çizelge 3.3, Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kalp dokusu malondialdehit düzeylerine ilişkin sonuçların grafiği

3.3.2. Ratların Kalp Dokusu SOD Aktivitesi Sonuçları

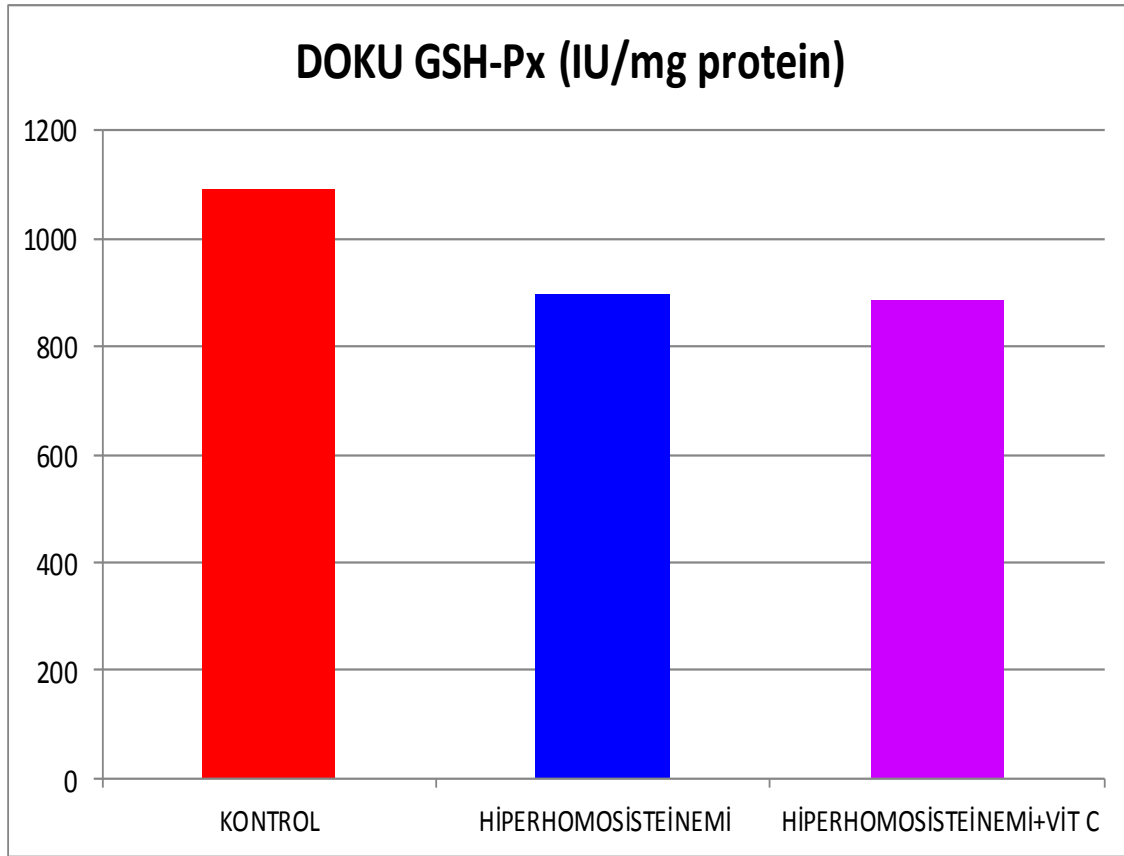
Kalp dokusu süperoksit dismutaz enzim aktivitesi kontrol grubundaki ratlarda ortalama 14.36 ± 0.89 U/mg protein, Hiperhomosisteinemi grubu ratlarda ortalama 7.54 ± 1.27 U/mg protein, Hiperhomosisteinemi+ Vit C grubundaki ratlarda ise ortalama 11.95 ± 0.75 U/mg protein olarak ölçüldü. Gerçekleştirilen istatistiksel analizde gruplar arasındaki bu farklılığın $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı olduğu saptandı (Çizelge 3.3, Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kalp dokusu süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri grafiği

3.3.3. Ratların Kalp Dokusu GSH-Px Aktivitesi Sonuçları

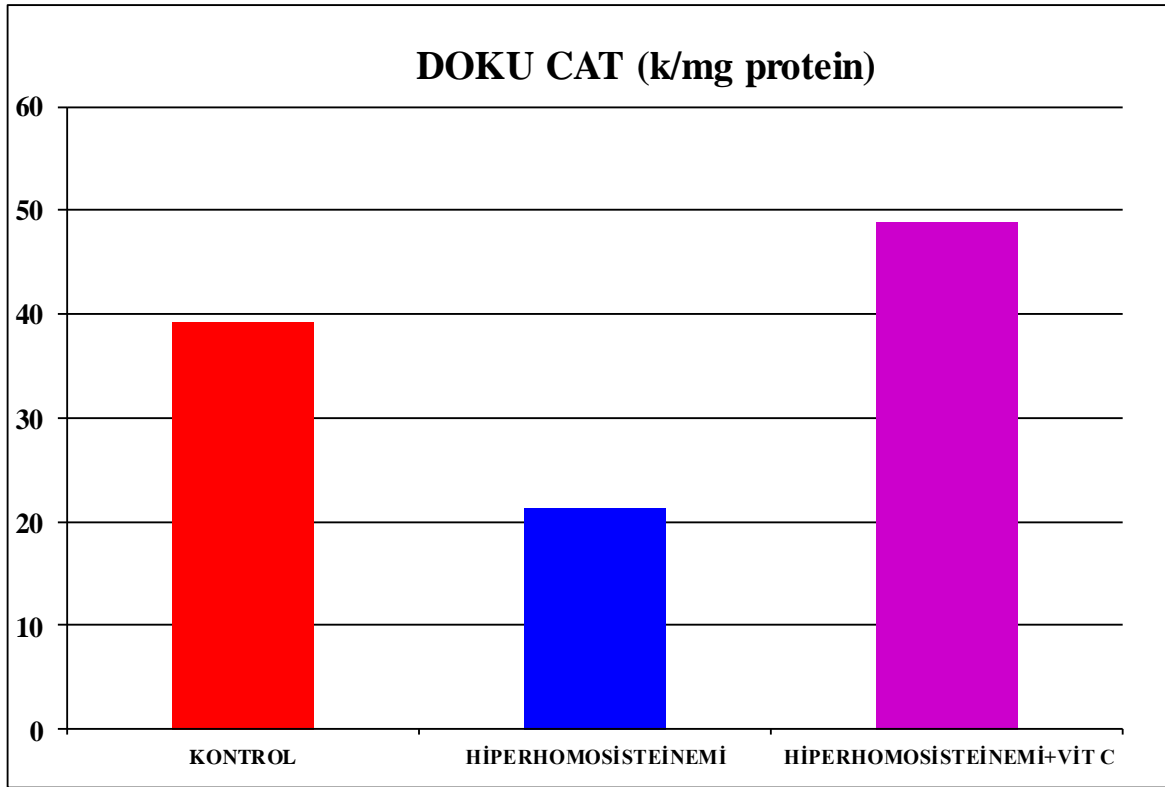
Kalp dokusu GSH-Px düzeyleri kontrol grubundaki ratlarda ortalama 1091.66 ± 53.31 IU/mg protein, Hiperhomosisteinemi grubu ratlarda ortalama 896.55 ± 41.05 IU/mg protein, Hiperhomosisteinemi+Vit C grubundaki ratlarda ise ortalama 884.18 ± 36.43 IU/mg protein olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki bu farklılığın $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olduğu saptandı (Çizelge 3.3, Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Kalp dokusu glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri grafiği

3.3.4. Ratların Kalp Dokusu CAT Aktivitesi Sonuçları

Kalp dokusu katalaz aktivitesi de kontrol grubundaki ratlarda ortalama 39.24 ± 3.98 k/mg protein, Hiperhomosisteinemi grubu ratlarında ortalama 21.28 ± 1.20 k/mg protein, Hiperhomosisteinemi+VitC grubundaki ratlarda ise ortalama 48.92 ± 5.51 k/mg protein olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki bu farklılığın $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı olduğu saptandı (Çizelge 3.3, Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Kalp dokusu katalaz enzim aktiviteleri grafiği

3.4. Ratların Eritrosit Hemolizati Analiz Sonuçları

Deneme sonunda Kontrol, Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+ Vit C gruplarına ait plazma MDA düzeyleri ve sırasıyla SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri belirlendi. Bu değerler yardımıyla her grup için hesaplamalar yapılarak ortalama değerler ve standart hataları bulundu. Kontrol, Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+ Vit C gruplarına ait plazma MDA düzeyleri ve sırasıyla eritrosit hemolizatlarındaki SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri ortalama değerleri ve standart hataları Çizelge 3.4'de görülmektedir.

Çizelge 3.4. Kontrol, Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+ Vit C gruplarına ait plazma MDA düzeyleri ve SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri

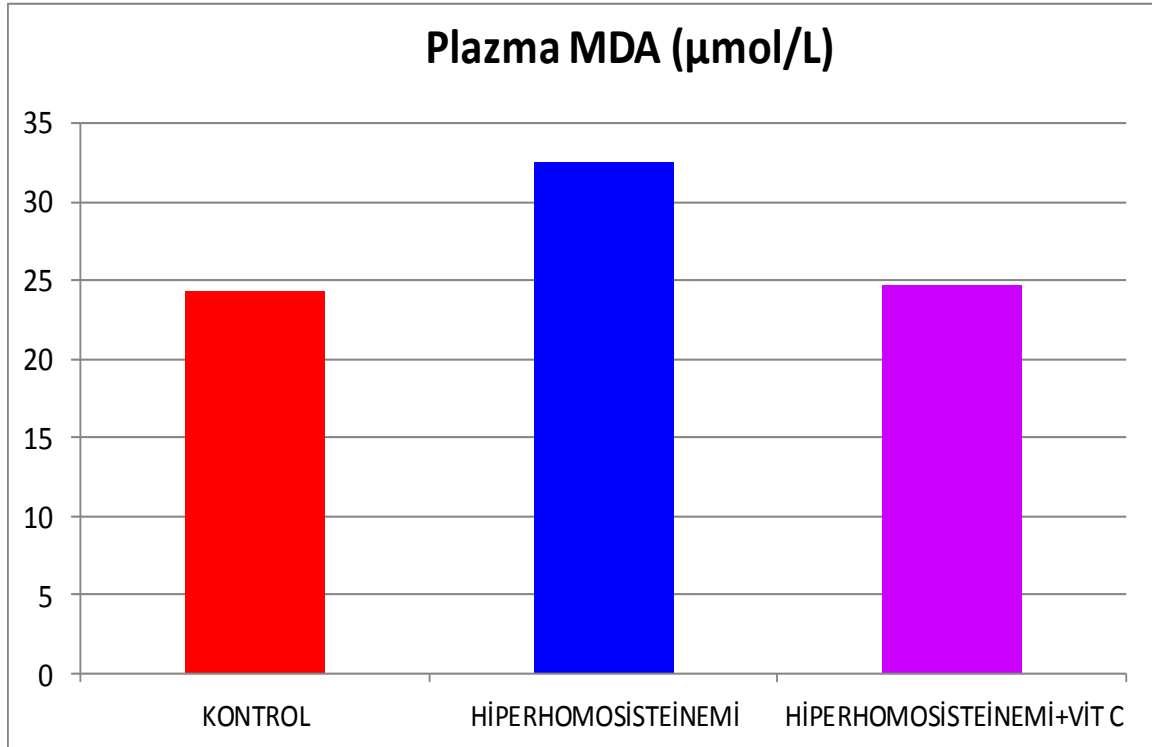
GRUPLAR	MDA (µmol/L)		SOD (U/g Hb)		CAT (k/g Hb)		GSH-Px (IU/g Hb)	
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$
KONTROL	12	24.29±0.99 ^b	12	45.68±5.63 ^a	12	2939.26±221.17 ^a	12	18350.62±4796.71 ^a
HİPERHOMOSİSTEİNEMİ	12	32.57±2.12 ^a	12	24.41±2.77 ^b	12	2172.32±116.87 ^b	12	6025.05±573.25 ^b
HİPERHOMOSİSTEİNEMİ + VİT C	12	24.73±1.66 ^b	12	39.31±5.02 ^a	12	3889.20±386.30 ^a	12	31118.92±8164.14 ^a
Önemlilik	**		**		**		***	

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

(** p<0,01 ^{b,a}, *** p<0,001, ^{a,b}: İstatistiksel olarak anlamlı)

3.4.1. Ratların Plazma MDA Sonuçları

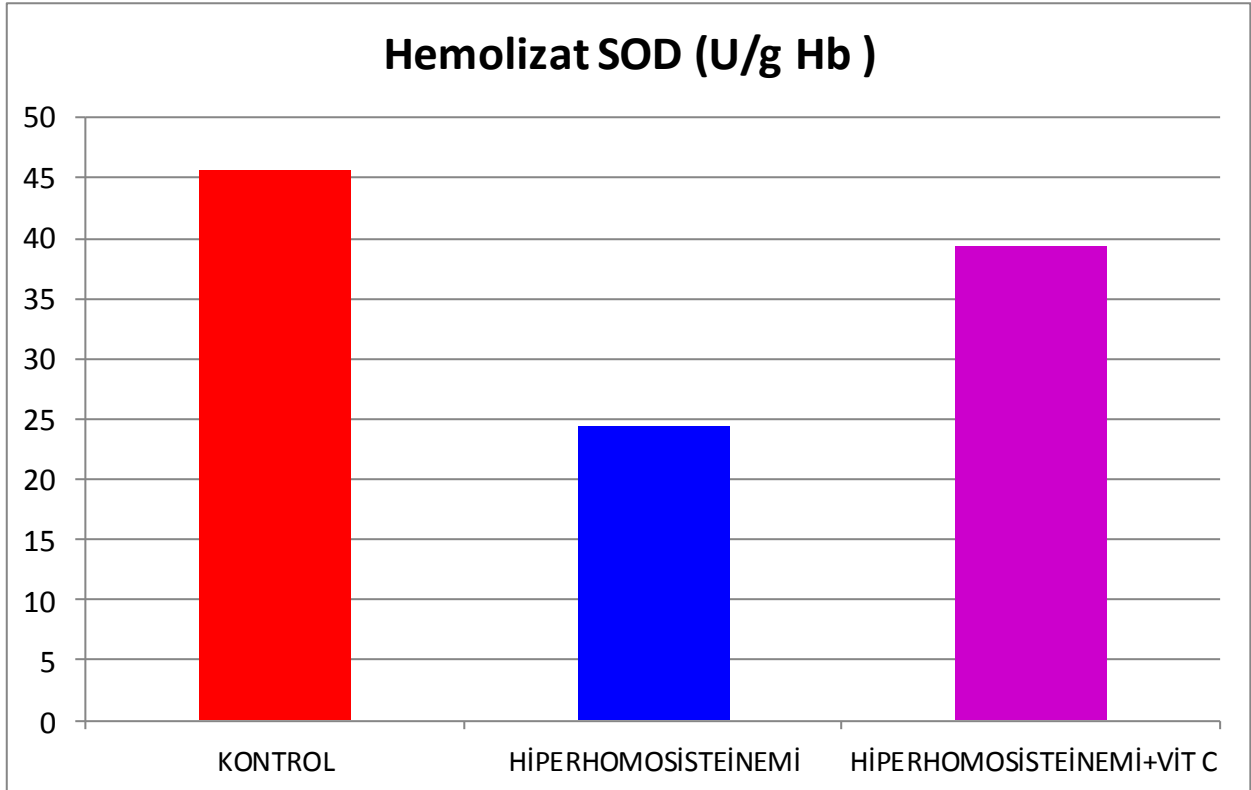
Plazma MDA düzeyleri kontrol grubundaki ratlarda ortalama 24.29 ± 0.99 $\mu\text{mol/L}$, Hiperhomosisteinemi grubu ratlarda ortalama 32.57 ± 2.12 $\mu\text{mol/L}$, Hiperhomosisteinemi+Vit C ratlarda ise ortalama 24.73 ± 1.66 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki bu farklılığın $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı olduğu saptandı (Çizelge 3.4, Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Plazma malondialdehit düzeyleri grafiği

3.4.2. Ratların Eritrosit Hemolizati SOD Aktivitesi Sonuçları

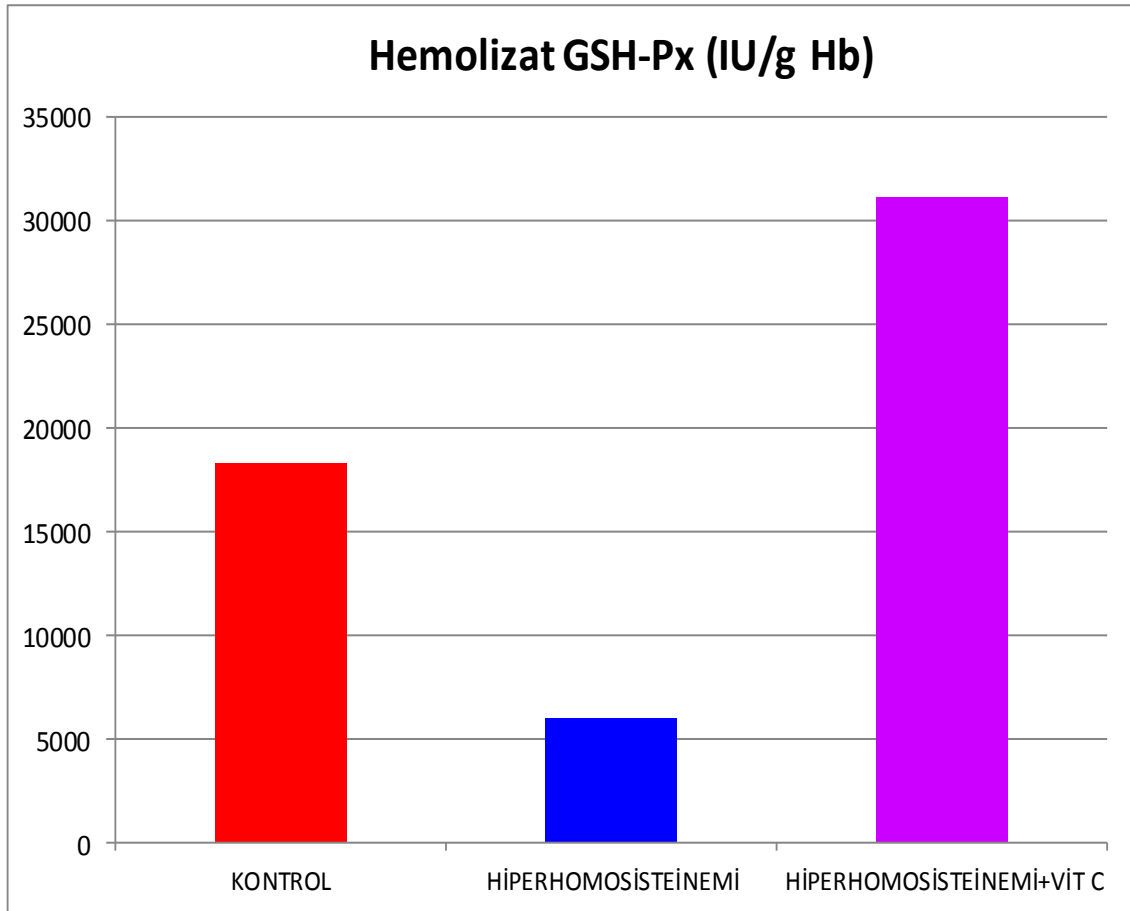
Eritrosit hemolizatındaki SOD aktivitesi düzeyleri kontrol grubundaki ratlarda ortalama 45.68 ± 5.63 U/g Hb, Hiperhomosisteinemi grubu ratlarda ortalama 24.41 ± 2.77 U/g Hb, Hiperhomosisteinemi+VitC grubundaki ratlarda ise ortalama 39.31 ± 5.02 U/g Hb olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki bu farklılığın $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı olduğu saptandı (Çizelge 3.4, Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Hemolizat süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri grafiği

3.4.3.Ratların Eritrosit Hemolizati GSH-Px Aktivitesi Sonuçları

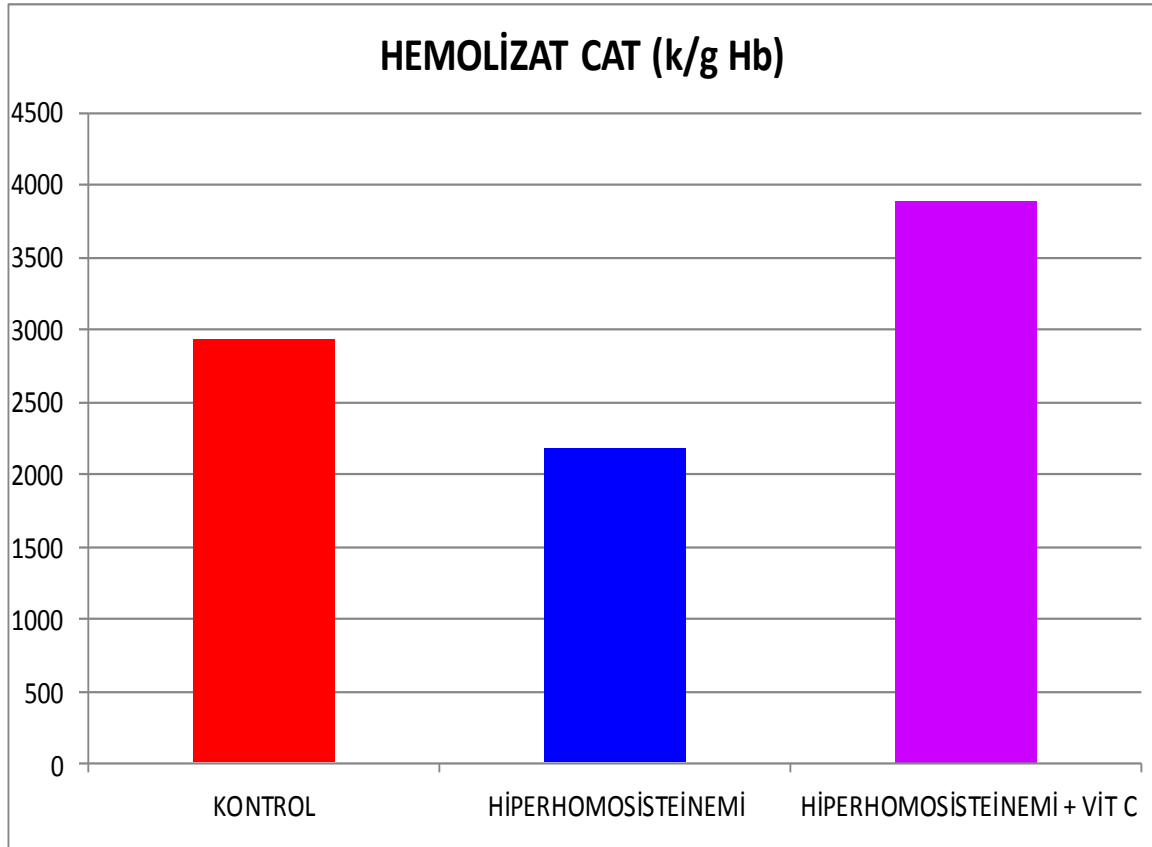
Eritrosit hemolizatındaki GSH-Px aktivitesi düzeyleri kontrol grubundaki ratlarda ortalama 18350.62 ± 4796.71 IU/g Hb, Hiperhomosisteinemi grubu ratlarda ortalama 6025.05 ± 573.25 IU/g Hb, Hiperhomosisteinemi+ Vit C grubundaki ratlarda ise ortalama 31118.92 ± 8164.14 IU/g Hb olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki bu farklılığın $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı olduğu saptandı (Çizelge 3.4, Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Hemolizat glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri grafiği

3.4.4. Ratların Eritrosit Hemolizati CAT Aktivitesi Sonuçları

Eritrosit hemolizatındaki katalaz aktivitesi de kontrol grubundaki ratlarda ortalama 2939.26 ± 221.17 k/g Hb, Hiperhomosisteinemi grubu ratlarında ortalama 2172.32 ± 116.87 k/g Hb, Hiperhomosisteinemi+Vit C grubu ratlarında ise ortalama 3889.20 ± 386.30 k/g Hb olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki bu farklılığın $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı olduğu saptandı (Çizelge 3.4, Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Hemolizat katalaz enzim aktiviteleri grafiği

4. TARTIŞMA

Homosistein serbest radikaller gibi etki gösteren ve son yıllarda oksidatif sisteme dahil olduğu kabul edilen, protein yapısına girmeyen bir aminoasittir (Boushey ve ark 1995). Uzun süreli yüksek metiyonin alımı remetilasyon yolunun inhibisyonu ile ilişkili olduğundan, transsülfürasyon yolunun saturasyonuna sebep olabilir. Bu durum homosisteinin hücrelerden dışarı atılmasına ve böylece plazma homosistein düzeylerinin artmasına sebep olmaktadır (Ueland ve Refsum 1989).

Enzimlerdeki konjenital eksiklik veya metabolizma sırasında reaksiyonlarda görev alan folik asit, vitamin B₁₂ ve B₆'nın yetersizliğine bağlı olarak plazma homosistein düzeyleri yükselmektedir. Hiperhomosisteinemi vücutta birçok zararlı etkilere yol açmaktadır. Bunlardan bazıları arasında serbest radikaller gibi davranıp endotel hasarı oluşturması ve bu olayın sonucunda da trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu, trombüs formasyonu gibi koagülasyonu artırıcı etkiler meydana getirmesi, biyolojik membranlarda oksidasyon yapması, LDL oksidasyonu yaparak ateroskleroza artırıcı etkiler ortaya çıkarması sayılabilmektedir (Brattstrom ve ark 1989; Boushey ve ark 1995, Noll ve ark 2009, Yang ve ark 2010, Liu ve ark 2013).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, koroner arter hastalıkları için geleneksel risk faktörlerinin (sigara içimi, alkol, diyabet, kolesterol, tansiyon vb.) dışında vasküler hastalıkların patolojisinde rol oynayan beslenme ve biyokimyasal faktörler (diyetteki antioksidanlar ve plazma homosistein miktarı) üzerinde yoğunlaşmıştır. Sülfür içeren bir aminoasit olan homosisteine ilgi, kardiyovasküler hastalıklar ile birlikte seyretmesinden dolayı daha da artmıştır. Homosistein, koroner arter hastalıkları ve periferik vasküler hastalıklar için göz önünde bulundurulması gereken önemli ve bağımsız bir risk faktörüdür (Linnebak ve ark 2011, Malinowska ve ark 2012, Mahalle ve ark 2013).

Homosisteinin farklı yönlerdeki birçok etkisini araştırmak için çeşitli çalışmalarda intraperitoneal yolla homosistein uygulanarak ya da içme sularına metiyonin katılarak rat, tavşan ve maymunlarda deneysel hiperhomosisteinemi modelleri oluşturulmuştur (Ungvari ve ark 1999, Li ve ark 2002, Schweinberger ve ark 2014).

Böger ve arkadaşları (2001) maymunlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada 4 haftalık oral metiyonin yüklemesinin plazma homosistein düzeylerinde yaklaşık 3 katı bir artış

oluşturduğunu insanlarda yaptıkları başka bir çalışmada (Böger ve ark 2009) ise oral yoldan tek doz metiyonin yüklemesi ile (100 mg/kg) plazma homosistein düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir.

Bu çalışmada Bagi ve arkadaşları (2003) tarafından daha önce tanımlanan rat hiperhomosisteinemi modeli uygulandı. Bu amaçla L-metiyonin suda çözülüp 6 hafta boyunca her gün 1 g/kg dozunda Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+VitC grubunda bulunan ratlara oral gavaj yoluyla uygulandı ve hiperhomosisteinemi oluşturulması amaçlandı. Kontrol ve uygulama gruplarının serum homosistein düzeylerine ilişkin sonuçlarının ortalamaları arası istatistiksel olarak anlamlı bir farkın ($p<0.001$) saptanması uygulama gruplarında hiperhomosisteineminin oluştuğunu göstermiştir (Çizelge 3.2, Şekil 3.2).

Çalışmamızda Bagi ve arkadaşlarının (2003) çalışmasındakine benzer serum homosistein seviyeleri ölçüldü. Ancak bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda, metiyonin içme suyuna katılmayıp oral gavaj yolu ile uygulandı. Böylelikle rat başına verilen oral metiyonin dozu tam olarak ayarlandı.

Homosistein, metiyoninden sentezlenen bir aminoasittir. Metiyonin ile homosistein birbirlerinin prekürsörleri niteliğinde olup, birinin detoksifikasyonu diğerinin sentez aşamasını kapsamaktadır ve bu ilişkinin temeli metiyonin metabolizmasını oluşturmaktadır (Sainz ve ark 2000). Folik asit, vitamin B₁₂ ve vitamin B₆ homosistein metabolizmasında kofaktör ve kosubstrat olarak görev alan önemli vitaminlerdir (Langman ve Cole 1999, Naurath ve ark 1995). Bu vitaminlerin eksikliği hiperhomosisteineminin önemli bir sebebidir. B vitaminleri ve folik asit eksikliğinde hiperhomosisteinemi oluşmasının yanı sıra hiperhomosisteineminin tedavisinde de bu vitaminler kullanılmaktadır. Literatürde hiperhomosisteinemi tedavisinde folik asidin yalnız ya da vitamin B₁₂ ve vitamin B₆'nın farklı dozlardaki kombinasyonlarıyla tedavisi ile ilgili çok sayıda çalışma vardır (Rimm ve ark 1996, Rimm ve ark 1998, Robinson ve ark 1998, Racek ve ark 2005, Sánchez-Moreno ve ark 2009, Breilmann ve ark 2010, Filip ve Ark 2010, Kolling ve ark 2011).

Tuncer ve arkadaşlarının (2008) yapmış olduğu bir çalışmanın sonucu, hiperhomosisteinemi tedavisinde dikkat çekmektedir. Çalışmada oral metiyonin yüklemesi yapılan ratlarda plazma homosistein düzeyinin kontrol grubuna göre %70,3 oranında artış gösterdiği ayrıca metiyonin yüklemesinin yaptığı plazma homosistein düzeyi artışının folik

asit (%45,9), vitamin B₆ (%34,0) ve vitamin C (%34,3) ile anlamlı derecede azaltıldığı; aynı zamanda folik asit, vitamin B₆ ve vitamin C desteğinin homosistein düzeyindeki artışı önlediği bildirilmektedir.

Başka bir araştırmada günlük 0,5 mg B₁₂ vitamini vermenin plazma homosistein düzeyini ortalama %7 azalttığını, günlük 16,5 mg B₆ vitamini vermenin de plazma Hcy düzeyini anlamlı derecede etkilemediği bildirilmiştir. Ayrıca yüksek plazma Hcy konsantrasyonlarıyla düşük folat, B₁₂ ve B₆ vitamin düzeylerinin ilişkili olduğu yine aynı çalışmada belirtilmektedir (Clarke ve ark1998).

Çalışmalarda folik asit, vitamin B₁₂ ve vitamin B₆'nın yüksek homosistein düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğu; bu ilişkinin genç hastalarda folik asit, yaşlı hastalarda vitamin B₁₂ yönünden daha anlamlı olduğu bildirilmiştir (Stampfer ve ark 1992, Selhub ve ark 1993).

Hanratty ve arkadaşları (2001) on sağlıklı gönüllü üzerinde gerçekleştirdikleri araştırmalarında oral metiyonin yüklemesi (100 mg/kg) ile toplam plazma homosistein düzeylerinin anlamlı derecede arttığını, ancak birlikte verilen vitamin C'nin bu artış üzerine herhangi bir etkisi olmadığını saptamışlardır. Az sayıda denek üzerinde gerçekleştirilmiş olan bu çalışmanın insanlarda yapılmış olması ve gerek metiyonin yüklemesinin gerekse vitamin C verilisinin akut veriliş şeklinde olması, bizim çalışmamıza göre belirgin farklılıklardır.

Brude ve arkadaşları (1999) da plazma homosistein düzeyleri ile diyetle alınan vitamin C ve vitamin E arasında negatif bir korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir.

Çalışmamızda Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+VitC grupları arasında serum homosistein düzeyleri bakımından istatiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır. Bu sonuç metiyoninle birlikte verilen vitamin C'nin serum homosistein düzeylerinin artışı veya azalışı üzerine herhangi bir etkisi olmadığı düşüncesini oluşturmuştur.

Homosistein düzeyi arttığında biyolojik tiyollerle etkileşerek hızla oto-okside olur, fazla miktarda disülfid homosistein ve homosistein-tiyolakton molekülü üretilir (Vermaak ve ark 1990). Ayrıca homosisteinin oto-oksidasyonu esnasında süperoksit ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikalleri oluşur. Oluşan hidrojen peroksit, damar endotelinde

hasara neden olurken süperoksit radikalleri de hem endoteli hasara uğratar, hem de LDL partiküllerini etkileyerek lipid peroksidasyonunu başlatır (Loscalzo 1996). Hiperhomosisteinemi deneysel modellerinde homosistein tarafından indüklenen oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinde artışa neden olduğu membran lipid peroksidasyonu göstergesi olan malondialdehit düzeylerinin serumda ve dokuda arttığı gösterilmiştir (Toborek ve ark 1995, Young ve ark 1997, Voutilainen ve ark 1999, Kocabalkan ve ark 2000, Serafinowicz ve ark 2000, Ventura ve ark 2000, Cavalca ve ark 2001, Stefanello ve ark 2005).

Homosistein metabolizması hücrede redoks potansiyeli tarafından düzenlenir (Zou ve Banerjee 2005). Homosisteinin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayan metiyonin sentaz ve sistatyonin β -sentaz gibi bazı enzimlerin aktivitesi hücredeki oksidatif duruma göre düzenlenir (Mosharov ve ark 2000, Maclean ve ark 2002, Zou ve Banerjee 2005). Hiperhomosisteinemide S-adenozil metiyonin oranı S-adenozil-L-homosistein'e göre düşüktür. S-adenozil metiyonin antioksidan bir maddedir ve glutatyon sentezini artırır, lipid peroksidasyonunu yaklaşık %65 oranında azaltır (Gharib ve ark 1983, Obeid ve Herrmann 2006).

Bu çalışmada hiperhomosisteinemi grubuna ait plazma MDA düzeylerinin, kontrol ve diğer deneme grubundaki ratların plazma MDA düzeylerinden istatistiksel önemde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$). Ayrıca hiperhomosisteinemi oluşturulan ve aynı zamanda Vitamin C verilen ratların, plazma MDA düzeylerinde bir düşüş görülmüştür (Çizelge 3.4, Şekil 3.7). Kalp dokusu MDA düzeyleri, plazma MDA düzeylerinde olduğu gibi metiyonin verilen ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunurken hiperhomosisteinemi+Vitamin C grubundaki ratlara ait doku MDA düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.01$) (Çizelge 3.3, Şekil 3.3). Bu sonuçlar verilen literatür bilgileriyle benzerlik göstermektedir. Hiperhomosisteinemi gruplarındaki yüksek plazma MDA değerleri, homosisteinin oksidatif stresi indüklediğini düşündürürken Hiperhomosisteinemi+vitamin C grubunda düşük MDA değerleri vitamin C'nin oksidatif strese karşı koruyucu etkisine bağlanabilir.

Serbest radikallerin ve peroksitlerin biyolojik etkileri, vücutta geniş bir antioksidan savunma mekanizması (vitamin E ve C, karotenoidler, glutatyon ve ürik asit gibi metabolitler ve antioksidan enzimler) tarafından kontrol edilmektedir (Guemouri ve ark

1991). Antioksidan sistem; serbest radikallerin zararlı etkisinden korunmada önemli role sahiptir. Antioksidan savunma ile serbest radikaller arasındaki dengenin bozulması oksidan strese ve bunun sonucunda doku hasarına yol açmaktadır (Taşkiran ve ark 2005).

Glutasyon peroksidaz ve katalaz enzimleri serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı en önemli hücre içi savunma mekanizmalarını oluştururlar. SOD enzimi ise toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırarak, potansiyel zararlı etkilere karşı savunmada çok önemli bir rol oynar. Normal koşullarda hücrelerde bulunan hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin yıkımını katalize eden glutasyon peroksidaz, lipid peroksidasyonunun başlaması ve gelişmesini engelleyen önemli bir enzimdir. Ancak yüksek konsantrasyonlardaki hidrojen peroksitin detoksifikasyonunu esas olarak katalaz enzimi üstlenmektedir (Seven ve Candan 1996).

Deneysel bir çalışmada metiyoninden-zengin ve folattan-fakir diyetle beslenen ratlarda kan, karaciğer, barsak, aort endotelyumu ve miyokartta lipid peroksidasyon substanslarının yükseldiği; GSH-Px, SOD, CAT ve GR aktivitelerinin ise azaldığı ortaya konulmuştur (Kravchenko ve ark 2004).

Yamamoto ve arkadaşları (2000), endotelial hücre yüzeyine ekstrasellüler SOD'un bağlanması üzerine homosisteinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, homosisteinin SOD etkinliğini azalttığını ifade etmişlerdir. Homosistein, SOD'un endotelial hücre yüzeyine bağlanmasını sağlayan endotelial heparan sülfat proteoglikanı bozarak arteriyel endotel hücre yüzeyine SOD'un bağlanmasını engellemektedir. Böylece yüksek miktarda homosistein fibroblastlarca ortama verilen SOD ekspresyonunu ve endotel hücrelerinin özellikle süperoksit radikali olmak üzere serbest radikallere karşı savunma yeteneğini azalttığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir.

Da Cunha ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada, rat akciğerlerinde kronik hiperhomosisteineminin bazı oksidatif stres parametrelerine etkilerini araştırmışlardır. Homosistein artışının lipid peroksidasyonunu ve proteine bağlı oksidatif hasarı artırdığı ve antioksidan savunma sistemini anlamlı bir şekilde kesintiye uğrattığı sonucuna varmışlardır. Bu sonuçlarında bazı homosistinürik hastalarda var olan akciğer hasarına neden olan mekanizmaları en azından kısmen açıklayabileceği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Yüce ve arkadaşları (2006) homosistein verilerek oksidatif stres oluşturdukları ratlarda homosistein grubu ratların plazma SOD ve CAT aktivitelerini kontrol grubu ratları değerlerine göre düşük bulmuşlardır.

Chang ve arkadaşları (2008) rat miyokard hücrelerinde homosisteinin indüklediği oksidatif stres çalışmasında homosisteinin mitokondriyal Mn-SOD aktivitesini doza bağımlı olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Kravchenko ve arkadaşlarının (2004) deneysel bir çalışmasında metiyoninden-zengin ve folattan-fakir diyetle beslenen ratlarda, GSH-Px, SOD, CAT ve GR aktivitelerinin ise azaldığını bildirmektedirler.

Machado arkadaşları (2011), kronik hiperhomosisteinemi glutamat alımının sıçanların hipokampusunda Na^+, K^+ -ATPaz, katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerini azalttığını ancak Vitamin C takviyesinin homosisteinin neden olduğu bu değişiklikleri anlamlı bir şekilde önlediğini tespit etmişlerdir. Homosisteinüride antioksidanların özel diyet olarak uygulanmasını adjuvan tedavi olarak önermektedirler.

Sunulan bu çalışmada kalp dokusu homojenatındaki SOD aktivitelerinde, kontrol ve deneme gruplarının ortalamaları arasında istatistiksel anlamda farklılık ($p < 0.001$) saptanmıştır. Kalp dokusu homojenatındaki SOD düzeyleri, kontrol grubuna ve vitamin C verilen ratlara göre, sadece metiyonin verilen Hiperhomosisteinemi grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.001$) (Çizelge 3.4, Şekil 3.7). Eritrosit hemolizati SOD aktivitelerinde de, kontrol ve deneme gruplarının ortalamaları arasında istatistiksel anlamda farklılık saptandı ($p < 0.01$) (Çizelge 3.4, Şekil 3.8). Bu sonuçlar verilen literatür bilgileriyle benzerlik göstermektedir. Ratlara metiyoninle birlikte vitamin C verilmesi, Hiperhomosisteinemi+Vitamin C grubunda SOD değerlerini Hiperhomosisteinemi grubu değerlerine göre artırmıştır. Hiperhomosisteinemi grubunda düşük SOD değerleri, homosisteinin SOD etkinliğini engellediğini düşündürmektedir. Hiperhomosisteinemi+Vitamin C grubunda ise SOD değerlerinin artması, SOD etkinliğine karşı vitamin C'nin koruyucu antioksidan bir etki mekanizmasına sahip olduğu görüşünü desteklemektedir.

Hiperhomosisteinemi oksidatif stresten korunma mekanizmalarından biri, antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidazın hidrojen peroksidi ve lipid peroksidlerin

redüksiyonunu katalizlemesidir. Homosisteinden peroksit üretimi ile in vitro hücre toksisitesi arasında korelasyon olup GSH-Px nitrik oksidin oksidatif inaktivasyonunu önlemektedir. Yapılan çalışmalarda homosisteinin GSH-Px ekspresyonunu suprese ettiği ve bu olayın lipid peroksidasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Wall ve ark 1991, Hugher ve ark 1994, Jones ve Rose 1994, Dayal ve ark 2002, Upchurch ve ark 1997, Bozkurt 2006).

Gliad ve arkadaşları (1997), tarafından homosisteinin peroksinitritlere karşı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, homosisteinin hem GSH-Px aktivitesini inhibe ettiği hem de bu enzimin mRNA'sını önemli olarak azalttığı bildirilmektedir. Buna karşın melatonin takviyesinin ise hem fizyolojik dozda hem de farmakolojik dozda GSH-Px aktivitesini artırdığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda ratların kalp dokusu homojenatında grupların GSH-Px aktiviteleri arasında istatistiksel anlamda farklılık olduğu saptandı ($p<0.05$). Bu farklılık, kontrole göre Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+Vit C gruplarında GSH-Px aktivitelerinde genel olarak bir azalışla kendini göstermektedir. (Çizelge 3.3, Şekil 3.5). Gruplara ait eritrosit GSH-Px aktivitelerini karşılaştırdığımız zaman ise literatür bilgileri ile uyumlu olarak hiperhomosisteinemi oluşturulan grupta GSH-Px aktivitelerinin, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.001$) (Çizelge 3.4, Şekil 3.9).

Rodrigo ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir çalışmada, artan homosistein düzeylerinin hidrojen peroksit oluşumunu artırdığı ve başlıca antioksidan enzimler olan GSH-Px, SOD ve CAT aktivitesinin baskılanmasına yol açtığı ve oksidatif stres oluşturduğu ileri sürülmüştür.

Toborek ve arkadaşları (1995) 6-9 ay boyunca metiyoninden-zengin diyetle beslenen tavşanlarda plazma ve aortik TBARS düzeyleri ile aortta antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı artış tespit ederken; eritrositlerde ise SOD aktivitesinin arttığını, CAT aktivitesinin değişmediğini, GSH-Px aktivitesinin ise azaldığını belirlemişlerdir.

Wyse ve arkadaşları (2002) homosistein uygulamasının ratlarda CAT aktivitesinde azalmalara neden olduğunu, vitamin E'nin ise azalan bu CAT aktivitesi üzerine koruyucu bir etki sergilediğini bildirmektedirler.

Scherer ve arkadaşları (2011) yapmış oldukları bir araştırmada yetişkin farelerde hafif hiperhomosisteinemi için kronik kimyasal yollarla uyarılan bir model geliştirmeyi amaçlayarak homosisteinin kronik olarak verilmesinin, yetişkin farelerde serebral korteks ve kanda redoks durumları üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Kronik hafif hiperhomosisteinemiye maruz bırakılan farelerin serebral kortekslerinde nitrit seviyeleri azalırken, reaktif oksijen turleri ve MDA düzeyleri plazmada ve serebral kortekste önemli bir şekilde arttığı ve homosisteinin, farelerin kan ve serebral kortekslerinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunmaları da bozduğu görülmüştür.

Norsidah ve arkadaşları (2013) metiyoninden zengin bir diyetle beslenen farelerdeki plazma homosistein ve kalp oksidatif stresi üzerine, folat ve vitamin E'nin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında yüksek metiyonin verilen grupta, kontrol grubuna göre daha düşük GSH-Px aktivitesi ölçmüşlerdir. CAT ve SOD aktiviteleri, metiyonin ve vitamin desteğinden etkilenmemiştir. Sonuç olarak, farelerin kalplerinde yüksek metiyonin diyetinin sebep olduğu hiperhomosisteineminin azaltılmasında vitamin E'nin folattan daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Sunulan bu çalışmada kalp dokusu katalaz enzim aktivitesinde kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel anlamda farklılık tespit edildi ($p < 0.001$). Ratların kalp dokusu CAT enzim aktivitesinde kontrole göre Hiperhomosisteinemi grubunda bir azalma, Hiperhomosisteinemi+Vit C grubunda ise bir artış görülmektedir (izelge 3.3, şekil 3.6).

Eritrosit katalaz enzim aktivitesinde ise kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel anlamda farklılık olduğu saptandı ($p < 0.01$) (izelge 3.4, şekil 3.10). Ratların eritrosit katalaz enzim aktivitesinde kontrole göre Hiperhomosisteinemi grubunda bir azalma, Hiperhomosisteinemi+Vit C grubunda önemli bir artış gözlenmektedir (izelge 3.4, şekil 3.10). Doku ve eritrositlerde Hiperhomosisteinemi grubunda homosistein seviyesinin giderek artmasının hidrojen peroksit oluşumunu artırdığı, oksidatif stres oluşturduğu ve katalaz aktivitesini baskıladığı verilen literatür bilgileri ile uyumludur.

Eritrosit ve Kalp dokusuna ait SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri genel olarak ele alındığı zaman; hiperhomosisteineminin bu antioksidan enzimlerin aktivitesini azalttığı görüldü. Bu azalma, hiperhomosisteinemi sonucu oluşan serbest radikal hasarına karşı antioksidan savunma amaçlı olarak bu enzimlerin tüketildiği şeklinde açıklanabilir. Askorbik asidin ise; homosisteinin oluşturduğu oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu

azaltmanın yanı sıra, antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmayı önemli ölçüde önlediği dikkati çekti. Bu da bize, dışarıdan verilen bu kuvvetli antioksidanın vücutta antioksidan savunma sistemini destekler nitelikte etki sergileyerek, antioksidan enzim aktivitelerini artırdığını göstermektedir. Ayrıca oluşturulan bu hiperhomosisteinemi modeli homosisteinin yol açtığı doku değişimlerini kapsayan ilave mekanizmaların araştırılması bakımından faydalı olabilir

5.SONUÇ

Bu çalışmada daha önce tanımlanan rat hiperhomosisteinemi modeline uygun olarak L-metiyonin suda çözülüp 6 hafta boyunca her gün 1 g/kg dozunda oral gavaj yoluyla Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+VitC grubunda bulunan ratlara uygulandı ve hiperhomosisteinemi oluşturuldu. Hiperhomosisteinemi+ Vitamin C grubu ratlarına her gün 1 g/kg dozunda L-metiyonin yanında 150 mg/kg vitamin C gavaj yoluyla verildi.

Metiyoninle birlikte verilen vitamin C, serum homosistein düzeylerinde azalışa neden olmasına rağmen bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Kalp dokusu ve plazma MDA düzeylerinin, Hiperhomosisteinemi grubunda kontrol ve diğer deneme grubundaki düzeylerden yüksek olduğu tespit edildi. Hiperhomosisteinemi oluşturulan ve aynı zamanda Vitamin C verilen ratların, plazma MDA düzeylerinde bir düşüş görüldü ($p<0.01$). Hiperhomosisteinemi gruplarındaki dokuda ve plazmada yüksek MDA değerleri, homosisteinin oksidatif stresi indüklediğini düşündürürken, Hiperhomosisteinemi+Vitamin C grubunda düşük MDA değerleri ise vitamin C'nin oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyuculuğunu göstermektedir.

Hiperhomosisteineminin, eritrosit ve kalp dokusu SOD, GSH-Px ve CAT antioksidan enzimlerinin aktivitelerini azalttığı saptandı. Antioksidan savunma amaçlı olarak, hiperhomosisteinemi sonucu oluşan serbest radikal hasarına karşı bu antioksidan enzimlerin tüketilmesi azalmanın sebebi olarak açıklanabilir. Vitamin C'nin antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmayı büyük oranda önlemesi, oksidatif strese karşı koruyucu olabileceğini düşündürmektedir.

Bütün bu bilgiler ışığında metiyoninle birlikte verilen vitamin C'nin serum homosistein düzeylerinin artışını veya azalışını etkilemede tek başına yeterli bir antioksidan olmadığı kanısına varıldı. Dışarıdan verilen bu kuvvetli antioksidanın vücutta antioksidan savunma sistemini destekler nitelikte etki sergileyerek, antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı görüldü. Bütün bu sonuçlar, hiperhomosisteinemi tedavisinde kullanılan diğer vitaminlere ek olarak vitamin C'nin de kullanılabileceği düşündürürken vitamin C'nin antioksidan etkilerinin araştırılacağı daha geniş çaplı benzer çalışmalara yön verecektir.

ÖZET

Ratlarda hiperhomosisteineminin eritrosit ve kalp dokusunda oluşturduğu oksidatif hasar üzerine vitamin C'nin etkisi

Bu çalışmada, uzun süreli metiyonin uygulanan ratlarda homosistein düzeyindeki artışın kalp dokusu ve eritrosit antioksidan sistem üzerine verdiği hasar ve ekzojen bir antioksidan olan vitamin C'nin oluşan bu hasarı ne oranda etkilediğinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmaya 3 grupta 36 adet rat alındı. Kontrol grubu her gün normal pelet yem ve çeşme suyuyla *ad libitum* beslendi. Hiperhomosisteinemi grubunda, L-metiyonin ratlara her gün 1 g/kg, Hiperhomosisteinemi+Vitamin C grubu ratlarına da her gün 1 g/kg dozunda L-metiyonin yanında 150 mg/kg/gün vitamin C 6 hafta boyunca gavaj yoluyla verildi. 6 haftalık denemenin sonunda deneme ve kontrol gruplarındaki hayvanlardan kan örnekleri alınarak elde edilen plazma örneklerinde MDA düzeyleri hemen ölçüldü. Plazma örnekleri elde edilirken GSH-Px, SOD ve CAT enzim aktivitelerinin tayini için eritrositler ayrıldı ve analizler gerçekleştirilinceye kadar -20°C de saklandı. Servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanan ratlardan kalp dokusu örnekleri alındı ve analizlerin yapıldığı güne kadar -80°C de muhafaza edildi. Elde edilen doku homojenatında MDA düzeyleri ölçülürken SOD, GSH-Px, CAT antioksidan enzim aktiviteleri analizleri hem doku örneklerinde hem de eritrosit hemolizatında gerçekleştirildi. Ayrıca serum homosistein düzeyleri ticari Rat Homosistein Kiti kullanılarak ELİSA cihazında ölçüldü.

Kontrol ve deneme gruplarının serum homosistein düzeylerinin ortalamaları arasında fark ($p<0.001$) saptanması deneme gruplarında hiperhomosisteineminin oluştuğunu gösterdi. Hiperhomosisteinemi ve Hiperhomosisteinemi+Vit C grupları arasında ise serum homosistein düzeyleri bakımından istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmadı.

Hiperhomosisteinemi grubuna ait kalp dokusu ve plazma MDA düzeylerinin, Hiperhomosisteinemi+Vitamin C ve kontrol grubundaki plazma MDA düzeylerinden yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.01$).

Kalp dokusu SOD aktiviteleri, Hiperhomosisteinemi+Vitamin C grubundaki ratlara göre sadece metiyonin verilen hiperhomosisteinemi grubunda düşük bulundu ($p<0.001$). Eritrosit hemolizati SOD aktivitelerinde metiyoninle birlikte vitamin C verilmesi, Hiperhomosisteinemi+Vitamin C grubunda SOD değerlerini Hiperhomosisteinemi grubu değerlerine göre artırdı ($p<0.01$). Kalp dokusunda GSH-Px aktivitelerinde, kontrole göre deneme gruplarının GSH-Px aktivitelerinde genel olarak bir azalma tespit edildi ($p<0.05$). Eritrosit hemolizatındaki GSH-Px aktivitelerinde, Kontrole göre Hiperhomosisteinemi grubunda GSH-Px aktivitesinde bir azalış, Hiperhomosisteinemi+VitC grubunda ise bir artış tespit edildi ($p<0.001$). Kalp dokusu homojenatında ve eritrosit hemolizatındaki katalaz enzim aktivitelerinde kontrole göre Hiperhomosisteinemi grubunda bir azalma, Hiperhomosisteinemi+Vit C grubunda ise bir artış görüldü ($p<0.001$).

Hiperhomosisteinemi grubunda yüksek MDA değerleri, homosisteinin oksidatif strese sebep olduğunu göstermektedir. Metiyoninle birlikte verilen vitamin C dokuda ve plazmada MDA değerlerini düşürdü. Hemolizat ve doku SOD, GSH-Px, CAT aktiviteleri hiperhomosisteinemi grubunda azalırken, Hiperhomosisteinemi+Vit C grubunda arttı. Metiyoninle birlikte verilen vitamin C'nin serum homosistein düzeyleri artışı veya azalışı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptandı. Serum homosistein düzeyleri üzerine tek başına yeterli olmadığı kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Hiperhomosisteinemi, homosistein, metiyonin, Vitamin C, oksidatif stres

SUMMARY

Effect of vitamin C on hyperhomocysteinemia-induced oxidative damage in erythrocyte and heart tissue in rats

In this study, we researched the damage of increase in homocysteine level over heart tissue and erythrocyte antioxidant system on long term methionine applied rats and effect level of vitamin C on this damage, which is antioxidant.

In the study 36 rats in 3 groups were used. The Control group were fed by everyday normal pellet feed and tap water ad libitum. In Hyperhomocysteinemia group, L-methionine were given each day by 1g/kg to the rats, to Hyperhomocysteinemia+Vitamin C group the rats were fed besides 1 g/kg L-methionine, 150 mg/kg/day vitamin C were given for 6 weeks by gavage. After 6 weeks study from control and in experimental groups blood samples were taken. In the plasma samples MDA levels immediately measured. While obtaining plasma samples for GSH-Px, SOD and CAT enzymes activities erythrocyte were separated and kept at -20 °C till to be analyzed. Heart tissue samples were taken from by cervical dislocation euthanasia applied rats and kept -80 °C until analysis had been done. While measuring the MDA levels in the sample tissues, SOD, GSH-Px, CAT antioxidant enzyme activities were analyzed both in tissue samples and in erythrocyte hemolysates. Additionally serum homocysteine levels were measured with ELISA apparatus by using commercial rat homocysteine kit.

Determining the difference ($p < 0.001$) between mean of serum homocysteine levels in the control and experimental groups, show that occurred hyperhomocysteinemia in experimental groups. In the terms of the serum homocysteine levels statistically non significant among the groups of Hyperhomocysteinemia and Hyperhomocysteinemia+Vit C.

The level of heart tissue and plasma MDA in Hyperhomocysteinemia group were greater than Hyperhomocysteinemia+Vit C and Control group ($p < 0.01$).

Heart tissue SOD activities were low just in methionine given Hyperhomocysteinemia group compared to Hyperhomocysteinemia+VitC group ($p < 0,001$). By giving methionine with vitamin C in erythrocyte hemolysates SOD activities increased SOD values in Hyperhomocysteinemia+VitC group compared to

Hyperhomocysteinemia group ($p < 0.01$). In heart tissue GSH-Px activities, there were general lowering in experimental groups compared to control group ($p < 0.05$). In erythrocyte hemolysates GSH-Px activities, compared to the control group, GSH-Px activity decrease in Hyperhomocysteinemia group, and increase in Hyperhomocysteinemia+VitC group were observed ($p < 0.001$). In heart tissue homogenates and erythrocyte hemolysates the catalase enzyme activities were decreased in Hyperhomocysteinemia group and increased in Hyperhomocysteinemia+VitC group compared to the control group ($p < 0.001$).

The high values of MDA in Hyperhomocysteinemia group shows us that, homocysteine causes oxidative stress. Given with methionine, vitamin C lowered MDA values in tissue and plasma. Hemolysates and tissue SOD, GSH-Px, CAT activities decrease in Hyperhomocysteinemia group but increase in Hyperhomocysteinemia+VitC group. Given with methionine, vitamin C has no affect on serum homocysteine levels it has not affective on itself.

Key words: Hyperhomocysteinemia, homocysteine, methionine, vitamin C, oxidative stress.

KAYNAKLAR

Akkiprik M, Çevik D, Özer A, Emerk K. Homosisteinin insan göbek kordon ven endotel hücre kültüründe eNOS ve DDAH gen ekspresyonları üzerine etkisi. Marmara Medical Journal 2007; 20(3): 144-9.

Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı. Konya: Mimoza Yayınları; 1995. s: 3-10.

Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. Turkish Journal of Biochemistry 2006; 31 (2); 51–56.

Alul RH, Wood M, Longo J, Marcotte AL, Campione AL, Moore MK, Lynch SM. Vitamin C Protects Low-Density Lipoprotein From homocysteine-Mediated Oxidation. Free Radical Biology & Medicine 2003; Vol. 34, No. 7, pp: 881–891.

Andreotti F, Burzotta F, Manzoli A. Homocysteine and Risk of Cardiovascular Disease. Journal of Thrombosis and Thrombolysis 2000; 9: 13–21

Anti aging biomarkers (Experts in Oxidative and Tissue Stress Makers), <http://www.woongbee.com/StressMarker/anti-Aging%20biomarkers.pdf>. Erişim Tarihi: 26 Eylül 2013.

Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. “Serum Total Homocysteine and Coronary Heart Disease.” International Journal of Epidemiology 1995; 24: 704-709.

Bagi Z, Cseko C, Toth E, Koller A. Oxidative stress-induced dysregulation of arteriolar wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment, American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 2003; 285: H2277-H2283

Baskin SI, Salem H. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington DC: Taylor and Francis, 1997a, pp: 26-35.

Baskin SI, Salem H. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington DC: Taylor and Francis, 1997b, pp:79-120.

Bast A, Goris RJA. Oxidative stress. Biochemistry and human disease. Pharm Weekbl Sci Journal 1989; 11 (6): 199-206.

Baydaş G, Gürsu M F, Yılmaz S, Canpolat S, Yasar A, Cikim G, Canatan H. “Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats.” *Neuroscience Letters* 2002; 323: 195-198.

Berlett BS, Stadman ER. “Recent advances in the analysis of oxidized proteins”, *Amino Acids* 2003; 25: 221-226.

Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 1996; 20: 707-727.

Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1963; May; 61: 882-8.

Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, Selhub J, D'Agostino RB, Wolf PA, Jacques PF, Wilson PW. Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Journal of The American Medical Association* 1999; 159(10): 1077-1080.

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. *Journal of The American Medical Association* 1995; 274: 1049-1057.

Bozkurt Ş. Homosistein'in vasküler düz kas fonksiyonları üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, Türkiye. 2006.

Boztepe Derici Ü, Altok Reis K. Hiperhomosisteinemi ve kronik böbrek yetmezliği. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2002; I(3): 129-134.

Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Hayens WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clinical Science* 2001; 100: 161-167.

Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality—An update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacological Research* 2009; 60(6): 481-7.

Brattstrom L, Israelsson B, Hultberg B. Plasma homocysteine and methionine tolerance in early-onset vascular disease. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 1989; 19 Suppl 1: 35-44. Review.

Breilmann J, Pons-Kühnemann J, Brunner C, Richter M, Neuhäuser-Berthold. Effect of antioxidant vitamins on the plasma homocysteine level in a free-living elderly population. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2010; 57(3-4): 177-82.

Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *The Journal of Nutrition* 2006; 136: 1636-40.

Brude IR, Finstad HS, Seljeflot I, Drevon CA, Solvoll K, Sandstad B, Hjermann I, Arnesen H, Nenseter MS. Plasma homocysteine concentration related to diet, endothelial function and mononuclear cell gene expression among male hyperlipidaemic smokers. *European Journal of Clinical Investigation* 1999; 29(2): 100-108.

Bulmuş FG. Kronik hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda alfa-lipoik asidin plazma ve çeşitli dokularda oksidan antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye. 2006.

Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve yaşlanma. (Oxidative DNA damage and aging). *Cerrahpaşa Journal of Medicine* 2004; 35: 159-169.

Burtis CA, Ashwood ER. "Tietz Textbook of Clinical Chemistry", W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1999.

Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research* 2000; 87: 349-354.

Catoni GL. S-Adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 1953;204:403-16.

Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C, De Franceschi M, Belardinelli R, Guazzi MD. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clinical Chemistry* 2001; 47(5) : 887-892.

Cervello I, Lafuente A, Giralt M, Mallol J. Enhanced glutathione Stransferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)preyne. *Placenta* 1992; 13(3): 273-280.

Challem J, Dolby V. *Homocysteine the Secret Killer*. Keats Publishing, inc. New Canan, USA. 1997.

Champe PC, Harvey RA. *Lipinkott Biyokimya*. Tokullugil A, Dirican M,Ulukaya E, Çev. Ed, 2. Baskı, İstanbul: Nobel kitabevi; 1997:1-12, 241-56.

Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jiang H, Du J, Tang C. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids* 2008; May; 34(4): 573-585.

Chao JC, Huang CH, Wu SJ, Yang SC, Chang NC, Shieh MJ, Lo PN. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 427-434.

Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C: Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 841–852.

Clarke R. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine lowering trialists' collobration. *BMJ: British Medical Journal* 1998; 316: 894-898.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroğlu M, Lunec J. "Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation and disease". *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003; 17: 1195-1214.

Cooper AJ. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *The Annual Review of Biochemistry* 1983; 52: 187-222.

Corrales FJ, Pérez-Mato I, Sánchez Del Pino MM, Ruiz F, Castro C, García-Trevijano ER, Latasa U, Martínez-Chantar ML, Martínez-Cruz A, Avila MA, Mato JM. Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. *Journal of Nutrition* 2002; 132: 2377-2381.

Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* 2002; 18(9): 761-6.

Çakar H. Etanolün oluşturduğu karaciğer hasarı üzerine quercetin'in etkisi (ed). Yüksek Lisans Tezi. 107s (yayınlanmamış). Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye. 2005.

Çalıklı A. "Kayısı ve vişne suyu üretimindeki atıkların değerlendirilmesi" Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri, Ankara, Türkiye. 2003.

Çavdar C, Sifil A, Çamsar T. Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Oksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 1997; 3-4: 92-95.

Da Cunha AA, Ferreira AG, da Cunha MJ, Pederzoli CD, Becker DL, Coelho JG, Dutra-Filho CS, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2011; 358(1-2): 153-60.

Dal K, İçağasıoğlu S, Candan F, Erselcan T, Korkmaz S, Kılıçlı M. Tip 2 diabetes mellituslu hastalarda homosistein düzeylerinin mikroalbuminüri ve retinopati üzerine etkisi, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2006; 26: 617-621.

Dalery K, Luise S, Selhub J, Latour Y. Homocysteine and Coronary Artery Disease in French Canadian Subject: Relation with Vitamins B₁₂, B₆, Pyridoxal Phosphate, and Folate. *American Journal of Cardiology* 1995; 75: 1107-1111.

Davir MK, Koury MJ, Captevilla A, Rana S, Wagner C. Plazma s-adenosylmethionine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 74: 7123-9.

Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach* (eds). Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 1996.

Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* 2002; 22: 1996-2002.

Dayal S, Lentz SR. ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vascular Medicine* 2005; 10(1): S27-33.

De Vigneaud VE. *Trial of research in sulfur chemistry and metabolism and related fields*. New York: Cornell university press; 1932. p: 135-39.

Deby C, Pincemail J.: Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanisms. In: Rökän (Ginkgo Biloba). Recent result in pharmacology and clinic. Ed: Fünfgeld EW. Springer- Verlag, Berlin, 1988; pp: 57-70.

Di Buono M, Wykes LJ, Cole DE, Ball RO, Pencharz PB. Regulation of sulfur amino acid metabolism in men in response to changes in sulfur amino acid intakes. *Journal of Nutrition* 2003; 133: 733-739.

Diplock A. Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. International Life Sciences Institute Europe concise monograph series. Belgium. 1998. p:59.

Doshi S, McDowell I, Goodfellow J, Stabler S, Boger R, Allen R, Newcombe R, Lewis M, Moat S. Relationship between Sadenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. *Metabolism*. 2005; 54(3): 351-60.

Emsley AM, Jeremy JY, Gomes GN, Angelini GD, Plane F. Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxide-mediated relaxation of the rat isolated aorta. *British Journal of Pharmacology* 1999; 126(4): 1034–1040.

Evans MD, Cooke MS. “Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids”, *BioEssays*, 2004; 6: 533-542.

Fırat S. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sisteinin bu system üzerindeki etkisi. Uzmanlık Tezi. 95s (yayınlanmamış). Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 1997.

Filip C, Elena A, Nina Z, Irina JM, Mihaela S, Luminita J, Nastasia G, Costel MO. Hyperhomocysteinemia’s effect on antioxidant capacity in rats. *Central European Journal of Medicine* 2010; 5(5): 620-626.

Finkelstein JD, Kyle WE, Harris BJ. Methionine Metabolism in Mammals: Regulatory Effects of S-Adenosylhomocysteine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1974; 165: 774-779.

Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2000; 32: 385-389.

Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2000; 26: 219-25.

Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *European Journal of Pediatrics* 1998; 157: 40-4.

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease-free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* 1982; 47(5): 412-425.

Garewal HS. Antioxidants and disease prevention. Florida: CRC Press LLC; 1997, pp 3-19.

Gezici T, Kökeş Ü, Hız F, Bilge S, Çelebi A. Akut iskemik ve akut hemorajik inmede risk faktörü olarak homosistein. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2008; 15(3): 181-185.

Gharib A, Chabannes B, Sarda N, Pacheco H. In vivo elevation of mouse brain Sadenosyl-l-homocysteine after treatment with l-homocysteine. *Journal of Neurochemistry* 1983; 40: 1110–1112.

Gliad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo Csaba. Melatonin is as Scavenger of Peroxynitrite. *Life Sciences* 1997; 60 (10): 169-174.

Guemouri L, Artur Y, Herbert B, Jeandel C, Cuncy G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, Glutathion peroxidase, and catalase in blood, *Clinical Chemistry* 1991; 37(11): 1932-1937.

Gutteridge JMC. “Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage”. *Clinical Chemistry* 1995; 41(12): 1819-1828.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third Edition, Oxford Science Publications, 2001. p:22-24.

Halliwell B, Gutteridge, JMC. “ Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease”, An overview (Packer L, Glazer AN, Eds.). *Oxygen Radicals in Biological Systems. Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., New York, 1990. 186:1-19.

Halliwell B. Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radical Research* 1996; 25: 439-454.

Hankey GJ, Eikelboon JW. Homocysteine and stroke. *Current opinion in Neurology* 2001; 14: 95-102.

Hanratty CG, Mcgrath LT, Mcauley DF, Young IS, Johnston GD. The effects of oral methionine and homocysteine on endothelial function. *Heart* 2001; 85: 326-30.

Hugher H, Matheus B, Lenz MI. Cytotoxicity of oxidized LDL to porcine aortic muscle cells is associated with the oxysterols 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1994; 14: 1177-1185.

Israelsson B, Brattström LE. Homocysteine and Myocardial Infarction. *Atherosclerosis* 1988; 71: 227-233.

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: Dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99: 3092-5.

Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry* 1998; 44: 1833-43.

Jacques P, Bostom A, Williams R. Relations between Folate Status a Common Mutation in MTHFR and Plasma Homocysteine Concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7-12.

James DH, Rene LJ, Lori MS, Margaret EB, John TB. Regulation of Homocysteine Metabolism. *Advances in Enzyme Regulation* 1999; 39: 69-91.

Jones BG, Rose FA. Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity. *Atherosclerosis*.1994; 105: 165-170.

Jousilahti P, Tuomilehto J, Vartiainen E, Pekkanen J, Puska P. Body weight, cardiovascular risk factors and coronary mortality. 15-year follow-up of middle-aged men and women in Eastern Finland. *Circulation* 1996; 93: 1372-1379.

Kaul S, Zadeh AA, Shah PK. Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease: not validated. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48(5): 914-23.

Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrah paşa tıp dergisi* 2004; 35(2), 83-89.

Koca HB. Koroner Arter Hastalarında Lipit Ve Protein Oksidasyonu İle Selenyum İçeren Antioksidanların Düzeyi. Yüksek Lisans Tezi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon, Türkiye. 2007.

Kocabalkan F, Baykal Y, Bozoğlu E. Yaşlılarda kardiyovasküler risk faktörü olarak homosistein. Turkish Journal of Geriatrics 2000; 3(2): 69-73.

Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse AT. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. Cardiovascular Toxicology 2011; 11: 67-73.

Kravchenko IV, Maltsev GL, Vasilev AV. Research of antioxidant defence system under alimentary induced oxidative stress. Biomed Khim 2004; 50(5): 477-483.

Kuch B, Bobak M, Fobker M, Junker R, Eckardstein A, Marmot M, Hense HW. Associations between homocysteine and coagulation factors-A cross-sectional study in two populations of central Europe. Thrombosis Research 2001; 103: 265-273.

Landvik SV, Diplock AT and Packer L. Efficacy of α -tokoferol in human health and disease. Journal of Clinical Pathology 1998; 121: 1123-1137.

Langman LJ, Cole DE. Homocysteine. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 1999; 36(4): 365-406.

Lentz SR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. Atherosclerosis Supplements 2003; 4: 61-65.

Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. Life Sciences 1997; 61: 1205-1215.

Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C, Goligorsky MS. Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in vascular endothelial cells: a mechanism for development of atherosclerosis? Circulation 2002; 105(9): 1037-1043.

Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JCM, Gourrentt TJ, Podel ER. Neuropsychiatric Disorders Caused by Cobalamin Deficiency. The New England Journal of Medicine 1988; 318: 1720-1728.

Linnebank M, Moskau S, Semmler A, Widman G, Stoffel-Wagner B, Weller M, Elger CE. Antiepileptic drugs interact with folate and vitamin B₁₂ serum levels. *Annals of Neurology* 2011; 69: 352–359.

Liu DS, Gao W, Liang ES, Wang SL, Lin WW, Zhang WD, Jia Q, Guo RC, Zhang JD. Effects of allicin on hyperhomocysteinemia-induced experimental vascular endothelial dysfunction. *The European Journal of Pharmacology* 2013; 714: 163–9.

Lohr JB. Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. *Archives of General Psychiatry* 1991; 48: 1097-106.

Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *The Journal of Clinical Investigation* 1996; 98: 5-7.

Lowry OH. Lowry method, a modification of the Folin method based on the presence of tyrosine and tryptophan in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 266-266.

Luck H : Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed): *Methods in Analysis*. London: Academic Press Incorporated; 1965.

Luft R. “The development of mitochondrial medicine”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994. 91: pp: 3731-3738.

Lunec J, Blake D. Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes. Ed.R.D.Cojhen, London: Baillière Tindall; 1990. pp: 189- 212.

MacCoss MJ, Fukagawa NK, Matthews DE. Measurement of intracellular sulfur amino acid metabolism in humans. *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2001; 280: 947-955.

Machado FR, Ferreira AG, da Cunha AA, Tagliari B, Mussulini BH, Wofchuk S, Wyse AT. Homocysteine alters glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C. *Metabolic Brain Disease* 2011; 26(1): 61-7.

Maclean KN, Janosik M, Kraus E, Kozich V, Allen RH, Raab BK, Kraus JP. Cystathionine beta-synthase is coordinately regulated with proliferation through a redox-sensitive mechanism in cultured human cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cellular Physiology* 2002; 192: 81–92.

Mahalle N, Kulkarni MV, Garg MK, Naik SS. Vitamin B₁₂ deficiency and hyperhomocysteinemia as correlates of cardiovascular risk factors in Indian subjects with coronary artery disease. *Journal of Cardiology* 2013; 61: 289–94.

Malinow MR. Homocysteine and Arterial Occlusive Disease (*Frontiers in Medicine*). *Journal of Internal Medicine* 1994; 236: 603-617.

Malinowska J, Kolodziejczyk J and Olas B. The disturbance of hemostasis induced by hyperhomocysteinemia; the role of antioxidants. *Acta Biochimica Polonica* 2012; Vol 59, No 2: 185–194.

Marklund S. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982; 79: 7634-8.

Markus C. Stühlinger, Roberta K. Oka, Eric E. Graf, Isabella Schmölder, Barbara M. Opon, Om Kapoor, Andrzej Szuba, M.Rene Malinow, Thomas C. Wascher, Otmar Pachinger and John P. Cooke Endothelial Dysfunction by Hyperhomocyst(e)inemia: Role of Asymmetric Dimethylarginine. *Circulation*; 2003; 108: 933-938.

Massy ZA, Ceballos I, Chadeaux-Latscha B, Nguyen-Khao T, Descamps-Latscha B, Driieke T, Jungers P. Homocysteine, oxidative stress, and endothelium function in uremic patients. *Kidney International Supplements* 2001; 59: s: 243-245.

Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: 339–345.

Mathers J, Fraser JA, McMahon M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochemical Society Symposia* 2004; (71): 157- 76.

Mattson M, Kruman I, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Research Reviews* 2002; 1: 95-111.

McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nature Medicine* 1996; 2: 386-389.

McCully KS. Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Publisher: Walter De Gruyter; 2005; 43(10): p 980-6.

Memişoğulları R, Bakan E. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2004; 18: 193– 197.

Memişoğulları R, Taysi S, Bakan E, Çapoğlu I. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochemistry and Function* 2003; 21: 291-296.

Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü Ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3, 30-39.

Miller JW, Nadeau MR, Smith J, Smith D, Selhub J. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's coordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochemical Journal* 1994; 298: 415-19.

Mineer SE, Evrovski J, Cole D. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism. An Update. *Clinical Biochemistry* 1997; 30: 189-201.

Ming CL, El-Saka A, Grazion T. The effect of vascular endothelial growth factor on a rat model of traumatic arteriogenic erectile dysfunction. *The Journal of Urology* 2002; 167:761–767.

Moat SJ, Lang D, Mcdowell IFW, Clarke ZL, Madhavan AK, Lewis MJ, Goodfellow J. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2004; 15: 64-79.

Mosharov E, Crawford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000; 39: 13005–13011.

Mukai FH, Goldstein BD. Mutagenicity of malondialdehyde: a decomposition product of polyunsaturated fatty acids. *Science* 1976; Feb 27; 191(4229): 868-9.

Murray RK, Graner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper'ın Biyokimyası. In: çev. Dikmen N, Özgünen T. (Çevirenler). 24. Baskı. İstanbul: Barış Kitabevi; 1998.

Naurath HJ, Joosten E, Reizler R, Stabler SP, Allen RH. Effects of vitamin B₁₂, folat and vitamin B₆ supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *The Lancet* 1995; 346: 85-9.

Nawar WW. Lipids. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), New York: Marcel Dekker; 1996. pp: 225-319.

Noll C, Hamelet J, Ducros V, Belin N, Paul JL, Delabar JM, Janel N. Resveratrol supplementation worsen the dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis observed in hyperhomocysteinemic mice. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47: 230–236.

Norsidah KZ, Asmadi AY, Azizi A, Faizah O, Kamisah Y. Palm tocotrienol-rich fraction reduced plasma homocysteine and heart oxidative stress in rats fed with a high-methionine diet. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2013; 69(3): 441-9.

Nygaard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvale G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *The Journal of the American Medical Association* 1995; 274: 1526–1533.

Nygaard O, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM, Brattström L. Total homocystein and cardiovascular disease. *Journal of Internal Medicine* 1999; 246: 425-454.

Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *Federation of European Biochemical Societes Letters* 2006; 580: 2994-3005.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95: 351-358.

Onat T, Emerk K, Sözmen E.Y. İnsan Biyokimyası. 1.Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık; 2002.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the qualitative and quantitative characterization of erythrocyte glutathion peroxidase *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1967; 70 (1): 158-169.

Paxton R, Scislowski PWD, Davis EJ, Harris RA. Role of Branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and Pyruvate dehydrogenase in 2-oxobutyrate Metabolism. *Biochemical Journal* 1986; 234: 295-303.

Payan A. "Üzüm Meyvesi Ve Çekirdeğinden Antioksidan Eldesi." Yüksek Lisans Tezi, 66 sayfa. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.2007.

Perry DJ. Hyperhomocysteinaemia. *Baillière's Best Practice & Research Clinical Haematology* 1999; 12: 451-477.

Pfanzagl B, Tribl F, Koller E, Möslinger T. Homocysteine strongly enhanced metal-catalyzed LDL oxidation in the presence of cystine and cysteine. *Atherosclerosis* 2003; 168: 39-48.

Pope AJ, Karupiah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacological Research* 2009; 60(6): 461-5.

Racek J, Rusňáková H, Trefil L, Siala KK. The Influence of Folate and Antioxidants on Homocysteine Levels and Oxidative Stress in Patients with Hyperlipidemia and Hyperhomocysteinemia. *Physiological Research* 2005; 54: 87-95.

Rixsen NP, Rongen GA, Blom HJ, Russel FGM, Boers GH J, Smits P. Potential role for adenosine in the pathogenesis of the vascular complications of hyperhomocysteinemia. *Cardiovascular Research* 2003; 59: 271-276.

Rimm EB, Ascherio A, Giovannucci E, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. Vegetable, fruit and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *Journal of The American Medical Association* 1996; 275: 447-51.

Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, Hennekens C Stampfer MJ. Folate and vitamin B₆ from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *Journal of The American Medical Association* 1998; 279: 359-364.

Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, Kottke-Marchant K, Savon SR, Selhub J, Nissen SE, Kutner M, Topol EJ, Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995; 92: 2825-2830.

Robinson R, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meleady R, Daly L, Witteman J, Graham I. Low circulating folate and

vitamin B₆ concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group, *Circulation* 1998; 97: 437-443.

Rocha MS, Teerlink T, Janssen MC, Kluijtmans LA, Smulders Y, Jakobs C, Tavares de Almeida I, Rivera I, Castro R, Blom HJ. Asymmetric dimethylarginine in adults with cystathionine β -synthase deficiency. *Atherosclerosis* 2012; 222: 509-11.

Rodrigo R, Passalacqua W, Araya J, Orellana M, Rivera G. Homocysteine and essential hypertension. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2003; 43(12): 1299-1306.

Sainz RM, Reiter RJ, Mayo JC, Cabrera J, Tan DX, Qi W, Garcia JJ. Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: effect of pinealectomy. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 119: 143-149.

Sánchez-Moreno C, Jiménez-Escrig A, Martín A. Stroke: roles of B vitamins, homocysteine and antioxidants. *Nutrition Research Reviews* 2009 Jun; 22(1): 49-67.

Scherer EB, da Cunha AA, Kolling J, da Cunha MJ, Schmitz F, Sitta A, Lima DD, Delwing D, Vargas CR, Wyse AT. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2011 Nov; 29(7):693-9.

Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy. *Critical Care Medicine* 1993; 21: 92-102.

Schweinberger BM, Schwieder L, Scherer E, Sitta A, Vargas CR, Wyse AT. Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain Na⁺,K⁺-ATPase/Mg²⁺-ATPase activity and oxidative status of the offspring. *Metabolic Brain Disease* 2014; Mar; 29(1): 153-60.

Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg ICH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *Journal of The American Medical Association* 1993; 270: 2693-8.

Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 2004; 9(3): 145-152.

Serafinowicz A, Kukula K, Cieciora T, Shaibant B. Homocysteine and lipid peroxidation products: Important atherosclerosis risk factors in renal allgraft recipients? *Transplantation Proceedings* 2000; 32: 1367-1368.

Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B vitamins and coronary artery disease. *Medical Clinics of North America* 2000; 84: 215-37.

Seven A, Candan G. Antioksidant defense systems. *Cerrahpasa Journal of Medicine* 1996; 27: 41-50.

Shacter E. "Protein oxidative damage". *Methods in Enzymology*. 2000; 319: 428–436.

Siliğ Y, Çelik KV, Atalay A. Daminozid Uygulamasından Sonra Elde Edilen Civcivlerde Karaciğer Sitoplazmik Glutatyon-S-Transferaz ve Mikrozomal Nitrozodimetilamin Demetilaz Aktivitelerindeki Değişiklikler. *Turkish Journal of Biology* 2000; 24: 119-126.

Sözmen EY. Yaşlanma Biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY (editörler) *İnsan Biyokimyası*, Ankara: Palme Yayıncılık; 2002. ss: 665-674.

Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH. Elevation of Serum Cystathionine Levels in Patients with Cobalamin and Folat Deficiency. *Blood* 1993; 81: 3403-13.

Stadtman ER, Levine RL. "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins". *Amino Acids* 2003; 25: 207-218.

Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Advers vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *The Journal of Clinical Investigation* 1993; 91: 308-318.

Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk of Myocardial infarction in US physicians. *Journal of The American Medical Association* 1992; 268: 877-81.

Stefanello FM, Chiarani F, Kurek AG, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse ATS. Methionine alters Na⁺,K⁺-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic

antioxidant defenses in rat hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2005; 23: 651–656.

Sumner JB, Dounce AL. "Crystalline Catalase". *Science* 1937;85 (2206): 366–367.

Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988; 34: 497-500.

Svingen BA, Buege JA, O'Neal FA, Aust SD. : The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation: The propagation of lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 1979; 254: 5892.

Şanal İS, Güvenç A, Salgın U, Mehmetoğlu Ü, Çalımlı A. Recycling of apricot pomace by supercritical CO₂ extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* 2004; Volume 32, Issues 1–3: 221–230.

Şen S, Durat G, Atasoy I. Vitamin B₁₂ ve Folik Asit Eksikliğinin Psikiyatrik ve Nörolojik Bozukluklarla İlişkisi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2009; 7(1): 31-6.

Taşkıran A, Eskiocak S, Çıkırıkçioğlu M, Ege T, Duran E. Koroner Arter Bypass Cerrahisi Öncesindeki Plazma Total Antioksidan Kapasite Düzeylerinin İskemi-Reperfüzyon Hasarı İle İlişkisi, *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 22(1): 16-22.

Taysi S, Gul M, Sari RA, Akçay F, Bakan N. Oxidant/antioxidant status in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2002a; 40: 684–688.

Taysi S, Polat, F, Gul M, Sari RA, Bakan E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 2002b; 21(5): 200–204.

Tekkeş Y. "Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitamininin dokularda lipit peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması" Y.Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye. 2006.

Temel İ, Özerol E. Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9(2): 149-157.

Tietz WN. Measurement of plasma hemoglobin. Fundamental of Clinical Chemistry. Saunders Company, 1987.

Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drozd M, Wieczorek M. Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1995; 115(2): 217-224.

Tuncer A. Normal diyet ve metiyoninden zengin diyetle beslenen sıçanlarda serum asimetric dimetil arginin (ADMA) düzeyleri üzerine vitamin E, vitamin C, Vitamin B₆ ve folik asidin etkileri. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Bilim Dalı, Edirne, Türkiye. 2008.

Turgut C, Aluçlu MU, Kale E, Hamdanoğulları D, Akkuş Z. Akut Serebral infarkt olgularında serum homosistein düzeyi. *Dicle Tıp Dergisi*, 2004; 31(1): 36-39.

Ubbink JB, Vermaak WJH, Von-der A, Becker PJ. Vitamin B₁₂, Vitamin B₆ and Folat Nutritional Status in Men with Hiperhomocysteinemia. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1993; 57: 47-53.

Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease and drug therapy. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1989; 114: 473-501.

Ungvari Z, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* 1999; 19: 1899-1904.

Upchurch GR, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF, Loscalzo J. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 17012-17017.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.

Utku U, Çelik Y. Strokta etyoloji, sınıflandırma ve risk faktörleri. In: Sevin Balkan (ed) *Serebrovasküler Hastalıklar*. Ankara: Güneş Kitabevi Yayınları; 2002. p: 49-61.

Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik gelişim* 1998; 11: 336-341.

Van Haaften RI, Evelo CT, Penders J, Eijnwachter MP, Haenen GR, Bast A. Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1548: 23-28.

Ventura P, Panini R, Verlato C, Scarpetta G, and Salvioli G. Peroxidation Indices and Total Antioxidant Capacity in Plasma During Hyperhomocysteinemia Induced by Methionine Oral Loading. *Metabolism* Vol149, No 2 (February), 2000: pp: 225-228 225.

Vermaak WJ, Ubbink JB, Barnard HJ, Potgieter GM, van Jaarsveld H, Groenewald AJ. Vitamin B-6 nutrition status and cigarette smoking. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1990; 51: 1058-61.

Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL: Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 612–628.

Voutilainen S, Morrow JD, Roberts LJ, Alfthan G, Alho H, Nyyssönen K, Salonen JT. Enhanced in vivo lipid peroxidation at Elevated Plasma total Homocysteine levels. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* 1999; 19: 1263-1266.

Vychytil A, Födinger M, Wöfl G, Enzenberger B, Auinger M, Prischl F, Buxbaum M, Wiesholzer M, Mannhalter C, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Major determinants of hyperhomocysteinemia in peritoneal dialysis patients. *Kidney International* 1998; 53: 1775-1782.

Wall RT, Harlan JM, Harker LA. Homocysteine induced endothelial cell injury. *Thrombosis Research* 1991; 18: 113-121.

Wanby P, Brattström L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 2003; 63(5): 347-53.

Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *The New England Journal of Medicine* 1998; 338(15): 1042-1050.

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2004; 44: 275–295.

Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrel W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1975; 55: 337-341.

Wyse AT, Zugno AI, Streck EL, Matte C, Calcagnotto T, Wannmacher CM, Wajner M. Inhibition of Na(+), K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochemical Research* 2002; 27: 1685–1689.

Yamamoto M, Hara H, Adachi T. Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *The Federation of European Biochemical Societies Letters* 2000; 486 (2) : 159-162.

Yanbeyi S. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri (ed). Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye. 1999.

Yang RX, Huang SY, Yan FF, Lu XT, Xing YF, Liu Y, Liu YF, Zhao YX. Danshensu protects vascular endothelia in a rat model of hyperhomocysteinemia. *Acta Pharmacologica Sinica* 2010; 31: 1395–400.

Yapıcı Ö. Tip 2 diabetes mellituslu hastalarda açlık plazma homosistein seviyesi ile diyabetin kronik komplikasyonları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Dahiliye Kliniği, İstanbul, Türkiye. 2004.

Yerer MB, Aydoğan S. Oksidatif stres ve antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2000; 9(1), 49-53.

Yoshoiko T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activeoxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1979; 135: 372-376.

Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 2001; 54: 176-186.

Young PB, Kennedy S, Molloy AM, Scott JM, Weir DG, Kennedy DG. Lipid peroxidation induced in vivo by hyperhomocysteinemia in pigs. *Atherosclerosis* 1997; 129: 67-71.

Yüce A, Aksakal M. Ratlarda homosisteinin oksidan ve antioksidan sistem ile koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine E vitamininin etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2006; 20(3): 189-197.

Zou CG and Banerjee R. Homocysteine and redox signaling. Antioxidants & Redox Signaling 2005; 7: 547–559.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Aydın'ın Karacasu İlçesi Ataeymir Kasabası'nda doğdum. İlkokulu ve ortaokulu Ataeymir Kasabası'nda tamamladım. Liseyi Karacasu Lisesi'nde bitirdim. 1988 yılında Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünü kazandım ve lisans öğrenimimi 1992 yılında tamamladım. Öğretmenlik mesleğine 1993 yılında başladım. 1999 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalında yüksek lisans sınavını kazandım. Bu bölümden bitki fizyolojisi alanında yüksek lisansımı tamamlayarak 2003'te mezun oldum. 2007 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu doktora sınavını kazandım. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalında doktora eğitimimin tez aşamasındayım. 2005 yılında atandığım Aydın Sosyal Bilimler Lisesi'nde halen uzman biyoloji öğretmeni olarak görevimi sürdürmekteyim. Evliyim ve bir kızım var.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada; öncelikle araştırma konumu belirleyen, doktora tez çalışmamda beni yönlendiren, doktora eğitimim süresince değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen, hoşgörüsünü hiçbir zaman eksik etmeyen tez hocam ve danışmanım ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Funda KIRAL'a ve doktora eğitimim süresince tez çalışmalarımında yardımlarını esirgemeyen her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm değerli hocalarım ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Ayşegül BİLDİK'e ve Prof.Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a, doktora tez çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı doktora öğrencisi Mürüvvet URAL'a, ayrıca doktora eğitimim boyunca ilgilerinden ve yardımlarından dolayı ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında tüm araştırma görevlisi, yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, doktora tezimin istatistik analizlerinde bana yardımcı olan ADÜ Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Murat BOYACIOĞLU'na, halen görev yaptığım Aydın Sosyal Bilimler Lisesi Müdürlüğü'ne ve yardımcı olan herkese verdikleri destek ve gösterdikleri anlayış için teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen, yaşam kaynağı olan, gösterdiği sonsuz sabır, özveri ve anlayışı için sevgili eşim Leylifer KIRTAŞ'a, heyecan kaynağım biricik kızım sevgili Gülizar KIRTAŞ'a, ayrıca çok değerli anneme, babama teşekkürlerimi sunarım.