

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**HİPERHOMOSİSTEİNEMİK SIÇANLARDA
N-ASETİLSİSTEİN UYGULAMASININ OKSİDATİF STRES
VE İNSÜLİN DİRENCİ ÜZERİNE ETKİSİ**

GAMZE KONDAKÇI

**DANIŞMAN
PROF.DR. M. MÜJDAT UYSAL**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**






İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Gamze KONDAKÇI tarafından hazırlanan Hiperhomosisteinemik sıçanlarda N-asetilsistein uygulamasının oksidatif stres ve insülin direnci üzerine etkisi. başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

04 / 09 / 2015

Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u> | <u>İmzası</u> |
|---|---|
| 1.Prof.Dr. B. Necla TOKER (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |
| 2.Prof.Dr. M. Müjdat UYSAL (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |
| 3.Prof.Dr. Seldağ BEKPINAR (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |
| 4.Prof.Dr. Yegane GÜVEN (İ.Ü.Diş Hekimliği Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |
| 5.Prof.Dr. Hikmet KOÇAK (İstanbul Bilim Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

GAMZE KONDAKÇI

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında ve eğitimim süresince bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam **Prof.Dr. M. Müjdat Uysal'a**,

Derslerine zevkle katıldığım, eğitimimde emeği büyük olan çok sevdiğim değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanımız **Prof.Dr. Necla Toker'e**,

Eğitimim boyunca desteklerini her zaman hissettiğim İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Eğitimim ve tez çalışmamın tüm aşamalarında destek ve yardımını esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan memnuniyet duyduğum sayın hocam **Uz.Dr. A. Fatih Aydın'a**,

Eğitimim süresince bana her konuda destek olmaya çalışan ve aynı kürsüde okumaktan memnuniyet duyduğum sevgili arkadaşım **Araş.Gör. A. Merve Baki'ye** ve tüm asistan arkadaşlara ve çalışanlara,

Eğitim sürecim ve hayatımın her döneminde destek, sevgi ve sabrını esirgemeyen, üzerimde emeği büyük olan anneme ve eğitim yaşamımda desteğini eksik etmeyen ablama ve canım aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38361

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Homosisteinin Yapısı, Oluşumu ve Metabolizması.....	3
2.2. Homosisteinin Kanda Bulunma Şekilleri ve Hiperhomosisteinemi	5
2.3. Homosistein Toksisitesinde Rol Oynayan Mekanizmalara İlişkin Genel Bilgiler ..	7
2.4. Homosistein Niçin Toksikdir?	13
2.5. Hiperhomosisteineminin Kan ve Dokular Üzerine Etkileri.....	17
2.6. N-Asetilsistein (N-Acetylcysteine; NAC)	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereçler.....	23
3.2. Çalışma Protokolü.....	23
3.3. Serumda Yapılan İncelemeler	24
3.4. Dokularda Yapılan İncelemeler	26
3.5. İstatistik İncelemeler	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Vücut, Karaciğer ve Böbrek Ağırlıkları ve İndeksleri.....	31
4.2. Serumda Elde Edilen Bulgular.....	31
4.3. Karaciğer Dokusunda Elde Edilen Bulgular	32
4.4. Böbrek Dokusunda Elde Edilen Bulgular	32
5. TARTIŞMA	42

KAYNAKLAR	47
ETİK KURUL KARARI	58
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Hiperhomosisteineminin nedenleri	6
Tablo 2-2: Oksijen ve azot kaynaklı aktif bileşikler	7
Tablo 2-3: Organizmada antioksidan sistem elemanları.....	8
Tablo 2-4: Serbest radikallerle ilişkili bazı patolojik durumlar	10
Tablo 4-1: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) vücut, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ile karaciğer ve böbrek indeksi üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10).....	34
Tablo 4-2: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum homosistein, glikoz, insülin ve HOMA değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10).....	35
Tablo 4-3: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum kolesterol, trigliserit, ALT, AST değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)	35
Tablo 4-4: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum total protein, albumin, BUN ve kreatinin değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10).....	36
Tablo 4-5: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum ROS, MDA ve uyarılmış MDA (uMDA) değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10).....	36
Tablo 4-6: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) karaciğerde ROS, MDA ve FRAP değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10).....	37
Tablo 4-7: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) karaciğerde GSH, SOD ve GSH-Px değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10).....	37

Tablo 4-8: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) böbrekte aktif oksijen radikalleri (ROS), malondialdehit (MDA) ve antioksidan aktivite (FRAP) değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)..... 38

Tablo 4-9: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) böbrekte GSH, SOD ve GSH-Px değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)..... 38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Homosisteinin metabolizması	4
Şekil 2-2: Homosisteinin kanda bulunma şekilleri	5
Şekil 2-3: NOS' un yapısı ve katalitik işlevleri.....	13
Şekil 2-4: S-homosisteinilasyon	16
Şekil 2-5: N-homosisteinilasyon.....	17
Şekil 2-6: Oksidatif stres uyarmalı insülin direncinde serin kinaz aktivasyonunun rolü 20	
Şekil 2-7: NAC' ın moleküler yapısı.....	21
Şekil 4-1: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum homosistein, glikoz, insülin ve HOMA değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10).....	39
Şekil 4-2: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) karaciğer ve böbrekte aktif oksijen radikalleri (ROS), malondialdehit (MDA) ve antioksidan aktivite (FRAP) değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10).....	40
Şekil 4-3: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) karaciğer ve böbrekte GSH, SOD ve GSH-Px değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10).....	41

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

5,10-MTFH	5,10-metilentetrahidrofolat
5-MTFH	5-metiltetrahidrofolat
ADMA	Asimetrik Dimetilargininin
BH ₄	Tetrahidrobiopterin
BHMT	Betain-homosistein S-metiltransferaz
CBS	Sistasyonin- β -sentaz
CGL	Sistasyonin γ -liyaz (sistasyonaz)
DMG	Dimetilglisin
ER	Endoplazmik Retikulum
FRAP	Total Antioksidan Aktivite
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSH-R	Glutasyon Redüktaz
GST	Glutasyon Transferaz
Hcy	Homosistein
HcyT	Homosistein Tiyolakton
hHcy	Hiperhomosisteinemi
HOMA	Homeostasis Model Assessment
IR	İnsülin Direnci
MAT	Metyoninadenoziltransferaz
MDA	Malondialdehit
MS	Metyonin Sentaz
MTHFR	5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz
MTs	Metil transferazlar
NAC	N-asetilsistein
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz

NT	Nitrotirozin
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SAH	S-Adenozil Homosistein
SAM	S-Adenozil Metyonin
SHMT	Serin Hidroksimetil Transferaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
THF	Tetrahidrofolat

ÖZET

Kondakçı, G. (2015). Hiperhomosisteinemi sıçanlarda N-asetilsistein uygulamasının oksidatif stres ve insülin direnci üzerine etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Yüksek homosistein (Hcy) düzeyleri toksik etkilere sahiptir. Hcy'nin bir tiyoesteri olan homosistein tiyolakton (HcyT) Hcy'ye bağlı toksisitede önemli bir rol oynar. Bu çalışmada, HcyT'nin iki farklı dozunun (100 mg/kg ve 500 mg/kg içme suyunda) serum Hcy düzeyleri, karaciğer ve böbrekte prooksidan-antioksidan denge ve insülin direnci üzerine etkileri araştırıldı. Antioksidan bir bileşik olan N-asetil sisteinin (NAC; 10 g/kg yem içerisinde, w/w) HcyT'ye bağlı toksisiteyi azaltma potansiyeli incelendi. Bu amaçla, dokularda reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu, malondialdehit (MDA), glutasyon ve total antioksidan aktivite (ferric reducing antioxidant power; FRAP) seviyeleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri tayin edildi. Serumda glikoz ve insülin düzeyleri ile böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri değerlendirildi. HcyT her iki dozda da serum Hcy düzeylerini yükseltti, ancak karaciğer ve böbrek fonksiyon test sonuçlarında değişikliğe sebep olmadı. HcyT 500, karaciğerde antioksidan parametreleri değiştirmeksizin ROS oluşumunu, MDA düzeylerini ve insülin direncini yükseltti. Böbreklerde ise ROS ve MDA seviyeleri ile SOD ve GSH-Px aktivitelerini arttırdı. HcyT 100 uygulanan sıçanlarda, böbreklerde prooksidan-antioksidan parametrelerde bazı değişiklikler gözlenmesine karşın, karaciğerde bir değişiklik oluşmadı. NAC uygulaması, incelenen dokularda HcyT'ye bağlı ROS ve MDA düzeyleri ile antioksidan enzim aktivitelerinde görülen artışları azalttı. Buna karşın, NAC insülin direncini veya karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını etkilemedi. Bulgularımız NAC uygulamasının Hcy düzeylerini düşürmede ve Hcy'ye bağlı karaciğer ve böbrekte gelişen oksidatif stresi azaltmada etkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hiperhomosisteinemi, Homosistein Tiyolakton, N-Asetilsistein, Oksidatif Stres, İnsülin Direnci

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38361

ABSTRACT

Kondakci, G. (2015). The effect of N-acetylcysteine (NAC) treatment on oxidative stress and insulin resistance in hyperhomocysteinemic rats. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Biochemistry. Master Thesis. İstanbul.

High levels of homocysteine (Hcy) have toxic effects. Homocysteine thiolactone (HcyT), a thioester of Hcy, plays an important role in Hcy-induced toxicity. In this study, the effect of two doses of HcyT (100 mg/kg and 500 mg/kg in drinking water) on serum Hcy levels, hepatic and renal prooxidant-antioxidant balance and insulin resistance were investigated. The ability of N-acetylcysteine (NAC; 10 g/kg in the diet, w/w), an antioxidant compound, to reduce HcyT-induced toxicity was evaluated. For this reason, reactive oxygen species (ROS) formation, malondialdehyde (MDA), glutathione and ferric reducing antioxidant power (FRAP) levels and superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were determined in the tissues. Glucose and insulin levels, liver and kidney function tests were measured in serum. HcyT at two doses increased serum Hcy levels, but results of liver and kidney function tests remained unchanged. HcyT 500 increased hepatic ROS formation, MDA levels and insulin resistance without any changes in hepatic antioxidant parameters. HcyT 500 caused increased renal ROS and MDA levels and SOD and GSH-Px activities. Some changes in prooxidant-antioxidant parameters were also observed in the kidney, but not in the liver of HcyT 100- treated rats. NAC treatment decreased serum Hcy levels and HcyT-induced increases in ROS and MDA levels and antioxidant enzyme activities in examined tissues. However, NAC did not change insulin resistance and liver and kidney function tests. We conclude that NAC treatment may be effective in decreasing Hcy levels and Hcy-induced hepatic and renal oxidative stress.

Key Words: Hyperhomocysteinemia, Homocysteine Thiolactone, N-Acetylcysteine, Oxidative Stress, Insulin Resistance

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 38361

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Homosistein (Hcy) serbest sülfidril grubu içeren bir amino asittir. Organizmada protein sentezine katılmayan amino asitlerden biridir. Besinlerle alınmamakta ve metyonin ara metabolizması sırasında sürekli olarak oluşmaktadır. Hcy toksik bir bileşik olup organizmada birikmesi tekrar metyonine dönüşmesi (remetilasyon) ya da sistein üzerinden sülfatlara metabolize olması (transsülfürasyon) ile engellenmektedir (34,73,80,88).

Normal koşullarda plazma Hcy düzeyleri 10 μ M'ın altındadır. Hcy düzeylerindeki artışlar hiperhomosisteinemi (hHcy) olarak adlandırılır (88). hHcy aterosklerotik değişikliklere (6,8,49,88,89,91), hemostatik bozukluklara (2,31,49,67), insülin direncine (25,45,46,61), karaciğer (6,51,95,99), kalp (10,29,93,100), böbrek (37,70,96,103) ve beyinde (1,30,50,69) yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olmaktadır. Hcy toksisitesini açıklamak için değişik görüşler ileri sürülmüştür. Bunlar arasında oksidatif ve nitrozatif stres, homosistein tiyolakton (HcyT) oluşumu ve homosisteinilasyon olarak tanımlanan posttranslasyonel protein değişiklikleri önemli bir yer tutmaktadır (2,34,49,88,102).

HcyT, Hcy'nin bir tiyoesteri olup Hcy'nin toksik etkilerinin oluşumunda özel bir öneme sahiptir. Plazmada eser miktarda bulunmasına rağmen, hHcy koşullarında kan ve dokularda miktarı artar (34,36,67,73,102). HcyT düzeylerindeki artış aktif oksijen radikalleri oluşumunu artırır ve N-homosisteinilasyon yolu ile N-Hcy bağlı protein düzeylerinde artışlara yol açar (38,102,106). Bu durum oksidatif strese, protein ve enzimlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulmalara neden olur (34,67,73,102). *In vitro* (55,97) ve *in vivo* (54,74) bazı çalışmalarda HcyT'nin Hcy'den daha toksik olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, HcyT uygulanarak yapılan *in vivo* çalışmalar kısıtlıdır ve bu çalışmalar genellikle Hcy'nin metabolik dönüşümünün yetersiz olduğu beyin (52,74) ve kalp-damar sistemleri üzerinde (12,13,17,54) yapılmıştır. Buna karşılık, Hcy metabolizmasında görevli enzimlerce zengin olan karaciğer (87) ve böbrek (66) dokuları ile ilgili iki çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda öncelikle düşük ve yüksek miktarda HcyT içeren içme suyu uygulayarak hHcy oluşturulan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında prooksidan-antioksidan dengeyi, insülin direncini ve serumda karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını ilk kez araştırmak istedik.

Öte yandan, hHcy koşullarında gelişen toksik etkilerde oksidatif ve nitrozatif stresin rolünün belirlenmesi ile çeşitli antioksidan bileşiklerin bu toksisiteyi azaltma/önleme potansiyelleri de araştırılmaktadır (1,6,10,31,35,49,99). N-asetilsistein (NAC) hücreleri koruyucu etkilere sahip antioksidan bir bileşiktir. Bir serbest radikal tutucusu gibi davranır, geçiş metalleri bağlar, hücre içi glutatyon (GSH) düzeylerinde artışa neden olur. Ayrıca antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (39,78,104). Mukolitik olarak ve parasetamol zehirlenmesi, doksorubisine bağlı kardiyotoksisite, anjina pectoris, iskemi-reperfüzyona bağlı kalp hasarı, bronşit, radyokontrast maddelere bağlı nefropati, ağır metal zehirlenmesi, şizofreni, bipolar bozukluk gibi psikiyatrik hastalıklar dahil birçok patolojinin tedavisinde kullanılmaktadır (39,78,104). Ayrıca insülin direnci üzerine de yararlı olabileceği bildirilmiştir (16,39,40,86). Bilebildiğimiz kadarıyla, NAC'nin hHcy'de etkilerini araştırın in vivo çalışma yoktur. Sadece civciv embriyoları ile yapılan bir in vitro çalışmada Hcy ile indüklenen oksidatif stresi baskıladığı bildirilmiştir (28). Ayrıca, bazı klinik çalışmalarda NAC'ın Hcy düzeylerini azaltmada etkili bir ajan olabileceği ileri sürülmüştür (9,68).

Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda ikinci amacımız NAC'in HcyT uygulanan sıçanlarda serumda Hcy düzeylerini, insülin direncini, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri ile, belirtilen dokularda prooksidan-antioksidan göstergeleri azaltma/engelleme potansiyeli olup olmadığını değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Homosisteinin Yapısı, Oluşumu ve Metabolizması

Homosistein (Hcy) serbest sülfidril grubu içeren bir amino asittir. Organizmada protein sentezine katılmayan amino asitlerden biridir. Besinlerle alınmamakta ve metyonin ara metabolizması sırasında sürekli olarak oluşmaktadır (34,73,80,88).

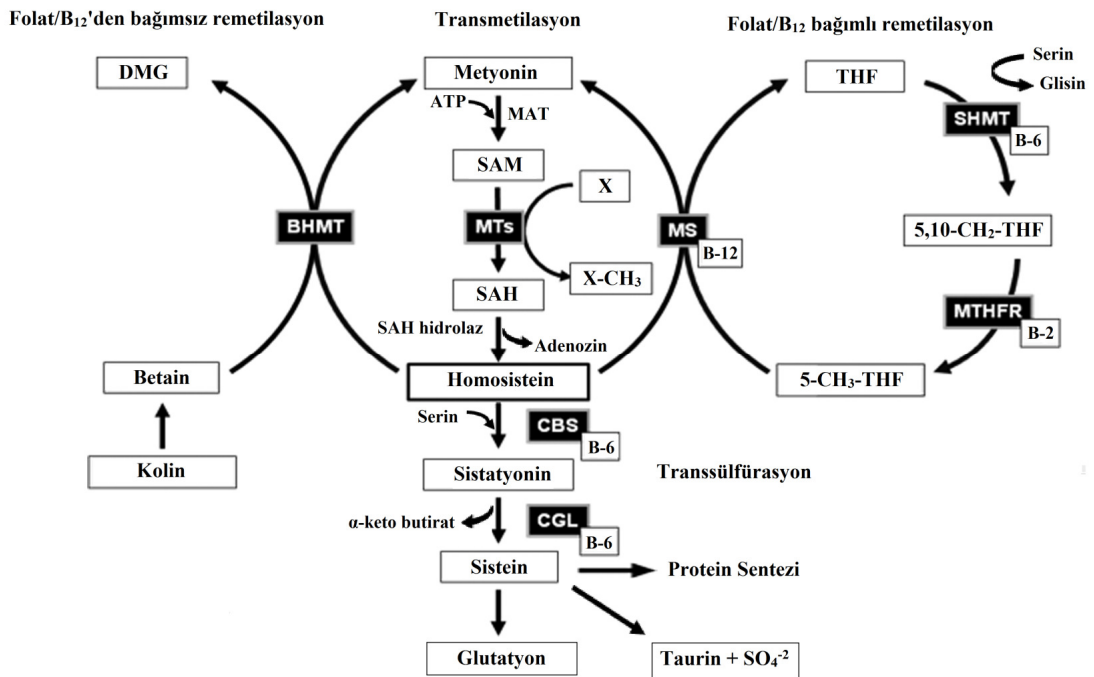
Metyoninin Hcy'e dönüşümünde ilk basamak S-adenozilmetyonin (SAM) oluşumudur. Metyonin, metyonin adenziltransferaz (MAT) katalizi ile SAM'a dönüşür. Bu bileşik organizmada aktif metil grubu vericisi olup, metil transferazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarla kreatin, fosfatidilkolin ve nörotransmitterler dahil birçok bileşiğin sentezinde görev alır. Ayrıca, metillenme gen ekspresyonunun kontrolünde de rol oynar. S-adenozilhomosistein (SAH) SAM'a bağlı metilasyon reaksiyonlarının bir ürünüdür. Daha sonra SAH, SAH hidrolaz etkisiyle adenzin ve Hcy'e dönüşür. SAH metilasyon reaksiyonlarının güçlü bir allosterik inhibitörü olup SAM/SAH oranı transmetilasyon potansiyelinin bir göstergesi olarak değerlendirilir (34,73,80,88).

Toksik bir bileşik olan Hcy, remetilasyon ve transsülfürasyon olmak üzere iki alternatif yolla değişime uğrar, ya remetilasyonla tekrar metyonine dönüşür, ya da transsülfürasyon yolu ile geriye dönüşümsüz olarak katabolize olur. Hcy tüm dokularda oluşmasına rağmen, transsülfürasyon yolu sadece karaciğer ve böbrekte aktif bir biçimde çalışır. Kan damarları ve beyin gibi dokularda transsülfürasyon yolu etkin değildir ve Hcy'nin bu dokulardaki detoksifikasyonu remetilasyon yolu ile gerçekleşir (34,80,103).

Hcy'nin remetilasyonu iki farklı yolla gerçekleşir. Bunlardan birincisi metyonin sentaz (MS) tarafından katalizlenmektedir. Kofaktörü B₁₂ olan bu enzim 5-metiltetrafolattan (5-MTHF) aldığı metil grubunu, Hcy'e aktarmakta, metyonin ve tetrahidrofolat (THF) oluşmaktadır. THF ise kofaktörü B₆ vitamini olan serin hidroksimetil transferaz (SHMT) etkisiyle önce 5,10-metilentetrahidrofolata (5,10-MTHF), bu bileşik de kofaktörü B₂ olan 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ile 5-MTHF'ye dönüşerek rejenere edilmektedir. Folat/B₁₂ bağımlı remetilasyon yolu olarak da tanımlanan bu yol Hcy'nin metyonine dönüşmesinde etkili olan temel yoldur. Diğer remetilasyon yolunda ise kolinin oksidasyon ürünü olan betain metil grubu

vericisi olup, dönüşüm betain-homosistein S-metiltransferaz (BHMT) tarafından kataliz edilir ve dimetilglisin (DMG) ve metyonin oluşur (34,73,80,88).

Transsülfürasyon yolunda sistatyonin- β -sentaz (CBS) ve sistatyonaz (sistatyonin γ -liyaz; CGL) enzimleri görev alır. Önce serinin β -karbonundaki hidroksil grubu ile Hcy'nin sülfidril grubunun birleşmesi ile sistatyonin oluşur. Bu reaksiyonu koenzimi B₆ olan CBS enzimi kataliz eder. Sistatyonin daha sonra CGL enzimi ile dezamine olarak sistein, α -ketobütirat ve amonyağa ayrılır. Koenzimi B₆ vitamini olan CGL bu yolla oluşan sistein tarafından allosterik inhibisyona uğrar. Oluşan sistein ise GSH sentetaz enziminin etkisiyle GSH sentezine katılabilir veya taurin ve sülfata metabolize olabilir. Başlıca karaciğer, böbrek ve pankreasta gerçekleşen sistatyonin sentezi geri dönüşümsüz enzimatik bir reaksiyondur (34,73,80,88) (Şekil 2.1).

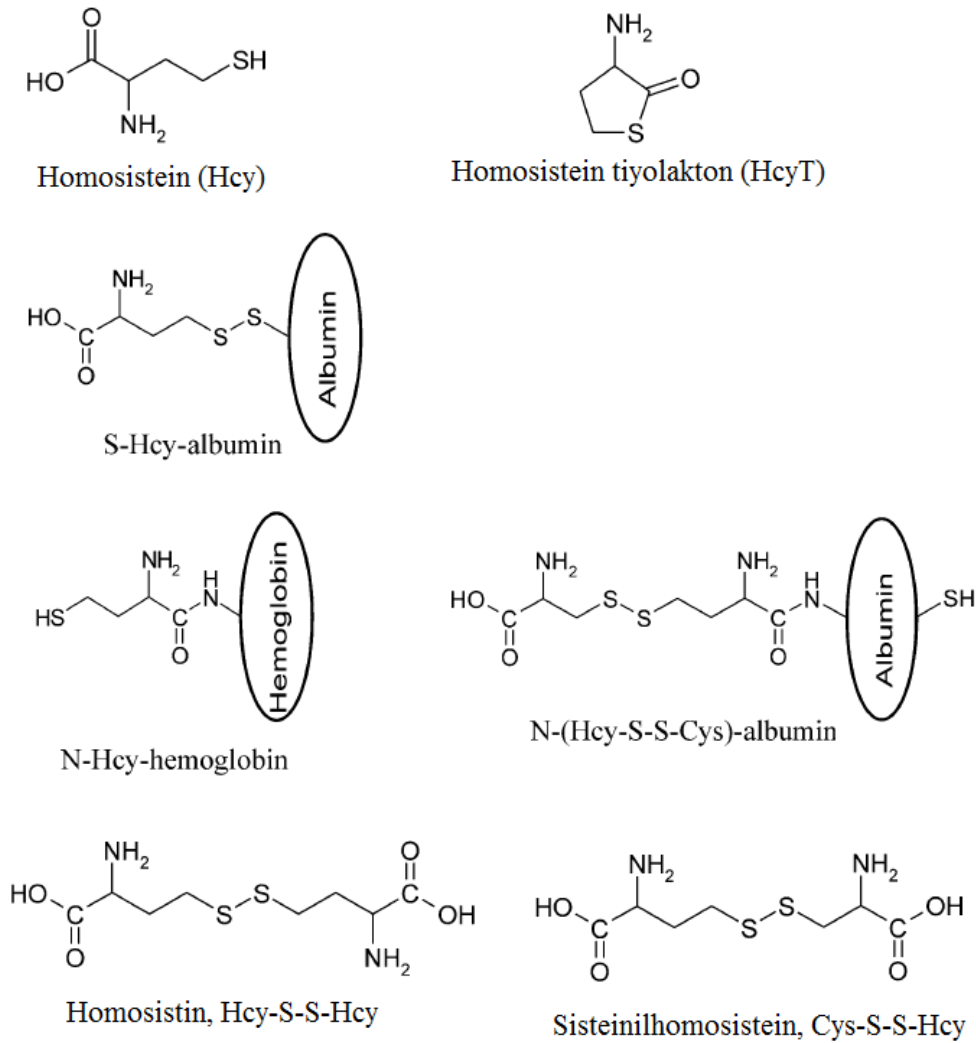


Şekil 2-1: Homosisteinin metabolizması

5,10-MTFH, 5,10-metilentetrahidrofolat; 5-MTFH, 5-metil tetrahidrofolat; BHMT, betain-homosistein S-metiltransferaz; CBS, sistatyon- β -sintaz; CGL, sistatyonin γ -liyaz (sistatyonaz); DMG, dimetilglisin; MAT, metyoninadenoziltransferaz; MS, metyonin sentaz; MTHFR, 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz; MTs, metil transferazlar; SAH, S-adenozil homosistein; SAM, S-adenozil metyonin; SHMT, serin hidroksimetil transferaz; THF, tetrahidrofolat;

2.2. Homosisteinin Kanda Bulunma Şekilleri ve Hiperhomosisteinemi

Plazmada Hcy'nin indirgenmiş ve oksitlenmiş halde bulunur. Plazmada total Hcy'nin %75 kadarı proteinlere, özellikle albümine bağlıdır. Bağlanma proteinlerdeki sisteinin sülfidril grupları ile olur (S-Hcy-albumin). Kanda ise Hcy'nin en büyük bölümü N-Hcy-hemoglobin (% 75) ve N-Hcy-albumin (%22) olmak üzere N-Hcy-protein şeklinde bağlı oksitlenmiş Hcy fraksiyonudur. Oksitlenmiş Hcy'nin geri kalanı homosistin (Hcy-S-S-Hcy) ve sisteinilhomosistein (Cys-S-S-Hcy) olarak disülfid formundadır. Oksitlenmiş Hcy'nin ufak bir bölümü ise homosistein tiyolakton (HcyT) şeklinde olup total plazma Hcy'nin sadece % 0.4'ünü oluşturur. HcyT son derece toksik bir Hcy türevidir. Plazmada total Hcy'nin sadece %2'si indirgenmiş serbest halde bulunur (34,67,80,88) (Şekil 2.2).



Şekil 2-2: Homosisteinin kanda bulunma şekilleri

İnsanlarda plazma total Hcy düzeyleri 10 μM 'ın altındadır. Hiperhomosisteinemi (hHcy) plazmada mevcut tüm Hcy formlarındaki artış olarak tanımlanmakta olup Hcy düzeylerine bakılarak ılımlı, orta derecede ve ciddi hHcy olarak sınıflandırılmaktadır. hHcy oluşumunda, Hcy metabolizmasında görev alan enzimlerdeki genetik anormallikler ve vitamin yetersizlikleri, böbrek hastalığı ve fazla miktarda metyonin alınması önemli rol oynamaktadır (49,73,88) (Tablo 2.1).

Tablo 2-1: Hiperhomosisteineminin nedenleri

Plazma Homosistein Düzeyleri	Nedenleri
İlmlı (16-30 μM)	İlmlı-orta derecede böbrek hastalığı Hipotiroidizm Psoriasis MTHFRB 677C>T variant İlmlı-orta derecede folat veya B ₁₂ vitamini eksikliği Yaşlanma Yüksek protein alımı Sebze ve meyvelerin az tüketilmesi
Orta dereceli (31-100 μM)	Ağır böbrek hastalığı Orta derecede vitamin B ₁₂ eksikliği Ciddi folat eksikliği MTHFR 677>T variant (folik asit eksikliği ile birlikte)
Ciddi (>100 μM)	Ciddi vitamin B ₁₂ eksikliği CBS enzim eksikliği

MS, MTHFR ve CBS enzimleri ile ilgili gen mutasyonları Hcy düzeylerinde artışa neden olur. Ayrıca, bu enzimlerin kofaktörlerini oluşturan folik asit, vitamin B₁₂ ve B₆ yetersizlikleri de hHcy'e neden olan diğer faktörlerdir. Bunlar içerisinde özellikle folat düzeylerindeki yetersizlikler önem kazanmaktadır (49,73). Hcy'nin oksitlenmesi nedeniyle, hHcy'li hastaların idrarında homosistin bulunur. Bu nedenle bu hastalıklar homosistinüriler olarak tanımlanır (88).

Yaşam stili, çeşitli hastalıklar, ilaçlar, yaş, cinsiyet, alkol ve sigara gibi faktörler de hHcy'e neden olabilmektedir (49,88). Plazma Hcy düzeylerini etkileyen önemli faktör böbrek hastalıklarıdır. Böbrekler Hcy metabolizmasında temel rol oynar. Gerek remetilasyon ve gerekse transülfürasyon yolları böbreklerde aktif bir biçimde çalışır. Böbrek fonksiyonlarında bozulma hHcy ile birlikte seyretmektedir, ancak nedenleri açık değildir (96,103).

Metyonince zengin diyet ile beslenme hHcy'nin bir diğer nedenidir. Et, balık ve süt ürünleri metyonince zengindir. Ortalama günlük alım erkeklerde 2.3 g, kadınlarda 1.6 g civarındadır. Alınan metyoninin yarısı organizmada Hcy'e dönüşmektedir. Bu dönüşüm SAM düzeylerinde artışa neden olur. SAM, MTHFR enzimini inhibe ederek remetilasyonu baskılar, buna karşılık CBS'yi aktive ederek transsülfürasyon yolunu uyarır. Aşırı metyonin yüklemesi bu dengenin bozulmasına ve Hcy düzeylerinde belirgin artışlara neden olur. Bu nedenle, deney hayvanlarında metyonin yüklemesi hHcy oluşturma yöntemi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (2,88).

2.3. Homosistein Toksisitesinde Rol Oynayan Mekanizmalara İlişkin Genel Bilgiler

A) **Oksidatif Stres:** Prooksidan-antioksidan denge sağlıklı bir yaşam için çok önemlidir. Serbest radikal oluşumundaki artışa ve/veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak organizmada oksidatif stres gelişmektedir. Serbest radikaller, dış orbitalinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan bileşiklerdir. Ömürleri çok kısa olup kararsız bir yapı gösterirler ve çevrelerindeki moleküllerden elektron alarak kararlı hale ulaşmak isterler. Bu nedenle çok aktif ve zararlı bileşiklerdir. Organizmada oluşan radikallerin çok önemli bir bölümü oksijen kaynaklıdır (Reactive oxygen species; ROS). Oksijen dışında azot, karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır (71,92)(Tablo 2.2).

ROS organizmada metabolik olaylar sırasında sürekli oluşur. Bu oluşumda mitokondri temel rol oynamakla birlikte, hücrelerin tüm fraksiyonları da etkilidir. Bunlar arasında mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplazmik ksantin oksidaz, hücre zarına bağlı NADPH oksidaz ve lipooksijenazlar gibi enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlar önemlidir. Öte yandan, radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasallar gibi çeşitli dış etkenler de ROS oluşumunda etkilidir (71,92).

Tablo 2-2: Oksijen ve azot kaynaklı aktif bileşikler

Radikaller		Radikal olmayanlar	
Hidroksil	HO·	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Alkoksil	RO·	Singlet oksijen	¹ O ₂
Peroksil	ROO·	Ozon	O ₃
Süperoksit	O ₂ ⁻ ·	Hipoklorit asit	HOCl
Nitrik oksit	NO·	Lipit hidroperoksit	LOOH
Azot dioksit	NO ₂ ·	Peroksinitrit	ONOO·

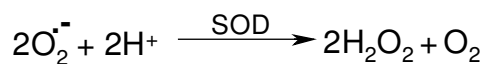
ROS kararsız yapıları nedeniyle başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere tüm hücre bileşenlerini etkiler ve onlara zarar verir. Bu zarar organizmada bazı tamir sistemleri tarafından önlenmeye çalışılır. Eğer bu mekanizmalar yetersiz kalırsa, oksidatif stresin zararlı etkileri ortaya çıkar. Bunlar arasında DNA hasarı, protein oksidasyonu, lipit peroksidasyonu, tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması önem kazanmaktadır. DNA'da bazların parçalanması, kollarının kırılması ve denatürasyon gibi yapısal değişiklikler olurken, proteinler oksidasyona uğrayarak yapı ve fonksiyonları bozular. Lipit peroksidasyonu ise hücre zarlarındaki çok doymamış yağ asitlerinde başlayıp zincirleme uzayan bir süreç olup zarların yapı ve fonksiyonlarını bozar. Buna bağlı olarak hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozular. Hücre içi kalsiyum düzeylerinin artması da proteazları aktifler. Bütün bu olaylar hücre hasarında etkili bir rol oynar (71,92).

Organizmada ROS hasarını engellemek için güçlü bir savunma sistemi bulunur. Antioksidan sistem olarak tanımlanan bu sistem özel enzimleri, suda ve yağda çözünen radikal tutucularını ve metal iyonlarını bağlayan proteinleri kapsamaktadır. Bu sistem radikal oluşumunu sınırlama, tetiklenen reaksiyonların kırılmasını sağlama, oluşan radikalleri yok etme, hasarlanmış molekülleri tamir etme ve ortadan kaldırma gibi mekanizmalarla etkili olur (71,72,92) (Tablo 2.3).

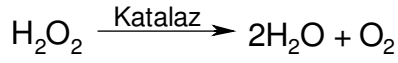
Tablo 2-3: Organizmada antioksidan sistem elemanları

Enzimler	Suda çözünen radikal tutucuları	Yağda çözünen radikal tutucuları	Metal iyonlarını bağlayan proteinler
Superoksit dismutaz (SOD)	Glutatyon (GSH)	E vitamini	Ferritin
Katalaz	C vitamini	β -Karoten	Transferrin
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	Ürik asit	Bilirubin	Haptoglobin
Glutatyon redüktaz (GSH-R)		Ubikinol	Seruloplazmin
Glutatyon transferaz (GST)		Flavonoidler	Albumin

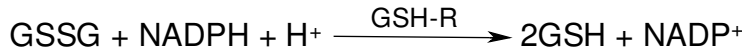
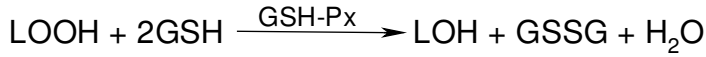
SOD: Süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot -}$) H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüştürür. SOD'un bakır ve çinko (Cu ve Zn) ve mangan (Mn) kapsayan iki izoenzimi bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sitozolde, Mn-SOD ise mitokondride bulunur.



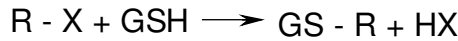
Katalaz: Tetramerik hemoprotein olan katalaz enzimi H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler. Enzim, peroksizomlarda yerleşmiştir.



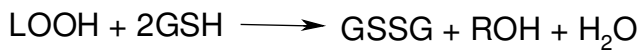
GSH-Px: H_2O_2 ve lipit hidroperoksitleri (LOOH) metabolize etmektedir. GSH-Px'in selenyuma bağımlı ve selenyumdan bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyuma bağımlı formu hem H_2O_2 'in hem de LOOH'ların metabolizmasında yer alırken, selenyuma bağımlı olmayan tipi sadece LOOH'ları metabolize etmektedir. Bu reaksiyonlarda GSH hidrojen verici olarak görev yapmakta, H_2O_2 ve LOOH'lar indirgenirken, GSH oksitlenmiş şekline (GSSG) dönüşmektedir. Oksitlenmiş glutatyon ise NADPH'a bağımlı glutatyon redüktaz (GSH-R) tarafından tekrar GSH'a indirgenmektedir.



GST: Dimerik yapıda sitozolde bulunan bir enzimdir. Çok sayıda izoenzimi vardır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu kataliz eder.



GST'lerin bazı izoenzimleri GSH-Px aktivitesi göstererek LOOH'ların metabolizmasını da sağlar.



GSH: Hücrenin en önemli antioksidan molekülüdür. γ -glutamik asit, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptiddir ve serbest sülfidril grubu içerir. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur.

GSH zehirsizleştirme reaksiyonlarına doğrudan katıldığı gibi, bazı enzimlerin substratı veya kofaktörü olarak da görev yapmaktadır. Başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek oranda bulunur. GSH-Px, GSH-R ve GST gibi enzimlerin fonksiyonu için gereklidir. Ayrıca hücrenin protein yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller.

E vitamini: Yağda erir nitelikte güçlü bir antioksidan vitamindir. Yapısal olarak birbiri ile bağlantılı bir grup bileşiği kapsar (tokoferoller ve tokotrienoller). Bunların hepsi izoprenoid takısı içerirler. Yapısındaki fenol halkasına bağlı hidroksil grubu aktif kısmını oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır.

C vitamini (Askorbik Asit): Suda çözünen güçlü antioksidan moleküldür. İnsanlarda sentez edilmediği için diyetle alınması gerekir. C vitamini yapıcı heksozlara benzer ve organizmada kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenir. Superoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipit peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipitleri ve zarları da oksidan hasara karşı korur. E vitamininin tekrar rejenerasyonunda görev alır, tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde düşük dansiteli lipoprotein (LDL)'yi oksidasyona karşı korur (71,92).

Hasarın olduğu yere bağlı olarak çeşitli organ ve sistemler etkilenmektedir. Günümüzde serbest radikallerin birçok hastalığın ve patolojik durumun ortaya çıkışında önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Oksijen radikalleri ile ilgili bu patolojik durumlar çok geniş bir yayılım göstermektedir. Serbest radikallerin ateroskleroz, kanser oluşumu, iskemi-reperfüzyon hasarı, diabetes mellitus komplikasyonlarının gelişimi gibi bir çok hastalıkta etkin bir rol oynadığı saptanmıştır (71,72,92) (Tablo2.4).

Tablo 2-4: Serbest radikallerle ilişkili bazı patolojik durumlar

➤ Ateroskleroz	➤ Radyasyon hasarı
➤ Kanser	➤ İnflamasyon
➤ İskemi-reperfüzyon hasarı	➤ Diabetes Mellitus
➤ Romatoidartrit	➤ Merkezi sinir sistemi hastalıkları
➤ Otoimmün hastalıklar	➤ Böbrek bozuklukları
➤ Akciğer hastalıkları	➤ Göz bozuklukları
➤ Kas hastalıkları	➤ Cilt bozuklukları
➤ Karaciğer bozuklukları	➤ Gastrointestinal bozukluklar
➤ Kan hastalıkları	➤ Beslenme yetersizlikleri

B) Endotel Disfonksiyonu ve Nitrik Oksit (NO) Biyoyararlanımı: Damar endoteli çok işlevli bir dokudur. Endotel hücrelerinin kan-doku bariyerinin korunmasında, kan akımı ve damar direncinin düzenlenmesinde, anjiogenezde, sıvı dengesinde, hormonların metabolizmasında, immün ve inflamatuvar reaksiyonların ayarlanmasında, özellikle düz kas hücreleri olmak üzere diğer hücre tiplerinin çoğalmalarının kontrolünde önemli bir rol oynar (27,38). Endotelde sentezlenen NO vazodilatör, anti-inflamatuvar, trombosit agregasyonu ve adezyonunu engelleyici, trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin salınımını baskılayıcı etkilerle bu kontrolde görev alır (22,27,42). Endotel disfonksiyonu ise endotelde üretilen vazodilatör etkili bileşiklerin biyoyararlılığının azalması, buna karşılık vazokonstriktörlerin etkisinin artmasına bağlı olarak gelişen bir olaydır (27,38). Endotel aracılı vazodilatasyonun bozulması, endotel disfonksiyonunun göstergesi olarak kabul edilir. Bu koşullarda inflamasyon ve koagülasyonu tetikleyen mekanizmalar da aktiflenir. Endotel disfonksiyonunun fizyopatolojisinde birçok karmaşık mekanizma yer alır. Bunlardan oksidatif stres ile NO biyoyararlanımının azalması etkin bir rol oynar (27,42,44).

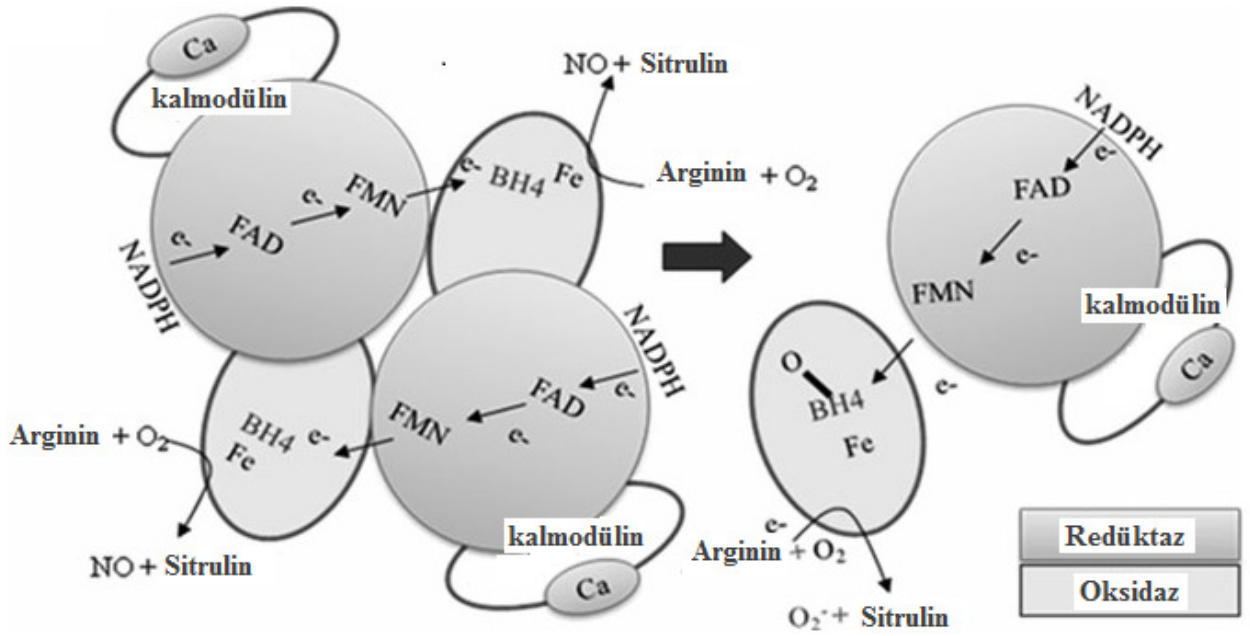
Endotel disfonksiyonunun moleküler temelinde NO'nun inaktivasyonu ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimidaki fonksiyon değişikliği rol oynamaktadır. NO renksiz bir gaz olup serbest radikal özelliğine sahip bir moleküldür. Dış orbitalinde paylaşılmamış tek elektronun varlığı bu moleküle radikal özelliği kazandırır. Fizyolojik koşullarda dayanıksız olup hızla nitrit ya da nitrata oksitlenerek ortamdaki uzaklaşır. Organizmada NO sentezi için kullanılan öncü molekül L-arginin olup bu sentez NOS tarafından gerçekleştirilir. Öncelikle L-arginin hidrosillenir, daha sonra sitrülün ve NO'ye çevrilir. Bu sentezde moleküler oksijen ve kofaktör olarak tetrahidrobiopterin (BH₄), FAD, FMN ve NADPH kullanılır (22,38).

NOS enziminin çeşitli izoformları vardır. Bunlar endotel hücrelerinde bulunan endotelyal NOS (eNOS), sinir dokusunda ve akciğer gibi bazı dokularda bulunan nöronal NOS (nNOS) ve immünolojik uyarımlarla indüklenen ve hemen hemen tüm hücrelerde bulunan indüklenebilir NOS (iNOS)'tur. Bunlardan nNOS ve eNOS yapısal NOS olarak adlandırılır (22).

NOS enziminin tüm formları redüktaz ve oksijenaz domenleri taşıyan iki monomerden oluşmaktadır. NOS enzimlerinin etkinliği dimer yapı oluşumuna bağlıdır. NOS enziminin her monomerinin karboksi terminallerinde redüktaz, amino

terminallerinde oksijenaz domenleri, iki domen arasında kalmodulin bağlayan segmentler bulunur. Kalmodulinin bağlanmasıyla, NADPH'dan gelen elektronlar FAD ve FMN üzerinden diğer monomerin oksijenaz domenindeki hem grubuna aktarılır. Bu domende hemin yanı sıra prostetik grup olarak BH_4 de bulunur. BH_4 'ün aktif bölgede *heme* sıkıca bağlı olarak her iki monomerdeki amino asit kalıntılarıyla etkileşimde olması, eNOS'un dimer oluşturmasını sağlar. BH_4 , bir elektron vermek suretiyle moleküler oksijeni aktifler ve hem bölümünde elektronlar O_2 'yi indirgeyerek L-argininden L-sitrülin ve NO oluşumunu gerçekleştirir. Bu sırada BH_4 , BH_3 radikaline dönüşür. Bu radikal, flavinli koenzimler veya alternatif olarak askorbik asit gibi indirgeyici ajanlarla rejenere olur (22,38). BH_4 'ün yetmezliği oluşursa eNOS'un homodimer yapısında ayrışma olur ve enzimde fonksiyon değişikliği görülür. Bu durum '*NOS uncouplingi*' olarak adlandırılır. Elektronların flavinlerden L-arginine akışı bozulur, L-arginin oksitlenemez ve bu nedenle moleküler oksijenden süperoksit anyonu oluşur (Şekil 2.3) (22,38,88).

Vasküler hastalıkların çoğunda damar duvarında NADPH oksidazların ekspresyon ve aktivitesi artar ve çok miktarda $O_2^{\bullet-}$ oluşur (38,44). SOD'un etkisiyle $O_2^{\bullet-}$ radikallerinden oluşan H_2O_2 eNOS ekspresyonunu uyarır. Oluşan NO hızla $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturur ve ortamdan uzaklaşmış olur. Oksidatif stresin uyarıldığı koşullarda oluşan bu $ONOO^-$ radikalleri eNOS'un kofaktörü olan BH_4 'ü oksitleyerek onu trihidrobiopterin radikali ($BH_3^{\bullet-}$) haline getirir. Sonuçta NOS'un, L-arginine olan ilgisi azalır ve eNOS, NO üreten bir enzim olmaktan çıkıp, $O_2^{\bullet-}$ üreten bir enzim haline dönüşür. Bu olayda rol alan mekanizmalar arasında BH_4 'ün oksidasyonu, L-arginin azalması ve endojen metilargininlerin, özellikle bir NOS inhibitörü olan asimetrik dimetilarginininin (ADMA) birikimi sayılmaktadır (22,38,44).



Şekil 2-3: NOS' un yapısı ve katalitik işlevleri

C) Nitrozatif Stres: Organizmada $O_2^{\cdot -}$ ile NO'nun birleşmesi ile oluşan $ONOO^{\cdot -}$ artışına bağlıdır. $ONOO^{\cdot -}$ radikali son derece güçlü bir oksidandır. Mitokondride elektron transport zincirini inhibe eder, proteinlerin sülfidril gruplarını oksitler, lipid peroksidasyonunu uyarır ve tirozin gibi sinyal iletim yollarında etkin aminoasitleri nitratlar (22,42,44). Bu radikalın proteinlerle olan başlıca reaksiyonu aromatik amino asitlerin nitrasyonudur ve özellikle 3-nitrotirozin (NT) oluşur. $ONOO^{\cdot -}$ dayanıklı bir bileşik olmadığından in vivo peroksinitrit oluşumunun ve nitrozatif stresin gösterilmesinde stabil bir son ürün olan nitrotirozin ölçümü kullanılmaktadır (22,38,42,44).

2.4. Homosistein Niçin Toksikdir?

Hcy'nin organizmaya toksik olmasının nedenlerini açıklamak için değişik görüşleri sürülmüştür. Bunlar arasında özellikle oksidatif ve nitrozatif stres, HcyT oluşumu, homosisteinilasyon ve endoplazmik retikulum stresi ön plandadır (2,34,49,88,102).

Oksidatif stres: Hcy'nin oksidatif stresi arttırmasında farklı mekanizmalar rol alır. Bunlar Hcy'nin otooksidasyonu, eNOS'un uncouplingi yoluyla NOS bağımlı süperoksit ve peroksinitrit oluşumunda artış, antioksidan enzim inhibisyonları ve NADPH oksidazların aktivasyonu olarak tanımlanmaktadır.

Hcy oksijen, demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hızla ootoksidasyona uğrar. Hcy'nin serbest tiyol grubunun oksidasyonu sırasında Hcy bir disülfid köprüsü ile plazma proteinlerine, özellikle albumine (a), sistein gibi düşük ağırlıklı plazma tiyollerine (b) veya ikinci Hcy (c) molekülüne bağlandığı sırada $O_2^{\bullet-}$ anyonu, H_2O_2 ve hidroksil (OH^{\bullet}) radikalleri gibi ROS oluşur (2,31,88,102).

- a) $Hcy-SH + Protein-SH \longrightarrow Hcy-S-S-Protein$ (Protein tiyol disülfid)
- b) $Hcy-SH + Cys-SH \longrightarrow Hcy-S-S-Cys$ (Sisteinilhomosistein)
- c) $Hcy-SH + Hcy-SH \longrightarrow Hcy-S-S-Hcy$ (Sistin)

Ootoksidasyon sırasında, Hcy oksijen ve geçiş metallerinin (M) varlığında tiyil (Hcy^{\bullet}) radikaline dönüşür. Bu radikal bir serbest radikal ara maddesi ($Hcy-S-S-Hcy^{\bullet}$) oluşturmak için Hcy ile reaksiyona girer. Bu ara madde de O_2 'i indirgeyerek $O_2^{\bullet-}$ radikali oluşumuna neden olur. Ootoksidasyon kademeleri aşağıdaki biçimde gösterilebilir (88,102).

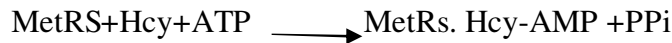
- $Hcy + M^n \longrightarrow M^{(n-1)} + Hcy^{\bullet}$
- $M^{(n-1)} + O_2 \longrightarrow M^n + O_2^{\bullet-}$
- $Hcy^{\bullet} + Hcy \longrightarrow Hcy-S-S-Hcy^{\bullet}$
- $Hcy-S-S-Hcy^{\bullet} + O_2 \longrightarrow Hcy-S-S-Hcy + O_2^{\bullet-}$

NOS bağımlı superoksit radikali oluşumu: Hcy'nin eNOS protein düzeylerini ve enzim aktivitesini etkilemeksizin NO oluşumunu baskıladığı, eNOS enziminin kofaktörü olan BH_4 oksidasyonunu uyardığı ve bu durumun NOS enziminin "uncoupling"i ile sonuçlandığı bildirilmiştir (18,38,88). Böylece $O_2^{\bullet-}$ radikali oluşumu daha da artıp NO oluşumu azalmaktadır. Hcy, eNOS'un endojen inhibitörü olan ADMA düzeylerini arttırarak da NO oluşumunu azaltır (38, 88).

Öte yandan, Hcy nNOS ve iNOS aktivitelerini arttırarak NO oluşumunu arttırmaktadır. NO artışı biyolojik olarak yararlı bir olay olmakla birlikte, hHcy gibi oksidatif stresin arttığı koşullarda $ONOO^-$ oluşumunun tetiklenmesi ile zararlı bir sonuç doğurabilir. Bu nedenle hHcy damarlarda endotele bağımlı vazodilatasyonu bozar ve ekstrasellüler matriks değişikliklerine neden olarak damar duvar yapısını etkiler (18,38,88).

Homosistein tiyolaktin: Hcy toksisitesinde HcyT ve onun etkisiyle oluşan protein N-homosisteinilasyon önemli bir rol oynamaktadır. HcyT, Hcy'nin bir tiyoesteridir. İlk kez 1930' lı yıllarda sentez edilmesine rağmen, biyolojik önemi 50 yıl kadar sonra, organizmada bazı aminoasıl-tRNA sentetazların hata tamir reaksiyonu sırasında bu bileşimin oluştuğunun saptanması ile önem kazanmıştır. HcyT tiyol ve karboksilik gruplar arasında molekül içi kondansasyon ile oluşur ve plazmada eser miktarlarda bulunur (34,36,67,73,102).

Tüm organizmalarda Hcy, metyonine yapısal benzerliği nedeniyle protein biyosentezinin ilk aşamasına girer ve metyonil-tRNA sentetaz (MetRS) tarafından tanımlanarak ve aktiflenerek bir tRNA-Hcy-AMP ara maddesi oluşur. Ancak MetRS'nin hata düzeltici aktivitesi Hcy'nin protein sentezine katılmasına izin vermez ve Hcy-AMP'deki anhidr bağının enerjisi molekül içi tiyoester bağının oluşumunda kullanılarak HcyT oluşur (11,36,38,73,102).



Hcy tiyolaktin oluşumu iki yönden zararlıdır. İlki bu reaksiyon ATP kullanır ve bu nedenle enerji sarfına yol açar. İkincisi proteinlerin lizin amino asitlerinin epsilon amino grupları ile amid bağları oluşumu vasıtasıyla proteinlerin N-homosisteinilasyonuna neden olur. N-homosisteinilasyon proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını etkilemekte, proteolitik parçalanmaya daha duyarlı hale getirmektedir. Bu nedenle Hcy toksisitesinde özel bir öneme sahiptir (38, 102,106).

HcyT'nin Hcy'den çok daha toksik olduğu, çok daha düşük konsantrasyonlarda apoptozisi ve endoplazmik retikulum stresini indüklediği *in vitro* çalışmalarla bulunmuştur (55,97). Özellikle LDL'nin N-homosisteinilasyonunun LDL'nin oksidasyona duyarlılığını arttırdığı ve makrofajlar tarafından alınmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir (102). HcyT'nin Hcy ve metyonine oranla daha toksik olduğu bazı *in vivo* çalışmalarda da ileri sürülmüştür (54,74).

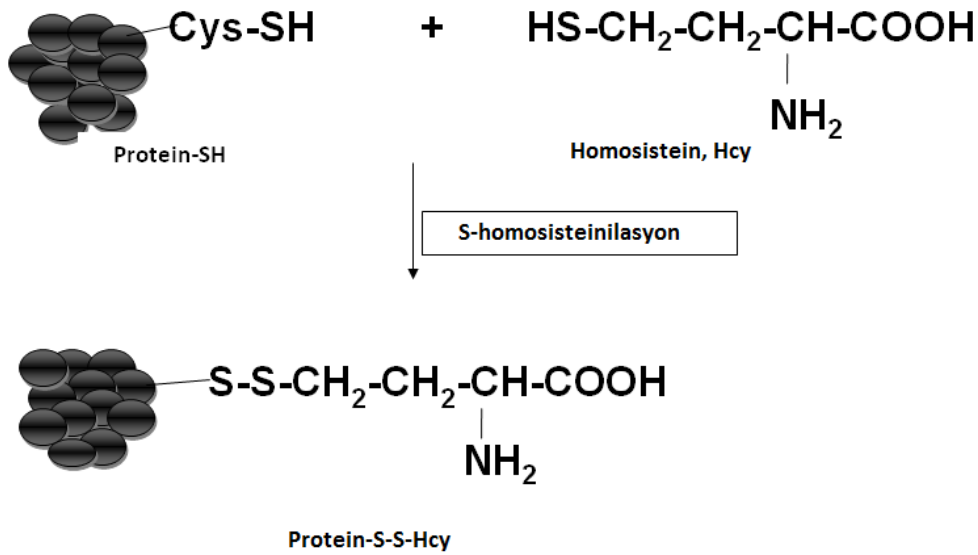
HcyT toksisitesini azaltmak için organizmada bir savunma sistemi bulunmaktadır (102). Tüm organizmalarda HcyT'nin büyük kısmı hücrelerden ekstrasellüler ortama atılır ve böbreklerden idrara salınarak temizlenir. Bunun yanısıra yüksek dansiteli lipoproteinlerde (HDL) bulunan Hcy tiyolaktinaz/paraoksonaz (PON1) enzimi tarafından plazmada yıkılır (11,18,102). Buna ek olarak, dokularda bleomisin

hidrolaz (BLH) olarak tanımlanan bir enzim de hücre içinde HcyT'yi metabolize etmektedir (106).

Endoplazmik retikulum (ER) stresi: HcyT oluşumu ve N-homosisteinilasyon ER stresine neden olur, ER'den salgılanan proteinlerde hasara yol açar. ER stresi lipid metabolizması bozukluklarına, inflamatuvar yolların aktivasyonuna, insülin sinyalinde bozulmaya ve hücre ölümüne neden olur (2,34,38,67).

Homosisteinilasyon: S-homosisteinilasyon ve N-homosisteinilasyon olmak üzere iki tipi vardır. Her iki olay da posttranslasyonel protein değişiklikleridir (34,36,67,73,102).

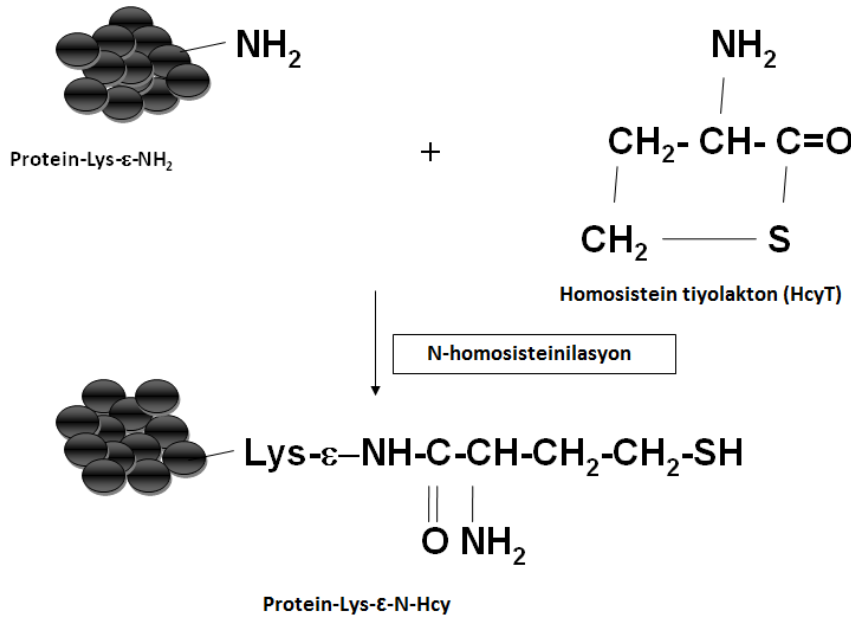
a) S-homosisteinilasyon: Protein tiyolasyonu olarak da tanımlanır. Hcy'nin serbest sülfidril grubunun proteinlerdeki sistein kalıntılarındaki sülfidril grubu ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur (Şekil 2.4). Kandaki Hcy'nin % 70'i tiyollenmiştir. Tiyolasyon kanda Hcy düzeylerine bağlıdır. Bu değişiklik proteinlerin sülfidril grubuna bağlı redoks durumunu değiştirir, proteinlerin ve enzimlerin fonksiyonlarını etkiler (67,73).



Şekil 2-4: S-homosisteinilasyon

b) N-homosisteinilasyon: Hcy'nin halkalı bir tiyoesteri olan HcyT'nin proteinlerdeki lizin amino asidinin ϵ -amin gruplarına bağlanması ile olur (Şekil 2.5). Kanda N-bağlı Hcy'nin % 75'i hemoglobinde, % 22'si albuminde ve %2'si γ -globulin fraksiyonunda taşınır. Diğer bütün kan proteinleri %1 N-bağlı Hcy taşır.

Plazmada ise N-bağlı Hcy'nin % 90'ı albuminle taşınır. hHcy koşullarında HcyT düzeylerindeki artış N-homosisteinilasyonu tetikler. N-homosisteinilasyon proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını etkiler ve onları denatürasyona duyarlı hale getirir. Hcy içeren bu proteinler otoimmün yanıtları da tetiklemektedir. Ayrıca, HcyT, aynı proteinlerde tiyolasyona da neden olmaktadır (34,36, 67,73,102).



Şekil 2-5: N-homosisteinilasyon

2.5. Hiperhomosisteineminin Kan ve Dokular Üzerine Etkileri

Kalp-damar sistemi üzerine etkileri: Homosistinürili hastalarda tromboembolik olayların sık görülmesi üzerine hHcy ile damar bozuklukları arasında bir ilişki olabileceği ileri sürülmüş ve bu ilişkinin niteliği klinik ve deneysel çalışmalarla araştırılmaya başlanmıştır (49,88). 1990'lı yıllardan itibaren bu alandaki çalışmalar giderek yoğunlaşmıştır. Günümüzde hHcy aterosklerotik kalp-damar hastalıklarında bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (8,38,80,88). hHcy'e bağlı olarak gelişen endotel hasarının ateroskleroz oluşumunda tetikleyici bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Hcy düzeyleri arttığında otooksidasyon ile ROS oluştuğu,

bunların doğrudan etkiyle endotel hasarı oluşturduğu, LDL'nin otooksidasyonunu hızlandırarak aterom plakları oluşumunu arttırdığı ileri sürülmüştür (2,49,88). Günümüzde oksidatif stresin ve özellikle LDL oksidasyonunun ateroskleroz patojenezinde etkin bir rol oynadığı bilinmektedir.

Bu nedenle hHcy'de ROS ve oksitlenmiş LDL'deki artışlar ateroskleroz oluşumundaki çeşitli basamakları tetiklemektedir (2,8,31,38,49,88).

hHcy'de endotel hasarı oluşumu, prostasiklin ve NO sentezinde azalma, trombosit adezyon ve agregasyonunda artma, endotelde vazodilatasyon kaybı, düz kas hücre proliferasyonunda artma ve koagülasyon zincirinde bozulma gibi olaylar gelişmektedir. Hcy düzeylerindeki artışın damar endotelinde NO biyoyararlanımını da etkilediği, başlangıçta endotelden salgılanan NO ile Hcy'nin bağlanması sonucu oluşan S-nitroso-Hcy koruyucu rol oynasa bile, aşırı ROS, NO oluşumunu azaltmakta ve böylece bu koruyucu mekanizma ortadan kalkmaktadır. Aksine, NO'nun $O_2^{\bullet-}$ ile birleşmesiyle çok etkili bir radikal olan ONOO⁻ radikali oluşmakta ve buna bağlı toksik etkiler gelişmektedir (2,18,36,38).

hHcy'nin miyokarda da yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olduğu ileri sürülmektedir (29,93). Metyoninin farklı dozlarının antioksidan sistem ve kalp yapı ve fonksiyonları üzerine etkisi konusunda bazı çelişkili sonuçlar elde edilmesine rağmen, kalpte oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir (6,10,62,84,100). Benzer çalışmalar homosistein (93) ve homosistin (35) uygulanan deney hayvanlarında da yapılmıştır.

Karaciğer üzerine etkileri: İlk kez Lynch ve Strain (47), 7 hafta süre ile %2 oranında metyonin içeren diyetle beslenen sıçanlarda karaciğerde prooksidan-antioksidan dengenin prooksidan yönünde değiştiğini bildirmiştir. Daha sonraki çalışmalarda metyonin uygulaması ile karaciğerde oksidatif stresin geliştiği ve bazı histopatolojik değişiklikler olduğu vurgulanmıştır (6,58,76,90,95). Benzer çalışmalar homosistein (51,79) ve kolin eksik (14) diyet uygulanan deney hayvanlarında da yapılmıştır. Anabilim Dalımızda yapılan bir çalışmada da 6 ay süre ile metyonin (1g/kg/gün) uygulanan sıçanlarda serum Hcy düzeylerinin 12 kat arttığı, serumda alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktiviteleri ile karaciğerde MDA, dien konjugat (DK), NT düzeylerinde anlamlı artışlar olduğu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemde bir yetersizlik oluştuğu, karaciğerde apoptotik ve nekrotik değişiklikler görüldüğü bulunmuştur (99).

Böbrekler üzerine etkileri: Klinik ve deneysel çalışmalar Hcy'nin böbrek hastalıklarının oluşumunda, ilerlemesinde ve kalp-damar komplikasyonlarının gelişmesinde çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir (96,103). Böbrek hastalarında Hcy düzeylerinin artışında transmetilasyonla Hcy oluşumundaki artışın yanı sıra Hcy'nin metabolizması ve vücuttan uzaklaştırılmasındaki yetersizlikler rol oynamaktadır (96,103). Son bulgular hHcy'nin doğrudan glomerülleri etkileyerek glomerüler skleroza neden olduğunu göstermiştir (88,96,103).

Metyonin (1 g/kg/gün) uygulanan sıçanlarda böbreklerde oksidatif ve nitrozatif stresin arttığı, antioksidan sistemin baskılandığı, serum kreatinin düzeylerinin ise değişmediği görülmüştür (6,105). Metyonin uygulanan bir çalışmada böbreklerde MDA düzeylerinin, NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz aktivitelerinin arttığı, SOD aktivitesinin azaldığı, glomerüllerde histopatolojik değişiklikler olduğu bildirilmiştir (32). Benzer çalışmalar diğer deneysel (15,37,43,70) ve genetik (82) hHcy modellerinde de yapılmış ve hHcy'nin böbrek yapı ve fonksiyonlarını engelleme potansiyeli araştırılmak istenmiştir.

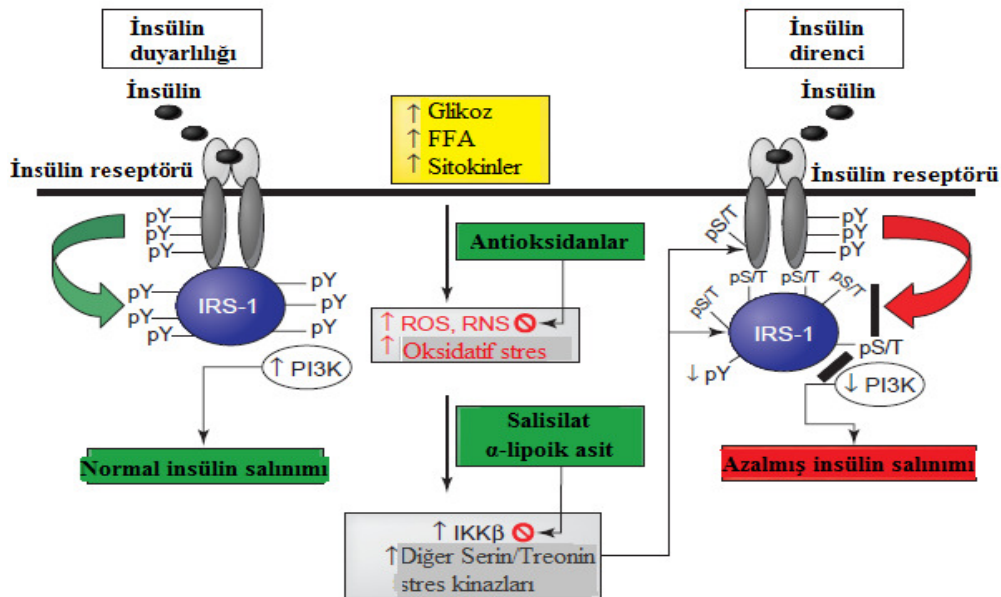
Hemostaz üzerine etkileri: hHcy'de endotel ve damar düz kas hücreleri, bağ dokusu, trombositler ve koagülasyon faktörleri etkilenmektedir (2,18,31,49,67). hHcy'nin hemostaz üzerine etkisi karmaşıktır ve henüz tam anlamı ile açıklanamamıştır. NO oluşumunda ve biyoyararlanımında bozulma, oksidatif stres, hemostatik proteinlerin N-homosisteinilasyonu veya S-homosisteinilasyonu, düz kas hücre proliferasyonunda artış, inflamasyon gibi faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmektedir (2,18,31,36,38,49,67).

Beyin üzerine etkileri: Hcy nörotoksik bir maddedir. Sinaptik disfonksiyona ve hücre ölümüne neden olur. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri yoluyla glutamat nörotoksisitesine yol açar. Epidemiyolojik çalışmalar Hcy düzeyleri ile nörodejeneratif hastalıklar arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (5,30,52,69).

Hcy kan beyin engelini kolayca aşmaktadır (63). Beyin dokusu betain remetilasyonu ve transsülfürasyon yolu enzimlerine sahip olmadığı için (21), hHcys ile indüklenen prooksidan uyarıya çok duyarlıdır. Metyonin (1,50,77) ve homosistein (81) uygulamalarının beyinde ve beynin farklı bölgelerinde prooksidan-antioksidan dengesini etkilediği, histopatolojik bazı değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir.

İnsülin direnci üzerine etkisi: İnsülin direnci (insulin resistance; IR) insülinin normal veya yüksek serum düzeylerine karşın azalmış etkinliği ile karakterize bir sendrom olup Tip 2 Diabetes Mellitus ve metabolik sendromun temel özellikleri arasında yer alır (56). IR'ye neden olan kompleks mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, oksidatif stres, inflamasyon ve endoplazmik retikulum stresi bu sendromun patogeneğinde rol alan temel mekanizmalar olarak kabul edilmektedir (19,56).

Glikoz, serbest yağ asitleri ve sitokin düzeylerindeki artış ROS ve reaktif azot türleri (RNS) düzeylerini artırır ve oksidatif strese yol açar. Bu durum I κ B kinaz B (IKK β) ve diğer stres-duyarlı serin/treonin kinaz sinyal kaskatlarında aktivasyona yol açar. Bu kinazlar aktiflendiklerinde insülin reseptörü ve IRS-1 ve IRS-2 gibi insülin reseptör substratı proteinler dahil birçok hedefte fosforilasyon yapar. İnsülin reseptör veya IRS proteinlerindeki serin ve treonin amino asitlerindeki bu fosforilasyon IRS-1'deki tirozinlerin fosforilasyonunu engeller ve yolaktaki onunla bağlantılı PI 3-kinaz (PI3K) gibi sinyal moleküllerindeki etkileşimi bozar ve sonuç olarak insülin etkisinde azalmaya yol açar (19,56,60). Antioksidanlar ise strese duyarlı kinazların aktivasyonunu engelleyerek oksidatif stres tarafından indüklenen IR'ye karşı koruyucu bir rol oynamaktadırlar (19,39) (Şekil 2.6).



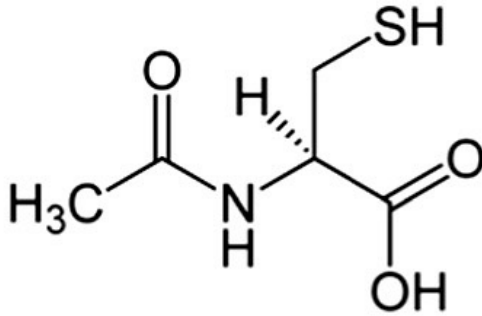
Şekil 2-6: Oksidatif stres uyarımlı insülin direncinde serin kinaz aktivasyonunun rolü

PS/T, serin veya treonin fosforilasyonu; PY, tirozin fosforilasyonu; RNS, reaktif azot türleri; ROS, reaktif oksijen türleri;

Plazma Hcy düzeyleri ile IR arasında bir korelasyon saptanmıştır (53). hHcy indüksiyonunu takiben IR geliştiğini gösteren *in vivo* (25,45,46) ve *in vitro* (45,61) birçok çalışma yayınlanmıştır. hHcy koşullarında IR gelişiminde Hcy ve HcyT birikimiyle uyarılan oksidatif stres etkili olmaktadır (55,61). Öte yandan, adiposit kültürüne *in vitro* (45) ve diabetik sıçanlara *in vivo* uygulanan (26) insülinin Hcy düzeylerinde bir artışa neden olduğu ve bu etkisini karaciğerde transsülfürasyon yolundaki enzimleri baskılayarak yaptığı saptanmıştır (33). Bu nedenle, hHcy'nin IR gelişiminde bir neden mi, yoksa bir sonuç mu olduğu tartışmalıdır.

2.6. N-Asetilsistein (N-Acetylcysteine; NAC)

NAC, L-sisteinin asetillenmiş halidir. Yapısındaki sülfidril grubu NAC'ın metabolik aktivitesini belirlemede, asetil grubu ise molekülü oksidasyona karşı dirençli kılmaktadır (Şekil 2.7). Sisteinin asetilasyonu polariteyi azaltmakta ve dokulara girişi kolaylaştırmaktadır.. Gerçekten, ağız yolu ile alındığında barsaklardan hızla ve tamamen emilerek vena porta ile karaciğere ulaşır ve karaciğerde deasetilasyonla sisteine dönüşür (39,78,104).



Şekil 2-7: NAC'ın moleküler yapısı

NAC uzun yıllardan beri klinik amaçla kullanılan bir tiyol bileşiktir. Mukolitik olarak ve parasetamol zehirlenmesi, doksorubisine bağlı kardiyotoksisite, anjinapektoris, iskemi-reperfüzyon kalp hasarı, bronşit, radyokontrast maddelere bağlı nefropati, ağır metal zehirlenmesi, şizofreni, bipolar bozukluk gibi psikiyatrik hastalıklar dahil birçok patolojinin tedavisinde kullanılmaktadır (39,78,104).

NAC'ın biyolojik etkinliğinde birçok mekanizma etkili olmaktadır (39,78,104). Antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve immunomodülatör etkilere sahiptir. Biyolojik etkinliğinde özellikle antioksidan etkinliği önem kazanmaktadır. NAC

doğrudan ve dolaylı antioksidan özelliklere sahiptir. NAC bir elektron vericisi olarak görev yapan serbest tiyol grubu ile hidroksil, azot dioksit ve karbontrioksit ve tiyil gibi güçlü oksitleyici radikallerle reaksiyona girer. Ayrıca demir ve bakır gibi metal iyonlarını bağlayarak da etkili olur. NAC'ın dolaysız antioksidan potansiyeli, bir GSH öncüsü olarak görev yapmasından kaynaklanır. Organizmada GSH sentezi için sistein sağlar. NAC uygulaması hücrede GSH düzeylerini artırır. GSH'ın oral yoldan emilimi düşük olduğu için, GSH düzeylerini etkileme açısından GSH'ın kendisinden daha etkilidir. Proteinlerdeki disülfid köprülerini indirgeyerek proteinlerin sülfidril gruplarının korunmasında etkili bir görev yapar (39,78,104).

Öte yandan, NAC antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Proinflamatuvar interlökinlerin (IL-6 ve IL-10) düzeylerini azaltır. Bu etkisinde nukleer faktör kapp B (NF-kB) gibi redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunun baskılanması da rol oynamaktadır. NAC; apoptozu önlemekte ve çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücrenin yaşam sürecini uzatmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle, çeşitli deneysel çalışmalarda NAC'ın oksidatif stresin ve inflamasyonun indüklendiği koşullarda doku hasarına karşı bir koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (16,40,83,98).

Son yıllarda NAC'ın sıçanlarda antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile insulin direnci ve diabet üzerine koruyucu etki gösterdiği, hiperglisemiyi önlediği, insulin düzeylerini ve insulin direncini düzelttiği de ileri sürülmüştür (16,39,40,86).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

- a. ELISA mikrolaka okuyucusu (Bio-tek Elx-800 ve μ Quant)
- b. Homojenizatör (Ultra-Turrax T25 / Janke & Kunkel Ika Labortechnik)
- c. Spektrofotometre (Ultrospec 2000 / Pharmacia Biotech)
- d. Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı (Ika Labortechnik)
- e. Masaüstü soğutmalı santrifüj (Megafuge 1.0 R / Heraeus Instruments)
- f. Mikrosantrifüj (Biofuge / Heraeus Instruments)
- g. Su banyosu (Electromag)
- h. pH metre (HI 9321 microprocessor pH meter)
- i. Vorteks (Ika MS2 Minishaker)
- j. Hassas terazi (AND HR-120)
- k. Pipet takımı (Eppendorf)

3.2. Çalışma Protokolü

Çalışmamızda 200-220 g ağırlığında Wistar türü erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı. Deneysel hayvanları 6 gruba ayrıldı ve 6 hafta süre ile aşağıda belirtildiği gibi beslendi.

a) Kontrol grubu (n=6): Bu sıçanlar normal sıçan yemi ile beslendi.

b) NAC grubu (n=6): Bu sıçanlar NAC (10 g/kg yemde) içeren yemle beslendi.

c) Düşük doz DL-HcyT grubu (HcyT-100) (n=10): Sıçanlar normal sıçan yemi ile beslendi ve içme sularına günlük HcyT alımı 100 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde HcyT eklendi. Bu amaçla sıçanların vücut ağırlıkları ve günlük içtikleri su miktarı belirlendi ve buna göre doz ayarlaması yapıldı. Normal koşullarda bu doza yaklaşık 1.5 g HcyT/L içme suyu ile ulaşılabileceği hesaplandı.

d) Yüksek doz DL-HcyT grubu (HcyT-500) (n=10): Sıçanlar normal sıçan yemi ile beslendi ve içme sularına günlük HcyT alımı 500 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde HcyT eklendi. Bu amaçla sıçanların vücut ağırlıkları ve günlük içtikleri su miktarı belirlendi ve buna göre doz ayarlaması yapıldı. Normal koşullarda bu doza yaklaşık 7.5 g HcyT/L içme suyu ile ulaşılabileceği hesaplandı.

e) NAC+HcyT-100 grubu (n=10): Sıçanlar NAC (10 g/kg yemde) içeren yemle beslendi ve içme suyu ile HcyT (100 mg/kg vücut ağırlığı/gün) uygulandı.

f) NAC+HcyT-500 grubu (n=10): Sıçanlar NAC (10 g/kg yemde) içeren yemle beslendi ve içme suyu ile HcyT (500 mg/kg vücut ağırlığı/gün) uygulandı.

Bu uygulamalar 6 hafta sürdürüldü. Bu sürenin sonunda sıçanlar bir gece süreyle aç bırakıldı ve ertesi sabah sıçanlar sodyum tiyopental (50 mg/kg; i.p) anestezisi altında kalplerinden kuru tüplere kan alınarak öldürüldü, karaciğer ve böbrek dokuları hızla çıkarıldı ve soğutulmuş %0.9 NaCl ile yıkandı ve sıvı azota alındı. Kan örnekleri 2500 rpm'de santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar ve dokular -80°C'de deneyler yapıncaya kadar saklandı.

3.3. Serumda Yapılan İncelemeler

a) Hcy düzeyleri Tayini: Total Hcy, kemilüminometrik yöntemle Immulite 2000 XPI (Siemens, Marburg, Almanya) sistemi ile ölçüldü.

b) Glikoz, kolesterol, trigliserit, total protein, albumin, üre azotu (BUN) ve kreatinin düzeyleri ile ALT ve AST tayinleri: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Merkez laboratuvarında Roche otoanalizöründe ölçüldü.

c) İnsulin tayini ve HOMA değerlerinin hesaplanması: “Rat/Mouse insulin ELISA kit” kullanıldı ve sonuçlar ng/mL olarak belirlendi. Bu değerler 25 ile çarpılarak $\mu\text{U/mL}$ 'ye çevrildi.

IR, HOMA (homeostasis model assessment) indeksi kullanılarak değerlendirildi.

HOMA indeksi= [açlık insülin düzeyi ($\mu\text{U/mL}$) x açlık glikoz düzeyi (mg/dL)]/405 formülüne göre hesaplandı.

d) MDA düzeyleri tayini (7): Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA' nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu kompleks spektrofotometrik olarak ölçüldü.

İşlem: 0.5 mL serum üzerine 0.5 mL % 0.9 NaCl ve 2 mL Buege-Aust ayırıcı eklendi. 15 dk 100 °C'deki su banyosunda kaynatıldıktan sonra tüpler soğutuldu ve 10 dk 3000 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen süpernatantın absorbanansı köre karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Ayıracılar:

- % 0.9 NaCl
- Buege-Aust ayıracı: 375 mg TBA, 15 mL % 100'lük triklorasetik asit (TCA) ve 2.1 mL derişik hidroklorik asit (HCl) karıştırılarak 100 mL'ye tamamlandı.
- Stok 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı: 22 mg TEP tartıldı ve 10 mL'ye distile su ile tamamlandı. Bu stok standardı çalışılmadan önce 1000 kez sulandırılarak 10 nmol/mL'lik çalışma standardı hazırlandı.

Hesap: Standart olarak TEP kullanıldı. Sonuçlar standart ve ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak $\mu\text{mol} / \text{L}$ serum olarak verildi.

e) Uyarılmış MDA düzeyleri tayini (24): Serum örnekleri final konsantrasyon 100 mM olacak şekilde 2,2'-azobis 2-amidinopropan (AAPH) ile 2 saat 37°C'de inkübe edildi ve oluşan MDA düzeyleri Buege-Aust yöntemi ile ölçüldü. Sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ serum olarak verildi.

f) Reaktif oksijen radikalleri (Reactive oxygen species ROS) tayini (94): Bu metod 2,7-diklorodihidrofloresein diasetat'ın (DCFH-DA) doku esterazları ile 2,7-diklorodihidrofloresein'e (DCFH) dönüşmesi ve oluşan bu ürünün ortamdaki ROS tarafından floresans veren 2,7-diklorofloresein'e (DCF) oksitlenmesine dayanır.

İşlem: Serum örnekleri 1 mL 100 μM 'lık DCFH-DA içerisine koyuldu ve çalkalayıcı su banyosunda 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Ayrıca deney körü hazırlamak için aynı miktar serum aynı koşullarda tamponlanmış tuzlu su (PBS) içerisinde inkübe edildi. Süre bitiminde deney körü ile deney tüplerinden alınan 200 μL örnekler ışıktan korunarak koyu renkli ELISA mikropalakaya pipetlendi. Örnekler hızla florometrik mikropalaka okuyucuda ($\lambda_{\text{eksitasyon}}: 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisyon}}: 538 \text{ nm}$) okundu (Thermo Electron Corporation Fluoroskan Ascent FL). Sonuçlar rölatif floresan ünite olarak verildi.

Ayıracılar:

- PBS (pH:7.4)

DCFH-DA: 5 mM'lık stok çözelti hazırlandı (% 99 DMSO içerisinde) ve -20 °C'de muhafaza edildi. Çalışma öncesi 100 μM olacak şekilde PBS ile sulandırıldı.

3.4. Dokularda Yapılan İncelemeler

Sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında oksidatif stres ve antioksidan belirteçler ölçüldü. Oksidatif stres göstergesi olarak ROS ve MDA, antioksidan gösterge olarak da FRAP, GSH, GSH-Px ve SOD ölçüldü.

a) Doku Homojenatlarının Hazırlanması ve Postmitokondri Fraksiyonlarının Eldesi: Doku homojenatlarının hazırlanması için; karaciğer ve böbrek dokuları tartıldı ve Potter-Elvehjem doku homojenizatörü kullanılarak 0.15 M KCl çözeltisi içerisinde dokular homojenize edildi ve %10'luk homojenatlar (w/v) hazırlandı.

Postmitokondri fraksiyonu eldesi için; doku homojenatları +4°C'ye ayarlanmış soğuk santrifüjde 600xg 'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınarak ependorf santrifüjünde 10000xg 'de 20 dk santrifüj edildi. Tekrar süpernatant fazı alınarak -80°C 'de muhafaza edildi.

b) ROS düzeyleri tayini (94): 200µL %10'luk homojenat, 20µL 1mM'lık DCFH-DA içerisine koyuldu ve çalkalayıcı su banyosunda 37°C'de 30 dakika inkübe edildi ve serum ROS tayini için belirtilen yöntem kullanıldı.

c) MDA düzeyleri tayini (64): Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA'nın TBA ile oluşturduğu kompleks spektrofotometrik olarak ölçüldü.

İşlem: % 10'luk doku homojenatlarından 0.2 mL alındı. Üzerine 0.2 mL % 8.1'lik sodyum dodesil sülfat, 1.5 mL % 20'lik asetik asit, 1.5 mL % 0.8'lik TBA ve 0.6 mL distile su eklendi. Bu karışım kaynar su banyosunda 1 saat tutuldu. Soğutulduktan sonra üzerine 1 mL distile su ve 5 mL butanol/piridin (15:1) karışımı eklendi, karıştırıldı ve organik faz santrifüj edilerek ayrıldı. Homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı absorbanlar 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Ayıraçlar:

- % 8.1'lik sodyum dodesil sülfat
- % 20'lik asetik asit (10 N NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı)
- % 0.8'lik TBA
- Butanol/piridin (15:1)

- Stok TEP standardı: 22 mg TEP tartıldı 10 mL'ye distile su ile tamamlandı. Bu stok standardı çalışılmadan önce 1000 kez sulandırılarak 10 nmol/mL'lik çalışma standardı hazırlandı.

Hesap: Standart olarak TEP kullanıldı. Sonuçlar nmol/g doku olarak tanımlandı.

d) GSH düzeyleri tayini (4): GSH düzeyleri, Ellman ayırıcı (5,5'- ditiobis-2 nitro benzoik asit-DTNB) kullanılarak tayin edildi. Bu ayırıcın dokulardaki serbest sülfidril (-SH) grupları tarafından indirgenmesi sonucunda, 1 mol SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiyobenzoik asit oluşmaktadır. Sarı renkli bu ürün spektrofotometrik olarak 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Ayıraçlar:

- Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA ve 30 g NaCl 100 mL distile suda çözüldü.
- 0.3 M Na₂HPO₄: 42.6 g Na₂HPO₄ 1000 mL distile suda çözüldü.
- Ellman Renk Ayırıcı: 4 mg DTNB 10 mL % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.
- GSH standardı: (0.1 mg/mL)

İşlem: Dokuların 0.15 M KCl'deki % 10'luk homojenatlarından 0.5 mL alındı. Hacimler 0.15 M KCl ile 2 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 3 mL proteinsizleştirme çözeltisi eklendi ve bu karışım 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. 0.5 mL supernatan alınarak üzerine 2 mL 0.3 M Na₂HPO₄ ve 0.5 mL Ellman ayırıcı ilave edildi. Oluşan renk 412 nm'de ayıraç körüne karşı okundu.

Hesap: GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı 13600 M⁻¹cm⁻¹ ve standart kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar µmol/g doku protein olarak tanımlandı.

e) Antioksidan Aktivite Tayini (Ferric Reducing Antioksidant Power; FRAP) (3): Postmitokondri fraksiyonunda +3 değerlikli demir (Fe³⁺) iyonlarını +2 değerlikli demir (Fe²⁺) iyonları indirgeyen antioksidan gücün ölçülmesi prensibine dayanır.

Ayır a lar:

- 40 mM HCl
- 300 mM asetat tamponu(pH:3.6): 3.1 g Na-asetat.3H₂O ile 16 mL asetik asit karıştırıldı ve 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. pH: 3.6'ya ayarlanır ve 10 kat sulandırıldı.
- 10 mM 2,4,6-tripridil-s-triazin (TPTZ): 312.33 mg TPTZ tartıldı ve 100 mL 40 mM HCl içinde  oz ld .
- 20 mM FeCl₃.6H₂O: 540 mg FeCl₃.6H₂O tartıldı ve distile su ile 100 mL'ye tamamladı.
- FRAP ayıracı: Sırasıyla asetat tamponu, TPTZ ve FeCl₃ ayır a ları 10:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.
- Askorbik asit standardı (500 ve 1000  M).

İşlem: Standart tüplerine sırasıyla 25, 500 ve 1000  M'lık askorbik asit standartları ve deney tüplerine de 25  L postmitokondri fraksiyonu koyulduktan sonra tüm tüplere 30 saniye aralıklarla 750  L FRAP ayıracı eklendi. Tüpler 37°C'de 4 dakika bekletildikten sonra absorbans değerleri 593 nm'de okundu.

Hesap: Askorbik asit standartlarına göre hesaplanan sonuçlar  mol/L olarak verildi.

f) Cu-Zn-Superoksit Dismutaz (SOD) Düzeyleri Tayini (59): SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği olarak  l lmesi prensibine dayanır. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksite dönüşür. Hidrojen peroksit ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürün 460 nm'de spektrofotometrik olarak saptanır.

Ayır a lar:

- 0.1 mM EDTA içeren 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7.8)
- 0.2 mM riboflavin: 7.3 mg riboflavin 100 ml 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5)'de  oz nd .
- 6 mM o-dianisidin: 19 mg o-dianisidin 10 mL distile suda  oz nd .

- SOD (100 IU/ml) standardı: Sigma firmasından sağlanan SOD standardı 100 IU/ml olacak şekilde soğuk distile su ile sulandırıldı. Daha sonra bu ana standarttan 0.1 ve 0.05 mL alınarak deney ortamında 10 ve 5 IU SOD standardının bulunması sağlandı.

İşlem: Kör, standart ve deney tüplerine sırası ile 2.6 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.8), 0.1 mL o-dianisidin ilave edildi. Kör tüpüne 0.1 mL distile su; standart tüpüne 0.1 mL standart; deney tüpüne 0.05- 0.1 mL postmitokondri fraksiyonu eklendi ve her tüpe 30 saniye ara ile 0.2 mL riboflavin kondu, karıştırıldı ve 460 nm'deki absorbans değerleri okundu. Tüpler 20W floresans lamba içeren 37° C'ye ayarlanmış özel bir kutuya yerleştirildi ve tam 8 dakika süre ile floresans ışığa maruz bırakıldı. Sürenin bitiminde tüplerin absorbansı tekrar 460 nm'de okundu ve iki absorbans arasındaki fark alındı. Ayrıca deney körü ve standart için de aynı işlemler yapıldı.

g) Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Düzeyleri Tayini (41): Kümen hidroperoksit substrat olarak kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. GSH-Px aktivite tayini iki reaksiyon ile gerçekleşir. Birinci reaksiyonda H₂O₂ veya organik hidroperoksitler (ROOH) GSH-Px etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH oksitlenmiş GSH'a (GSSG) dönüşür. İkinci reaksiyonda GSSG, GSH-redüktaz (GSH-R) etkisi ile tekrar GSH'a, NADPH ise NADP⁺'ye oksitlenmektedir. Bu dönüşüm 340 nm'de spektrofotometrede izlenir.

İşlem: GSH-Px aktivitesi, 1 mL'lik hacimde son konsantrasyonlar 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azid, 0.2 mM NADPH, 1 mM GSH, 0.5 IU/ml glutatyon redüktaz, 1.2 mM kümen hidroperoksit, ve değişik oranlarda sulandırılmış post mitokondri fraksiyonu içerecek şekilde hazırlanmış ortamda tayin edildi. Küvetler 37°C'ye ayarlanmış termostatlı spektrofotometreye yerleştirildi ve 1'er dakika arayla spektrofotometrede 340nm'de absorbans değişimi izlendi. Ayrıca post mitokondri fraksiyonu içermeyen ortamda da reaksiyon izlenerek enzimatik olmayan değişim kayıt edildi (kör deney).

Hesap: Sonuçlar NADPH'in ekstinksiyon katsayısı olan $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 'den yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol NADPH / dakika / mg protein olarak belirtildi.

h) Protein Tayini (85): Doku homojenatları fraksiyonlarında protein miktarı bişinkoninik asit metodu ile belirlendi.

Ayıracılar:

- Bişinkoninik asit
- %4 CuSO₄
- Protein renklendirme ayıracı: 10 ml bişinkoninik asit çözeltisi üzerine 0.2 ml %4 CuSO₄ ekleyerek hazırlandı.

İşlem: 200 µL protein renklendirici ayıracı üzerine sulandırılmış karaciğer ve böbrek homojenatlarından 10 µL ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 37⁰ C' de 30 dk beklendi. Oda ısısında soğutuldu ve oluşan rengin absorbansı 562 nm' de ELİSA' da okundu.

3.5. İstatistik İncelemeler

Sonuçlar ortalama ± SD olarak verildi. Grup dağılımları Levene's testi ile saptandı ve ANOVA (post-hoc Tukey) /Kruskal-Wallis (post-hoc Mann-Whitney U) testleri kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Vücut, Karaciğer ve Böbrek Ağırlıkları ve İndeksleri

a) HcyT-100 uygulaması final vücut ağırlığını değiştirmedir. Karaciğer ağırlığı azaldığı halde, karaciğer indeksi değişmedi. Böbrek ağırlığı ve böbrek indeksi de kontrol değerlere göre bir değişiklik göstermedi.

b) HcyT-500 uygulaması final vücut ağırlığını, karaciğer ve böbrek ağırlığını azalttı, ancak karaciğer ve böbrek indeksleri değişmedi.

c) NAC uygulamaları HcyT-100 ve HcyT-500 gruplarında final vücut, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ile karaciğer ve böbrek indekslerini etkilemedi.

4.2. Serumda Elde Edilen Bulgular

a) 100 mg/kg HcyT uygulaması sıçanların serum Hcy düzeylerine % 54 oranında bir artış oluşturdu. Bu koşullarda serumda glikoz ve insülin düzeyleri değişmedi. HOMA değerlerinde % 62 oranında bir artış olmasına rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. NAC uygulaması Hcy düzeylerinde % 29.1 oranında anlamlı bir azalma oluşturdu. Glikoz ve insülin düzeylerinde bir değişiklik olmadı, ancak HOMA değerlerinde % 22 oranında istatistik olarak anlamlı olmayan bir azalma bulundu (Tablo 4.2; Şekil 4.1).

b) 100 mg/kg HcyT uygulaması serum kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile ALT ve AST aktivitelerinde bir değişiklik oluşturmadı. Bu değerler NAC uygulamasından sonra da değişmedi (Tablo 4.3).

c) Gerek HcyT-100 ve gerekse NAC+HcyT-100 gruplarında total protein, albumin, BUN ve kreatinin düzeyleri (Tablo 4.4) ile ROS, endojen ve uyarmalı MDA düzeyleri (Tablo 4.5) kontrol grubuna göre bir farklılık göstermedi.

d) 500 mg/kg HcyT uygulaması sıçanların serum Hcy düzeylerinde % 140.7 oranında bir artış oluşturdu. Serumda glikoz düzeyleri değişmedi. İnsülin düzeylerinde % 70, HOMA değerlerinde ise % 80 oranında anlamlı bir artış saptandı. NAC uygulaması Hcy düzeylerinde % 29.7 oranında anlamlı bir azalma oluşturdu. Glikoz ve insülin düzeylerinde ve HOMA değerlerinde bir değişiklik olmadı (Tablo 4.2; Şekil 4.1).

e) 500 mg/kg HcyT uygulaması serum kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile ALT ve AST aktivitelerinde bir değişiklik oluşturmadı. Bu değerler NAC uygulamasından sonra da değişmedi. Sadece serum ALT aktivitelerinde NAC uygulaması ile anlamlı bir azalma bulundu (Tablo 4.3).

f) Gerek HcyT-500 ve gerekse NAC+HcyT-500 gruplarında total protein, albumin, BUN ve kreatinin düzeyleri (Tablo 4.4) ile ROS, endojen ve uyarmalı MDA düzeyleri (Tablo 4.5) kontrol grubuna göre bir farklılık göstermedi.

4.3. Karaciğer Dokusunda Elde Edilen Bulgular

a) Karaciğerde ROS, MDA ve FRAP düzeylerinin 100 mg/kg HcyT uygulamasından sonra değişmediği bulundu. NAC uygulaması ile ROS düzeylerinin % 25.4 oranında anlamlı bir azalma, FRAP değerlerinin ise % 28.8 oranında arttığı bulundu. MDA düzeylerine ise bir değişiklik bulunmadı (Tablo 4.6; Şekil 4.2).

b) 100 mg/kg HcyT uygulaması karaciğer GSH düzeylerinde anlamlı bir artış oluşturdu, SOD ve GSH-Px aktivitesini etkilemedi. NAC uygulaması bu göstergelerde bir değişiklik oluşturmadı (Tablo 4.7; Şekil 4.3).

c) 500 mg/kg HcyT uygulaması ile ROS ve MDA düzeylerinde kontrol gruba göre sırasıyla % 61.9 ve % 29.1 oranlarında artış oldu, FRAP değerleri ise değişmedi. NAC uygulaması ROS ve MDA düzeylerini azalttı, FRAP düzeylerini ise arttırdı (Tablo 4.6; Şekil 4.2).

d) 500 mg/kg HcyT uygulaması karaciğer GSH düzeyleri ile SOD ve GSH-Px aktivitesinde bir değişiklik oluşturmadı. NAC uygulaması GSH düzeylerine bir artış oluşturdu, ancak SOD ve GSH-Px aktivitesini etkilemedi (Tablo 4.7; Şekil 4.3).

4.4. Böbrek Dokusunda Elde Edilen Bulgular

a) 100 mg/kg HcyT uygulanan sıçanlarda böbrekte ROS düzeylerinde anlamlı artış, FRAP değerlerinde ise anlamlı bir azalma saptandı, MDA düzeyleri ise değişmedi. NAC uygulaması ile ROS ve MDA düzeylerinin azaldığı, FRAP değerlerinin ise değişmediği bulundu (Tablo 4.8; Şekil 4.2).

b) 100 mg/kg HcyT uygulaması GSH düzeyleri ile SOD aktivitesini etkilemedi. GSH-Px aktivitesinde ise anlamlı bir artış oluşturdu. NAC uygulaması GSH

ve SOD'u etkilemedi , GSH-Px aktivitesinde anlamlı bir azalma oluşturdu (Tablo 4.9; Şekil 4.3).

c) 500 mg/kg HcyT uygulaması ile ROS ve MDA dőzeylerinde kontrol gruba göre sırasıyla % 46.0 ve % 27.2 oranlarında artış oldu, FRAP değerleri ise değişmedi. NAC uygulaması ROS ve MDA dőzeylerini azalttı, FRAP dőzeylerini ise etkilemedi (Tablo 4.8; Şekil 4.2).

d) 500 mg/kg HcyT uygulaması ile bėbrek GSH dőzeyleri değişmedi, ancak SOD ve GSH-Px aktivitesinde anlamlı bir artış bulundu. NAC uygulaması GSH dőzeylerini etkilemediği halde, artmış olan SOD ve GSH-Px aktivitesini azalttı (Tablo 4.9; Şekil 4.3).

Tablo 4-1: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) vücut, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ile karaciğer ve böbrek indeksi üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

Gruplar	Vücut ağırlığı (g)	Karaciğer ağırlığı (g)	Karaciğer indeksi (%)	Böbrek ağırlığı (g)	Böbrek indeksi (%)
Kontrol	289.7 \pm 13.0	7.88 \pm 0.58	2.72 \pm 0.11	2.06 \pm 0.21	0.71 \pm 0.07
NAC	296.2 \pm 14.6	8.38 \pm 0.73	2.82 \pm 0.15	2.06 \pm 0.21	0.69 \pm 0.06
HcyT-100	269.9 \pm 16.1	7.00 \pm 0.59 ^a	2.60 \pm 0.20	1.94 \pm 0.19	0.72 \pm 0.07
HcyT-100 + NAC	272.1 \pm 32.0	7.34 \pm 0.76	2.72 \pm 0.32	1.84 \pm 0.18	0.68 \pm 0.08
HcyT-500	240.6 \pm 16.2 ^{a,b}	6.32 \pm 0.57 ^{a,b}	2.63 \pm 0.16	1.71 \pm 0.12 ^a	0.71 \pm 0.05
HcyT-500 + NAC	250.5 \pm 24.0 ^a	7.25 \pm 1.40	2.88 \pm 0.33	1.84 \pm 0.25	0.71 \pm 0.07

^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 HcyT-100+NAC ve HcyT-500 grupları HcyT-100 grubu karşılaştırıldığında

Tablo 4-2: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum homosistein, glikoz, insülin ve HOMA değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

Gruplar	Homosistein (μ mol /L)	Glikoz (mg /dL)	İnsülin (ng / mL)	HOMA
Kontrol	7.27 \pm 1.21	119.5 \pm 11.9	0.60 \pm 0.12	4.42 \pm 1.01
NAC	7.06 \pm 0.93	114.2 \pm 15.8	0.71 \pm 0.05	5.06 \pm 0.87
HcyT-100	11.2 \pm 2.02 ^a	124.0 \pm 16.2	0.92 \pm 0.32	7.19 \pm 3.32
HcyT- 100 + NAC	7.94 \pm 1.83 ^b	114.8 \pm 10.8	0.79 \pm 0.27	5.60 \pm 2.08
HcyT 500	17.5 \pm 3.94 ^{a,b}	127.1 \pm 17.3	1.02 \pm 0.39 ^a	7.96 \pm 3.10 ^a
HcyT 500 + NAC	12.3 \pm 3.72 ^{a,c}	111.0 \pm 5.37	1.01 \pm 0.19 ^a	6.98 \pm 1.54 ^a

^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 HcyT-100+NAC ve HcyT-500 grupları HcyT-100 grubu ile; ^cp<0.05 HcyT-500+NAC grubu HcyT-500 grubu ile karşılaştırıldığında

Tablo 4-3: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum kolesterol, trigliserit, ALT, AST değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

Gruplar	Kolesterol (mg / dL)	Trigliserit (mg / dL)	ALT (U / L)	AST (U / L)
Kontrol	52.5 \pm 11.9	25.3 \pm 10.4	41.2 \pm 7.62	118.0 \pm 32.4
NAC	53.5 \pm 5.09	35.0 \pm 12.4	39.3 \pm 9.26	126.3 \pm 13.9
HcyT 100	53.3 \pm 9.18	30.3 \pm 7.39	40.2 \pm 5.90	126.2 \pm 34.8
HcyT 100 + NAC	44.8 \pm 7.05	30.1 \pm 10.0	35.3 \pm 2.87	126.1 \pm 12.0
HcyT 500	52.1 \pm 7.62	33.1 \pm 7.72	47.0 \pm 6.07	124.9 \pm 30.1
HcyT 500 + NAC	47.0 \pm 6.50	31.0 \pm 8.19	36.0 \pm 4.00 ^c	105.9 \pm 15.2

^cp<0.05 HcyT-500+NAC grubu HcyT-500 grubu ile karşılaştırıldığında

Tablo 4-4: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum total protein, albumin, BUN ve kreatinin değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

Gruplar	Total protein (g / L)	Albumin (g / L)	BUN (mg / dL)	Kreatinin (mg / dL)
Kontrol	5.61 \pm 0.36	3.61 \pm 0.12	23.2 \pm 3.31	0.40 \pm 0.11
NAC	5.85 \pm 0.28	3.40 \pm 0.11	21.3 \pm 2.58	0.38 \pm 0.07
HcyT 100	5.73 \pm 0.20	3.52 \pm 0.35	25.0 \pm 3.23	0.41 \pm 0.09
HcyT 100 + NAC	5.88 \pm 0.42	3.62 \pm 0.22	22.5 \pm 2.83	0.35 \pm 0.05
HcyT 500	5.82 \pm 0.47	3.38 \pm 0.48	25.8 \pm 4.13	0.34 \pm 0.05
HcyT 500 + NAC	5.77 \pm 0.33	3.52 \pm 0.24	22.0 \pm 3.80	0.36 \pm 0.05

Tablo 4-5: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum ROS, MDA ve uyarılmış MDA (uMDA) değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

Gruplar	ROS (rölatif floresan ünite)	MDA (μ mol /L)	Uyarılmış MDA (μ mol /L)
Kontrol	93.7 \pm 18.9	2.39 \pm 0.44	22.8 \pm 2.49
NAC	85.3 \pm 15.5	2.36 \pm 0.40	22.3 \pm 2.92
HcyT 100	118.4 \pm 32.9	2.93 \pm 0.67	21.8 \pm 2.85
HcyT 100 + NAC	123.0 \pm 28.8	2.60 \pm 0.57	20.3 \pm 4.45
HcyT 500	78.6 \pm 15.3 ^b	2.33 \pm 0.33	20.7 \pm 2.57
HcyT 500 + NAC	87.8 \pm 23.0	2.47 \pm 0.53	19.8 \pm 2.35

^bp<0.05 HcyT-100+NAC ve HcyT-500 grupları HcyT-100 grubu ile karşılaştırıldığında

Tablo 4-6: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) karaciğerde ROS, MDA ve FRAP değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

Gruplar	ROS (rölatif floresan ünite)	MDA (nmol /g)	FRAP (μ mol /L)
Kontrol	944.8 \pm 71.1	399.0 \pm 53.2	849.2 \pm 70.2
NAC	939.1 \pm 142.1	387.2 \pm 56.8	865.2 \pm 65.4
HcyT 100	1082.0 \pm 194.3	412.1 \pm 59.2	834.8 \pm 49.7
HcyT 100 + NAC	806.6 \pm 72.8 ^b	375.4 \pm 63.0	1075.7 \pm 72.2 ^{a,b}
HcyT 500	1530.1 \pm 177.4 ^{a,b}	515.0 \pm 38.5 ^{a,b}	808.3 \pm 75.4
HcyT 500 + NAC	963.0 \pm 128.3 ^c	386.7 \pm 73.7 ^c	1007.9 \pm 49.3 ^{a,c}

^ap<0.05 kontrol grubu ile; ^bp<0.05 HcyT-100+NAC ve HcyT-500 grupları HcyT-100 grubu ile ;^cp<0.05 HcyT-500+NAC grubu HcyT-500 grubu ile karşılaştırıldığında

Tablo 4-7: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) karaciğerde GSH, SOD ve GSH-Px değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

Gruplar	GSH (μ mol /L)	SOD (U/mg protein)	GSH-Px (nmol/dak/mg protein)
Kontrol	5.54 \pm 0.66	19.8 \pm 2.00	547.7 \pm 41.5
NAC	7.60 \pm 0.64 ^a	19.6 \pm 2.21	550.7 \pm 67.3
HcyT 100	6.15 \pm 0.28 ^a	19.1 \pm 2.40	572.2 \pm 79.8
HcyT 100 + NAC	6.03 \pm 0.50	20.2 \pm 2.52	597.0 \pm 90.5
HcyT 500	5.97 \pm 0.27	19.0 \pm 1.52	551.4 \pm 53.2
HcyT 500 + NAC	6.58 \pm 0.82 ^a	18.2 \pm 2.36	607.8 \pm 56.4

^ap<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

Tablo 4-8: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) böbrekte aktif oksijen radikalleri (ROS), malondialdehit (MDA) ve antioksidan aktivite (FRAP) değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

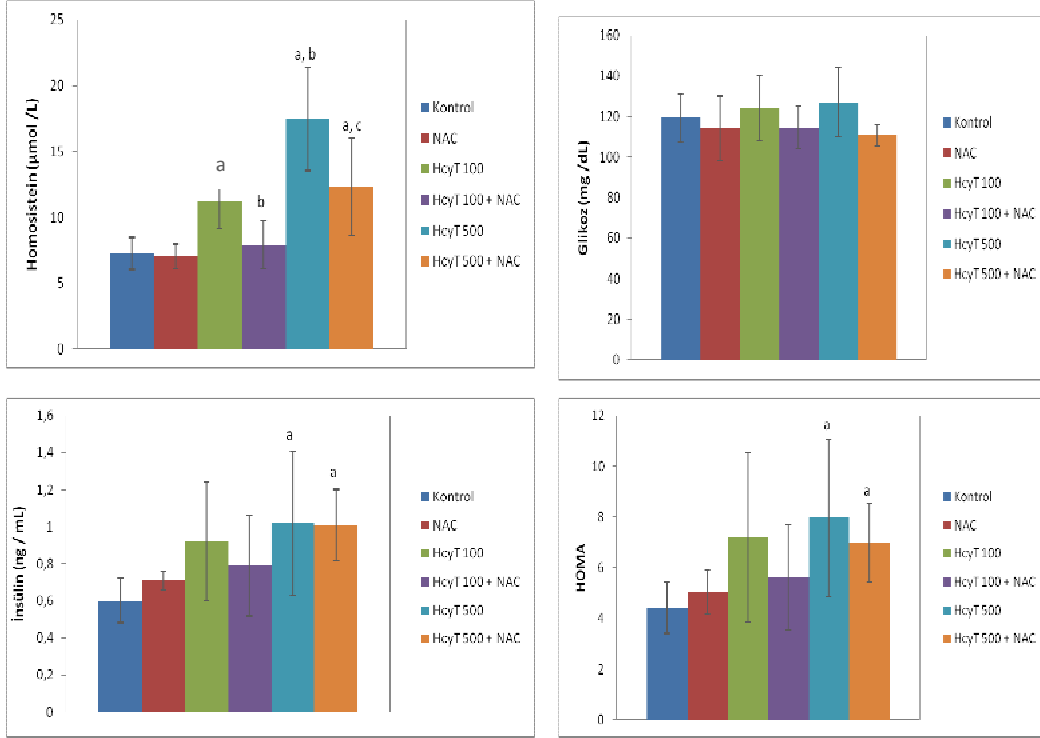
Gruplar	ROS (rölatif floresan ünite)	MDA (nmol /g)	FRAP (μ mol /L)
Kontrol	3180.8 \pm 209.3	283.2 \pm 15.3	388.7 \pm 34.8
NAC	3265.8 \pm 193.5	265.8 \pm 24.8	365.2 \pm 17.3
HcyT 100	4245.8 \pm 250.3 ^a	303.7 \pm 48.4	338.3 \pm 21.6 ^a
HcyT 100 + NAC	3782.0 \pm 408.2 ^{a,b}	242.0 \pm 43.0 ^{a,b}	407.8 \pm 24.8
HcyT 500	4643.3 \pm 433.6 ^a	360.4 \pm 14.9 ^{a,b}	361.8 \pm 30.0
HcyT 500 + NAC	3465.2 \pm 305.3 ^c	286.8 \pm 16.0 ^c	391.9 \pm 25.6

^ap<0.05 kontrol grubu ile; ^bp<0.05 HcyT-100+NAC ve HcyT-500 grupları HcyT-100 grubu ile ;^cp<0.05 HcyT-500+NAC grubu HcyT-500 grubu ile karşılaştırıldığında

Tablo 4-9: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) böbrekte GSH, SOD ve GSH-Px değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

Gruplar	GSH (μ mol /g)	SOD (U/mg protein)	GSH-Px (nmol/dak/mg protein)
Kontrol	1.68 \pm 0.13	10.5 \pm 1.41	237.6 \pm 27.4
NAC	1.72 \pm 0.76	10.8 \pm 1.05	241.2 \pm 13.5
HcyT 100	1.84 \pm 0.21	11.3 \pm 1.45	330.3 \pm 54.4 ^a
HcyT 100 + NAC	1.80 \pm 0.17	10.6 \pm 2.16	232.2 \pm 23.5 ^b
HcyT 500	1.75 \pm 0.28	17.2 \pm 3.81 ^{a,b}	365.2 \pm 56.1 ^a
HcyT 500 + NAC	1.61 \pm 0.20	10.8 \pm 1.44 ^c	218.3 \pm 26.2 ^c

^ap<0.05 kontrol grubu ile; ^bp<0.05 HcyT-100+NAC ve HcyT-500 grupları HcyT-100 grubu ile karşılaştırıldığında

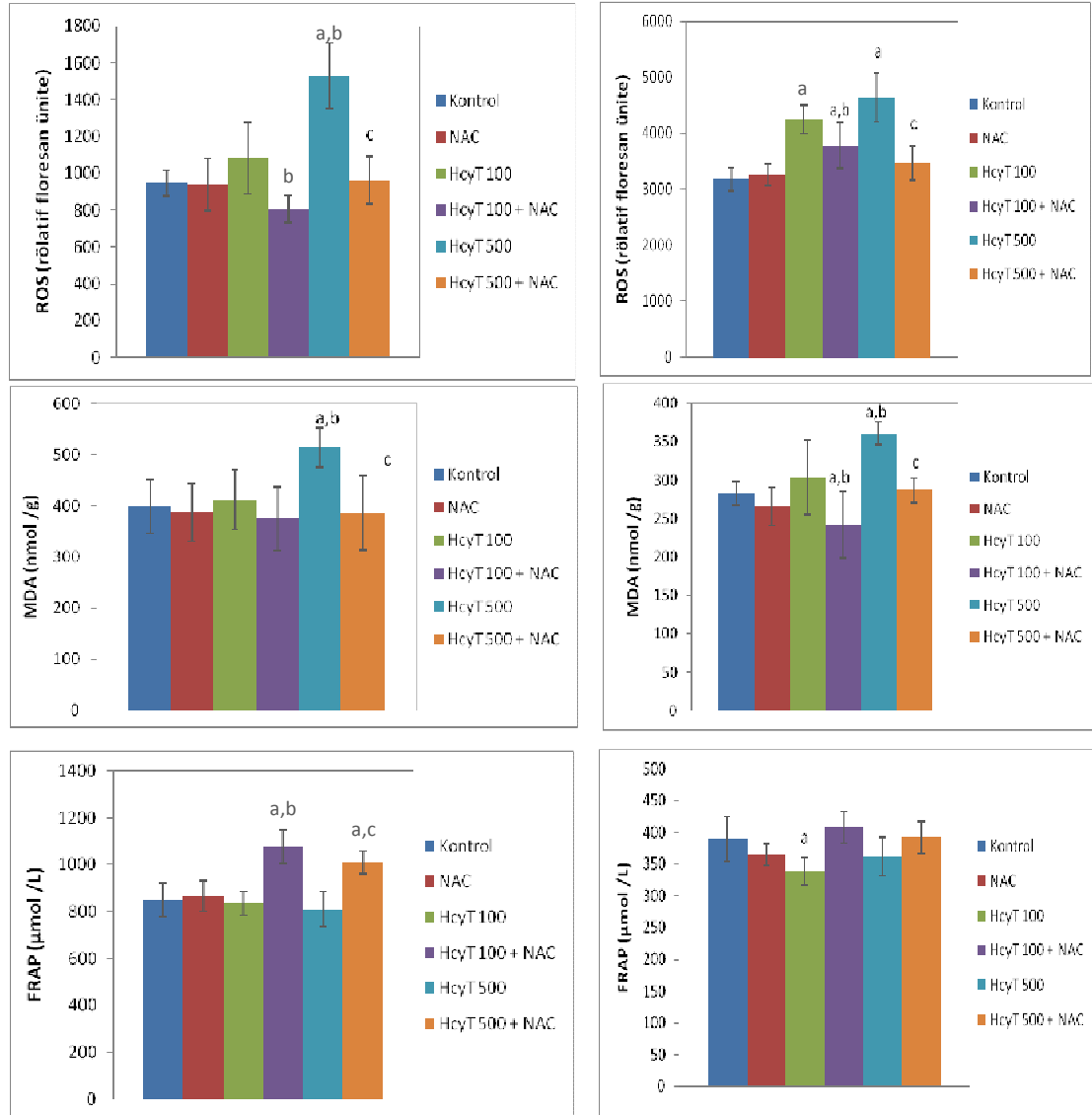


Şekil 4-1: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolakton (HcyT) uygulanan sığanlarda N-asetilsisteinin (NAC) serum homosistein, glikoz, insülin ve HOMA değerleri üzerine etkisi (Ortalama ± SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

^ap<0.05 kontrol grubu ile; ^bp<0.05 HcyT-100+NAC ve HcyT-500 grupları HcyT-100 grubu ile; ^cp<0.05 HcyT-500+NAC grubu HcyT-500 grubu ile karşılaştırıldığında

KARACİĞER

BÖBREK

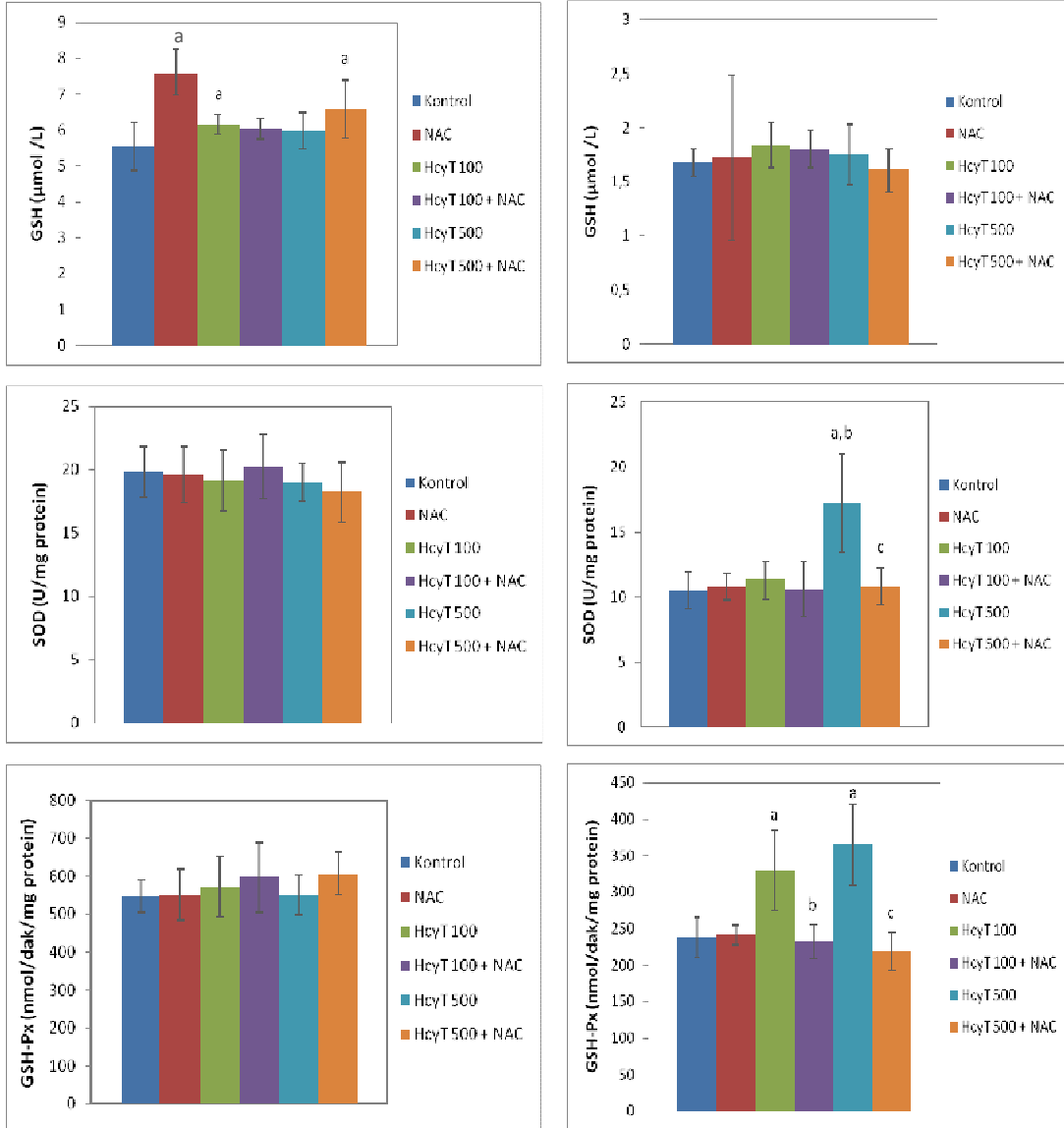


Şekil 4-2: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolaktin (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) karaciğer ve böbrekte aktif oksijen radikalleri (ROS), malondialdehit (MDA) ve antioksidan aktivite (FRAP) değerleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

^ap<0.05 kontrol grubu ile; ^b p<0.05 HcyT-100+NAC ve HcyT-500 grupları HcyT-100 grubu ile; ^cp<0.05 HcyT-500+NAC grubu HcyT-500 grubu ile karşılaştırıldığında

KARACİĞER

BÖBREK



Şekil 4-3: 6 hafta süre ile iki farklı dozda homosistein tiyolaktin (HcyT) uygulanan sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) karaciğer ve böbrekte GSH, SOD ve GSH-Px değerleri üzerine etkisi (Ortalama ± SD; kontrol ve NAC gruplarında n=6, diğer gruplarda n=10)

^ap<0.05 kontrol grubu ile; ^bp<0.05 HcyT-100+NAC ve HcyT-500 grupları, HcyT-100 grubu ile; ^cp<0.05 HcyT-500+NAC grubu, HcyT-500 grubu ile karşılaştırıldığında

5. TARTIŞMA

Hiperhomosisteineminin (hHcy) kan ve dokular üzerine toksik etkileri birçok klinik ve deneysel araştırmalara konu olmuştur. Bu alışmalar genellikle kalp-damar sistemi ve beyin üzerinde yoğunlaşmış olup bu dokularda transsülfürasyon yolunun yetersizliği toksik etkilerin belirgin olmasında etkili olmaktadır. Karaciğer ve böbrekler ise gerek remetilasyon gerekse transsülfürasyon enzim sistemlerine sahip olup organizmada Hcy birikimini önlemede etkin bir rol oynamaktadır. Aşırı Hcy birikimi bu dengeyi bozmakta, karaciğer ve böbrek dokularını etkilemektedir (34,80,103).

hHcy'nin karaciğer ve böbrek dokuları üzerine etkileri değişik deneysel modellerde incelenmiştir. Deneysel hHcy oluşturmak amacıyla farklı yöntemler kullanılmıştır. Diyetle veya içme suyu ile yüksek dozda metyonin uygulaması en sık kullanılan yöntemdir. Metyonin uygulaması, karaciğerde oksidatif ve nitrozatif stresi etkilemekte ve histopatolojik değişimlere neden olmaktadır (6,58,76,90,95,99). Bununla birlikte, uygulamanın plazma Hcy düzeylerini etkileme potansiyeli kullanılan hayvan türüne, metyonin dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak değişmektedir Öte yandan, metyonin oksidasyona duyarlı amino asitlerden biri olması yüzünden, metyonince zengin diyet uygulamasına bağlı olarak gelişen belirtilerin metyoninin kendisine mi yoksa gelişen hHcy mi bağlı olduğu tartışma konusudur (20,89,91).

Kolin/folat eksik diyetle besleme ve CBS enzim eksikliği olan genetik hayvan modelleri hHcy oluşturmak için kullanılan diğer yöntemler arasındadır. Kolin eksik diyetle beslenen sıçanlarda plazma ALT aktivitesinde ve karaciğerde yağlanma ile birlikte MDA düzeylerinde artış ve GSH düzeylerinde bir azalma bulunmuştur (14). Folat eksik diyetle beslenen farelerde ise (15) idrarda protein miktarının arttığı, glomerüllerde hasar ve böbreklerde superoksit oluşumunda bir artış saptanmıştır. Sıçanlarda da plazma ve böbreklerde MDA düzeylerinin, SOD ve GSH-Px aktivitelerinin arttığı, ancak serumda kreatinin, glikoz, kolesterol ve trigliserit düzeylerinin etkilenmediği bulunmuştur (43). Bir diğer çalışmada folat eksik diyetin sıçanlarda serum Hcy düzeylerinde 3 katlık bir artışa neden olduğu, serum BUN, kreatinin, albumin düzeyleri ile idrarda protein miktarının ise değişmediği bildirilmiştir (37). CBS enzim eksikliği olan farelerde de böbrek fonksiyonlarında bazı değişiklikler saptanmıştır (82).

Son yıllarda hHcy'nin doku düzeyindeki etkileri deney hayvanlarına Hcy, homosistin, HcyT gibi Hcy türevleri uygulanarak da incelenmekte ve böylece hHcy'nin direkt etkileri açığa çıkarılmak istenmektedir. Sauls ve ark. (79) 6 ve 12 aylık tavşanlara 8 hafta süre ile Hcy (30 mg/kg, i.p.; günde 2 kez) uyguladığında sıçanlarda serum Hcy düzeylerinde % 65'e varan bir artış olduğunu, serum folat düzeylerinin düştüğünü, karaciğerde MDA düzeylerinin arttığını, ancak serum ALT ve AST aktivitelerinin, glikoz ve B₁₂ düzeylerinin değişmediğini bulmuştur. Pexa ve ark. (70) ise %2 homosistin verilen sıçanlarda karaciğer ve böbreklerde Hcy düzeylerinin arttığını, bu artışın böbreklerde daha belirgin olduğunu saptamıştır. Bu araştırmacı %1 homosistin ve %1 metyonin içeren diyetleri 12 hafta süre ile sıçanlara uygulayarak olası etkileri karşılaştırmış ve metyoninin plazma Hcy düzeylerinde 5.9 katlık, homosistin ise 8.8 katlık bir artış oluşturduğunu bulmuştur. Ancak bu koşullarda serum kreatinin, folat ve B₁₂ vitamini düzeylerinde bir değişiklik bulamamıştır.

Öte yandan, Hcy toksisitesinde HcyT ve onun etkisiyle oluşan protein N-homosisteinilasyonu giderek önem kazanmaktadır (34,67,73,102). Homosisteinilasyona uğrayan proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının etkilendiği ve biyolojik aktivitelerinde önemli kayıplar olduğu bulunmuştur (34,67,102). HcyT'nin toksik etkilere sahip olduğu (48,65,101,107) ve bu etkisinin Hcy'den daha fazla olduğu in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (55,65,97). Bununla birlikte, HcyT ile yapılan in vivo çalışmalar oldukça azdır ve bazı çelişkiler içermektedir.

Akut HcyT uygulamasının farelerde ve sıçanlarda konvülziyonlara neden olduğu, bu durumun Na,K-ATPaz inhibisyonu ile ilişkili olduğu, aynı doz uygulanan Hcy'nin ise böyle bir etki oluşturmadığı saptanmıştır (74). 28 haftaya kadar uzayan bir süreçte HcyT (500 mg/kg/gün) uygulanan farelerde Hcy düzeylerinde 10 katlık bir artış, serum ALT ve AST aktivitelerinde ve MDA düzeylerinde bir artış, öğrenme yeteneğinde bozulma, beyinde protein agregatları birikimi saptanmış, buna karşılık beyin protein karbonil, MDA düzeyleri ile antioksidan enzim aktivitelerinde bir değişiklik bulunmamıştır (57).

6 hafta süre ile içme suyu ile HcyT (50 mg/kg/gün) uygulanan sıçanlarda plazma Hcy düzeylerinde % 70 oranında bir artış olduğu, bu uygulamanın plazma trigliserit düzeyleri artışı dışında, rutin biyokimya testlerinde bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır (23). Bir başka çalışmada da içme suyu ile verilen HcyT (50 mg/kg/gün; 6

hafta) serum lipit peroksit, glikoz, trigliserit ve kolesterol düzeylerinde ve aortanın yapısında bir değişiklik oluşturmamıştır. Ancak, sıçanlar HcyT uygulamasına ek olarak B₆ vitamini eksikliğine maruz bırakıldığında aorta da ateroskleroz benzeri değişiklikler oluştuğu saptanmıştır (17). Karotis arter yapısı ve damar fonksiyonları içme suyu ile 15-30 gün HcyT (1 g/kg/gün) uygulanan sıçanlarda incelenmiş ve bu damarların yapı ve fonksiyonlarında anlamlı değişiklikler oluştuğu bildirilmiştir (12,13).Ayrıca, 15 gün içme suyu ile HcyT (1 g/kg/gün) uygulanan sıçanlarda plazma Hcy düzeylerinin 9 kat civarında arttığı, kan basıncı, kalp hızı ve damar fonksiyonlarında değişiklikler olduğu saptanmıştır (75). Benzer şekilde, Mendes ve ark. (54) 8 hafta süreyle gavaıyla HcyT (100 mg/kg/gün) ve metyonin (100 mg/kg/gün) uygulanan sıçanlarda plazma Hcy düzeylerinin aynı oranda arttığını, HcyT uygulamasının kalpte prooksidan bir durum yarattığını ve kalp fonksiyonlarında değişiklikler oluşturduğunu, bu değişikliklerin metyonin uygulanan sıçanlarda oluşmadığını bildirdiler.

Karaciğer ve böbrek düzeyinde HcyT kullanılarak yapılan sadece iki çalışma bulunmaktadır. Stangl ve ark. (87) sıçanların yemlerine 2.8 g ve 5.6 g/kg olacak şekilde HcyT ekleyerek 14 gün süre ile beslemişler ve bu uygulamanın 100 mg/kg ve 200 mg/kg Hcy dozlarına eşdeğer olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmalarında serum Hcy düzeylerinin uygulanan Hcy dozuna paralel olarak 3 ve 6.5 katlık artış gösterdiğini, karaciğerde HcyT düzeylerinde benzer bir artış olduğunu, bu uygulamaların plazma ve karaciğerde kolesterol düzeylerini etkilemediğini, sıçanların vücut ve karaciğer ağırlığında ve karaciğer indeksinde bir değişiklik oluşturmadığını bulmuşlardır. Ossani ve ark. (66) 10 ve 44 hafta süre ile sıçanlara HcyT (50 mg/kg/gün) uyguladığında, 10 hafta sonra serum Hcy düzeylerinin %53, 44 hafta sonra ise %56 yükseldiğini bulmuştur. Bu araştırmacılar böbreklerde histopatolojik ve morfometrik değişiklikler gözlenmediğini, ancak glomerüler filtrasyon hızı ve renal plazma akımında bir azalma olduğunu bildirmişler ve ılımlı hHcy'nin böbreklerde fonksiyonel, biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler oluşturmadığını ileri sürmüşlerdir.

Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda öncelikle 6 hafta süre ile iki farklı dozda HcyT (100 ve 500 mg/kg) uygulanan sıçanlarda Hcy düzeylerinin ne oranda arttığı ve bu koşullarda karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında ve prooksidan-antioksidan dengede bir değişiklik olup olmadığı ilk kez incelenmek istendi. 100 ve 500 mg/kg HcyT uygulaması sıçanların serum Hcy düzeylerinde sırasıyla % 54 ve % 140 oranlarında bir

artış oluşturdu. 500 mg/kg HcyT uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda ROS ve MDA düzeylerinin arttığı, antioksidan göstergelerde bir değişiklik olmadığı bulundu. 500 mg/kg HcyT uygulaması böbrek dokusunda da ROS ve MDA düzeylerinin yanı sıra, SOD ve GSH-Px aktivitesinde de artışlara neden oldu. Buna karşılık, 100 mg/kg HcyT uygulamasından sonra karaciğerde prooksidan-antioksidan dengede belirgin bir değişiklik olmadığı halde, böbreklerde ROS düzeyleri ile GSH-Px aktivitesinde artış, FRAP düzeylerinde bir azalma bulundu. Bu bulgular yüksek doz HcyT uygulamasının sıçanlarda karaciğerde ve böbrekte prooksidan bir etki yarattığını açıkça göstermektedir. Buna karşılık, serumda ROS ve lipid peroksit düzeylerinde bir değişiklik bulunmadı. Ayrıca, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için kullandığımız serum testlerinde de bir değişiklik saptanmadı. Serum bulgularımız literatürdeki bazı çalışmalarla uyum göstermektedir (17,23,66).

Öte yandan, çalışmamızda HcyT uygulamasının insülin direnci üzerine etkisi de incelendi. Giriş bölümünde de belirtildiği gibi, hHcy'nin insülin direncine sebep olduğu, oluşan insülin direncinin hHcy'yi arttırarak kısır bir döngüye neden olduğu öne sürülmektedir (25,26,45,46,61). Çalışmamızda, 100 ve 500 mg/kg HcyT uygulamalarından sonra insülin ve HOMA değerlerinde artışlar bulundu, ancak bu artışların sadece 500 mg/kg HcyT uygulanan sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Bu sonuçlar, HcyT uygulamasının sıçanlarda bir insülin direnci oluşturduğunu açıkça göstermektedir.

hHcy'e bağlı toksik etkilerin oluşumunda oksidatif stresin öneminin belirlenmesi ile birlikte, çeşitli antioksidanların bu toksisiteyi önleme/azaltma potansiyelleri de araştırılmaya başlanmıştır (1,6,10,31,35,49,99). N-asetilsistein (NAC) hücreleri koruyucu etkilere sahip antioksidan bir bileşiktir. Bir serbest radikal tutucusu gibi davranır ve organizmada GSH düzeylerinde artışa neden olur (39,78,104). Son yıllarda parasetamol zehirlenmesi, iskemik kalp hastalığı, kemoterapiye bağlı toksisitelerin önlenmesi, ağır metal zehirlenmeleri gibi çeşitli klinik durumlarda kullanılmaktadır (39,78,104). Ayrıca insülin direnci üzerine de yararlı olabileceği bildirilmiştir (16). NAC'ın IR üzerine etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, antioksidan potansiyeli ve proteinlerin sülfidril gruplarını koruyucu etkileri NAC'in etkilerinden sorumlu tutulmaktadır (39,78,104).

Bilebildiğimiz kadarıyla, NAC'in hHcy koşullarında *in vivo* etkisini araştıran deneysel bir çalışma bulunmamaktadır. Sadece civciv embriyolarında yapılan *in vitro* çalışmada NAC'ın Hcy ile indüklenen oksidatif stresi ve apoptozisi baskıladığı saptanmıştır (28). Çalışmamızda içme suyu ile iki farklı dozda HcyT uygulanan sıçanlara NAC 10 g/kg olacak şekilde normal sıçan yemine karıştırılarak 6 hafta süreyle uygulandı. Günlük doz, sıçanların yem tüketimleri dikkate alındığında yaklaşık 0.8-1.0 g/kg'a karşılık olup, bu doz etkin doz olarak kullanılmıştır (40,83,86,98).

Sonuçlarımıza göre, NAC uygulaması HcyT uygulanan sıçanlarda Hcy düzeylerinde anlamlı bir azalmaya yol açtı. Gerçekten, NAC'ın böbrek yetmezliği hastalarında serum Hcy düzeylerini azalttığı ve kardiyovasküler komplikasyonların azaltılmasında yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (9,68). NAC'ın bu etkisini proteine bağlı Hcy'de disülfid köprülerini kırarak yaptığı bildirilmiştir (68). Ayrıca, NAC'ın HcyT uygulamasına bağlı olarak karaciğer ve böbrekte ROS ve MDA düzeyleri ile böbrekte SOD ve GSH-Px aktivitelerinde saptanan artışları azalttığı bulundu. Buna karşılık, NAC uygulamasından sonra karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını belirlemek için kullanılan testlerde hiçbir değişiklik bulunmadı. Bu sonuçlar, NAC'ın HcyT uygulamasıyla artan Hcy düzeyleri ile karaciğer ve böbreklerde prooksidan durumu iyileştirmede etkili olduğunu gösterdi. Ancak, NAC uygulamasının insülin direncini düzeltici bir etkiye sahip olduğu bildirilmekle birlikte (16,39,40,86), çalışmamızda HcyT'e bağlı insülin direnci üzerinde olumlu bir etki yaratmadı.

Sonuç olarak, özellikle yüksek dozda HcyT uygulaması ılımlı bir hHcy, insülin direnci, karaciğer ve böbreklerde prooksidan durum oluşturdu. Bu koşullarda karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerinde bir değişiklik saptanmadı. NAC uygulaması Hcy düzeyleri ile dokularda prooksidan durumu iyileştirmede etkili oldu, insülin direncindeki artışı ise düzeltmedi.

KAYNAKLAR

1. Ansari MN, Bhandari U. Protective effect of *Embelia ribes burm* on methionine-induced hyperhomocysteinemia and oxidative stress in rat brain. *Indian J Exp Biol* 2008; 46: 521-527.
2. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 2004; 11: S56-S64.
3. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
4. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-888.
5. Boldyrev, A.A. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. *Biochemistry (Moscow)* 2009; 74: 589-598.
6. Boyacioglu M, Sekkin S, Kum C, Korkmaz D, Kiral F, Yalinkilinc HS, Ak MO, Akar F. The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Exp Toxicol Pathol* 2014; 66: 407-413.
7. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310.
8. Cacciapuoti F. Hyper-homocysteinemia: a novel risk factor or a powerful marker for cardiovascular diseases? Pathogenetic and therapeutical uncertainties. *J Thromb Thrombolysis* 2011; 32: 82-88.
9. Cacciapuoti F. Lowering homocysteine levels may prevent cardiovascular impairments? Possible therapeutic behaviors. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23: 677-679.
10. Chang L, Xu J, Yu F, Zhao J, Tang X, Tang C. Taurine protected myocardial mitochondria injury induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Amino Acids* 2004; 27: 37-48.

11. Chwatko G, Jakubowski H. Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans. *Clin Chem* 2005; 51: 408-415.
12. De Andrade CR, Fukada SY, Olivon VC, de Godoy MA, Haddad R, Eberlin MN, Cunha FQ, de Souza HP, Laurindo FR, de Oliveira AM. Alpha1D-adrenoceptor-induced relaxation on rat carotid artery is impaired during the endothelial dysfunction evoked in the early stages of hyperhomocysteinemia. *Eur J Pharmacol* 2006; 543: 83-91.
13. De Andrade CR, Tirapelli CR, Haddad R, Eberlin MN, Ramalho LN, Iyomasa MM, Uyemura SA, de Oliveira AM. Hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in DL-homocysteine thiolactone promotes alterations on carotid reactivity independent of arterial structure. *Vascul Pharmacol* 2009; 51: 291-298.
14. Deminice R, Rosa FT, da Silva LE, Jordao AA. Taurine supplementation does not decrease homocysteine levels and liver injury induced by a choline-deficient diet. *Life Sci* 2014; 105: 43-47.
15. Díez N, Pérez R, Hurtado V, Santidrián S. Hyperhomocysteinemia induced by dietary folate restriction causes kidney oxidative stress in rats. *Br J Nutr* 2005; 94: 204-210.
16. El Midaoui A, Ismael MA, Lu H, Fantus IG, de Champlain J, Couture R. Comparative effects of N-acetyl-L-cysteine and ramipril on arterial hypertension, insulin resistance, and oxidative stress in chronically glucose-fed rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 752-760.
17. Endo N, Nishiyama K, Otsuka A, Kanouchi H, Taga M, Oka T. Antioxidant activity of vitamin B6 delays homocysteine-induced atherosclerosis in rats. *Br J Nutr* 2006; 95: 1088-1093.
18. Eren E, Ellidag HY, Aydin O, Yilmaz N. Homocysteine, paraoxonase-1 and vascular endothelial dysfunction. *J Clin Diagn Res* 2014; 8: 01-04.
19. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1040-1052.
20. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-879.

21. Finkelstein, J.D. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 219-225.
22. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33: 829-837.
23. Frauscher G, Karnaukhova E, Muehl A, Hoeger H, Lubec B. Oral administration of homocysteine leads to increased plasma triglycerides and homocysteic acid-additional mechanisms in homocysteine induced endothelial damage? *Life Sci* 1995; 57: 813-817.
24. Fuhrman B, Volkova N, Kaplan M, Presser D, Attias J, Hayek T, Aviram M. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels, and decreased systolic blood pressure. *Nutrition* 2002; 18: 268-273.
25. Golbahar J, Aminzadeh MA, Kassab SE, Omrani GR. Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male Sprague-Dawley rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 76: 1-5.
26. Gürsu MF, Baydaş G, Cikim G, Canatan H. Insulin increases homocysteine levels in a dose-dependent manner in diabetic rats. *Arch Med Res* 2002; 33: 305-307.
27. Hamilton SJ, Watts GF. Endothelial dysfunction in diabetes: Pathogenesis, significance, and treatment. *Rev Diabet Stud* 2013; 10: 133-156.
28. Han ZJ, Cui Y, Song G, Xia HF, Ma X. Protective effects of N-acetylcysteine on homocysteine induced injury in chick embryos. *Front Biosci* 2010; 2: 940-947.
29. Herrmann M, Taban-Shoma O, Hübner U, Pexa A, Kilter H, Umanskaya N, Straub RH, Böhm M, Herrmann W. Hyperhomocysteinemia and myocardial expression of brain natriuretic peptide in rats. *Clin Chem* 2007; 53: 773-780.
30. Herrmann W, Obeid R. 2011. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 435-441.
31. Hoffman M.. Hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. *Med Hypotheses* 2011; 77: 1088-1093.

32. Hwang SY, Siow YL, Au-Yeung KK, House J, O K. Folic acid supplementation inhibits NADPH oxidase-mediated superoxide anion production in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300: F189-98.
33. Jacobs RL, House JD, BrosnanME, Brosnan JT. Effects of streptozotoin-induced diabetes and of insulin administration on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes* 1998; 47: 1967-1970.
34. Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006; 136: 1741-1749.
35. Joseph J, Joseph L, Devi S, Kennedy RH. Effect of anti-oxidant treatment on hyperhomocysteinemia-induced myocardial fibrosis and diastolic dysfunction. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27: 1237-1241.
36. Karolczak K, Olas B. Mechanism of action of homocysteine and its thiolactone in hemostasis system. *Physiol Res* 2009; 58: 623-633.
37. Kumagai H, Katoh S, Hirosawa K, Kimura M, Hishida A, Ikegaya N. Renal tubulointerstitial injury in weanling rats with hyperhomocysteinemia. *Kidney Int* 2002; 62: 1219-1228.
38. Lai WKC, Kan MY. Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Ann Nutr Metab* 2015; 67: 1-12.
39. Lasram MM, Dhouib IB, Fazaa SE, Gharbi N. A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. *Clin Biochem* 2015 (Baskıda)
40. Lasram MM, El-Golli N, Lamine AJ, Douib IB, Bouzid K, Annabi A, El Fazaa S, Abdelmoula J, Gharbi N. Changes in glucose metabolism and reversion of genes expression in the liver of insulin-resistant rats exposed to malathion. The protective effects of N-acetylcysteine. *Gen Comp Endocrinol* 2015; 215: 88-97.
41. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.
42. Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E, Billiar TR. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide* 2013; 35: 175-185.

43. Li C, Xia M, Abais JM, Liu X, Li N, Boini KM, Li PL. Protective role of growth hormone against hyperhomocysteinemia-induced glomerular injury. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2013; 386: 551-561.
44. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014; 237: 208-219.
45. Li Y, Jiang C, Xu G, Wang N, Zhu Y, Tang C, Wang X. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro. *Diabetes* 2008; 57: 817-827.
46. Li Y, Zhang H, Jiang C, Xu M, Pang Y, Feng J, Xiang X, Kong W, Xu G, Li Y, Wang X. Hyperhomocysteinemia promotes insulin resistance by inducing endoplasmic reticulum stress in adipose tissue. *J Biol Chem* 2013; 288: 9583-9592.
47. Lynch SM, Strain JJ. Increased hepatic lipid peroxidation with methionine toxicity in the rat. *Free Radic Res Commun* 1989; 5: 221-226.
48. Malinowska J, Babicz K, Olas B, Stochmal A, Oleszek W. Aronia melanocarpa extract suppresses the biotoxicity of homocysteine and its metabolite on the hemostatic activity of fibrinogen and plasma. *Nutrition* 2012; 28: 793-798.
49. Malinowska J, Kolodziejczyk J, Olas B. The disturbance of hemostasis induced by hyperhomocysteinemia; the role of antioxidants. *Acta Biochim Pol* 2012; 59: 185-194.
50. Mangat GS, Jaggi AS, Singh N. Ameliorative effect of a selective endothelin ETA receptor antagonist in rat model of L-methionine-induced vascular dementia. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18: 201-209.
51. Matte C, Stefanello FM, Mackedanz V, Pederzolli CD, Lamers ML, Dutra-Filho CS, dos Santos MF, Wyse ATS. Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats. *Int J Devl Neuroscience* 2009; 27: 337-344.
52. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003; 26: 137-146.

53. Meigs JB, Jacques PF, Selhub J, Singer DE, Nathan DM, Rifai N, D'Agostino RB, Wilson PWF. Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 2001; 24: 1403-1410.
54. Mendes RH, Sirvente RA, Candido GO, Mostarda C, Salemi VM, D'Almeida V, Jacob MH, Ribeiro MF, Belló-Klein A, Rigatto K, Irigoyen MC. Homocysteine thiolactone induces cardiac dysfunction: role of oxidative stress. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 55: 198-202.
55. Mercie P, Garnier O, Lascoste L, Renard M, Closse C, Durrieu F, Marit G, Boisseau RM, Belloc F. Homocysteine thiolactone induces caspase-independent vascular endothelial cell death with apoptotic features. *Apoptosis* 2000; 5: 403-411.
56. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2009; 42: 1331-1346.
57. Miyazaki Y, Sugimoto Y, Fujita A, Kanouchi H. Ethanol extract of Brazilian propolis ameliorates cognitive dysfunction and suppressed protein aggregations caused by hyperhomocysteinemia. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015; 19: 1-6.
58. Mori N, Hirayama K. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J Nutr* 2000; 130: 2349-2355.
59. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 82: 512-520.
60. Najib S, Sanchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and protein synthesis: possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and p70 S6K phosphorylation. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 119-126.
61. Najib S, Sánchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *J Mol Endocrinol* 2001; 27: 85-91.
62. 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. *J Physiol Biochem* 2013; 69: 441-449.

63. Obeid R, Hermann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 2006; 580: 2994-3005.
64. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-358.
65. Olas B, Kontek B. Hydrogen sulfide decreases the plasma lipid peroxidation induced by homocysteine and its thiolactone. *Mol Cell Biochem* 2015; 404: 39-43.
66. Ossani GP, Fischer PA, Caram SG, Dominguez GN, Monserrat AJ, Masnatta LD. Mild hyperhomocysteinemia promotes renal hemodynamic dysfunction without histopathologic changes in adult rats. *Kidney Int* 2004; 66: 1866-1872.
67. Perla-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. Review. *Amino Acids* 2007; 32: 561-572.
68. Perna AF, Sepe I, Lanza D, Pollastro RM, De Santo NG, Ingrosso DJ. Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure: alternative therapeutic strategies. *Ren Nutr* 2012; 22: 191-194.
69. Petras M, Tatarkova Z, Kovalska M, Mokra D, Dobrota D, Lehotsky J, Drgova A. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. Review. *J Physiol Pharmacol* 2014; 65: 15-23.
70. Pexa A, Herrmann M, Taban-Shomal O, Henle T, Deussen A. Experimental hyperhomocysteinemia: differences in tissue metabolites between homocystine and methionine feeding in a rat model. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 197: 27-34.
71. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015; 97: 55-74.
72. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res Intern* 2014; 2014; 761264.
73. Ramakrishnan S, Sulochana KN, Lakshmi S, Selvi R, Angayarkanni N. Biochemistry of homocysteine in health and diseases. *Indian J Biochem Biophys* 2006; 43: 275-283.

74. Rasić-Marković A, Stanojlović O, Hrncić D, Krstić D, Colović M, Susić V, Radosavljević T, Djuric D. The activity of erythrocyte and brain Na⁺/K⁺ and Mg²⁺-ATPases in rats subjected to acute homocysteine and homocysteine thiolactone administration. *Mol Cell Biochem* 2009; 327: 39-45.
75. Resstel LB, de Andrade CR, Haddad R, Eberlin MN, de Oliveira AM, Corrêa FM. Hyperhomocysteinaemia-induced cardiovascular changes in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35: 949-956.
76. Robin S, Courdeot-Masuyer C, Nicod L, Jacqueson A, Richert L, Berthelot A. Opposite effect of methionine-supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 80-89.
77. Sain H, Sharma B, Jaggi AS, Singh N. Pharmacological investigations on potential of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in hyperhomocysteinemia-induced vascular dementia in rats. *Neuroscience* 2011; 192: 322-333.
78. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4117-4129.
79. Sauls DL, Boyd LC, Allen JC, Hoffman M. Differences in the metabolic response to exogenous homocysteine in juvenile and adult rabbits. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 96-102.
80. Schalinske KL, Smazai AL. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv Nutr* 2012; 3: 755-762.
81. 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 chronicmildhyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29: 693-699.
82. Sen U, Basu P, Abe OA, Givvimani S, Tyagi N, Metreveli N, Shah KS, Passmore JC, Tyagi SC. Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297: F410-F419.
83. Setshedi M, Longato L, Petersen DR, Ronis M, Chen WC, Wands JR, de la Monte SM. Limited therapeutic effect of N-acetylcysteine on hepatic insulin

- resistance in an experimental model of alcohol-induced steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011; 35: 2139-2151.
84. Singh AP, Kaur T, Singh Dahiya R, Singh N, Singh BPM. Ameliorative role of rosiglitazone in hyperhomocysteinemia-induced experimental cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 56: 53-59.
 85. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
 86. Song D, Hutchings S, Pang CCY. Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 508: 205-210.
 87. Stangl GI, Weisse K, Dinger C, Hirche F, Brandsch C, Eder K. Homocysteine thiolactone-induced hyperhomocysteinemia does not alter concentrations of cholesterol and SREBP-2 target gene mRNAs in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 81-87.
 88. Steed MM, Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 1927-1943.
 89. Toborek M, Henning B. Dietary methionine imbalance, endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. *Nutr Res* 1996; 16: 1251-1266.
 90. Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drozd M, Wieczorek M. Increased lipid peroxidation and antioxidant activity in methionine-induced hepatitis in rabbits. *Nutrition* 1996; 12: 534-537.
 91. Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J. The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15089-15094.
 92. Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. *Biyokimya*, Editörler: F. Gürdöl ve E. Ademoğlu, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2012, s. 647-652.
 93. Walker E, Black J, Parris C, Bryda EC, Cansino S, Hunt L, Chappell J, Wehner P, Studeny M, Wright GL. Effect of experimental hyperhomocysteinemia on cardiac structure and function in the rat. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34: 175-180.

94. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 612-616.
95. Woo CW, Prathapasinghe GA, Siow YL, O K. Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: Protective effect of folic acid supplementation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 656-665.
96. Wu CC, Zheng CM, Lin YF, Lo L, Liao MT, Lu KC. Role of homocysteine in end-stage renal disease. *Clin Biochem* 2012; 45: 1286-1294.
97. Wu S, Gao X, Yang S, Meng M, Yang X, Ge B. The role of endoplasmic reticulum stress in endothelial dysfunction induced by homocysteine thiolactone. *Fundam Clin Pharmacol* 2015; 29: 252-259.
98. Xia Z, Guo Z, Nagareddy PR, Yuen V, Yeung E, McNeill JH. Antioxidant N-acetylcysteine restores myocardial Mn-SOD activity and attenuates myocardial dysfunction in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2006; 544: 118-125.
99. Yalçinkaya S, Unlüçerçi Y, Giriş M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: protective effect of taurine. *Nutrition* 2009; 25: 436-444.
100. Yalçinkaya-Demirsöz S, Depboylu B, Dogru-Abbasoglu S, Unlüçerçi Y, Uysal M. Effects of high methionine diet on oxidative stress in serum, apo-B containing lipoproteins, heart, and aorta in rabbits. *Ann Clin Lab Sci* 2009; 39: 386-391.
101. Yang XH, Li P, Yin YL, Tu JH, Dai W, Liu LY, Wang SX. Rosiglitazone via PPAR γ -dependent suppression of oxidative stress attenuates endothelial dysfunction in rats fed homocysteine thiolactone. *J Cell Mol Med* 2015;19: 826-835.
102. Yılmaz N. Relationship between paraoxonase and homocysteine: crossroads of oxidative diseases. *Arch Med Sci* 2012; 8: 138-153.
103. Yi F, Li PL. Mechanisms of homocysteine-induced glomerular injury and sclerosis. *Am J Nephrol* 2008; 28: 254-264.
104. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 6-20.
105. Zhang F, Siow YL, O K. Hyperhomocysteinemia activates NF-kappaB and inducible nitric oxide synthase in the kidney. *Kidney Int*. 2004; 65: 1327-1338.

106. Zimny J, Sikora M, Guranowski A, Jakubowski H. Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 2006; 281: 22485-22492.
107. Zivkovic V, Jakovljevic V, Pechanova O, Srejovic I, Joksimovic J, Selakovic D, Barudzic N, Djuric DM. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: the role of different gasotransmitters. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 318471.

ETİK KURUL KARARI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gamze	Soyadı	KONDAKÇI
Doğ.Yeri	BAKIRKÖY	Doğ.Tar.	14.11.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	23206302570
Email	gamzekondakci@gmail.com	Tel	05393768356

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. İTF BİYOKİMYA ANABİLİM DALI	2015
Lisans	AİBÜ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ	2011
Lise	OSMAN ÜLKÜMEN LİSESİ	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Klinik Araştırma Koordinatörü	ATLAS CRO Medikal	2013-devam
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

2011 / 2.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, Poster İkincilik Ödülü

Özel İlgil Alanları (Hobileri):

Film festivallerine katılmak