

HOMOSİSTEİNİN İNDÜKLEDİĞİ OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE SİYAH ÜZÜM SUYUNUN KORUYUCU ETKİSİ

Kimyager Elif KAĞA

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN
Tez No: 2007-038

2007 – AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HOMOSİSTEİNİN İNDÜKLEDİĞİ OKSİDATİF STRES ÜZERİNE SİYAH
ÜZÜM SUYUNUN KORUYUCU ETKİSİ**

Kimyager Elif KAĞA

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN

2007 – AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.08.2007

Doç. Dr. Tülay KÖKEN
ÜYE

Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN
ÜYE

Biyokimya Anabilim Dalı yüksek Lisans öğrencisi Elif KAĞA'nın
“Homosisteinin İndüklediği Oksidatif Stres Üzerine Siyah Üzüm Suyunun Koruyucu
Etkisi” başlıklı tezi 28/08/2007 günü saat 10:00'da lisansüstü eğitim ve öğretim sınav
yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Yavuz DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN yönetiminde hazırlanarak Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü' ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Tez konusunun seçimi, çalışmanın planlanması ve yürütülmesi sırasında ilgi ve alakasını esirgemeyen değerli destek ve yardımlarını gördüğüm sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Eğitimim süresince, yetişmemde değerli katkıları olan bilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen kıymetli hocam Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Tülay KÖKEN'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini sınırsız sundukları için sevgili aileme, anneme ve babama sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren desteğini esirgemeyen sevgili eşim Arş. Gör. Sadık KAĞA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmanın sürdüğü 30 gün boyunca ratların bakım aşamasında ve biyokimyasal analizlerin yapılmasında her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Bio. Naime KOCABAŞ'a, ratların kesim aşamasında, bilgi ve emeklerini esirgemeyen Arş. Gör. Murat KUŞ, Arş. Gör. Ayhan VURMAZ ve Arş. Gör. Zafer SÖYLEMEZ'e sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Bize rahat bir çalışma ortamı sunan Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi Başkanı sayın Doç. Dr. Zehra BOZKURT'a teşekkür ederim.

Son olarak eğitimim ve tez çalışmam süresince sıcak ilgi ve alakalarından dolayı, Rektörlük Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Homosistein	3
2.1.1. Homosistein Metabolizması	5
2.1.2. Hiperhomosisteinemi Nedenleri	7
2.1.3. Hiperhomosisteinemi ve KVH ile Bağlantısı	8
2.1.4. Homosistinüri	9
2.2. Oksidatif Stres	11
2.2.1. Serbest Radikaller	12
2.2.1.1. Süperoksit Anyon Radikali (O ₂ ⁻)	14
2.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	15
2.2.1.3. Hidroksil Radikali (·OH)	16
2.2.1.4. Singlet Oksijen (¹ O ₂)	17
2.2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	17
2.2.2.1. Membran Lipitleri Üzerine Etkileri	19
2.2.2.2. Proteinler Üzerine Etkileri	20
2.2.2.3. Tiyol Gruplarının Oksidasyonu	24
2.2.2.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri	24
2.2.2.5. DNA Üzerine Etkileri	25
2.3. Antioksidanlar	25

2.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	27
2.3.2. Glutasyon S-Transferazlar (GST)	28
2.3.3. Katalaz (KAT)	28
2.3.4. Glutasyon Redüktaz	29
2.3.5. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	29
2.3.6. Mitokondriyal sitokrom oksidaz	29
2.3.7. Redükte Glutasyon (GSH)	30
2.3.8. Melatonin	31
2.3.9. Vitamin C (Askorbik asit)	31
2.3.10. Vitamin E (α - tokoferol)	31
2.3.11. Karotenler	32
2.3.12. Transferrin	32
2.3.13. Sistein	33
2.3.14. Metionin	33
2.4. Siyah Üzüm (<i>Vitis vinifera</i>)	33
2.4.1. Siyah Üzümün Fenolik İçeriği	34
2.4.2. Flavonoidler	35
3. MATERYAL VE METOT	38
3.1. Materyal	38
3.1.1. Hayvan Materyali	38
3.1.2. Üzüm Suyu Temini ve Uygulaması	38
3.1.3. Homosisteinin Temini ve Uygulanışı	39
3.2. Metot	39
3.2.1. Kan örneklerinin alınması ve hazırlanması	40
3.2.2. Biyokimyasal analizler	40
3.2.2.1. Eritrosit Paketi Ve Dilüsyonlu Stok Hazırlanması	40
3.2.2.2. Hemoglobin Tayini	41
3.2.2.3. Plazma MDA Düzeylerinin tayini	41
3.2.2.4. Plazma Protein Karbonil Grupları Tayini	42
3.2.2.5. Eritrosit GSH Tayini	44
3.2.2.6. Plazma -SH Grupları Tayini	45
3.2.2.7. Eritrosit SOD Aktivite Tayini	46

3.2.2.8. Eritrosit Katalaz Aktivite Tayini	47
3.2.2.9. Total Fenolik İçerik Tayini	48
3.2.3. İstatistiksel Analizler	49
4. BULGULAR	50
4.1. Plazma MDA Düzeyleri	50
4.2. Plazma Karbonil Grupları	51
4.3. Eritrosit Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyleri	52
4.4. Plazma Sülfhidril (-SH) Grupları	53
4.5. Eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) Aktiviteleri	54
4.6. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktiviteleri	55
4.7. Toplam Fenolik İçerik	56
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ	66
7. KAYNAKLAR	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Alfa
ADH	: Alkol dehidrogenaz
AOPP	: İleri oksidasyon protein ürünleri
B	: Beta
BHMT	: Betain-homosistein metil transferaz
Br	: Brom
CAT	: Katalaz
CBS	: Sistatyonin β -sentaz
CH ₂ THF	: 5,10-metilentetrahidrofolat
CH ₃ THF	: 5-metiltetrahidrofolat
Cl	: Klor
Cu	: Bakır
CYS	: β -sistatyonaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit
e ⁻	: Elektron
EPR	: Elektron paramanyetik rezonans
Fe	: Demir
G	: Gram
GSH-P _x	: Glutatyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
GSSGR	: Glutatyon redüktaz
GST	: Glutatyon-S-transferaz
Hb	: Hemoglobin
Hms	: Homosistein
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO ₂ [·]	: Perhidroksil radikali
HOCl	: Hypoklorik asid

HPLC	:Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
K	: Potasyum
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
KVH	: Kardiovasküler hastalıklar
L	: Litre
L \cdot	: Lipid radikali
LDL	: Low density lipoprotein
LO \cdot	: Alkoksil radikali
LOO \cdot	: Peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksit
μ	: Mikro
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
MS	: Metiyonin sentaz
MTHFR	: Metilentetrahidrofolatredüktaz
Na	: Sodyum
NADPH	: Nikotinamid adenin nükleotid
NaOH	: Sodyum hidroksit
NO	: Nitrik oksit
NO ₂	: Nitrit
NT	: Nitro trozin
¹ O ₂	: Singlet oksijen
O ₂	: Moleküler oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyon radikalleri
\cdot OH	: Hidroksil radikali
ONOO \cdot	: Peroksinitrit
P-SH	: Protein tiol
PCO	: Protein karbonil oksidasyonu
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
R \cdot	: Aril radikali
RNA	: Ribonükleik asit
ROO \cdot	: Peroksi radikali

ROS	: Reaktif oksijen türleri
S·	: Tiil radikali
SAH	: S-adenozil homosistein
SAM	: S-adenozilmetiyonin
SH	: Sülfidril grupları
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBARS	: Tiyo barbitürik asit reaktif ürünleri
TCA	: Trikarboksilik asit
TG	: Trigliserid
THF	: Tetrahidrofolat

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Homosistein'in oksidlenmesi sonucu homosistin oluşması.	3
Şekil 2.2. Homosistein metabolizması.	6
Şekil 2.3. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu.	13
Şekil 2.4. Serbest radikal hasarının hedefleri ve ürünleri.	18
Şekil 2.5. Protein karbonil oluşumuna primer modifikasyon reaksiyonları.	21
Şekil 2.6. Sekonder modifikasyon reaksiyonları.	23
Şekil 2.7. GSH ve GSSG'nin yapısı	30
Şekil 2.8. Flavonoidlerin basit iskelet yapısı.	35
Şekil 4.1. Plazma MDA düzeyleri	50
Şekil 4.2. Plazma karbonil grupları düzeyi	51
Şekil 4.3. Eritrosit GSH düzeyleri	52
Şekil 4.4. Plazma -SH düzeyleri	53
Şekil 4.5. Eritrosit SOD aktiviteleri	54
Şekil 4.6. Eritrosit CAT aktiviteleri	55

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Total plazma homosistein bileşenleri ve yüzdeleri.	4
Tablo 2.2. Total plazma homosistein dağılımı.	5
Tablo 2.3. Reaktif oksijen türleri.	14
Tablo 2.4. Antioksidanların sınıflandırılması.	27
Tablo 4.1. Plazma MDA düzeyleri	50
Tablo 4.2. Plazma karbonil düzeyleri	51
Tablo 4.3. Eritrosit GSH düzeyleri	52
Tablo 4.4. Plazma -SH düzeyleri	53
Tablo 4.5. Eritrosit SOD aktiviteleri	54
Tablo 4.6. Eritrosit CAT aktiviteleri	55

ÖZET

Oksidatif sisteme dahil olduğu bilinen homosistein, bir amino asit olup, bir çok patolojik nedenden dolayı, plazmadaki düzeylerinin yükselmesiyle hiperhomosisteinemi meydana gelmektedir. Bu olay aynı zamanda oksidatif stresi indükleyen bir durumdur. Oksidatif stres sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelir ve bunlar da lipid peroksidasyonu ve membran hasarının gelişmesine yol açarlar. Vücudumuzda ROS'un zararlı etkilerine karşı antioksidan savunma mekanizması ve oksidanların oluşturduğu hasarı onaran antioksidanlar bulunmaktadır. Siyah üzümde yüksek düzeyde bulunan flavonoidler gibi fenolik bileşikler, oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirirler.

Bu çalışma, 30 gün boyunca homosistein verilen ratlarda antioksidan enzim düzeylerinde gerçekleşecek değişimler ve bu değişimlere siyah üzüm suyunun etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 32 Sprague dawley erkek rat kullanıldı ve hayvanlar kontrol, siyah üzüm, homosistein ve siyah üzüm + homosistein grupları olarak 4 gruba ayrıldı. Çalışmanın sürdüğü 30 gün boyunca, kontrol grubuna her gün gavajla musluk suyu ve intra peritoneal olarak serum fizyolojik uygulandı. Siyah üzüm grubuna her gün 10ml/kg dozda üzüm suyu gavajla verildi. Bunun yanında 1ml/kg serum fizyolojik i.p. olarak uygulandı. Siyah üzüm + homosistein grubuna günlük 1mg/kg homosistein i.p. olarak ve 10 ml/kg miktarında üzüm suyu gavajla verildi.

Çalışmada, oksidatif stresin göstergesi olan plazma malondialdehit (MDA), plazma karbonil ve antioksidan kapasitenin göstergesi olarak eritrosit glutatyon (GSH), plazma sülfhidril (SH) gruplarının düzeyleri ve eritrosit katalaz (CAT) ile eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri tayini yapıldı. Çalışma sonucunda, siyah üzüm grubunda eritrosit GSH ve eritrosit CAT düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu, bununla beraber plazma MDA düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Homosistein grubunda ise plazma MDA ve karbonil düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve plazma -SH ve eritrosit SOD düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Siyah üzüm +

Homosistein grubunda ise, Homosistein grubu ile karşılaştırıldığında plazma –SH, eritrosit GSH, eritrosit CAT düzeylerinin anlamlı derecede yükseldiği tespit edildi.

Sonuç olarak, siyah üzüm suyunun plazma MDA düzeylerini azaltarak ve eritrosit GSH düzeylerini ve eritrosit CAT aktivitesini artırarak, homosisteinin indüklediği oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Homosistein, oksidatif stres, antioksidan, fenolik bileşikler, siyah üzüm suyu.

SUMMARY

Homocysteine belonging to oxidative stress, is an aminoacid, and due to increase in plasma level, hyperhomocysteinemia takes place. As a result of oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) occur and they causes lipid peroxidation and membrane demolitions. There are antioxidant defence system versus ROS harmful effect and antioxidants repairing injuries. Antioxidant-dependent phenolic compounds, such as flavonoids rich enough in purple grape by transmitting a single hydrogen to oxidant make these harmful phenomenas ineffective.

This study carried out to determine the effect of grape juice on changes of antioxidant enzyme level in rats for 30 days. 32 Sprague dawley rat were used and study was conducted in four different groups; control, purple grape juice, homocysteine and homocysteine + purple grape juice. Daily normal water and serum physiologic as intra peritoneal were given to control group. Daily 10 ml/kg dose grape juice with gavage was given to purple grape juice group. Besides 1 ml/kg serum physiologic was given. 1 mg/kg homocysteine as i.p. and 10 ml/kg grape juice were given to homocysteine + grape juice group.

Plasma malondialdehyde (MDA), plasma carbonyl, erythrocyte glutation (GSH), plasma sulfhydryl (SH), erythrocyte catalaz and erythrocyte superoxide dismutase (SOD) activities were determined. Results revealed that in grape juice group, erythrocyte GSH and erythrocyte CAT levels were found as significantly higher than control group. However, plasma MDA level significantly decreased. In Homocysteine group, plasma MDA and carbonil levels significantly increased and plasma –SH and erythrocyte SOD levels significantly decreased than control group. In purple grape + homocysteine group, if compered to homocysteine group, plasma –SH, erythrocyte GSH and erythrocyte CAT levels significantly increased.

Results as signed that by decreasing MDA level, increasing GSH level and erythrocyte CAT activity grape juice makes decrease oxydative stress induced by homocystein.

Keywords: Homocystein, oxidative stress, antioxidant, phenolic compounds, purple grape juice.

1. GİRİŞ

Homosistein vücutta tüm hücrelerde bulunan sülfür içeren bir aminoasittir. Metiyoninin demetilasyonu ile oluşur. Homosistein iki farklı metabolik yola girer. Bunlardan ilki remetilasyon yolu olup homosistein B₁₂'ye bağımlı metiyonin sentaz (MS) tarafından 5-metil tetra hidrofolat varlığında metiyonine remetile olur. Bir diğer yol olan transsülfürasyon yolunda ise ilk enzim B₆'ya bağımlı sistatyonin β-sentaz (CBS)'dir. Sistatyonin, vitamin B₆'nın kofaktörlüğünde sistationinaz enzimi ile α-ketobutirat ve sisteine çevrilir, α-ketobutirat ise 2-metilsitrik asit ve metilmalonik asite parçalanır. Bu parçalanma sonucunda oluşan sistein, inorganik sülfata dönüşür ve ardından idrarla atılır (1,2,3).

Homosistein kardiovasküler hastalıklar için, bilinen önemli risk faktörü veya risk belirleyicilerindedir. Plazma veya serum homosistein düzeylerinin artması, nöral tüp defektleri ve diğer doğum defektleri için önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir. Hiperhomosisteineminin en önemli sebepleri arasında, folat, vit B₁₂ ve B₆ eksikliği gelmektedir. Sağlıksız beslenme, sigara, aşırı alkol tüketimi, aşırı kahve tüketimi, fiziksel egzersiz yapmama gibi stres yaratabilecek sağlıksız yaşam faktörleri de hiperhomosisteinemi nedenleri arasındadır (4).

Oksidatif stres, prooksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Homosistein serbest radikal etkilerinden dolayı, son yıllarda oksidatif sisteme dahil edilmiştir. Serbest radikaller gibi etki göstermesi vücutta birçok zararlı etkilere yol açar (4,5).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için kullanılan birçok savunma mekanizmaları vardır. Süperoksit radikalleri enzimatik dismutasyonla temizlenmesinin yanında antioksidan olarak bilinen fakat enzim olmayan bileşikler de vardır ve bu bileşikler, organizmada oksijen radikallerinin temizlenmesini sağlayan vitaminler ve flavanoidler gibi bileşiklerdir (6).

Siyah üzüm (*Vitis vinifera*) ün özellikle meyveleri kullanılarak yapılan ilaçlar, geleneksel tıpta yüz yıllarca kullanılmıştır (7). Siyah üzüm de bulunan polifenollerin %65'i çekirdeğinde, %22'si sapında, %12'si kabuğunda ve %1'i ise meyva özünde bulunmaktadır. Siyah üzümde bol bulunan başlıca fenolik bileşikler, flavonoidler, antiosiyantinler ve proantiosiyanidinlerdir (8).

Flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyon ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Fenolik antioksidan, lipid radikallere hızla H^{\cdot} vermesi ile lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi ROO^{\cdot} ve RO^{\cdot} radikalini parçalamak ve böylece LPO zincir reaksiyonunu sonlandırmaktadır. Ayrıca antioksidan etkilerinden dolayı bakır iyonlarıyla kompleks oluşturabilirler (9,10). Flavonoidler serbest radikal temizleyicisi olmaları, enzim aktivitelerini düzenlemeleri, hücre çoğalmasını inhibe etmeleri, antibiyotik, antiallerjen, antidiyareik, antiülser ve antiinflamatuvar ilaç gibi işlev görmeleri dolayısı ile önem kazanmaktadır (11,12).

Bu çalışmanın amacı, yüksek homosistein düzeylerinin oksidatif stresi indüklemesi sonucu oluşan oksidatif hasar üzerine iyi bir flavonoid kaynağı olan siyah üzüm suyunun koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

Bu amaçla, lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak plazma malondialdehid (MDA) düzeyleri, protein oksidasyonunun göstergesi olarak, plazma protein karbonil (PCO) düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca antioksidan kapasitenin göstergesi olarak eritrosit redükte glutatyon (GSH) ve plazma sülfhidril ($-SH$) gruplarının düzeyleri ve enzimatik antioksidan kapasiteyi göstermek için eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) ve eritrosit katalaz (CAT) enzimlerinin aktivitelerini ölçmek istedik.

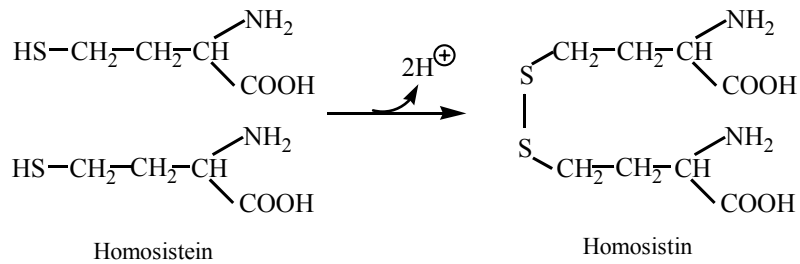
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Homosistein

Homosistein, vücuttaki tüm hücrelerde, diyetle alınan metiyoninden demetilasyon sonucunda oluşur. Sülfür içeren ve esansiyel olmayan bir aminoasittir. Homosistein, kofaktör olarak vitamin B₁₂ kullanılırsa remetilasyonla tekrar metiyonine veya vitamin B₆ kullanılırsa transsülfürasyonla sisteine metabolize olur.

İnsan plazmasında, homosisteinin yaklaşık %70-80'i temel olarak albumine olmak üzere proteinlere disülfid bağları ile bağlıdır. Geri kalan homosistein oksidlenerek dimerler (*homosistin*) veya sisteinle birleşerek mikst disülfidler oluşturur (Tablo 2.1). Homosistein, çok küçük bir oranda (<%1) dolaşımda serbest olarak bulunur (1,2).

İnsan plazmasında homosistein, hem indirgenmiş (redükte) hem de yükseltgenmiş (oksidize) formda, serbest veya proteine bağlı olarak bulunur (Tablo 2.1). Homosistein sıvı fazda çok dayanıksız olup miktarı artınca oksidasyonla homosistine dönüşür (Şekil 2.1). Normal kişilerin idrarındaki homosistein tespit edilemeyecek kadar az miktardadır ancak, sistasyon β-sentaz eksikliğinde homosisteinin sistatiyona dönüşümü azaldığı için artmaktadır. Metil tetrahidro folat transferaz eksikliğinde homosistinüri meydana geliş sebebi, metiyonine geri dönüşümün azalmasıdır.



Şekil 2.1. Homosistein'in oksidlenmesi sonucu homosistin oluşması (2).

Tablo 2.1. Total plazma homosistein bileşenleri ve yüzdeleri (2).

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

Yapılan çalışmalar sonucu homosisteinle ilgili kimyasal tanımlamalar belirlenmiştir. Bu kimyasal tanımlamalar, sülfidriilli ya da redükte formdaki homosistein ve disülfidli ya da okside formdaki homosistein olarak adlandırılmıştır. Disülfidli formlar, reaktif sistein kalıntıları içeren proteinlerle ve sisteinle oluşur. Homosisteinin okside formları mikst disülfidler olarak da adlandırılır. Plazmadaki homosisteinin multipl formlarının isimlendirilmesinde henüz fikir birliği yoktur. Ancak “total homosistein, indirgenmiş homosistein, proteine bağlı homosistein, serbest homosistein ve homosistein-sistein kompleksi” gibi kavramlar genel olarak kullanılmaktadır. “Total homosistein” plazma ve serumdaki tüm homosistein formlarını belirtmek için kullanılan kavramdır (2).

Sağlıklı bireylerde normal total homosistein düzeyi (tablo 2.2.), (high performance liquid ehromotography yöntemi ile) açlıkta 5-15 $\mu\text{mol/L}$ arasındadır (2). Eğer değerler 16-30 $\mu\text{mol/L}$ arasında ise hafif yükseklikten, 31-100 $\mu\text{mol/L}$ arasında ise orta derecede yükseklikten, >100 $\mu\text{mol/L}$ ise ciddi homosistein yüksekliğinden bahsedilir. Homosistein düzeyleri aynı yaş grubu erkeklerde kadınlardan %10 kadar daha yüksektir (1).

Tablo 2.2. Total plazma homosistein dağılımı (2).

Normal oran	5-15 $\mu\text{mol/L}$
Beklenen	< 10 $\mu\text{mol/L}$
Hiperhomosisteinemi	
Hafif	15-25 $\mu\text{mol/L}$
orta	25-50 $\mu\text{mol/L}$
Ağır	50-500 $\mu\text{mol/L}$

Normal sağlıklı kişilerde günlük homosistein üretimi 20.000 μmol kadardır. Total homosisteinin 1200 $\mu\text{mol/gün}$ kadarlık kısmı plazmada sürekli bir döngü durumundadır. Homosisteinin yaklaşık 3-10 $\mu\text{mol/24}$ saat kadarlık miktarı idrarla atılır. Bu miktar total homosistein'in yaklaşık %0,1 kadarını oluşturur (1,2).

Normal değerlerdeki total homosistein oranı, genetik veya sonradan kazanılan olmak üzere birçok faktörden etkilendiği bilinir. Metilen tetra hidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T (677C→T) mutasyonu gibi genetik faktörler termolabilite, aktivitelerinde azalma ve özellikle düşük folatlı diet sonunda açlık hiperhomosisteinemisine neden olur. Homozigot TT varyantı sık görülmekle birlikte özellikle Kafkasya'lılarda %12 oranına ulaşmıştır. Sistasyonin β -sentaz (CBS) geninde gerçekleşen mutasyonlar genellikle homosistinüriye neden olur. Heterozigotlarda, CBS eksikliğinin önemi hakkında bilinenler yetersizdir. Ancak, metiyonin yüklenme sonucu hiperhomosisteinemiye neden olabilir (2).

2.1.1. Homosistein Metabolizması

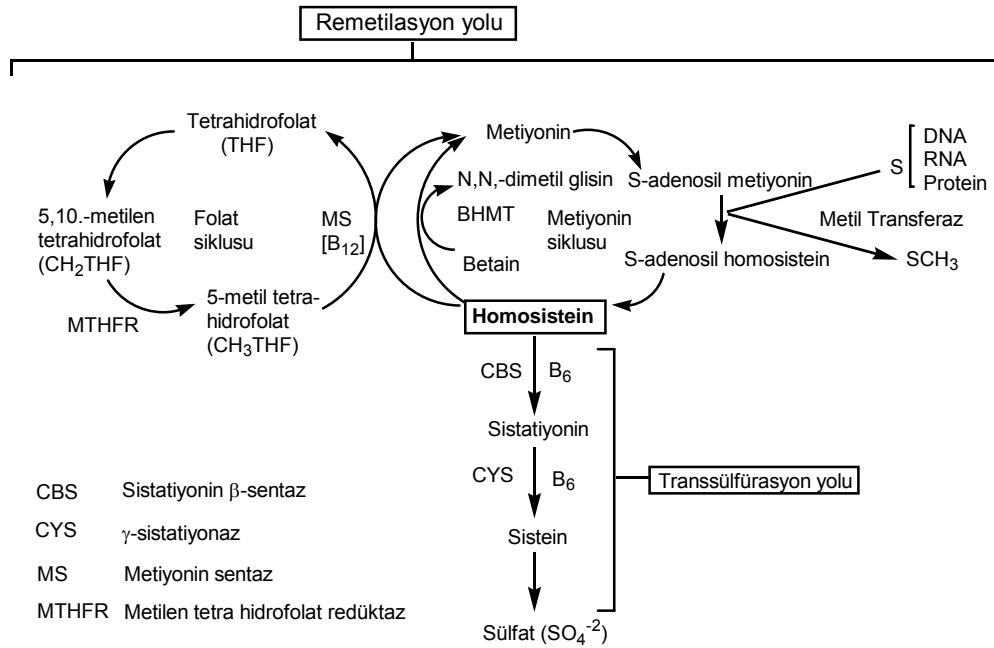
Metiyoninin demetilasyonu ile oluşan homosistein remetilasyon yolu ve transsülfürasyon yolu olmak üzere iki farklı metabolik yola girer.

a) Remetilasyon yolu: Homosistein, 5-metil tetra hidrofolat varlığında B_{12} 'ye bağımlı metiyonin sentaz (MS) tarafından metiyonine remetile olur. Ardından, CH_2THF metilen tetra hidrofolat redüktaz (MTHFR) ile 5-metil tetra hidrofolata (CH_3THF) indirgenir.

Karaciğer ve böbrekte homosistein remetilasyonu, betain-homosistein metil transferaz (BHMT) aracılığıyla gerçekleşir ve tekrar metiyonine dönüşümü sağlanır (1,2). Diyetle alınan metiyonin, metiyonin siklusunda, metil transferaz için metil grubu vericisi olarak yardım eden S-adenozil metiyonin (SAM)'e dönüşür (2,3). SAM, nükleik asitler, nörotransmitterler, fosfolipidler ve bazı hormonlar için metil donörüdür. Aynı zamanda, homosisteinin gireceği metabolik yolun belirlenmesinde de önemli bir regülatördür. SAM miktarı artarsa remetilasyon yolunun en önemli enzimi olan metilen tetrahidrofolat redüktaz enzimi inhibe olur ve fazla miktarda homosistein transsülfürasyon yoluna yöneltilir (1,2).

Bu reaksiyonda oluşan diğer bir ürün olan S-adenozil homosistein (SAH), SAH hidrolaz tarafından homosistein ve adenezine hidrolizlenir (2,3).

Bu metabolik yolun substratı olan 5-MTHF, termolabil metilentetrahidrofolat redüktaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla metilentetrahidrofolattan (diyetle alınan folattan derive edilen) sentezlenir. Dolayısıyla folik asit eksikliklerinde remetilasyon yolu için gerekli substrat miktarı da azalmış olur (1,2).



Şekil 2.2. Homosistein metabolizması (2,3).

b) Transsülfürasyon yolu: Bu metabolik yolda homosistein kofaktör olarak vitamin B₆'yı (pridoksin) kullanır. Bu yoldaki ilk enzim B₆'ya bağımlı sistatinyonin β-sentaz (CBS)'dir. Sistatinyonin, vitamin B₆'nın kofaktörlüğünde sistationinaz enzimi ile α-ketobutirat ve sisteine çevrilir, α-ketobutirat ise 2-metilsitrik asit ve metilmalonik asite parçalanır. Oluşan sistein, inorganik sülfata dönüştükten sonra idrarla atılır. Transsülfürasyon yolu, sınırlı doku dağılımı (karaciğer, böbrek, pankreas ve beyin) gösterir (1,2,3).

CBS enzimi bu yolun en önemli enzimidir. Bu enzime ait homozigot defektler homosistein düzeylerinin (>100 Umol/L) artışına ve homosistinüriye neden olur. Heterozigot defektlerde ise parsiyel CBS eksikliği olmakta, orta düzeyde hiperhomosisteinemi ya da normal bir açlık homosistein düzeyleri saptanabilir. Özellikle metiyonin yükleme testinden sonra hiperhomosisteineminin belirgin bir şekilde ortaya çıkması ile tanısı konulabilir. Kofaktör B₆'nın eksikliklerinde ise parsiyel CBS eksikliğindeki tabloya benzer homosistein yükseklikleri görülebilir (1,2).

2.1.2. Hiperhomosisteinemi Nedenleri

Total plazma homosistein düzeyi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu faktörler aşağıda özetlenmektedir.

Yaş ve cinsiyet: Kadınların total homosistein düzeyi erkeklerden daha düşüktür ve total homosistein yaşla birlikte artar. Bu kısmen vitamin durumuna bağlı olmasına rağmen cinsiyet hormonlarının etkisinden de ileri gelebilir.

Renal fonksiyon: Total homosistein seviyesinin güçlü bir göstergesidir. Bu minör olan üriner ekstraksiyondan ziyade renal metabolizmayla ilgilidir. Renal fonksiyonlardaki fizyolojik azalma yaşın etkisini kısmen de olsa açıklayabilir.

Yaşam tarzı: Dietle alınan vitamin B₆, B₁₂ ve folat düzeyleri ile plazma total homosistein ters orantılıdır. Aşırı sigara, alkol ve kafeinli kahve alan kişilerde total homosistein yükselirken fizyolojik aktivite ile total homosistein seviyesi düşer. Kadınlarda bu tür hayat tarzı faktörlerinin etkisi, erkeklerden daha belirgindir. Kronik alkoliklerde, etanolün vitamin durumunu etkilemesi sonucu total homosistein seviyesi artarken orta derecede etanol tüketenlerde total homosistein düşmektedir.

Genetik faktörler: Yeni doğanlarda, total homosistein metabolizması defektleri homosisteinüri ile seyreden ağır hiperhomosisteinemiye neden olur. CBS eksikliği en sık olmak üzere MTHFR defektleri, homosistein remetilasyonunun bozulmasına ve kobalamin metabolizmasındaki yeni doğan hatalarına bağlıdır.

Klinik hastalıklar ve kullanılan ilaçlar: Folat ve kobalamin eksikliği hiperhomosisteineminin ana nedenleri arasındadır. Yüksek total homosistein seviyeleri böbrek yetmezliğinde ve çeşitli durumlarda da gözlenmiştir. Hiperhomosisteinemi bazı ilaçlarla özellikle homosistein metabolizmasını etkileyen vitaminlerle azalabilir (2).

2.1.3. Hiperhomosisteinemi ve KVH İle Bağlantısı

Homosisteinin aterogenez, ateroskleroz ve trombozda oynadığı roller bilinmemektedir. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar hiperhomosisteineminin direkt olarak vasküler endotel hücrelerinde hasara neden olabildiği gösterilmiş buna ek olarak, endotelin antikoagulan özelliğini prokoagulana dönüştürebildiği ve in vitro düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olabildiği gösterilmiştir. Homosistein, vasküler düz kas hücrelerinde mitogeneze ve sitotoksik etkiye neden olabilmektedir. Bazı araştırmacılar, güçlü bir vazodilatatör ve trombosit agregasyon inhibitörü olan nitrik oksitin sığır endotelial hücrelerinden salınımının bozulduğunu göstermişlerdir. Nitrik oksit salınımının ve etkilerinin azalması, hiperhomosisteinemide gözlenen trombotik olaylara neden olmaktadır (2).

Homosisteinin bazı etkileri endotelial fonksiyon bozuklukları ve daha spesifik olarak nitrik oksidin salınımı ve etkilerinin azalması sonucu ortaya çıkar. Endotelial fonksiyon bozukluklarında, damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon azalır (2).

Koroner arter hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve periferik vasküler hastalıkların eşlik ettiği hafif hiperhomosisteinemi, klasik homosisteinüriye göre homosisteinin oynadığı rol daha azdır. Ancak, önceden miyokard infarktüsü geçiren serebrovasküler trombozlu yaşlı erkeklerde total homosistein'in 10 µmol/L'den yüksek olduğu tespit edilmiştir. Akut koroner sendromlu hastalarda pıhtılaşma faktörleri ile homosistein arasında ilişki bulunmuş ve koroner yetmezlikli hastalara folik asit ve antioksidan vitaminler verilerek total homosistein konsantrasyonu azaltılmıştır. Bu nedenlerden dolayı total homosistein konsantrasyonunun düşürülmesiyle KVH'nın mortalite ve morbiditesinin azaltılabileceği düşünülmektedir (2).

2.1.4. Homosistinüri

Homosistinüri, homosisteinin sistatyonine dönüşümünü sağlayan CBS enzim eksikliğine dayanır. Sistatyonin β-sentaz (CBS), metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ve metiyonin sentaz (MS) eksikliği ile ortaya çıkmakta ve otozomal resesif bir mekanizmayla kalıtsal olarak geçmektedir. Homozigot CBS eksikliği daha sık görülmekle beraber, genetik olarak heterojen olabilmektedir. Bu bireylerde, fibroblast ve lenfositlerdeki CBS aktivitesi normale göre %0-10 oranında azalmıştır. Homozigot CBS eksikliği olan bireylerde transsülfürasyon yoluyla sıvılarında metiyonin, homosistein ve prekürsörleri birikmesiyle beraber sistein ve sistin miktarı azalır. Metiyonin miktarı normalde 0.45 mg/dL iken hiperhomosistinüri de 30 mg/dL'ye çıkmaktadır.

İdrarda homosistin ve homosistein yanında metiyonin, metiyonin sulfoksit ve mikst disulfidli sistein gibi diğer sülfürlü aminoasitler de artar. Hastalığın dağılımında

belirgin coğrafik farklılıklar vardır. Genel olarak popülasyonun %1'inden daha azında Heterozigot CBS eksikliğine rastlanır. Bu kişiler genellikle aç iken normal total homosistein'e sahip olmalarına rağmen metiyonin yüklemesinden sonra total homosistein seviyesi yükselebilir. Yapılan son genetik çalışmalara göre vasküler hastalığı olan kişilerde CBS eksikliği için heterozigotluk seyrek olarak ortaya çıkar ve bu hafif genetik defekt hastalarda hiperhomosisteinemiye genellikle neden olmaz.

Homosisteinürinin seyrek rastlanan formları; şiddetli MTHFR defekti, Homosistein remetilasyonunda bozulma ve kobalamin metabolizmasındaki yeni doğan hataları sonucunda ortaya çıkar. Homosisteinin metillenerek metiyonin oluşturması, folata bağımlı bir sistem tarafından gerçekleşmektedir (Şekil 2.2). Bu siklusta substrat olarak folat kullanılırken N₅-metil tetrahidrofolat transferaz (MTHFT)'i aktive etmek için kofaktör olarak vitamin B₁₂ kullanılır. Genetik olarak, folat siklusunda kullanılan redüktaz ve transferaz enzimleri defekti olan, folat veya vitamin B₁₂'yi biyokimyasal olarak aktif formlarına dönüştüremeyen veya diyetle alınan folat ve vitamin B₁₂ düzeyi yetersiz olan kişilerde homosistein birikerek homosistinüriye neden olur.

MTHFR genindeki sık görülen C677T mutasyonu, enzim aktivitesinde azalmaya, termolabiliteye ve folat metabolizma bozukluklarına neden olması yanında, orta (15-30 µmol/L) veya daha yüksek (30-100 µmol/L) hiperhomosisteinemiye neden olur. Bu vakalarda, tanı idrarda homosistein ve plazmada metiyonin konsantrasyonlarının artması ile koyulur.

Vakaların yarısından azında gözlenen mental retardasyonun da trombotik komplikasyonlardan kaynaklandığı düşünülebilir. Bu bireyler, idrarları ile büyük miktarda homosistein atarlar ve plazma total homosistein konsantrasyonları sağlıklı popülasyona göre 10-50 kat daha yükselmiş olup 50 ile 500 µMol/L arasındadır (2).

Bu bireylerde görülen arterioskleroz ve aterosklerozun oldukça hızlı başlaması, total plazma homosisteini ile KVH'nın başlangıcı ve ilerlemesi arasında bir doz-zaman

ilişkinin olabileceğini akla getirebilir. Bu nedenle, genel populasyonda plazma homosisteininde hafif veya orta derecede yükselmenin ateroskleroza zemin hazırlayacağı hipotezi geliştirilmiştir. Çok basit bir tedavi sonunda bu hipotez, özellikle oral B grubu vitamin verilenlerde plazma homosisteininin anlamlı oranda düşmesiyle ilgi odağı haline gelmiştir (2).

2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, prooksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır (5). Ateroskleroz, kronik böbrek yetmezliği, respiratuvar distres sendromu, romatoid artrit, diyabet, sepsis ve alzheimer hastalığı gibi birçok patolojik durumda ve yaşlılıkta ortaya çıkmaktadır (13).

Proteinler açısından bakıldığında triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin gibi sülfür içeren aminoasitlere sahip proteinler, serbest radikaller ile reaksiyona girmektedirler (14).

Homosistein, son yıllarda oksidatif sisteme dahil olduğu kabul edilmiş protein yapısına girmeyen bir amino asittir. Serbest radikaller gibi etki gösterir. Enzimlerde konjenital eksiklik ve metabolizma sırasında reaksiyonlarda işlev gören folik asit, vitamin B₁₂ ve B₆'nın yetersizliğine bağlı olarak plazma homosistein düzeyleri yükselir. Buna bağlı olarak hiperhomosisteinemi görülür ve serbest radikaller gibi davranıp endotel hasarı oluşturur (4).

Hiperhomosisteinemi sonucunda, trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu, trombüs formasyonu gibi koagülasyonu artırıcı etkilerin ortaya çıkması, biyolojik membranlarda oksidasyon yapması, LDL oksidasyonu yaparak ateroskleroza artırıcı etkiler oluşması meydana gelmektedir. Homosistein düzeylerinin artmasının

diğer bir sonucu ise, endotelde bulunan ve lipid peroksidasyonunu engelleyen glutatyon peroksidaz aktivitesinin baskılanmasıdır (4, 15, 16).

Oksidatif stres oluşumunu değerlendirebilmek için, öncelikle serbest radikallerin nasıl oluştuğı ve bu radikallere karşı organizmanın antioksidan savunma sistemleriyle kendisini nasıl savunduğı gözden geçirilmelidir.

2.2.1. Serbest Radikaller

Dış orbitallerinde çiftlenmemiş elektron içeren atom veya moleküllere radikal (R) adı verilir. Atomun üzerindeki nokta paylaşılmamış elektronu gösterir. Kararsız bir yapı gösteren bu tanecikler bir an önce kararlı hale ulaşmak isterler. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çeşitli dış etkenlerin etkisiyle oluşabilir. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapıda olup tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğı göstermektedir (17,18,19).

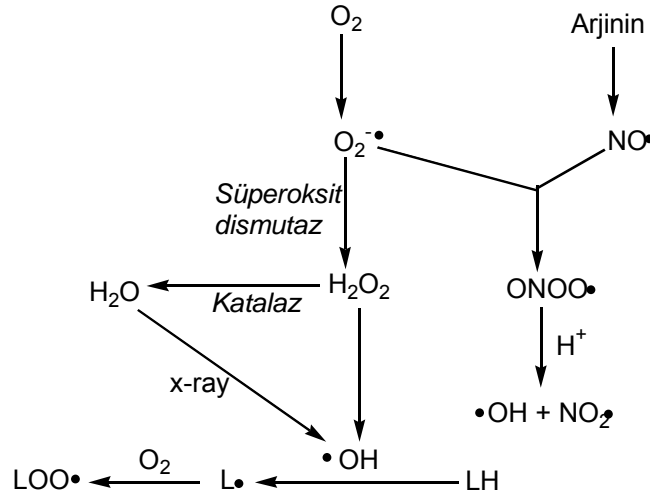
Orbitallerinde bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektron taşıyan halojen atomlar (Cl ve Br), Na, K gibi alkali metal atomları, hidrojen atomu, ve oksijenin redüksiyon ara ürünleri olan süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (OH^{\cdot}), gibi kısa ömürlü, reaktif atomlar serbest radikal olarak tanımlanmaktadır (20,23).

Bazı atom kombinasyonları ise bir orbitalinde tek elektron bulundurmaları nedeniyle radikaldir. Örneğın önemli bir hava kirliliğı etkeni olan nitrit dioksit (NO_2), ve endotel kaynaklı relaksan faktor olan nitrik oksit (NO) bu tip radikallerdir (24).

Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron konfigürasyonlarının yanısıra, termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile de değerlendirilirler. Bu

nedenle demir, bakır, mangan, molibden gibi geçiş metalleri dış yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezler (21,22).

Diatomik oksijen iki tane eşlenmiş elektronu bulunduğu için kendisi bir radikaldir. Oksijenin suya indirgenmesi olayı ardışık univalent basamaklarda olur. Bundan dolayı oksijenin bir elektron redüksiyonu mümkündür. Moleküler oksijen kolayca bir elektron kazanmasıyla, süperoksit anyon radikali (O_2^-) olarak bilinen, bir tane eşlenmemiş elektronu bulunan radikal oluşur. Biyolojik sistemlerde önemli serbest radikallerin bir çoğu oksijene dayanır. Hasta ve yaşlı olan, hücreler fazla miktarda serbest radikal üretirler (25).



Şekil 2.3. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu. (25)

Serbest oksijen radikalleri, kuvvetli oksidan nitelikli ve çok kısa ömürlü oksijen radikalleridir. Bu radikallere; süperoksit radikali, hidroksil radikali, singlet oksijen (delta singlet oksijen, sigma singlet oksijen), hidroperoksi radikalleri örnek olarak verilebilir (26).

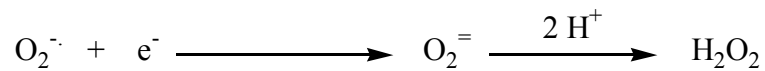
Tablo 2.3. Reaktif oksijen türleri (26).

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

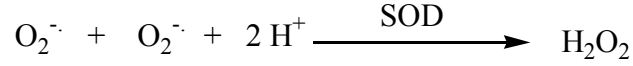
2.2.1.1. Süperoksit Anyon Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Moleküler oksijen dış orbitallerinde ortaklanmamış iki elektron içerir. Bu elektronların her biri ayrı ayrı orbitallerde bulduklarında, paylaşılmadığında ya da spinleri aynı yönde olduğu zaman en düşük enerji seviyesinde bulunurlar. Bu orbitaller birer elektron daha kabul edebilecek durumdadır. Bu orbitallerin tek elektron alması durumunda, süperoksit anyonu radikali ($O_2^{\cdot-}$), iki elektron alması durumunda ise, peroksi anyonu (O_2^{-2}) oluşur (28).

Hüresel ortamlarda üretilen süperoksit, indirgeyici ya da oksitleyici olarak etki edebilir. Aldığı bir elektronu metal iyonuna, sitokrom c'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici özellikte olan süperoksit anyonu bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir.



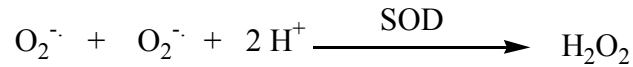
Bu yukarıda belirtilen tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olmaktadır. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'e çevrilmesi SOD tarafından katalizlenmektedir.



Yukarıda gösterilen bu tepkime “dismutasyon tepkimesi” olarak tanımlanır. Süperoksit, hafif asidik ortamlarda SOD olmadan da kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2 'e dönüşebilir. Süperoksit, pK'sı 4.8 olan zayıf bir baz olduğundan, pH'nın daha düşük olduğu fagozom içinde daha kolaylıkla kendiliğinden dismutasyon yolu ile H_2O_2 oluşturabilir. Nötral pH'da enzimatik dismutasyon 10^9 kat daha hızlı gerçekleştiğinden SOD enzimi antioksidatif savunma için mutlaka gereklidir (29).

2.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

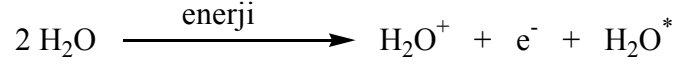
Moleküler oksijenin enzimatik olarak elektron çifti alması ya da süperoksidin bir elektron alması sonucunda peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) oluşturur (29).



SOD tarafından katalizlenen yukarıda gösterilen reaksiyon sonucu, H_2O_2 oluşur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ile moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler oluşması nedeniyle bu reaksiyon bir dismutasyon reaksiyonudur. Hidrojen peroksitin pK'sı 10.6 olduğundan, nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz ve biyolojik zarları kolayca geçebilir. Hidrojen peroksit yapısında paylaşılmamış elektron içermediği için radikal özellikte değildir (32).

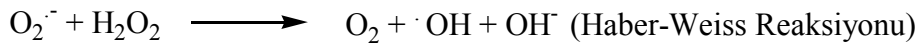
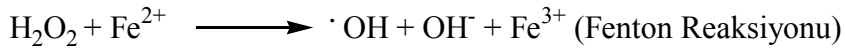
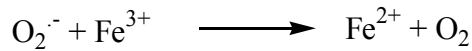
2.2.1.3. Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$)

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) canlılarda iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması sonucu oluşabilir.



Uyarılmış su molekülünün (H_2O^*) homolitik yıkımı ile; H_2O^+ nin ise bir su molekülü ile tepkimeye girmesi sonucu başlıca reaktif radikal olarak hidroksil radikalleri oluşturulur.

Bu tepkimeler çok kısa bir süre içinde gerçekleşir ve bunun sonucunda üretilen $\cdot\text{OH}$, radyasyonun canlılardaki zararından sorumlu başlıca kimyasal bileşiktir (32). $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 'in geçiş metalleri varlığında indirgenmesi (Fenton reaksiyonu) ile oluşan son derece reaktif bir radikaldir. Ayrıca H_2O_2 'in O_2^- ile reaksiyonu sonucunda da (Haber Weis reaksiyonu) meydana gelir. Haber-Weis reaksiyonu katalizörsüz çok yavaş olduğu halde Fe^{+2} katalizörlüğünde çok hızlı oluşur (33,34,35).



Süperoksit H_2O_2 'in öncül molekülü olmakla birlikte, aynı zamanda metalleri indirgeyici bir türdür. Süperoksit proteinlere bağlı metallerin serbest kalmasına da neden olur. Bu sebeple biyolojik koşullarda süperoksit üretiminin arttığı ortamda $\cdot\text{OH}$ üretimi de gerçekleşir (32).

Biyolojik sistemlerdeki en reaktif tür olan $\cdot\text{OH}$, ortamda rastladığı her biyomolekülle çok hızlı bir şekilde tepkimeye girer. Bu nedenle ömrü 10^{-9} saniyeden daha kısadır. Hidroksil radikalının başlıca tepkimeleri elektron transfer tepkimeleri, hidrojen çıkarma tepkimeleri ve bunu takiben katılma tepkimeleridir. $\cdot\text{OH}$ 'nin seçtiği başlıca hedef noktalar elektronca zengin bileşiklerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikal yapıdaki tepkimelerde binlerce farklı ara ürün oluşabilir (29,32).

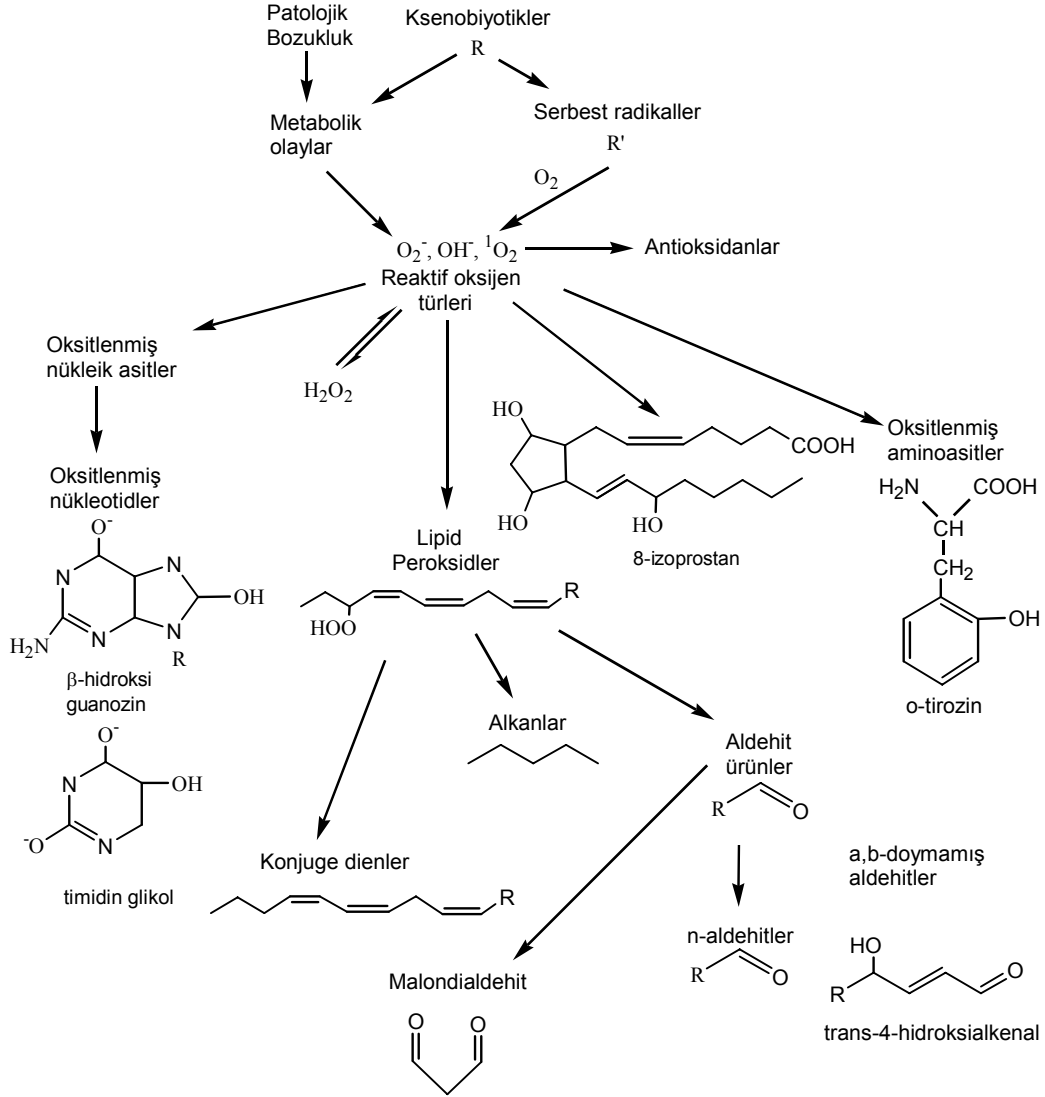
2.2.1.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijenin ortaklanmamış elektronu bulunmadığı için radikaller arasında gösterilmez. Oksijenin yüksek enerjili bir formu olan singlet oksijende ($^1\text{O}_2$) spin kısıtlaması olmadığı için reaktivitesi çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi olarak verip oksijene geri dönüşebildiğinden, oluşumu kemilüminesans ölçümü ile takip edilebilir. Vücutta, pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorplaması sonucu, hidroperoksitlerin metal varlığındaki yıkım tepkimelerinde ya da kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında oluşabilir.

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Singlet oksijen doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girer ve peroksi radikalini ($\text{ROO}\cdot$) oluşturur. Bunun sonucunda hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (29,32).

2.2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Serbest radikaller hücresel yapıları etkiler ve hücresel hasara yol açarlar memeli hücre membranları, peroksidatif hasara karşı çok hassas olan büyük miktarda çok doymamış yağ asidi (PUFA) içerirler (26).



Şekil 2.4. Serbest radikal hasarının hedefleri ve ürünleri (26).

Çeşitli nedenlerle oluşan serbest radikaller, hücre çekirdeğinde genel olarak DNA ile tepkimeye girerler. Nükleik asit yapısındaki baz değişimleri olmasının yanında DNA zincirinin kopması ile de kromozomal yapıda değişikliklere neden olurlar (26).

Serbest radikallerin bazı zararlı etkileri şöyle sıralanabilir;

- Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması sonucu hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değişmesi,
- DNA hasarı,
- Nükleotid yapısında olan koenzimlerin yıkımı,
- Protein ve lipidlerle kovalent bağlantılar oluşması,
- Enzim aktivitelerinde veya lipid metabolizmasında gerçekleşen değişiklikler,
- Mukopolisakkaritlerin yıkılması,
- Proteinlerin bozulması ve proteinlerin “turn over”inin yükselmesi,
- Lipid peroksidasyonu ile zar yapısının bozulması,
- Zar proteinlerinin hasarı, taşıma sistemlerinin bozulması,
- Yaş pigmenti ve Seroid denilen maddelerin birikimi,
- Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozulması ile kapillerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması (18,19,27).

2.2.2.1. Membran Lipitleri Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin en belirgin etkileri, lipit peroksidasyonuna neden olarak, bir çok hastalığın komplikasyonlarının ortaya çıkmasında ve progresyonunda rol oynamalarıdır. Tüm büyük biyomoleküller serbest radikallerden etkilenirler, fakat en hassas olanlar lipitlerdir.

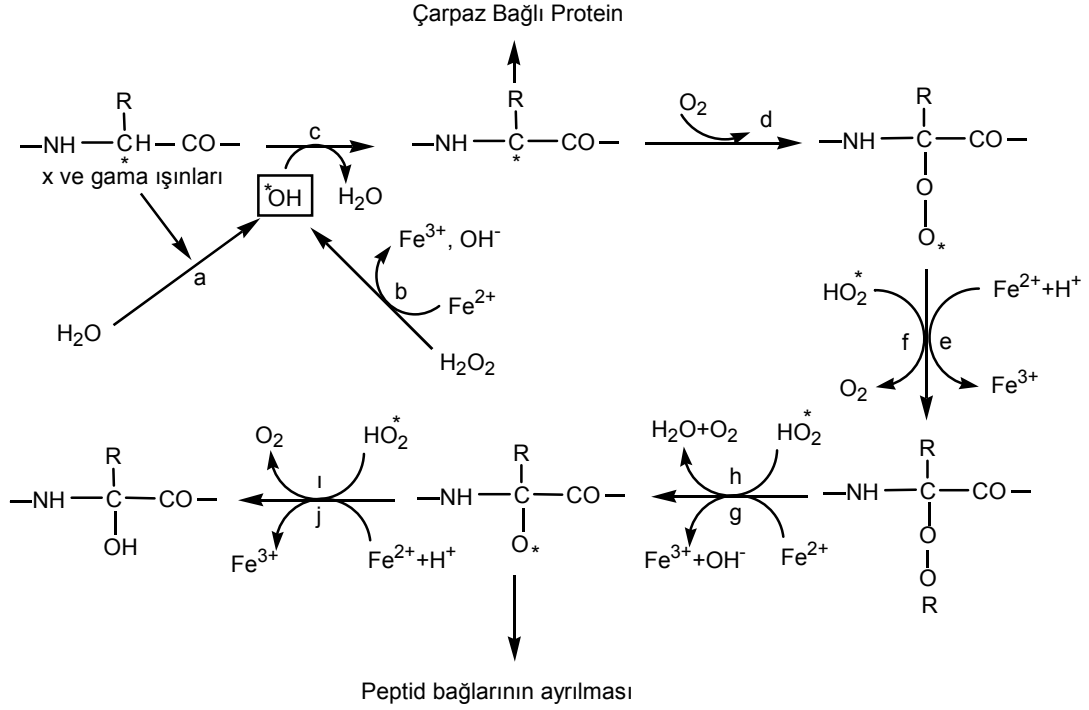
Hücre zarı su içermez bu nedenle hidroksil radikalının ($\cdot\text{OH}$) başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu, zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini arttırması sonucu hücre ölümü gerçekleşebilir. Lipit peroksidasyonu sonucu meydana gelen membran hasarı, geri dönüşümsüzdür. Lipit peroksidasyonu, membranlara yakın bölgelerde ortaya çıkan $\cdot\text{OH}$ radikalının membran fosfolipitlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla meydana gelir (31,32).

Reaksiyon sonucu $\cdot\text{OH}$ radikali ortadan kalkar, ancak membranda karbon merkezli lipit radikali oluşur. Oluşan lipit radikali kararlı bir yapıya sahip değildir ve bunun yanında bir takım değişikliklere uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle birlikte konjuge dien yapıları oluşur (Şekil 2.4). Daha sonra da lipit radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksil radikali oluşur. Lipit peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluşturur. Bunun yanında, kendileri de açığa çıkan H^{\cdot} parçacığı ile birleşerek lipit hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Lipit peroksidasyonu, toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder (36,37).

2.2.2.2. Proteinler Üzerine Etkileri

Protein oksidasyonu, reaktif oksijen türleri ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirek olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanır. Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna neden olabilir (38,39).

Proteinlerde yapısal değişikliğe neden olan en önemli moleküler mekanizmalar protein karbonil oksidasyonu (PCOO) oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, nitrotirozin (NT) ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) oluşumu olarak sıralanır.



Şekil 2.5. Protein karbonil oluşumuna primer modifikasyon reaksiyonları (40).

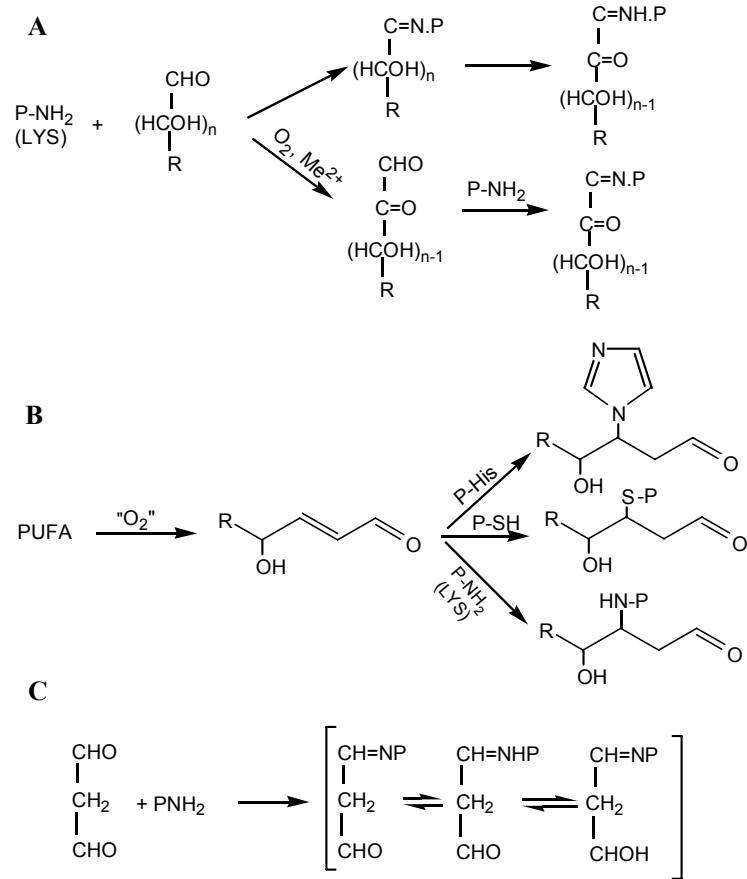
PCOO türevlerinin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları (Şekil 2.5), amino asitlerin α - karbon atomlarının veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından ve bu modifikasyonlar sonucunda meydana gelen reaktif oksijen aracılı peptit ayrılması reaksiyonundan oluşur. Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asitte veya proteinlerin peptit omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak PCOO ürünleri meydana gelir. PCOO düzeylerinin saptanması protein oksidasyon düzeyini belirlemede duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (40).

Polipeptit omurgasındaki α -karbon atomundan $\cdot\text{OH}$ radikali ile α -hidrojen atomunun çıkarılması ile amino asit, karbon merkezli radikal haline dönüşür (Şekil 2.5, Reaksiyon c). Bu reaksiyona yol açan OH^{\cdot} radikali suyun radyolizinden (x ve γ ışınlarıyla) veya H_2O_2 'in metal katalizör ile yıkımından açığa çıkar (reaksiyon a ve b). Oluşan karbon merkezli radikal moleküler oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek (reaksiyon d) daha sonra alkilperoksidi verecek olan alkilperoksil radikal ara ürününü

oluşturur. Alkilperoksit, alkoksil radikali (reaksiyon h) aracılığı ile hidroksi protein türevini verir (reaksiyon j). Reaksiyon basamaklarının bir çoğunda Fe^{++} ve Cu^{+} varlığında HO_2^{\cdot} ile etkileşim önem taşır (reaksiyon e,g,i).

Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil, ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki R yan zincirleri ve yan reaksiyonlar ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna neden olur. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller aracılığı ile yukarıdaki reaksiyonlar tekrarlanır.

Oksijen yokluğunda reaksiyon (reaksiyon d) gerçekleşmez. Oluşan karbon merkezli radikal diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna neden olur (Şekil 2.5). Alkoksil radikalinin oluşumu (Şekil 2.5, reaksiyon h ve g) peptit bağının diamit veya α -amidasyon metabolik yollarından ayrılmasına neden olur. Diamit metabolik yoluyla ayrılma sonucunda, diamid ve izosiyanat yapısı, α -amidasyon metabolik yolunda ise amid ve N- α -ketoaçil yapısına sahip peptid fragmentleri olduğu gözlenmiştir (40).



Şekil 2.6. Sekonder modifikasyon reaksiyonları (41).

Yukarıdaki şekilde, şekerlerin proteinlerdeki lizin amino grupları (P-NH₂) ile reaksiyonunu (A), Michael tipi katılma reaksiyonu ile 4-hidroksi-2-nonenal'in proteinlerdeki lizin P-NH₂, histidin (P-His), veya sistein (P-SH) bakiyelerine bağlanması (B) Proteinlerdeki amino grupları ile lipid peroksidasyon ürünü malondialdehitin reaksiyonu (C) olmak üzere glikasyon, gliksidasyon ve poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyon ürünleri ile proteinlerin reaksiyonları sonucu, protein karbonil gruplarının oluşumu (Sekonder modifikasyon reaksiyonları) gösterilmektedir.

Lipit peroksidasyonunda oluşan aldehitler (4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit), indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizinler ile reaksiyonu (glikasyon ve glikoksidasyon reaksiyonları) sonucu oluşan reaktif karbonil türevleri (ketoaminler, ketoal-dehitler, deoksiozonlar) protein yapısına karbonil gruplarının katılmasına neden olur. Lipitlerden oluşan aldehitler veya otooksidasyona uğramış şekerler Schiff bazı oluşumu yolu ile proteinlerdeki amino gruplarına bağlanır. Schiff bazı oluşumu geri dönüşümlü bir reaksiyondur. Bununla birlikte, sıklıkla geri dönüşümsüz bir reaksiyon olan amodori düzenlemesine uğrar (40).

2.2.2.3. Tiyol Gruplarının Oksidasyonu

Serbest radikallerin proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açtığı belirtilmiştir. Sisteinin -SH grubu oksidatif hasara oldukça yatkındır. -SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan tiil radikali (-S[•]) proteinlerdeki disülfit bağlarının oluşumuna neden olur. -SH gruplarının disüfitle ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, serbest radikallerin neden olduğu protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir (40).

2.2.2.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Glikoz, mannoz ve deoksi şekerlerin fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğraması sonucu, süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana gelir. Serbest radikaller, bir çok hastalığın patogenezinde önemli rol oynarlar. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, behçet hastalığı, psoriasis, romatoid artrit, deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi hastalıklarda serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (29,31).

2.2.2.5. DNA Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olur ve bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır. Hidroksil radikalının ($\cdot\text{OH}$) DNA ile tepkimesi ile baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden sonucunda hücre ölümüne neden olur.

Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girmesi nedeniyle farklılaşmalara neden olur. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında oluşursa pürin ve primidin bazlarını etkiler ve mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), nükleik asitlerde, çift bağlara hidrojenin katılma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer veya doymuş karbon atomlarından hidrojeni uzaklaştırır. Süperoksit anyonu da güçlü bir oksitleyici olması nedeniyle, guanin gibi yüksek elektron yoğunluğu bulunan moleküllerle daha kolay tepkimeye girer (31,40).

Hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine gelerek DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Reaktif oksijen türleri (ROS), DNA'nın oksidatif hasarı ile hastalıklara ve yaşlanmanın patogenezinine etkilidir (31).

2.3. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek amacıyla kullanılan birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar antioksidan savunma sistemleri ya da antioksidanlar olarak adlandırılırlar. Süperoksit radikalleri enzimatik dismutasyonla temizlenirken, bunun yanında antioksidan olarak bilinen fakat enzim olmayan bileşikler de organizmada oksijen radikallerinin temizlenmesini sağlarlar. Bu açıdan en önemli kimyasal bileşikler A, E ve C vitaminleridir.

Enzimler oksidanları tutarak daha zayıf bir moleküle dönüştürürler. Vitaminler ve flavanoidler gibi bileşikler, oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirirler. Oksidanların oluşturduğu hasarı onaran antioksidanlar bulunmaktadır. Ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini oksidanları bağlayarak zararlı fonksiyonlarına engel olurlar (6).

Antioksidanların belirli etki şekilleri vardır;

- Antioksidan enzimler ve küçük moleküller toplayıcı etki gösterirler. Bu etki, antioksidanların serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme ile olur.

- Vitaminler, flavanoidler bastırıcı etkiye sahiptir. Bastırıcı etki, serbest oksijen radikalleriyle etkileşme yoluyla onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme olayıdır.

- Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp bunun sonucunda fonksiyonlarını engellerler.

- Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması işlemi ise onarıcı etki ile olur. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayıp lipit peroksidasyonunu önlerler.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı olabildikleri gibi eksojen kaynaklı da olabilirler. Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlarken eksojen antioksidanlar ise vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılırlar (29).

Tablo 2.4. Antioksidanların sınıflandırılması (29).

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

2.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

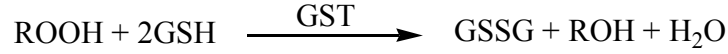
Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD) süperoksit serbest radikalinin (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümü sırasında katalizör olarak kullanılan intraselüler enzimlerden olan bir antioksidandır. Hücrede süperoksit dismutazın iki izomer tipi bulunur. Bunlar; sitozolde yer alan Cu-Zn SOD; Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır ve siyanidle inhibe edilir. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır.

Mn SOD ise mitokondride bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, Siyanidle inhibe olmaz. SOD'ın fizyolojik olarak en önemli fonksiyonu oksijeni metabolize edebilen hücreleri, süperoksit serbest radikalinin (O_2^-) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır (42).



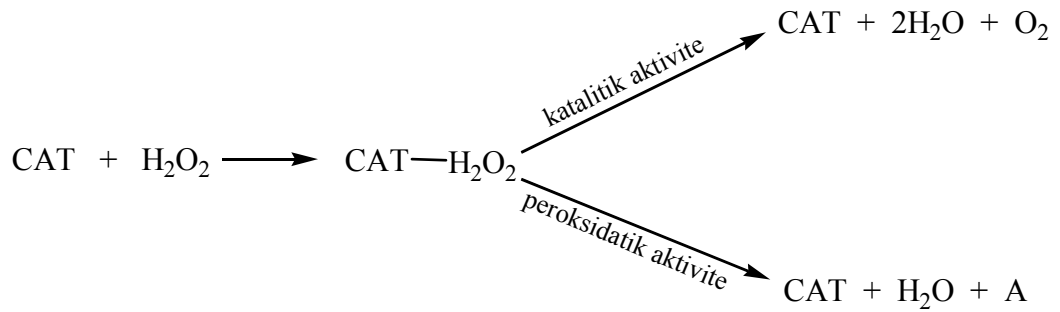
2.3.2. Glutasyon S-Transferazlar (GST)

Karaciğer stoplazmasında Glutasyon-S transferazlar (GST) adı verilen bir grup enzim daha bulunur. Bu enzimler, glutasyonla meydana gelen enzimatik dönüşüm için kullanılır. Glutasyon S-transferazlar (GST), EC 2.5.1.18 kodlu ve her biri iki alt birimden oluşmuş enzimlerdir. GST katalitik ve katalitik olmayan bir çok fonksiyona sahiptirler. Detoksifikasyon yapmaları yanında hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri de vardır (43,44).



2.3.3. Katalaz (CAT)

Katalaz peroksizomlarda, sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. katalaz (H_2O_2 : H_2O_2 oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) yapısındadır. Dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Katalaz H_2O_2 'yi suya ve oksijene parçalar (42). Katalazın peroksidatik ve katalitik olmak üzere iki fonksiyonu vardır.



Katalaz aktivitesi daha çok karaciğer, böbrek, çizgili kaslar ve eritrositlerde etkilidir. Kanser, diyabet, ateroskleroz, katarakt, artrit, nörodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik durumlarda ortaya

çıkan oksidatif strese karşı savunmada, antioksidan sistemin öncelikli bir enzimidir (45,46).

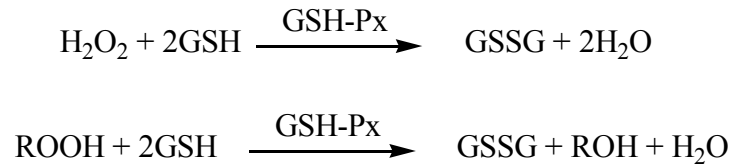
2.3.4. Glutasyon Redüktaz (GSSR-R)

Hidroperoksitlerin redükte olması sırasında oluşan okside glutasyon (GSSG), GSSG-R'ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür. Reaksiyonun oluşabilmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır (29,37,47).



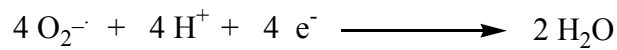
2.3.5. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Hücrelerde gerçekleşen hidroperoksitlerin detoksifikasyonundan sorumlu bir enzimdir. Tetramerik yapıda olup sitozolik bir enzimdir dört adet selenyum atomu içerir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler (29).



2.3.6. Mitokondriyal sitokrom oksidaz

Süperoksidi (O_2^-) detoksifiye eden mitokondriyal sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir.



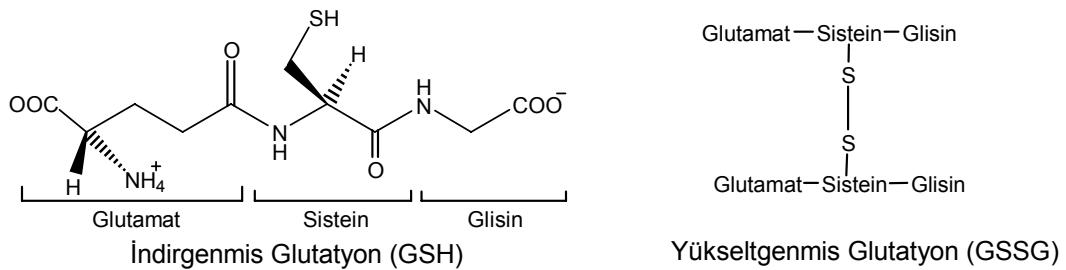
Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli oluşan normal bir reaksiyondur. Bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve böylece bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır (29,42).

2.3.7. Redükte Glutasyon (GSH)

Redükte glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisin içerir, ayrıca vücuttaki GSH'nun büyük bölümü karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan iki aşamada sentezlenebilen bir tripeptittir. GSH da aktif bir sülfidril (-SH) grubu bulunur.

GSH'nın en önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ve redükte formlarının kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip olan birçok enzim okside olarak ya da O_2 'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelerini yitirirler.

GSH kendisi okside olup tiyol gruplarının tekrar indirgenmesini sağlayarak bunların aktivasyonuna neden olur. Ayrıca H_2O_2 'nin elimine edilmesinde GSH'ın oksitlenebilirliğinden faydanılır. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu sağlar (31).



Şekil 2.7. GSH ve GSSG'nin yapısı

GSH eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir (29).

2.3.8. Melatonin

Günümüze kadar bilinen en güçlü antioksidanlardan biridir. Hidroksil radikalini ortadan kaldırması yanında lipofilik özelliğe sahiptir. Böylece hücrenin bütününe ve hücre çekirdeğine ulaşılabilir ve kan-beyin bariyerini de kolayca geçebilir. Ayrıca DNA hasarını da çok etkili bir şekilde inhibe ettiği kanıtlanmıştır (29,37).

2.3.9. Vitamin C (Askorbik asit)

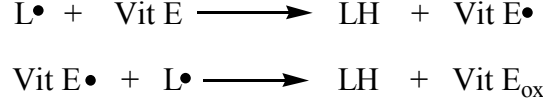
Vitamin C organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak işlev görür. Bir ketolakton olan vitamin C, kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit gibi iki aktif formu vardır ve iyi bir redükleyicidir. Aynı zamanda askorbik asit, radikal süpürücüdür ve reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu etki sağlamaktadır (31).

Bu özelliklerinin yanında askorbik asit tirozinden epinefrin sentezinin dopamin β -hidroksilaz basamağında, lizinden karnitin sentezinde, tirozin yıkılımında p-hidroksi fenil pirüvatın homogentizata oksidasyonunda, safra asitlerinin sentezindeki 7- α -hidroksilaz başlangıç basamağında ve demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici olarak görev alır. Midede ferri demiri ferro demire indirger. Ayrıca immünite ve yara iyileşmesinde olumlu etkileri vardır (42).

2.3.10. Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin E (α -tokoferol) hücre membran fosfolipitlerinde bulunan yağ asitlerini serbest radikallerin oksitleyici etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturan çok güçlü bir antioksidandır. Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirgerme özelliğine sahiptir. Vitamin E zincir

kırıcı antioksidan olarak değerlendirilir. Lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonu, bu vitamin E sayesinde sonlandırılabilir (48).



Vitamin E parçalanmadan önce ve oksitlendikten sonra askorbik asit ve glutatyon ile yeniden indirgenir. Glutatyon peroksidaz ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı bir etkiye sahiptir. Vitamin E peroksitlerin sentezini engellerken glutatyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırır (29,31,49).

2.3.11. Karotenler

Hücreleri korumada görevli olan ve doğada yaygın olarak bulunan pigmentlerdir. A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten, singlet oksijeni bastırabilmesi yanında, süperoksit radikalini temizler ve peroksi radikalleri ile direkt olarak etkileşerek antioksidan vazife görür (50, 51).

2.3.12. Transferrin

Dolaşımdaki serbest demiri bağlama işlevi görür (44). Diyetle alınan demir, Fe^{2+} şeklinde bağırsak mukozasından emilir, eritrositlerin yıkılımı ile de günde yaklaşık 25 mg demir açığa çıkmaktadır. Serbest halde toksik etkili olan demir, organizmada gerek duyulan dokulara taşınmak üzere transferrin ile birleşir ve toksisitesi azalır. Transferrin, Fe^{3+} halindeki demiri kemik iliğindeki depolanma yerlerine ve bir dereceye kadar da karaciğere taşır (52).

2.3.13. Sistein

Süperoksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısıdır (22,27). Tiol içeren aminoasitlerden biri olan sistein GSH sentezinde temel rol oynar. Sülfür içeren aminoasitler sistein katabolizması ve GSH sentezi arasında sisteinin akış yönünü belirlemede çok önemlidir. Sistein, GSH sentezi için hız belirleyici basamakta bulunan C-glutamat sistein ligaz enzimini onarır. Bundan dolayı sistein, GSH sentezi için hız belirleyici bir aminoasit olarak kabul edilir (53,54).

2.3.14. Metionin

Metionin, önemli bir metil vericisidir ve proteinlerin sentezi için gereklidir. Vücuttaki sülfürün temel kaynaklarından biridir. Metionin, toksik olan asetaldehidin düzeyini düşürme yolu ile alkolün zararlı etkilerini azaltma işlevi görür (53,55).

2.4. Siyah Üzüm (*Vitis vinifera*)

Siyah üzüm Botanik terminolojide *Vitis vinifera* olarak adlandırılmıştır. Ayrıca yıllık odunsu üzüm asması olarakta tanımlanır ve Asya'ya özgüdür. Daha sonraları, Avrupa ve diğer ülkelerde tanınmış ve kültürel yapı içerisine girmiştir. Siyah üzümün özellikle meyveleri kullanılarak yapılan ilaçlar, geleneksel tıpta yüzyıllarca kullanılmıştır. Eski çağlarda; üzüm çekirdeğinden yapılan yağın; laksatif, antiasit, safra üretimini artırıcı özellikleri bilinmekle birlikte yanık ve ağrısız ülserlere karşı da yararlı olduğu belirlenmiştir.



Geleneksel tıpta siyah üzüm meyveleri özellikle, afrodisyak, diüretik, laksatif, purgatif ve serinletici olarak kullanılır. Ayrıca bronşiyal astım, kan hastalıkları, göz hastalıkları, ateş, sarılık ve boğaz ağrısında ilaç olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Siyah üzüm, Afrika'da, antiscorbüt özelliklerinden dolayı kullanılmış ve üzüm şurubunun difteri tedavisinde faydalı olduğu belirtilmiştir. Lübnan'da yaşayan insanlar üzümü; ateş, sinirlilik, karaciğer hastalıkları ile çiçek hastalığında ve tüberküloz tedavisinde tedavi amaçlı kullanmışlardır. Ayrıca siyah üzümünden yapılan kırmızı şarap değişik ağrılarda analjezik olarak kullanılmıştır.

Siyah üzümün farmakolojik etkileri İngiliz ve Amerika farmakopelerinde tanımlanmış ve içerisinde bulunan proanthocyanidinlerin vasküler bozuklukların tedavisinde terapötik etkinliklerinin oldukları yapılan çalışmalarla ısıpatlanmıştır. Üzüm çekirdeği içindeki biyoaktif antioksidan proanthocyanidinleri içeren özel farmositik ürünler, başta Fransa olmak üzere, Avrupada, venöz-lenfatik yetmezlik ve periferik kapiller permeabilite artışı gibi mikrosirkülasyon bozukluklarının tedavisinde kullanılmaktadır (7).

2.4.1. Siyah Üzümün Fenolik İçeriği

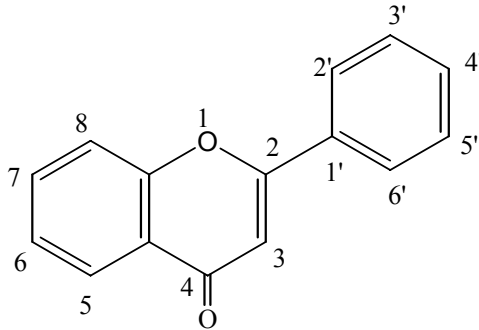
1970'li yıllarda Fransa'nın belli bölgelerinde yaşayan ve bol miktarda kırmızı şarap tüketen bireylerde yüksek oranda yağ tüketimine karşın diğer batı toplumlarına göre kalp

hastalığı oranının düşük oluşu araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Alkol almak istemeyenler siyah üzümün suyunu içtiklerinde de aynı etkiyi elde edilebilmektedir. Üzüm suyu tüketimi ile trombosit agregasyonu da azaltılabilmektedir. Kırmızı şarap beyaz şaraba göre polifenolik bileşiklerden 20-50 kat daha zengindir. Polifenolik bileşikler LDL-kolesterolun oksidasyonunu önler (56,48,57,58,44).

Siyah üzümün polifenollerinin %65'i çekirdeğinde, %22'si sapında, %12'si kabuğunda ve %1'i ise meyva özünde bulunmaktadır. Siyah üzümde bol bulunan başlıca fenolik bileşikler, fenolik asit flavonoidler, antiosiyantinler, proantiosiyantinlerdir. Polifenoller veya fenolik bileşenler iki ana kısma ayrılabilir; flavonoidler ve non-flavonoidlerdir. Fenolik bileşimler, antioksidan aktivite, serbest radikallerin temizlenmesi, lipoprotein oksidasyon inhibisyonu, LDL oksidasyon redüksiyonu gibi potansiyel kalp hastalığı risk faktörlerinin azaltılması ve ortadan kaldırılması işlevleri ile ilgilidir (8).

2.4.2. Flavonoidler

Lipidlerde çözünen antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Başlıca besinsel kaynakları elma, portakal, limon gibi meyveler ile patates, karnabahar gibi sebzelerdir. Şarap, üzüm suyu ve çay gibi bitkisel kaynaklı içeceklerde de bulunurlar (37).



Şekil 2.8. Flavonoidlerin iskelet yapısı. (59)

Flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Fenolik antioksidan, lipid radikallere hızla H[·] vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi ROO[·] ve RO[·] radikalini parçalamak ve böylece LPO zincir reaksiyonunu sonlandırmaktadır. Ayrıca bakır iyonlarıyla kompleks oluşturabilirler; bu durum antioksidan etkilerine bağlanabilir (9,10).

Flavonoidler, santral pıran halkasının farklı oksidasyonu ile oluşmuş, difenilpropanların (C₆+C₃+C₆) temel iskelet yapısına sahip fenoliklerin grubuna aittir.

Flavonoidler bitkisel pigmentler olarak bilinmektedir. Polifenolik bileşikler grubundan olup hemen hemen bütün bitkilerde bulunur. Flavonoidler altı ana alt gruba ayrılabilir, bu alt gruplar içerdikleri C halkasındaki değişimlere göre belirlenir.

Flavonlar, flavanonlar, flavanoller, antosiyanidinler, katekinler ve isoflavonlar (58,44,60). Flavonoidler açısından zengin çeşitli bitkisel kaynaklı besin ve içecekler (şarap, meyvalar, sebzeler, çay, kakao) vardır. Bir flavonol olan quercetin, besinlerde (özellikle soğan, çay) bolca bulunur (60).

Flavonoidler serbest radikal yakalayıcısı olmaları, enzim aktivitelerini düzenlemeleri, hücre çoğalmasını inhibe etmeleri, antibiyotik, antiallerjen, antidiyareik, antiülser ve antiinflamatuvar ilaç gibi işlev görmeleri dolayısı ile özellik kazanmaktadır (44, 61). Flavonoidler, oksidatif DNA zedelenmesini, serbest radikal tutulması dışında mekanizmalarla önler. Ayrıca flavonoidler endojen antioksidanların korunup ve güçlendirilmesi yolu ile de etkili olabilirler. Flavonoidlerin çoğu glutatyon-S transferaz (GST) enzimini aktive etme özelliğine sahiptir(60).

Finlandiya'da 9959 kadın ve erkek üzerinde yapılan bir çalışmada flavonoid alımı ile kanser arasında ters bir ilişki olduğu bulunmuştur. Flavonoid alımı yüksek olan bireylerde 24 yıllık gözlem sonucunda akciğer kanseri oranının %50 azaldığı

gösterilmiştir. Hawai’de elma ve soğan tüketimi ile akciğer kanseri arasında ters bir ilişki olduğu bulunmuştur (62,63).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan Materyali

Çalışmada Sprague-Dawley cinsi ortalama ağırlıkları 200-300 gr olan erkek ratlar kullanıldı. Ratlar ortama uyum sağlamaları bakımından Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezin'e geldikten bir hafta sonra çalışmaya başlandı. Uygun sıcaklıkta, rat bakımı için tasarlanmış özel kafeslerde 12 saatlik ideal aydınlık ortamında barındırıldı. Ratlar, standart yem ve musluk suyu ile beslendi.

Çalışmada kullanılan ratlar 4 gruba ayrıldı:

Grup I: Kontrol Grubu

Grup II: Siyah Üzüm Grubu

Grup III: Siyah Üzüm +Homosistein Grubu

Grup IV: Homosistein Grubu

3.1.2. Üzüm Suyu Temini ve Uygulaması

Piyasadan temin edilen siyah üzüm suyu (%100), günlük 10 ml/kg olarak 30 gün süreyle kontrol grubu hariç tüm gruplardaki ratlara gavajla verildi.

3.1.3. Homosisteinin Temini ve Uygulanışı

SIGMA chemical Co. (St. Louis, USA)'dan temin edilen homosistein kilogram başına 1mg dozda intra peritoneal (i.p.) olarak 30 gün boyunca kontrol grubu hariç bütün gruplardaki ratlara enjekte edildi.

3.2. Metot

Ratlar, siyah üzüm suyu ve homosistein verilmeden önce tartıldı ve uygun dozlar belirlendikten sonra işlem yapıldı.

Çalışmanın sürdüğü 30 gün boyunca ratların, standart yemleri ve suları her gün saat 17:00 de verildi. Siyah üzüm suyu ve homosistein verilmesini içeren işlemler yemler verilmeden önce uygulandı. Çalışmada her biri 8 rattan oluşmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Çalışma grupları aşağıdaki gibi belirlendi.

Kontrol grubu (n=8): Bu gruba gavajla musluk suyu ve intra peritoneal olarak serum fizyolojik uygulandı.

Siyah üzüm grubu (n=8): Bu gruba her günlük 10ml/kg dozda üzüm suyu gavajla verildi. Bunun yanında 1 ml/kg serum fizyolojik i.p. olarak uygulandı.

Siyah üzüm +homosistein grubu (n=8): Bu gruba günlük 1mg/kg homosistein i.p. olarak ve 10ml/kg miktarında üzüm suyu gavajla verildi.

Homosistein grubu (n=8): Bu gruba günlük 1mg/kg homosistein i.p. olarak ve 10ml/kg musluk suyu gavajla verildi.

3.2.1. Kan örneklerinin alınması ve hazırlanması

0,4 ml Ketamin + 0,6 ml Xylazine olacak şekilde anesteziik çözeltili hazırlandı ve 1,6 ml/kg miktarında i.m. olarak verildi. Derin anestezi altında toraks açılıp ekarte edilerek açık kalpten kan örnekleri dikkatle tüplere alındı. MDA, CAT, SOD ve GSH analizleri için heparin'li cam tüpler kullanıldı. Heparinli'li cam tüplere kan örnekleri alındıktan sonra, aynı gün içinde laboratuvarında gerekli parametreler çalışıldı.

Tüm spektrofotometrik ölçümlerde, Shimadzu UV-1601 spektrofotometresi kullanıldı.

Homosistein, Gallik Asit, Folin –Ciocalteu Reaktif, Etanol, Ketamin, Xylazine SIGMA chemical Co. (St. Louis, USA)'dan temin edildi. Kimyasallar analitik saflıkta idi.

3.2.2. Biyokimyasal analizler

3.2.2.1. Eritrosit Paketi ve Dilüsyonlu Stok Hazırlanması

Çalışma sonrası santrifüj edilerek tam kan ile plazma ayrıldıktan ve plazmalar ayrı tüplere alındıktan sonra eritrositler, serum fizyolojikle üç defa yıkanıp santrifüj edildi ve böylece eritrosit paketi hazırlandı.

Eritrositler 1/1 oranında soğuk distile su ile dilüe edildi ve böylece dilüsyonlu stok hazırlanmış oldu.

3.2.2.2. Hemoglobin Tayini

Reaktifler:

- Dropkin solüsyonu
- 0,2 g/dl $K_3F(CN)_6$
- 0,05 g/dl KCN
- 1,0 g/dl $NaHCO_3$

Prosedür:

Dilüsyonlu stoktan 20µl alındı ve üzerine 6 ml dropkin solüyonu eklendi ve Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 540 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı okundu. Hb değerleri standart ve numune absorbanları kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve g/dl olarak ifade edildi.

$$C_N = (A_N/A_S) \times C_S$$

C_N : Numunenin Konsantrasyonu

C_S : Standardın Konsantrasyonu

A_N : Numunenin Absorbansı

A_S : Standardın Absorbansı

3.2.2.3. Plazma MDA Düzeylerinin Tayini

Plazma MDA düzeyleri Ohkawa ve ark. yöntemine göre ölçüldü (64).

Prensip:

MDA'nın asidik ortamda thio barbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm dalga boyunda absorbanlarının ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı.

Reaktifler:

- Potasyum fosfat tamponu	0,1 M pH 7,4
- Asetik asit	% 20, pH 3,5
- Tiyobarbitürük asit (TBA)	% 0,8
- Bütanol/Piridin	15:1

Prosedür:

Plazma 0,5'er ml (500 µl) alınarak her birinin üzerine 0,2 ml %8,1 Sodyum dodesil sülfat, 5 ml %20 asetik asit (pH: 3,5) ve 1,5 ml %0,8 TBA solüsyonu eklenerek 95 °C'de 60 dakika kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 5 ml Bütanol:Piridin (15:1) eklendi ve karıştırılıp 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakadaki rengin absorbansı reaktif körüne karşı 532 nm dalga boyunda okundu. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan'ın 4,173 µmol/L'lik çözeltisi kullanıldı. MDA düzeyleri plazmada nmol/L olarak ifade edildi. Aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$C_N = (A_N/A_S) \times C_S$$

C_N : Numunenin Konsantrasyonu

C_S : Standardın Konsantrasyonu

A_N : Numunenin Absorbansı

A_S : Standardın Absorbansı

3.2.2.4. Plazma Protein Karbonil Grupları Tayini

Plazma protein karbonil grupları Levine ve ark. modifiye spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (65).

Prensip:

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNP) karbonil grupları ile birleştğinde renkli bir hidrazon oluşmakta ve oluşan bu hidrazonun absorbanası 360 nm dalga boyunda okunmaktadır.

Reaktifler:

- DNP (2,4- dinitrofenilhidrazin)	10 mM
- HCl	2 N
- TCA (Trikloroasetikasit)	%10, %20
- NaOH	1M
- Sodyum fosfat tamponu	1/15 M pH:7,8

Prosedür:

Numune plazmasından 500 µl alınarak üzerine 500 µl %20 TCA eklenip vortekslenmek suretiyle karıştırıldı. 4000 rpm'de 15 sn santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü. Pelet 500 µl DNP (2N HCl içinde 50 °C'de çözülecek) ile karıştırıldıktan sonra karanlıkta oda ısısında bir saat bekletildi. Her 10 dakikada bir vortekslenerek pelletin DNP ile muamelesi sağlandı. Daha sonra 500 µl TCA eklenip 2-3 dakika oda ısısında dinlendirildi. 4000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü ve aynı işlem %10 TCA ile üç kez tekrarlandı. presipitat 2 ml 1 M NaOH içinde 37 °C'de 30 dk. bekletilerek çözüldü. Numunenin absorbanası NaOH körüne karşı 360 nm dalga boyunda Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde okundu.

$\epsilon_{\max} = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ kullanılarak sonuçlar µmol/L olarak verildi.

3.2.2.5. Eritrosit GSH Tayini

Eritrosit GSH düzeyleri spektrofotometrik olarak Beutler yöntemi ile belirlendi (66).

Prensip:

Eritrosit GSH'nin SH grupları bir disülfid kromojeni olan 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB)'i indirgemesi ile sarı renkli bir bileşik oluşturur. Bu bileşiğin 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbanısı GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Reaktifler:

- Çöktürücü solüsyon (Proteinsizleştirme çözeltisi)
- Metafosforik asit 1,67 g/dl,
- EDTA 0,2 g/dl
- NaCl 30 g/dl
- Na₂HPO₄ çözeltisi 0,3 M
- DTNB (5,5'-2-dithiobis nitrobenzoik asit) 2 mM

Prosedür:

Dilüsyonlu stoktan 0,2 ml örnek alınarak üzerine 108 ml distile su ve 3 ml çöktürücü solüsyon eklenerek karıştırıldı. 5 dakika oda ısısında bekledikten sonra süzgeç kağıdından süzülerek filtrat elde edildi. 0,4 ml filtrat üzerine 1,6 ml 0,3 M Na₂HPO₄ çözeltisi ve 0,2 ml 40 mg/dl DTNB (%1'lik sitrat içerisinde çözülen) ile muamele edilerek oluşan rengin absorbanısı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 412 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı okundu. GSH standartı (50 µmol/L) hazırlandı. Numunelere uygulanan işlem, GSH standardına da uygulandı. GSH düzeyleri, standart ve numune absorbanıları kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve µM/gHb olarak ifade edildi.

$$C_N = ((A_N/A_S) \times C_S)/Hb$$

C_N : Numunenin Konsantrasyonu

C_S : Standardın Konsantrasyonu

A_N : Numunenin Absorbansı

A_S : Standardın Absorbansı

Hb: Hb miktarı (g/dl)

3.2.2.6. Plazma -SH Grupları Tayini

Plazma -SH grupları Koster ve ark. spektrofotometrik metoduna göre belirlendi (67).

Prensip:

Protein -SH grupları, DTNB tarafından indirgenir ve disülfid bağı oluşturarak bir kromofor (5-merkapt-2-nitrobenzoik asit) açığa çıkarırlar. Oluşan kromoforun absorbansı 412 nm dalga boyunda okunmaktadır.

Reaktifler:

- DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)) 2 mM
- Potasyum fosfat tamponu 0,1 M pH 7,4
- Sodyum Sitrat %1

Prosedür:

100 µl numune üzerine 1500 µl (1,5 ml) fosfat tamponu eklendi. 400 µl DTNB (%1 sodyum sitrat içinde) ilave edildikten sonra 5 dakika 37 °C'de bekletildi. Numunelerin absorbansı 412 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı Shimadzu UV- 1601 spektrofotometresinde okundu.

Sonuçlar $\epsilon_{\max}=13600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ kullanılarak µmol/L olarak verildi.

3.2.2.7. Eritrosit SOD Aktivite Tayini

Eritrosit SOD aktiviteleri Winterbourn ve ark. spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (68).

Prensip:

Yöntemin esasını oksijen ve fotoredüksiyonla indirgenen riboflavinin reaksiyonu sonucu oluşan O^{2-} ile NBT'un redüksiyonunu enzimin inhibe etme yeteneği oluşturur.

Reaktifler:

- EDTA+NaCN 0,1 M (0,1 M 100 ml EDTA içine 1,5 g NaCN eklenir)
- Nitro Blue Tetrazoliumchloride (NBT) 1,5 mM
- Sodyum fosfat tamponu 1/15 M pH 7,8
- Riboflavin 0,12 mM

Prosedür:

Dilüsyonlu stoktan 0,5 ml örnek alındı ve üzerine 3,5 ml soğuk distile su eklendi. İyice çalkalandıktan sonra üzerine 1 ml %99 luk etanol ve ardından 0,6 ml kloroform eklendi. 5-6 dakika çalkalandıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Sonra süpernatanttan 50 µl alınıp üzerine 200 µl EDTA+NaCN eklendi. Ardından 100 µl NBT, 2,6 ml fosfat tamponu ve 50 µl riboflavin eklendikten sonra 15 dakika kutu içinde florasan ışığına maruz bırakıldı. Oluşan rengin absorbansı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 560 nm dalga boyunda hava körüne karşı okundu. Aynı işlem SOD standartları ile tekrarlandı. Aşağıdaki formüle göre U/Hb olarak hesaplandı.

$$C_N = ((A_N/A_S) \times C_S)/Hb$$

C_N : Numunenin Konsantrasyonu

C_S : Standardın Konsantrasyonu

A_N : Numunenin Absorbansı

A_S : Standardın Absorbansı

Hb: Hb miktarı (g/dl)

3.2.2.8. Eritrosit Katalaz Aktivite Tayini

Eritrosit CAT aktiviteleri Beutler'in spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (69).

Prensip:

CAT aktivitesi, H_2O_2 'nin H_2O 'ya dönüşmesi esnasındaki absorbans değişimi reaktif körüne (H_2O_2 hariç diğer bütün reaktifleri içeren kör) karşı 230 nm dalga boyunda absorbans farkları alınarak hesaplandı.

Reaktifler:

- | | |
|-----------------|---------|
| - Tris-HCl-EDTA | pH: 8,0 |
| - Tris-HCl | 1 mM |
| - EDTA | 5 mM |
| - H_2O_2 | 10 mM |

Prosedür:

Dilüsyonlu stoktan 0,2 ml alındı ve üzerine 0,8 ml soğuk distile su eklenerek karıştırıldı. 3 kez 10'ar dakika difrizde dondurulup çözüldükten sonra distile su ile 1/200 dilüsyon daha yapıldı ve bu dilüsyondan 1 ml alınarak 100 ml ye distile su ile tamamlandı ve toplam dilüsyon 1/2000 oldu. 100 µl Tris-HCl-EDTA (pH:8,0) üzerine 1800 µl 10 mM H_2O_2 ve 60 µl distile su eklenip 10 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon,

dilüe hemolizattan (1/2000)'tan 40 µl eklenmesi ile başlatıldı. H₂O₂ 'nin H₂O 'ya dönüşümünü, 4 dakika boyunca reaktif körüne karşı (H₂O₂ hariç diğer bütün reaktifleri içeren kör) absorbans değişimi izlenip kaydedildi (5 ölçüm yapıldı). Bir dakikada oluşan ABS değişimi (ΔABS) bulundu. Enzim ünitesi, absorbans değişimi H₂O₂ 'ye ait ekstinksiyon kat sayısına bölünerek aşağıdaki formüle göre hesaplandı. CAT aktiviteleri U/g Hb olarak ifade edildi.

$$A=(\Delta ABS/(E \times N \times V_H)) /Hb$$

E: Milimolar ekstinksiyon kat sayısı (H₂O₂ için 0,71)

N: İndikatörün molekül sayısı (H₂O₂ için 2)

V_H: Homojenatın volümü

ΔABS: Dakikada değişen absorbans

Hb: Hb miktarı (g/dl)

3.2.2.9. Total Fenolik İçerik Tayini

Siyah üzüm içerisindeki toplam fenol miktarları Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir (70) .

Reaktifler:

- Folin-ciocalteu reaktifi	%10
- Na ₂ CO ₃	%7,5
- Gallik asit	20 gr gallik asit+15 ml ethanol
- Ethanol	%40

Prosedür:

%10 luk folin-ciocalteu reaktifi 2,5 ml alındı ve üzerine %7,5 lik 2 ml Na₂CO₃ çözeltisi ve 0,5 ml üzüm suyu konulup iyiye karıştırıldı.45 C de 15 dk inkübasyondan sonra 760

nm de absorbansı okundu. %40 lık 15 ml ethanolde 20 mg miktarında çözülerek hazırlanmış olan gallik asit solüsyonu standart olarak kullanıldı ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\%Fenolik \text{ içerik} = ((A_{\text{örnek}} \cdot W_{\text{standart}} \cdot 50 / A_{\text{standart}} \cdot W_{\text{örnek}} \cdot 50) / (100/100))$$

$W_{\text{örnek}}$: Örneğın Konsantrasyonu

W_{standart} : Standardın Konsantrasyonu

$A_{\text{örnek}}$: Örneğın Absorbansı

A_{standart} : Standardın Absorbansı

3.2.3. İstatistiksel Analizler

Sonuçlar SPSS 10.0 (Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak Mann Whitney-U testine göre analiz edildi. Ortalamalar \pm standart hata olarak verildi. İstatistiksel olarak önemlilik seviyesi $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Plazma MDA Düzeyleri

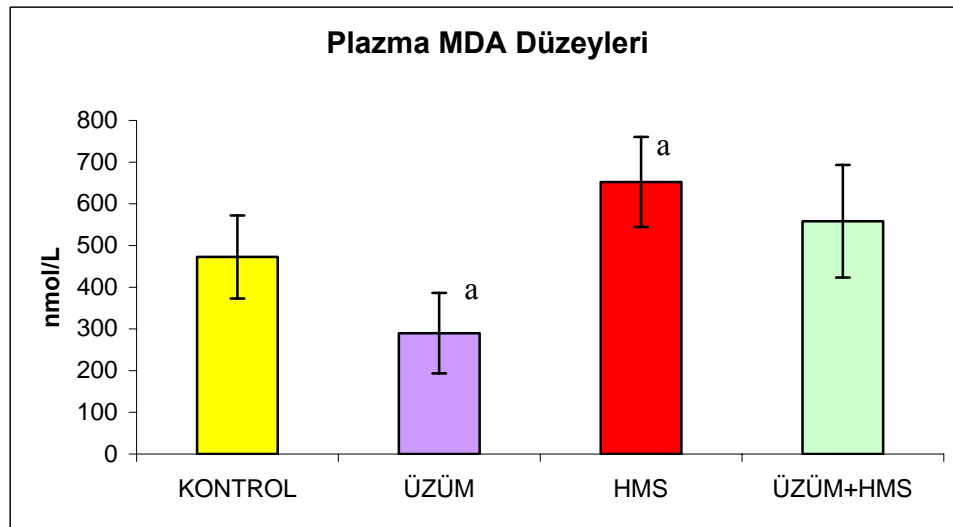
Plazma MDA düzeyleri Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre plazma MDA düzeyleri homosistein grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ($p < 0.05$) bulundu.

Kontrol grubuyla siyah üzüm+homosistein grubu ve homosistein grubu ile siyah üzüm+homosistein grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu plazma MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4.1. Plazma MDA düzeyleri.

GRUPLAR	nmol/L
Kontrol	472,65 ± 99,62
Siyah Üzüm	289,81 ± 96,54 ^a
Homosistein	652,46 ± 108,05 ^a
Siyah Üzüm + Homosistein	558,19 ± 135,05

(a) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$



Şekil 4.1. Plazma MDA düzeyi.

4.2. Plazma Karbonil Grupları

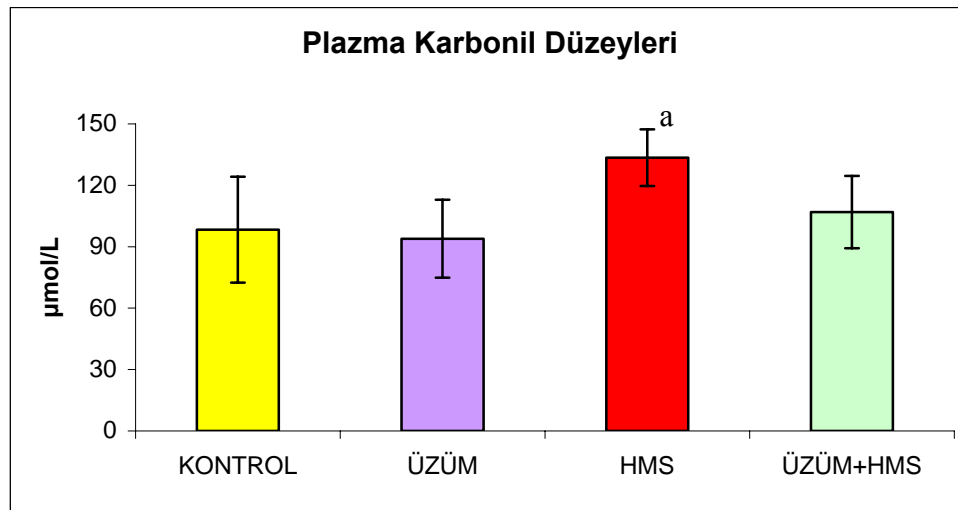
Plazma karbonil düzeyleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre plazma karbonil düzeyleri homosistein grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p<0.05$) bulundu.

Kontrol grubuyla siyah üzüm ve siyah üzüm+homosistein grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu plazma karbonil düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4.2. Plazma karbonil düzeyleri.

GRUPLAR	$\mu\text{mol/L}$
Kontrol	$98,32 \pm 25,85$
Siyah Üzüm	$93,91 \pm 19,03$
Homosistein	$133,49 \pm 13,82^a$
Siyah Üzüm + Homosistein	$106,91 \pm 17,66$

(a) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$



Şekil 4.2. Plazma karbonil grupları düzeyi.

4.3. Eritrosit Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyleri

Eritrosit GSH düzeyleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Bu bulgulara göre eritrosit GSH düzeyleri siyah üzüm grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.05$) bulundu, Homosistein+siyah üzüm grubunda da homosistein grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.05$) bulundu.

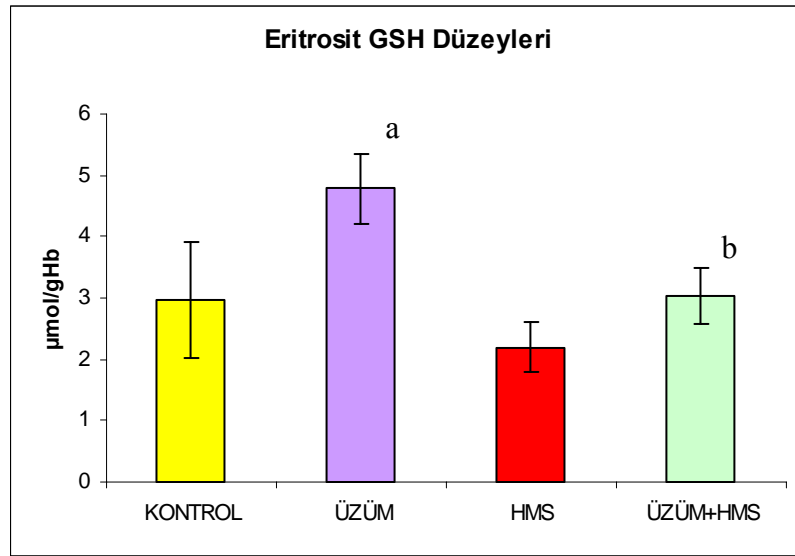
Kontrol grubuyla, homosistein ve siyah üzüm+homosistein grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu plazma karbonil düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4.3. Eritrosit GSH düzeyleri.

GRUPLAR	$\mu\text{mol/gHb}$
Kontrol	$2,96 \pm 0,93$
Siyah Üzüm	$4,78 \pm 0,56^a$
Homosistein	$2,19 \pm 0,40$
Siyah Üzüm + Homosistein	$3,04 \pm 0,47^b$

(a) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$

(b) Homosistein grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,01$



Şekil 4.3. Eritrosit GSH düzeyleri.

4.4. Plazma Sülfhidril (-SH) Grupları

Plazma -SH düzeyleri Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre plazma -SH düzeyleri homosistein grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ($p<0.05$) bulundu, Homosistein+siyah üzüm grubunda ise homosistein grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($p<0.05$) bulundu.

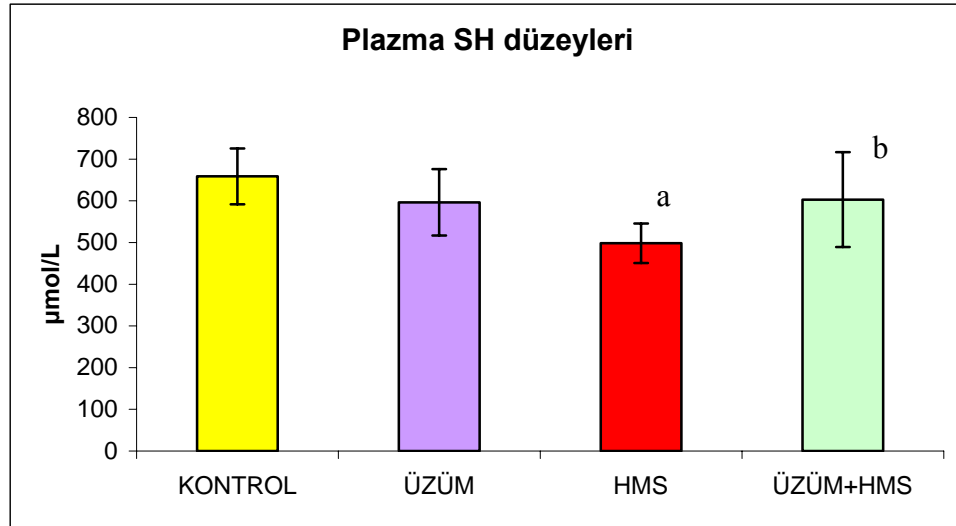
Kontrol grubuyla siyah üzüm ve siyah üzüm+homosistein grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu plazma -SH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4.4. Plazma -SH düzeyleri.

GRUPLAR	$\mu\text{mol/L}$
Kontrol	658,65 \pm 66,96
Siyah Üzüm	596,27 \pm 79,61
Homosistein	498,25 \pm 47,36 ^a
Siyah Üzüm + Homosistein	602,95 \pm 113,61 ^b

(a) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$

(b) Homosistein grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$



Şekil 4.4. Plazma -SH düzeyleri.

4.5. Eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) Aktiviteleri

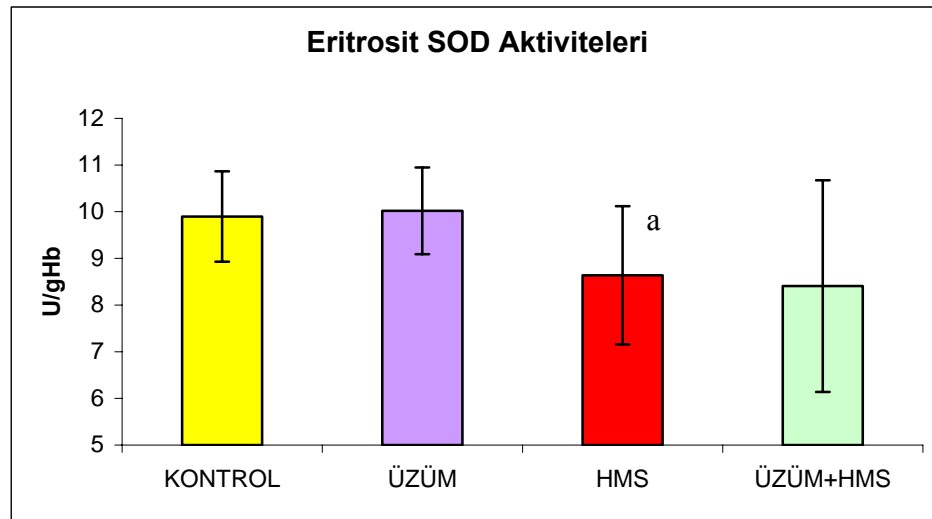
Eritrosit SOD aktiviteleri Tablo 4.5 ve Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre eritrosit SOD aktiviteleri homosistein grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ($p<0.05$) bulundu.

Kontrol grubuyla, siyah üzüm ve siyah üzüm+homosistein grubu arasında ve homosistein ile üzüm+homosistein grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu, eritrosit SOD aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4.5. Eritrosit SOD aktiviteleri.

GRUPLAR	U/gHb
Kontrol	9,90 ± 0,97
Siyah Üzüm	10,02 ± 0,93
Homosistein	8,64 ± 1,48 ^a
Siyah Üzüm + Homosistein	8,41 ± 2,27

(a) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$



Şekil 4.5. Eritrosit SOD aktiviteleri.

4.6. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktiviteleri

Eritrosit CAT aktiviteleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.6'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre eritrosit CAT aktiviteleri siyah üzüm grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0.05$) bulundu, Homosistein+siyah üzüm grubunda da homosistein grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0.05$) bulundu.

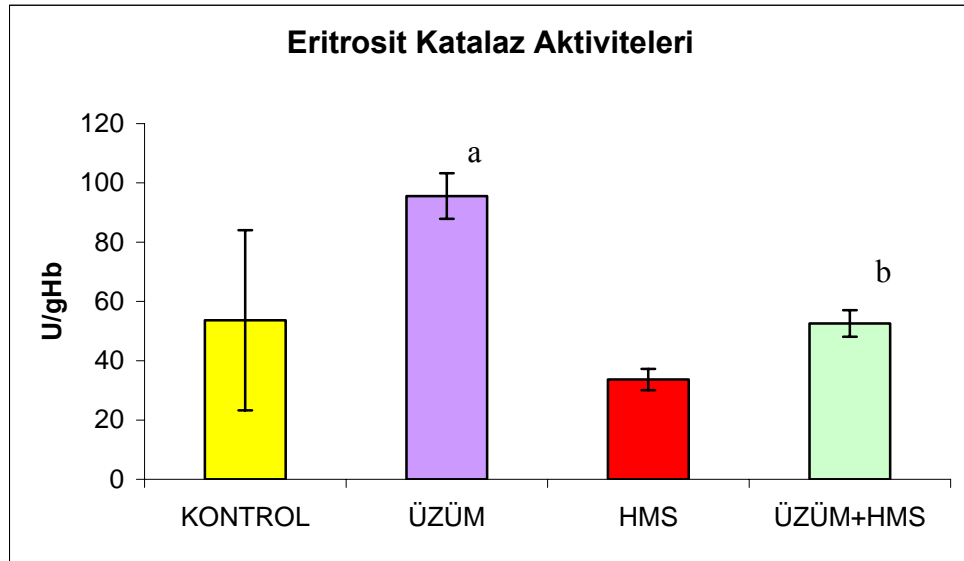
Kontrol grubuyla, homosistein ve siyah üzüm+homosistein grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu eritrosit CAT aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4.6. Eritrosit CAT aktiviteleri

GRUPLAR	U/gHb
Kontrol	53,64 ± 30,40
Siyah Üzüm	95,55 ± 7,70 ^a
Homosistein	33,65 ± 3,59
Siyah Üzüm + Homosistein	52,58 ± 4,47 ^b

(a) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$

(b) Homosistein grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,01$



Şekil 4.6. Eritrosit CAT aktiviteleri.

4.7. Toplam Fenolik İçerik

Siyah zm de bulunan toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu Metodu (70) kullanılarak tayin edilmiştir ve sonuç olarak; toplam fenolik içerik 720 mg/ml olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Homosistein sülfür bağı bir amino asittir. Homosistein vücuttaki tüm hücrelerde diyetle alınan metiyoninden demetilasyon yolu ile oluşur. Homosistein insan plazmasında, hem indirgenmiş (redükte) hem de oksidize formda serbest veya proteine bağı formda bulunur. Redükte homosistein, yüksek oranlarda reaktif serbest tiol gruplarına sahiptir. Bu gruplar redoks reaksiyonlarına katılabilir ve fizyolojik pH da otooksidasyona karşı duyarlıdır. Bu sebeple iki homosistein molekülü arasındaki disülfid bağı şekilleri veya sisteinle karışık disülfidler oluşmuştur.

Homosisteinin sentez ve metabolizmasının büyük kısmı karaciğerde gerçekleşir. Metioninin büyük çoğunluğu karaciğerde metabolize olur. Karaciğer, metionin ve dolayısıyla homosistein metabolizmasında yer alan genlerin ekspresyonunda büyük rol oynar. Betain-homosistein metil transferaz (BHMT) ve sitatyonin beta sentaz (CBS) enzimlerinin sentezi karaciğer de gerçekleşir. Bu nedenle karaciğer hasarı gerçekleştiğinde homosistein metabolizmasında önemli değişiklikler meydana gelir.

Homosistein, koroner arter hastalıkları ve periferel vasküler hastalıklar için göz önünde bulundurulması gereken önemli ve bağımsız bir risk faktörüdür. Kalp-damar hastalıklarının gelişiminde plazma homosistein düzeylerinin yükselmesinin etkili olduğu genel bir anlayış olarak benimsenmiştir (71,72,73).

Serbest radikaller, hücre metabolizmasında meydana gelen biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan ve çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir. Miyokardiyal enfarktüs, diyabet, kanser, katarakt, romatoid artrit, infertilite, solunum, sinir ve üriner sistem hastalıkları ile stres ve yaşlanma sürecinde antioksidan enzim aktivitelerinde önemli değişiklikler ve lipit peroksidasyonunda artışla birçok hastalığın patolojik sürecinde önemli role sahiptirler (74).

Siyah üzüm (*vitis vinifera*) özellikle çekirdeğinde bulunan yüksek fenolik bileşim ve bu fenolik bileşimden kaynaklanan flavonoidlerin de sayesinde güçlü bir antioksidan etki göstermektedir. Siyah üzüm bu antioksidan etki sayesinde bir çok farmakolojik özelliğe sahiptir ve oksidatif strese karşı korunma sağlar (75).

Kazem ve ark. (76) tarafından yapılan bir çalışmada, üzüm yaprağı ekstraktının izole rat aortları üzerine vazorelaksasyon etkisi tespit edilmiştir. Fenolikler aromatik halkalarında OH grubu içerdikleri için kısmi reaktiviteye sahiptir ve bu özelliklerinden dolayı antioksidanlar gibi davranırlar. Antioksidan aktivitenin majör metabolizması hidrojen atomlarını vererek radikal temizleme esasına dayanır (75).

Homosistein düzeylerinin artması sonucu H_2O_2 oluşumu artar, antioksidan savunma sistemleri etkilenir ve lipid peroksidasyonu artar ve bunların sonucu olarak endoteial hücreler üzerine toksik etki yaratır (72).

Huang ve arkadaşlarının (77) yaptıkları çalışmaya göre, düşük folat içeriği ve bunu takiben yüksek plazma homosistein konsantrasyonları, ratlarda lipid peroksidatif hasarla beraber oksidatif stres yaratmıştır. Folat eksikliği bulunan ratların karaciğerinde peroksidatif hasar artmıştır. Neden olarak, plazma homosistein düzeylerinin artması gibi güçlü bir oksidan etkinin varlığını veya hepatik antioksidan enzim fonksiyonlarının azalması ile hepatik antioksidan mekanizmanın gücünün de azalması ile oksidatif hasarın şiddetlenmesini göstermişlerdir.

MDA nonenzimatik oksidatif lipid peroksidatların parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerinden biridir. İki den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda ve eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksidatlar MDA'nın asıl kaynağıdır (78).

Yüce ve ark. (74) homosistein verilen ratların plazma ve doku MDA değerlerini incelendiğinde sadece homosistein uygulanan ratların plazma MDA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığını belirtmişlerdir. Bu sonuç artan homosistein miktarının, lipid peroksidasyon oluşumunu engelleyen ve antioksidan

enzimlerden biri olan olan GSH-Px'in aktivitesini azaltarak oluşturduğu görüşünü destekler nitelikte olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada ratlarda karaciğer iskemi/perfüzyon hasarına üzüm çekirdeğinde bulunan pronosiyadinlerin etkileri araştırılmış ve çalışmada MDA yükselmesi üzüm alan grupta anlamlı olarak engellenmiştir (79).

Bizim çalışmamızda homosistein verilen ratlarda, plazma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Siyah üzüm suyu verilen ratların, plazma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Homosistein grubunda yüksek MDA değerleri, homosisteinin oksidatif stresi indüklediğini düşündürürken siyah üzüm grubunda düşük MDA değerleri siyah üzümün oksidatif strese karşı koruyucu etkisine bağlanabilir.

Vanetura ve ark. (80) homosistein tarafından indüklenen oksidatif stresin, membran lipit preroksidasyonu ölçümü sonucu, MDA düzeylerinde artış gözlemlemiş ve metiyonin yükleme testi yapmışlardır. Sonrasında sağlıklı denekler ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, yüklemekten 8 saat sonra plazma antioksidan kapasitede bir azalma gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Sreemantula ve ark. (81) yaptıkları çalışmada, siyah üzüm ekstraktının antioksidan aktivitesini, Hidroksil Radikal Assay Metodu kullanılarak göstermişlerdir. Böylece Vitis vinifera ekstraktının askorbik asitten 8 kat daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

James ve ark. (82) koroner arter hastalarında siyah üzümün kısa süreli alımı sonucunda endotelial fonksiyonların geliştiğini ve LDL oksidasyon hassasiyetinin azaldığını belirtmişlerdir. Siyah üzümde bulunan flavonoidler tarafından sağlanan potansiyel bir mekanizma tarafından endoteliuma bağlı vazodilatasyon gerilediği ve LDL oksidasyonu önlediği savunulmuştur.

Antosiyaninler ve diğer flavonoidlerle fenolik asitlerin serbest radikalleri tutma ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme etkileri vardır. Kırmızı ve siyah frenk üzümünün, benzer antiradikal etkileri bilinmektedir. Bu meyve ekstraktlarının tümü kimyasal yolla açığa çıkan süperoksit radikallerine karşı yüksek aktivite özelliği göstermektedir. Yine bu ekstraktlar, hücrede serbest radikal oluşumunu başlatan ksantinoksidaz enzimine karşı inhibitör etkiye sahiptir (83).

Terao ve ark. (84) quercetin fosfolipid çift tabakalarında lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisini göstermişlerdir. Flavonoidlerin, Fe ve Cu gibi geçiş metalleri şelatlayarak bu iyonların Fenton Reaksiyonu ile H_2O_2 'den $\cdot OH$ radikali oluşumunu engelleyerek lipid peroksidasyonunu önlemektedir (85).

Protein karbonil türevlerinin oluşumuna neden olan primer modifikasyon reaksiyonları, aminoasitlerin α -karbon atomlarının veya yan zincirlerinin oksidatif modifikasyona uğramalarından ve bu modifikasyonları takiben, reaktif oksijen-aracılı peptit ayrılması reaksiyonundan oluşmaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit de veya proteinlerin peptit omurgasında oluşan oksidatif hasardan dolayı protein karbonil ürünleri oluşur. Protein karbonil düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede hassas ve genel olarak uygulanan bir yöntemdir (86).

Esterbauer ve ark. (86) poliansatüre yağ asitlerinin radikal bağımlı oksidasyonu sonucu α,β -doymamış aldehitlerinin, özellikle 4-HNE'nin oluştuğunu ve bu moleküllerin proteinlerin sülfidril grupları ile "Michael addition tip" mekanizması ile reaksiyona girerek, karbonil fonksiyonunu içeren daha stabil tiyoeter türevlerini oluşturduklarını göstermişlerdir. Ayrıca bu α,β -doymamış aldehitleri histidin ve lizin rezidüleri ile reaksiyona girerek, karbonil içeren molekülleri oluşturduğu belirtilmiştir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmaya göre, homosistein düzeylerindeki artış, vasküler hasarda rol oynayan reaktif oksijen türlerindeki artışa neden olur (74). Homosistein düzeylerinin yüksek olmasından kaynaklanan ROS ise birincil olarak

nitrik oksid sentez mekanizması tarafından ve ikincil olarak homosistein oksidasyonunun artmasından dolayı oluşmaktadır (87).

Horakova ve ark. (88), standartize flavonoid (EGb 761, Pycnogenol) ekstraktı ve troloks ve stobadin'in antioksidan etkisini araştırmış ve tavşan iskelet kaslarında bulunan sarkoplazmik retikulum üzerine $Fe^{+3}/H_2O_2/AA$ ve $HOCl$ oksidan sistemler tarafından oksidatif hasar gerçekleşmesini sağlamışlardır. Bunun sonucunda oksidan + antioksidan gruplarının protein karbonil düzeyleri, oksidan gruplarının protein karbonil düzeylerine göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmada, plazma karbonil düzeyleri (PCO) açısından yukarıda belirtilen çalışmaya paralel sonuçlar elde ettik (88). Homosistein verilen ratların plazma karbonil düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0,05$). Siyah üzüm ve siyah üzüm + homosistein gruplarında ise homosistein gruplarına göre plazma karbonil düzeylerinde düşüş gözlenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Siyah üzümün plazma karbonil düzeylerini düşürmesi siyah üzümün yüksek homosistein değerlerinde meydana gelen serbest radikalleri temizleme özelliğinden ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisinden kaynaklanabilir.

Sisteinin $-SH$ grubu oksidatif hasara oldukça hassastır ve $-SH$ gruplarından farklı mekanizmalarla oluşan tiil radikali ($-S^{\cdot}$) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna yardım eder. $-SH$ gruplarının disüfitle ve oksiasitler gibi oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikallerden kaynaklanan protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir. Tiyol gruplarının diğer bir oksidasyon şekli ise 4-hidroksinonenal'in, proteinlerdeki $-SH$ gruplarına Michael Reaksiyonu sonucunda tioeter bağıyla bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Michael Reaksiyonu geri dönüşümlü bir reaksiyondur (89).

Bizim yaptığımız çalışmada homosistein verilerek oksidatif strese maruz bırakılan homosistein grubunun plazma $-SH$ düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0,05$). Üzüm+homosistein grubunun plazma $-SH$ düzeyleri ise

homosistein verilen grubun plazma –SH düzeylerinden anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$).

Köken ve ark. (90) nın yaptığı çalışma da, protein –SH ve karbonil düzeyleri bizim çalışmamızda gözlenen düzeylerle paralellik göstermektedir. Bu çalışma da kronik böbrek yetmezliği oksidatif stres için bir risk faktörü olarak belirlenmiş ve (KBY) bulunan hastalarda renal antioksidan enzim sentezinin bozulması, demir tedavisi ve besin kısıtlamasından kaynaklanan selenyum ve GSH eksikliğini oksidatif stresin nedenleri olarak belirtilmiştir. KBY'li hastalarda protein karbonil içeriği sağlıklı kişiler ile kıyaslandığında artmış olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışmada plazma protein –SH gruplarının oksidatif hasara karşı hassas olup, oksidatif hasarın olduğu hastalıklarda plazma protein –SH düzeylerinin düştüğünü belirtilmiş ve yapılan çalışma sonucu kronik böbrek yetmezliği bulunan hastaların sağlıklı bireylere göre plazma protein –SH düzeylerinin düştüğü belirtilmiştir.

GSH, karaciğerde sentezlenebilen bir tripeptittir ve non-enzimatik antioksidandır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek oksidatif hasarın oluşmasına engel olur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellemesinin yanında GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu sağlar. GSH'nın en önemli görevlerinden biri, proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını, vitamin E ile vitamin C'yi redükte halde tutmaktır ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylelikle membran antioksidan savunma sistemi korunmuş olur. GSH eksikliğinde okside olan bu vitaminlerin redüksiyonu azalacak ve membran yapısında bozulmalar görülecektir (86,90).

Mosharov ve ark. (91) homosisteinin GSH sentezini azaltarak, GSH antioksidan savunma sisteminin intraselüler inaktivasyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmaya göre koroner aterosklerosisli hastalarda, kontrol gruplarına göre eritrosit GSH değerleri daha düşük bulunmuştur. Bunun sonucunda, GSH ve total homosistein arasında önemli derecede zıt bir korelasyonun göstergesi olduğu belirtilmiştir (4).

Yapılan bir çalışmada karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarı boyunca hepatik GSH konsantrasyonunun hızla azaldığını ve glutatyon seviyesinin üzüm çekirdeği ekstraktı tedavisi ile anlamlı olarak yüksek kaldığını gösterilmiştir. Bu durumun GSH'un reaktif oksijen moleküllerinin nötralize etmek için kullanılmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (79). Bir çok çalışmada eksojen olarak verilen GSH'un hücre içi GSH seviyelerini artırdığı ve oksidatif hasarı engellediği gösterilmiştir. Ayrıca glutatyonun oksidatif yaralanmalarda major koruyucu olarak etkisi tespit edilmiştir (92,93).

Yaptığımız çalışmada homosistein uygulanan ratların, siyah üzüm verilen ratların ve Homosistein+siyah üzüm verilen ratların eritrosit GSH düzeyleri incelendiğinde yukarıdaki çalışmayla paralel sonuçlar bulunmuştur (78). Siyah üzüm grubunun eritrosit GSH değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Homosistein+siyah üzüm grubunun eritrosit GSH değerleri homosistein grubunun eritrosit GSH değerlerinden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,01$).

Rajdl ve ark (92) yaptıkları çalışmada günlük olarak uygun miktarda tüketilen beyaz şarabın kardiyoprotektif ve antioksidan etkiye sahip olduğunu önermişlerdir. Bu çalışmada intraselüler GSH düzeylerindeki artış sonucunda, beyaz şarabın reaktif oksijen türlerine karşı iyi bir redüksiyon sağladığı tespit edilmiştir.

Yüce ve ark. (74) ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, periton içi homosistein uygulamasının plazma homosistein, MDA ve doku MDA düzeylerini artırdığını, plazma SOD, CAT, GSH, GSH-Px ve doku GSH, GSH-Px aktivitelerini azalttığını tespit etmişlerdir. Buna karşılık periton içi homosistein uygulamasına ek olarak melatonin uygulaması plazma homosistein, MDA ve doku MDA düzeylerini azaltırken, plazma SOD, CAT, GSH, GSH-Px ve doku GSH, GSH-Px aktivitelerini artırdığını belirtmişlerdir.

Süperosit dismutaz (SOD) enzimi süperoksidin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizler ve antioksidan savunmanın ilk basamağını oluşturur. SOD intrasellüler savunmada aerobik hücrelerde oksijen radikalinin zararına karşı önemli rol oynar.

Homosistein, SOD'ın endotel hücre yüzeyine bağlanmasını sağlayan endotel heparan sülfat proteoglikanını bozar ve arteriyel endotel hücre yüzeyine SOD'ın bağlanmasını engeller. Homosisteinin yüksek düzeyleri fibroblastarca ortama verilen SOD basımını azaltır. Böylece homosistein, endotel hücrelerinin özellikle süperosit radikali olmak üzere serbest radikallere karşı savunma yeteneğini azaltmış olur (74).

Yapılan bir çalışmada homosisteinin plazmada hızla otooksidasyona uğrayarak homosistin, mikst disülfidler ve homositein tiolakton oluşturduğu belirtilmektedir (72). Homosisteinin otooksidasyonu sırasında süperoksid ve hidrojen peroksid gibi potent reaktif oksijen molekülleri oluşmaktadır. Özellikle hidrojen peroksidin hiperhomosisteinemiye bağlı vasküler toksisitede rol oynadığı düşünülmektedir. Hidroksil radikalinin süperoksid anyon radikaline bağlı oluşumunun endotelial plazma membranı ve içindeki lipoprotein partikülleri düzeyinde bir etkiyle lipid peroksidasyonunu başlattığı gösterilmiştir (72).

Reshma ve ark. (94) oral kanserde eritrosit antioksidanlar üzerine okkum flavonoidlerinin etkilerini araştırmış flovanoidlerin uygulandığı grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında SOD aktivitesi, bizim çalışmamıza benzer şekilde yüksek bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmada, homosistein grubunun eritrosit SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuç homosistein uygulanan ratlarda oksidatif hasarın bir göstergesi olabilir. Siyah üzüm grubunda eritrosit SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre hafif artışa rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Kahraman ve ark.(93) yaptıkları çalışmada etanolün indüklediği gastrik lezyonlara quarcetin antioksidatif, antihistaminik etkisini araştırmışlar ve SOD

aktivitelerinde etanol verilmesiyle önemli düşüş gözlenirken, quarcetin verilmesiyle önemli artış tespit etmişlerdir.

Lin ve ark. (95) üzüm süspansiyonunun, bilateral iskeminin oksidatif etkilerine karşı koruyucu etkisini araştırmak için tavşanlarla yaptıkları çalışmada, SOD ve CAT regülasyon aktivitesine, üzüm süspansiyonunun koruma etkisinin eşlik ettiğini önermişlerdir ve üzüm verilen gruplarda SOD ve CAT aktivitesinde yükselme tespit etmişlerdir.

SOD enziminin canlılardaki dağılımı CAT ile birlikte incelenmelidir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürün, oksijenin toksik türlerinden biridir ve CAT tarafından birikimi önlenmektedir. CAT, genel hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Daha çok peroksizomlarda bulunur. CAT'ın hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük molekülleri indirgeyici aktivitesi vardır ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ile böbreklerde yüksek miktarda bulunur (66).

Yaptığımız çalışmada, siyah üzüm grubunun eritrosit CAT aktivitesi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Homosistein+siyah grubunun eritrosit CAT aktiviteleri ile homosistein grubunun eritrosit CAT aktiviteleri karşılaştırıldığında, homosistein+üzüm suyu CAT aktivite değerlerinin anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Bunun nedeni, üzüm suyunda bulunan flavonoidlerin homosisteinin neden olduğu serbest radikallere karşı antioksidan etki göstermesi olabilir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak ratlara homosistein uygulanarak oksidatif stres indüklenmiş ve melatoninin oksidatif hasara karşı antioksidan etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, homosistein uygulanan ratların plazma SOD ve CAT değerleri, kontrol ve melatonin grubu ratların plazma SOD ve CAT değerlerinden anlamlı olarak düşük olduğu tespit edilmiştir (74).

6. SONUÇ

Sonuç olarak homosisteinin, yüksek plazma MDA düzeyleri ile yansıtılan lipit peroksidasyonunda ve yüksek protein karbonil düzeyleri ile yansıtılan protein oksidasyonunda artışa neden olduğu görülmektedir.

Siyah üzüm+Homosistein grubunda Homosistein grubuna göre plazma MDA düzeylerinin düşmesi ve buna karşın eritrosit GSH, plazma protein –SH düzeylerinin ve eritrosit SOD ve CAT aktivitelerinin artması, üzüm suyunun fenolik içeriğinden dolayı ve yüksek homosistein düzeylerinin indüklediği oksidatif strese karşı siyah üzüm suyunun antioksidan olarak koruyucu etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ratlarla yapılan bu çalışmanın insan çalışmaları ile desteklenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Boztepe Derici Ü., Altok Reis K. (2002) Hiperhomosisteinemi ve kronik böbrek yetmezliği. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi **I(3)**, 129-134.
2. Temel İ., Özerol E. (2002) Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi **9(2)**, 149-157.
3. Vychytil A., Födinger M., Wolf G., et al. (1998) Major determinants of hyperhomocysteinemia in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* **53**, 1775-1782.
4. Bolander C. (2002) Focus On Homocysteine And The Vitamins Involved In Its Metabolism (ed). Second enlarged et revised edition, springer verlage france, Sweden.
5. Sies H. (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* **82**, 291-295.
6. Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y. (2002) İnsan Biyokimyası (eds). Palme Yayıncılık, Ankara.
7. Masquelier J. (1997) Perfumes, Cosmetiques, Aromes. Oct.-Nov., 89-97.
8. Antioxidant properties of muscadine grape products trivette l. (2003)Vaughan.
9. Feredtoon S., Janitha P.K., Wanasundara P.D. (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **32(1)**, 67-103.
10. Avcı A. (2001) Diyabet oluşturulmuş ratlarda böbrek antioksidan savunma sistemi ve E vitaminin etkileri (ed) Ankara Üni.Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 56s (yayınlanmamış).
11. Prior R.L.(2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* **78(Suppl)**, 570S-578S.
12. Dillard C.J., German J.B. (2000) Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J Sci Food Agric* **80**, 1744-1756.
13. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* **329**, 23-38.
14. Wyllie A.H., Duvall E. (1992) Cell injury and death. In: Mcgee J.O.D., Isaacson P.G., (eds) Wright NA. *Oxford Textbook of Pathology*. Newyork: Oxford University Press, 141-193.

15. Brattstrom L., Israelsson B., Tengborn L., Hultberg B. (1989) Homocysteine, factor VII, and antithrombin III in subjects with different gene dosage for cystathionine β -synthase. *J Inher Metab Dis*; **12**, 475-482.
16. Upchurch G.R., Welch G.N., Freedman J.E., Loscalzo J. (1995) Homocysteine attenuates endothelial glutathione peroxidase and thereby potentiates peroxide-mediated cell injury. *Circulation* **92**, 1-28.
17. Del Maestro R.F. (1980) An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta 48 Physiol* **492**, 153-168.
18. Kehre J.P., Smith J.V. (1994) Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in etiology of human diseases; In Frei B. (ed) : *Natural Antioxidants In Human Health and Disease*. San Diego: Academic Press 25-62.
19. Uysal M. (1998) Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidanantioksidan dengesi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* **11**, 336-341.
20. Dündar Y., Aslan R. (2000) Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. 1.Baskı Ankara: Uyum Ajans 4-11.
21. Aslan R., Şekeroğlu M.R., Bayiroğlu F. (1995) Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücrel Antioksidan Savunma. *Sağlık.Bil. Derg.* **2**, 137-142.
22. Byung P.Y. (1994) Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews* **74(1)**, 139-172.
23. Haris E.D. (1992) Regulation of Antioxidant Enzymes. *Faseb Jour.* **6**, 2675-2683.
24. Aslan R., and Dündar Y. (1998) Nitric Oxide As Biophysiological Component and A Radical Metabolite. *Konya Hayvancılık Araş. Derg* **8**, 34-38.
25. McCord J.M., (1993) "Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance", *Clin. Biochem.* **26(5)**, 351- 357.
26. Onat T., Emerk, K., Sözmen, E.Y, (2002) İnsan Biyokimyası (eds) Palme Yayıncılık, Ankara.
27. Fridovich I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **44**, 147-59.
28. Kılınç K., Kılınç A., (2002) Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* **33(2)**, 110-118.
29. Akkuş İ. (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri (ed) Mimoza yayımları, Konya.
30. Halliwell B., and Gutteridge J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine* (eds) Oxford: Oxford University Press.

31. Yanbeyi S., (1999) Aspirin ve antioksidant butylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri (ed). Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun.
32. Kılınç K., Kılınç A. (2002) Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi **33(2)**, 110-118.
33. Akkuş İ. (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları. Konya.
34. Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. Am J Med **91**, 11- 12.
35. Haber F., Weiss J.J. (1984) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc R Soc Lond Ser **147**, 332-351.
36. Gutteridge, J.M. (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. Dec; **41(12 Pt2)**, 1819-28.
37. Dikici İ. (1999) Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması (ed). Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 73s (yayınlanmamış).
38. Shacter E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metab Rev **32**, 307-326.
39. Berlett B.S., Stadtman E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stres. J Biol Chem **272**, 20313-20316.
40. Kayalı R., Ça katay U. (2004) Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. Cerrah paşa tıp dergisi **35(2)**, 83-89.
41. Mosharow et al. (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione syntesis by the transsulphuration pathway and its regulation by redox changes. Biochemistry **39**, 13005-11.
42. Dawn B.M., Allan D.M., Colleen, M.S. (1996) Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach (eds). Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.
43. Burtis C.A., Ashwood E.R. (1999) Tietz Textbook of Clinical Chemistry (eds). W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
44. Meister K.A., Whelan E.M., Kava R. (2000) The health effects of moderate alcohol intake in humans: an epidemiologic review. Crit Rev Clin Lab Sci **37**, 261-96.

45. Boyd R.F., (1988) *General Microbiology* (ed). Second edition, Times Mirror/Mosby College Publishing, Missouri, ABD.
46. Yılmaz S., Ozan T.S. (2003) Meme Kanserli Hastalarda Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki. *Türk Biyokimya Dergisi*, **28(4)**, 252-256.
47. Rice-evans C.A., Dıpllock at., Symons M.C.R. (1991) *Techniques in free radicals research*. Elsevier, Amsterdam, vol **22**, 19-50.
48. What you need to know about the health benefits of functional foods. (2007) <http://www.extension.iastate.edu/Publications/PM1798.pdf>
49. Beutler E., Duron O., Kelly B.M. (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. May; **61**, 882-8.
50. Frei B. (1994) Reactive oxgen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action.,*The American Journal of Medicine*, **97(Suppl 3A)**, 26,3A-5S-3A 12S.
51. Dı Mascio P., Murphy M.E., Sies H. (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr*. Jan;**53(1 Suppl)**, 194S-200S.
52. İnternet kaynağı (2007) <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-05.doc>
53. Parcell S. (2002) Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med. Rev* **7**, 22-44.
54. Kim Y.G., Kim S.K., Kwon J.W., Park O.J., Kim S.G., Kim Y.C., et al. (2003) Effects of cysteine on amino acid concentrations and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition. *Life Sci*; Sarmısağın ve tiol içeren bazı bileşiklerin antioksidatif etkileri **72**, 1171-81.
55. Alvarez B., Ferrer-Sueta G., Freeman B.A., Radi R. (1999) Kinetics of peroxy-nitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J Biol Chem* **274**, 842-8.
56. Keevil J.G., Osman H.E., Reed J.D., Folts J.D. (2000) Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr* **130**, 53-5.
57. Hasler C.M. (2002) Functional foods: benefits, concerns and challenges – a position paper from the American Council on Science and Health. *J Nutr* **132**, 3772-3781.
58. Constant J. (1997) Alcohol, ischemic heart disease, and them French paradox. *Coron Artery Dis* **8**, 645-649.

59. Shahidi F., Naczki M. (1995) Food Phenolics (eds). Technomic Publishing Company, Pennsylvania.
60. Ross J.A., Kasum C.M. (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* **22**, 19-34.
61. Beecher G.R. (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* **133**, 3248S-3254S.
62. Knekt P., Jarvinen R., Seppanen R., et al. (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* **146**, 223-230.
63. Le Marchand L., Murphy S.P., Hankin J.H., Wilkens L.R., Kolonel L.N. (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**, 154-160.
64. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for Lipid Peroxidase in Animal Tissues By Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-358.
65. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., (1990) Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Method Enzymol* **186**, 464-478.
66. Beutler E., Robson M.J., Buttenvieser E. (1957) The Glutathione Instability of Drug Sensivity Red Cells. *J Lab Med* **49**, 84.
67. Koster J.F., Biemond P., Swaak J.G. (1986) Intracellular and Extracellular Sulphydryl Levels in Romatoid Arthritis. *Annals of The Rheumatic Disease* **45**, 44-46.
68. Wintenbourn C.C., Hawkin R.E., Brian M., Corell R.W. (1975) The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* **85**, 337-341.
69. Beutler E. (1973) Red Cell Metabolism, A Manuel Of Biochemical Methods. Grune & Stratton, Inc., New York.
70. Novrak R. et al. (2007) Polyphenols of Rosa L. leaves extracts and their radical scavenging activity. *Z Naturforsch [C]*. **62(1-2)**, 32-8.
71. Tekkeş Y. (2006) Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve e vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması (ed). Kahramanmaraş Sütçü imam Üniversitesi Fen Bilimleri enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 66s (yayınlanmamış).
72. McCully K.S. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia. *Am J Pathol* **56**, 111-128.
73. De la Vega M.J., Santolaria F., Gonzalez-Reimers E., et al. (2001) High prevalence of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: the importance of the

thermolabile form of the enzyme methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR). Alcohol Oct; **25(2)**, 59-67.

74. Yüce A., Aksakal M. (2006) Ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisi F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, **20(1)**, 51-59.

75. Yu H., Zhao X., Xu G., and Wang S.E. (2003) Effect of grape seed extracts on blood lipids in rabbits model with hyperlipidemia. Wei Sheng Yan Jiu **31(2)**, 114-116.

76. Kazem M., Naseri G., Heidari A. (2006) Bronchodilatory Activity of Vitis vinifera LeafHydroalcoholic Extract in Rat Iranian Biomedical Journal **10(2)**, 79-83.

77. Huang R.F. et al. (2001) Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. J. Nutr **131(1)**, 33-8.

78. Schimizu S., Saitoh Y., Yamamoto T., Momose K. (1994) Stimulation by hydrogen-peroxide of L-arginine metabolism to L-citrulline coupled with nitric oxide synthesis in cultured endothelial cells. Res Commun Chem Path Pharmacol, **84**, 315-329.

79. Özel Y. (2006) Ratlarda karaciğer iskemi/reperfüzyon Hasarında grape seed proanthocyanidininin Koruyucu etkilerinin incelenmesi Genel cerrahi kliniği İstanbul. Uzmanlık tezi (yayınlanmış).

80. Ventura P., et al. (2000) peroxidation indices and total antioxidant capacity in plazma during hyperhomocysteinemia induced by methiyonine oral loading. Metabolism clinical and experimental **49**, 2255-8.

81. Sreemantula S., Nammi S., Kolanukonda1 R. Et al. (2005) Adaptogenic and nootropic activities of aqueous extract of Vitisvinifera (grape seed): an experimental study in rat BMC Complementary and Alternative Medicine, 5, 1 doi:10.1186/1472-6882-5-1.

82. James H. et al. (1999) Purple Grape Juice Improves Endothelial Function and Reduces the Susceptibility of LDL Cholesterol to Oxidation in Patients With Coronary Artery Disease Circulation. **100**, 1050-1055.

83. Gültaş M., ve Turantaş F. (2000) Meyvelerin Beslenmedeki Önemi ve Üzümsü Meyvelerin Sağlık Üzerine Etkileri. Gıda. Dünya Yayınları. **12**, 97-100.

84. Terao J., Piskula M., Yao Q. (1994) Protective effects of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phosfolipid bilayers. Arc Biochem Biophys **308**, 278-284.

85. Çakatay U., Telci L. et al. (2000) yaşlanmanın plazma oksidatif protein hasarına etkisi cerrahpaşa tıp dergisi

86. Çakar H. (2005) Etanolün oluşturduğu karaciğer hasarı üzerine quercetin'in etkisi (ed). Afyon Kocatepe Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar, 107s (yayınlanmış).
87. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H., (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**, 81-128.
88. Horakova I. et al. (2005) protective effects of some antioxidant on oxidatively modified sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscle *Biologia, Bratislava* **17**, 129-132.
89. Kayalı R., Ça katay U. (2004) Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları *Cerrahpaşa J Med*; **35**, 83-89.
90. Köken T., Kahraman A. et al. (2001) Hemodiyalizin protein karbonil içeriği ve Sülfidril grubları düzeyi üzerine etkisi *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* **10(2)**, 83-85.
91. Mosharov E. Et al. (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 39(42), 13005-11.
92. Rajdl D. et al. (2007) Effect of White Wine Consumption on Oxidative Stress Markers and Homocysteine Levels. *Physiol. Res.* **56**, 203-212.
93. Kahraman A., Erkasap N., Köken T., Serteser A. (2003) The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* **183(1-3)**, 133-42.
94. Reshma K. et al. (2005) Effect of ocimum flavonoids as a radioprotector on the Erythrocyte antioxidants in oral cancer *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **20(1)**, 160-164.
eski 72
95. Lin A.D. et al. (2007) Effect of bilateral in vivo ischemia/reperfusion on the activities of superoxide dismutase and catalase: response to a standardized grape suspension. *Mol Cell Biochem.* **296(1-2)**, 11-6.