

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mısır uygarlığından beri bilinen ateroskleroz hakkında 20. yüzyıl içerisinde son derece önemli gelişmeler olmuş, patogenezi ile ilgili tedavisini de yönlendirecek oldukça kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Ancak halihazırda, ateroskleroz ile ilgili bilmediğimiz bir çok ayrıntı bulunmaktadır ve halen gelişmiş ülkelerde ölümlerin en sık nedeni aterosklerozun neden olduğu kardiyovasküler hastalıklardır. Kardiyovasküler nedenli ölümlerin %51'i koroner arter hastalığına bağlıdır (1). Koroner bakım ünitelerinin modernleştirilmesi ve tedavi yöntemlerinde önemli ilerlemelere rağmen koroner arter hastalığı mortalite ve morbiditenin önde gelen sebebi olmaya devam etmektedir (2). Bu konuda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, ateroskleroz çocukluk yaşlarında başlamakta ve klinik bulgularını erişkin yaşlarda göstermektedir (3). Bu nedenle aterosklerotik lezyonların gelişimini önlemek veya mevcut aterosklerotik plakların ilerlemesinin azaltılması toplum sağlığı açısından önem taşımaktadır. Bazı bireyler bu konuda daha büyük risk altındadır. Cinsiyet, yaş, düşük dansiteli lipoprotein (LDL-kolesterol), yüksek dansiteli lipoprotein (HDL-kolesterol), kan basıncı, diabetes mellitus, sol ventrikül hipertrofisi, fizik aktivite azlığı, trombojenik faktörler, obesite, lipoprotein (a) yüksekliği, düşük antioksidan düzeyleri, östrojen azlığı, alkol, enfeksiyon ve psiko-sosyal nedenler, homosistein düzeyi ateroskleroz için risk faktörleri olarak kabul edilmiş ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmıştır (4–8).

İlk kez 1989'da Steinberg ve ark tarafından aterosklerozisin “oksidatif modifikasyon hipotezi” ortaya atılmıştır (9). Günümüzde, oksidatif stresin koroner ateroskleroz patogenezinde ve onun komplikasyonlarında önemli bir role sahip olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda, ateroskleroz için önemli bir risk faktörü olan serbest oksijen radikallerinin endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri ve adventisyal hücreler tarafından üretiminin artırıldığı gösterilmiştir. Ayrıca ateroskleroz için iyi bilinen risk faktörlerinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini de arttırdığı saptanmıştır (10–13). Bunlar da aterosklerozisin başlangıcında rol alan bazı yolakların oluşmasını sağlamaktadırlar (14).

Plazma homosistein düzeylerindeki artışın ateroskleroz için farkedilebilir bir risk faktörü olarak ortaya çıktığı, homosistein birikiminin koroner, serebral ve periferel

ateroskleroz için bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (15–16). Artmış homosistein düzeyinin koroner ateroskleroz için yalnızca bağımsız risk faktörü olmadığı, aynı zamanda koroner ateroskleroz miktarı ve yaygınlığı ile de ilişkisinin olduğunu destekleyen veriler artmaktadır (17–21).

Aterosklerozda plazma kolesterolü ile homosistein düzeyi arasında korelasyon vardır. Diğer taraftan homosistein katabolizmasını kolaylaştıran mikrobeyinler plazma homosistein, kolesterol, trigliserit ve LDL düzeylerini azaltmaktadır (22).

Elde edilen bulgular, plazmada orta derecede artış gösteren homosisteinin, prematüre kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğuna işaret etmektedir (23).

Vitamin E ve C' nin etkili birer antioksidan oldukları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır, fakat aterogenez sürecindeki oksidatif strese etkileri üzerine çelişkili çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca primer korumada bu vitaminlerin kullanım yerlerini ve gereksinimlerini belirlemek için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Aterogenez patogenezine birçok farklı yolla etki eden homosistein için pek çok sekonder koruma çalışması olmasına rağmen, primer korumadaki etkinliğine yönelik yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Biz bu çalışmada, oksidatif strese karşı etkili olduğu bilinen, E ve C vitamini ile homosistein düzeyini azaltan B₁₂ ve folik asidin aterogenez sürecindeki oksidatif stres ve homosistein düzeyine, dolayısıyla ateroskleroz gelişimi üzerine etkisini deneysel bir modelde incelemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Aterosklerozun Vasküler Biyolojisi

Yirminci yüzyıl, ateroskleroz patogenezi ile ilgili olağanüstü evrime tanıklık etmektedir. Öyle ki, bu hastalığa mısır mumyalarının arterlerinde bile rastlanmıştır. Yakın zamana kadar arterler, yaşayan dinamik dokulardan çok, cansız tüpler olarak görülmekteydi. Kardiyak ölümlerin baş suçlusunu, ateroskleroz olarak tanımlandı. Aterosklerozu ne kadar iyi tanırsak, onunla o kadar iyi baş edebiliriz. Yüzyıldan fazla bir süre önce Virchow, aterogeneze hücrelerin katkısını fark etti. Virchow aterosklerozun proliferatif bir hastalık olduğu görüşündeysen, Rokitansky ateromların trombüslerin rezorpsiyonundan ve iyileşmesinden kaynaklandığını düşünüyordu. Yirminci yüzyılın başlarında yapılan deneysel çalışmalarda, tavşanların arterlerinde diyet düzenlemesi sonucu yağlı lezyonlar oluşturuldu ve suçlu, kolesterol olarak tanımlandı. Yirminci yüzyılın ortalarında ateroskleroza neden olan yağların içeriği, insan lipoprotein partikülleri tanımlandı. Günümüzde ise aterogeneze katkısı bulunan elementler tanımlanmıştır (24).

Ateroskleroz zamanla heterojenite gösteren bir yapıya sahiptir. Akut ve kronik fazların her ikisini de sergiler. İnsanları etkileyen sadece birkaç hastalığın inkübasyon süresi, aterosklerozdan daha uzundur. Bu yavaş ilerleyen hastalık periyoduna rağmen, ateromun miyokard infarktüsü, kararsız anjina veya inme gibi komplikasyonları çoğu zaman tipik olarak aniden meydana gelir.

Aterosklerozla ilgili bir başka tam anlaşılammış konuda, bazı damarlarda stenoz veya daralmaya sebep olurken bazılarında ektazi oluşturmasıdır. Bizler çoğunlukla koroner aterosklerozda darlıktan korkarız, halbuki özellikle aortada meydana gelen anevrizma bu hastalığın sıklıkla karşımıza çıkan bir diğer görüntüsüdür (24).

2.1.1.Normal Arter Yapısı

2.1.1.1.Tunika İntima

En içteki tabaka olup, bazal laminaya bitişik olan endotel hücrelerinden oluşmuş tek sıralı bir yapı olarak tanımlansa da erişkin insan intiması gerçekte çok daha kompleks heterojen bir yapıya sahiptir. Arteriyel intimanın endotelyal hücreleri kan ile çok önemli bir temas yüzeyi oluşturur. Arteriyel endotelyal hücreler, arteriyel hastalıkların patogenezi sırasında ters giden olayları düzenleme ve vasküler homeostazı sağlamada çok önemli bir role sahiptir.

Yaşla birlikte insan arterleri, arteriyel düz kas hücreleri ve interstisyel kollajenin fibriler formlarını (tip I ve III) içeren daha karmaşık intima geliştirirler. Düz kas hücreleri arteriyel intimanın ögelerinden olan ekstraselüler matriksi üretir. Daha karmaşık intimanın bulunuşu patologlar tarafından diffüz intimal kalınlaşma olarak bilinir ki bu yetişkin insan arterlerinde saptanmıştır. Arteriyel ağacın belli bölgelerinde ateroskleroz olmasa bile intimal kalınlaşmaya meyil vardır; örneğin sol ön inen koroner arterin proksimalinde sıklıkla düz kas hücrelerinin daha gelişmiş olduğu bir intimal bant izlenir. Diffüz intimal kalınlaşma gelişiminde lipit toplanması gerekli değildir.

2.1.1.2.Tunika Medya

Eksternal ve internal elastik lamina arasında uzanır. Musküler arterlerin mediası genellikle daha az sterotipik organizasyon içerir. Bu küçük arterlerin düz kas hücreleri genellikle laminar sıradan çok, kendilerini çevreleyen matriks içine gömülüdürler. Normal arterlerdeki düz kas hücreleri nadiren prolifer olurlar. Aslında hücrenin bölünme hızı ve hücre ölümü normal şartlar altında oldukça yavaştır. Normal arterde ekstraselüler matriks denge halindedir. Çünkü ekstraselüler matriks ne birikir ne de atrofiye olur. Arteriyel matriks sentez hız ve ölümü genellikle bir diğerinin dengesine bağlıdır.

2.1.1.3.Tunika Adventisya

Arterlerin adventisyası, son zamanlarda arteryel homeostazis ve patolojideki potansiyel rolleri artmış olsa da daha az incelenmiştir. Adventisya, vasküler remodeling ve nitrik oksit (NO) bioaktivitesinin kontrolü üzerinde, reaktif oksijen türlerinin oluşumu nedeniyle önemli bir rol oynamaktadır. Adventisya, genellikle intimadan daha az oranda kollajen lifleri içerir. Vazo vazorum ve sinir uçları arteryel duvarın bu en dıştaki tabakasında yerleşmiştir. Adventisya diğer arteriyel tabakalardan daha farklı bir hücresel popülasyona sahiptir. Bu tabakada görülen hücreler temelde fibroblastlar ve mast hücreleridir.

2.1.2.Aterosklerozun Başlaması

2.1.2.1.Ekstraselüler Lipid Birikimi

İnsanlarda aterogenezisin ilk basamağı büyük oranda tahminidir. Ancak hayvanlardaki deneysel çalışmaların sonuçlarıyla genç insanlardan elde edilen dokularda yapılan gözlemlerin birleştirilmesi bu konuda ipuçları sağlamaktadır. Kolesterol ve satüre yağdan zengin aterojenik diyetle bağlı olarak küçük lipoprotein partikülleri intimada birikir. Bu lipoprotein partikülleri arteryel intimanın proteoglikanını oluşturur ve agregatlar halinde birleşme eğilimindedirler. İşaretlenmiş lipoprotein partikülleri ile yapılan detaylı kinetik çalışmalar, tavşanlarda erken lezyon oluşumunun yerlerini göstermiştir. İntimadaki proteoglikanlara bağlanan lipoprotein partikülleri yakalanır ve buldukları yerde uzun süre alıkonurlar (25–26). Proteoglikanlara bağlı lipoprotein partikülleri oksidasyon veya diğer kimyasal modifikasyonlara maruz kalır ve bu çoğu araştırmacı tarafından erken aterosklerozun önemli bir bileşeni olarak kabul edilir (27–29). Diğer çalışmalar, endotelial tabakanın geçirgenlik tercihinin, lezyon alanlarında LDL lehine arttığını öne sürmektedir.

2.1.2.2.Lökosit Birikimi

Aterogenezisin bir diğer işareti, lezyon gelişiminin erken döneminde ortaya çıkan lökosit birikimidir. Normal endotel hücreler lökosit adezyonuna dirençlidir. Yangılı dokularda bile lökositlerin en çok toplanma ve değiş tokuşu arterlerde değil, post kapiller venüllerde olur. Ancak hiperkolesteroleminin başlamasından hemen sonra, lökositler endotelyuma yapışır ve endotel hücreleri arasından subintimal alana geçerler. Burası lipilerin birikmeye başladığı ve köpük hücrelerin olduğu yerdir. Monositlere ek olarak T lenfositler de insan ve hayvan erken aterosklerotik lezyonlarında birikmeye eğilimlidir.

Endotel hücre yüzeyinde lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonu, monosit ve T hücrelerinin endotele yapışmasını regüle eder. Lökosit adezyon moleküllerinin iki geniş kategorisi vardır. Bunlardan, vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) immünglobulin süperfamilyasındandır, erken aterogenezde önemlidir, çünkü tipik olarak sadece yeni oluşan aterom içinde toplanan bu sınıf lökositlerce eksprese edilen, monositler ve T hücrelerinde biriken bir integrinle etkileşir. Tavşan ve farelerdeki çalışmalar da yeni oluşan ateromatöz lezyonlar üzerindeki endotel hücrelerde VCAM-1 ekspresyonunu gösterilmiştir. Lökosit adezyon moleküllerinin immünglobulin süperfamilyasının diğer üyesi, intersellüler adezyon molekülünü (ICAM-1) içerir. Bu molekül daha dağınık yerleşimlidir.

Lökosit adezyon moleküllerinin bir başka kategorisi selektinlerdir. E-selektin erken aterogenezde çok az rol oynar. E-selektin tercihen erken ateromda nadiren bulunan polimorfonükleer lökositleri toplar. (PMNL, akut inflamasyonda gereklidir ve bakteriyel patojenlere karşı konak savunmasında rol oynar) (30). Ayrıca, aterom üzerindeki endotel hücreler bu adezyon molekülünü yüksek seviyelerde eksprese etmez. Bu ailenin diğer üyesi P-selektindir, ateromdaki lökosit toplanmasında daha önemli bir rol oynayabilir, çünkü insan ateromundaki endotel hücreler bu adezyon molekülünü eksprese eder. Selektinler, lökositlerin endotel üzerindeki hareketlerini başlatma eğilimindedir. İmmünglobulin süperfamilyasına ait olan adezyon molekülleri lökositlerin immobilizasyonu ve daha sıkı adeziv etkileşimde bulunmasını sağlar. Genetik olarak değiştirilmiş farelerdeki çalışmalar, deneysel aterosklerozda VCAM-1 ve P-selektinin rollerini kanıtlamıştır (31-33).

2.1.2.3.Lezyon Oluşumunun Odağı

Aterosklerozun heterojenitesini açıklamak oldukça güçtür. Lipoproteinler gibi, kan kaynaklı risk faktörleri de tüm damarlardaki endoteli etkilemektedir. Sigaranın arterler üzerine lokal etkiyi nasıl yaptığını açıklamak zordur. Aterom tipik olarak fokal oluşur. Bazı yazarlar, aterogenezisin “multisentrik köken” hipotezini ortaya atmıştır. Buna göre aterom, arteryel duvarın iyi huylu leiomyomu olarak oluşur. Ateromdaki pek çok moleküler belirteçlerin, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz izoformları gibi, tek tip oluşu aterogenezisin monoklonal hipotezini destekler (34). Ancak, lezyonların yerleştiği bölgelerin arterlerin proksimal kesimlerine, dallanma noktalarından sonra veya bifurkasyonlarda olma eğilimi erken lezyon gelişiminde bir hemodinamik temeli düşündürür. İnternal mamarian arter veya radial arterler gibi dalı olmayan arterler ateroskleroz geliştirme eğiliminde değildirler. Akım değişikliklerinin lezyon yerini etkilemesini anlamada iki yaklaşım yardımcı olabilir; lokal olarak bozulmuş akım, erken aterogenezisin basamaklarını uyaracak değişiklikleri indükleyebilir. Alternatif olarak genellikle erken lezyonların gelişme eğiliminde olmadıkları yerlerde olan laminar akım antiaterojenik hemostatik mekanizmaları aydınlığa kavuşturabilir (ateroprotektif fonksiyonlar) (35).

2.1.2.4.İntraselüler Lipid Birikimi; Köpük Hücre Oluşumu

Monositler öncelikle arteriyel intimaya toplanırlar, lipitleri fagosite edip, köpük hücresi veya lipit yüklü makrofajlar olurlar. LDL reseptörünün bazı tipleri çöpcü reseptörleri olarak bilinir, bunlar aşırı lipit alımı ile köpük hücre oluşumuna aracılık ederler. Uzun süreli çalışmalar, bu reseptörlerin “scavenger receptor-A” ailesine ait olduğunu göstermiştir. Bu yüzey molekülleri doğal lipoproteinlerden çok modifiye olanlarla bağlanmayı tercih eder. Fonksiyonel scavenger receptor-A bulunmayan, mutasyonlu, ateroskleroz eğilimli farelerde, fonksiyonel scavenger receptor-A bulunanlara göre daha az miktarda aşırı yağlı lezyon oluşumu görülür (36).

Makrofaj hücrelerinin aterosklerotik plakta bölünmesini tetikleyen faktör, içerdiği makrofaj koloni stimüle edici faktördür (MCSF). Mononükleer fagositler için, bu ko-mitojen ve hayatta kalım faktörü, insan ve deneysel aterosklerotik lezyonlarda bulunmaktadır. Yine, ateroskleroz eğilimli farelerde fonksiyonel MCSF eksikliği yağlı lezyon gelişimini geriletir. Makrofaj mitojenleri veya komitojenleri için diğer adaylar, interlökin-3 ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktördür. Yeni oluşan ateromun gelişiminde, lezyon öncelikle lipit dolu makrofajlardan ibarettir. Fibrozis, trombozis ve kalsifikasyon gibi kompleks oluşumlar, kompleks ateromların öncü lezyonları, yeni oluşan ateromda gözlenmez.

2.1.3.Ateromun Gelişimi

2.1.3.1.Aterogeneizde İnflamasyonun Mekanizması

Son 10 yılda yapılan çalışmalar, aterogeneizde inflamasyonun başrolü olduğunu göstermiştir. Makrofaj köpük hücreleri arter duvarına toplanır, aterosklerotik lezyonun oluşumunda bu hücreler, sitokinler ve kemokinler gibi proteinler ve çeşitli eikozanoidler, platelet aktive edici lipitler gibi zengin proinflamatuvar mediatör kaynakları sağlarlar. İnflamatuvar mediatörler plaktaki inflamasyonu iletir ve lezyonun progresyonuna katkıda bulunur. Plak progresyonunda antijen-spesifik veya adaptif immüitenin rolü olduğunu desteklemektedir (37–38). Mononükleer fagositlere ek olarak aterosklerotik lezyondaki dentritik hücreler, aterosklerotik lezyondaki lökositlerin önemli bir azınlığını oluşturan T hücrelerine antijen sunarlar. Bu adaptif immün yanıtı uyarmaya aday antijenler modifiye lipoproteinler, ısı şok proteinleri, β -2 glikoprotein 1b ve infeksiyöz ajanları içerir. Antijen sunucu hücreler (makrofajlar, dentritik hücreler veya endotelial hücreler) T hücreleri ile antijenlerin aktivasyonunu sağlayacak şekilde bir etkileşime olanak sağlar. Aktive T hücreleri daha sonra aterogenezi modüle edebilecek miktarlardaki sitokinleri salgılayabilir.

Yardımcı T hücreleri (CD4 taşıyan) iki genel kategoriye ayrılır; Th-1 subtipi, interferon- γ , lenfotoksin, CD-40 ligant ve TNF- α (tümör nekrozis faktör- α) gibi

proinflamatuvar sitokinler salgılar. Bu Th-1 sitokinleri sırayla vasküler duvar hücrelerini aktive eder, plak destabilizasyonu ve artmış trombojeniteye yol açabilecek plak biyolojisindeki değişiklikleri yönetir, öte yandan, Th hücreleri Th-2 sitokinlerinin inhibitörleri, interlökin-10 gibi, aterogeneziste inflamasyonun inhibitörleri olarak hizmet edebilir. Sitolitik T hücreleri (CD8 taşıyan) fas ligant ve diğer sitotoksik faktörleri eksprese edebilir. Bu da düz kas, endotelial hücre ve makrofajları içeren hedef hücrelerin sitolizini ve apoptozisini başlatabilir (39-40). Bu üç hücre tipinin tümünün ölümü aterosklerotik lezyonda gerçekleşebilir ve plak progresyonu ve komplikasyonlarına katkıda bulunabilir. Aterosklerozda B hücrelerinin ve antikorların rolü tam olarak ortaya konamamıştır. Hümmoral immünite, şartlara bağılı olarak ateroprotektif veya aterojenik özelliklere sahip olabilir.

2.1.3.2.Düz Kas Hücre Migrasyonu ve Proliferasyonu

Aterom başlangıcındaki erken olaylarda esas olarak, endotelial disfonksiyon sonucu lökositlerin toplanması ve birikimini söz konusu iken, bunu takiben ateromun daha kompleks plaklara ilerleyişi düz kasları da içerir. Normal arteriyel tunika medyada ki düz kas hücreleri, intimasında aterom içereninkinden belirgin olarak farklıdır. Bazı düz kas hücreleri arteriyel intimaya erken yaşlarda ulaşırken, ilerlemesini sürdüren ateromda biriken diğerleri, alttaki medyadan intimaya göç eden hücrelerden kaynaklanır. Düz kas hücreleri için kemoatraktanlar platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi molekülleri içerir. PDGF aktive makrofajlardan güçlü bir düz kas hücre kemoatraktanı olarak salınır. Aterosklerotik intimadaki bu düz kas hücreleri hücre bölünmesi ile de çoğalabilir. İnsan aterosklerotik lezyonlarında düz kas hücrelerinin tahmini bölünme hızı %1'den azdır. Ancak bu düşük replikasyon bile on yıllar içerisinde anlamlı düz kas hücre birikimi sağlayabilir (24).

Stabil durumda düz kas hücrelerinin replikasyonu matür insan ateromunda sık olmuyor gibi gözüksede, bir ateromatöz lezyonun yaşam öyküsü sırasında düz kas hücre replikasyonunda patlamalar olabilir. Trombozis ile birlikte olan plak yırtılması sırasında düz kas hücreleri potent mitojenlere maruz kalabilir. Bundan dolayı ateroskleroz ve intimanın büyümesi sırasında düz kas hücrelerinin birikimi sürekli ve

lineer bir tarzda olmayabilir. Düz kas replikasyonu ve migrasyonundaki patlamalar gibi diğer olaylar da ateromun hikayesini değiştirebilir (24).

2.1.3.3.Aterogenezis Sırasında Düz Kas Hücre Ölümü

Düz kas hücre replikasyonuna ek olarak, bu hücrelerin ölümü aterosklerotik plağın komplikasyonuna katkı sağlayabilir. İlerlemiş insan ateromunda ki düz kas hücrelerinin en azından bazılarında, programlanmış hücre ölümü veya apoptozise özgü nükleer DNA fragmantasyonu görülür. Apoptozis, gelişen ateromda varlığı bilinen inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak ortaya çıkabilir. Apoptozisi tetikleyen soluble sitokinlere ek olarak, ateromdaki T hücreleri bazı düz kas hücrelerinin elimine edilmesine katılabilir. Plaklar içinde toplanmış olan bazı T hücreleri yüzeylerinde fas ligant oluşturabilir. Fas ligant düz kas hücre yüzeyindeki fasa bağlanabilir ve soluble proinflamatuvar sitokinlerin katkısı ile düz kas hücrelerinin ölümüne yol açar (41-43).

Diğer bir deyişle, büyüyen aterosklerotik plaktaki düz kas hücre birikimi, muhtemelen hücre replikasyonu ve hücre ölümü arasındaki şiddetli rekabettin sonucudur.

2.1.3.4.Arteriyel Ekstraselüler Matriks

Hücrelerden sentezlenen ekstraselüler matriks ilerlemiş bir aterosklerotik plağın hacminin çoğunluğunu oluşturur. Bundan dolayı plağın ekstraselüler içeriği de oldukça önemlidir. Ateromda biriken major ekstraselüler matriks makromolekülleri; intersitisyel kollajenler (tip I ve III), versikan, biglikan, agrekan ve dekorin gibi proteoglikanları içerir. Aterosklerotik plaklarda elastin lifleride birikebilir. Damar düz kas hücresi bu matriks moleküllerini normal gelişim sırasında olduğu gibi, hastalık sırasında da üretir. Düz kas hücrelerinin aşırı kollajen üretimi için uyarı, PDGF ve TGF- β (Transforming growth factor- β) tarafından sağlanır.

Düz kas hücrelerinin birikimi gibi ekstraselüler matriks sekresyonunda bir dengeye bağlıdır. Ekstraselüler matriks moleküllerlerinin biyosentezi, matriks

metalloproteinazları (MMPs) olarak bilinen katabolik enzimlerin katalize ettiği yıkımla ayarlanır.

Ateromatöz lezyonun yaşam öyküsünün ilk kısmı sırasında plağın büyümesi, lümeni daraltacak tarzda içe doğru değil, dışa doğrudur. İntimanın bu dışa doğru büyümesi, tüm arterin çapında bir artışa yol açar. Buna “pozitif remodeling” veya “kompansatuar genişleme” denir. Luminal darlık, plak yüklü arterin çapraz-kesit alanının %40 ının üzerinde olduğunda ortaya çıkma eğilimindedir.

2.1.3.5.Plaklardaki Anjiogenezis

Düz kas hücresi, gelişen aterosklerotik plak içindeki migrasyon ve proliferasyonunda yalnız değildir. Endotelyal migrasyon ve replikasyon, plaklarda mikrosirkülasyon oluştuğça gerçekleşmektedir. Endotelyal hücreler, uygun markerlarla histolojik olarak incelendiğinde, gelişen plakta zengin bir neovaskülarizasyon gözlenir. Bu mikrodamarlar ateromda aşırı eksprese edilen anjiogenik peptitlere yanıt olarak oluşurlar. Bu anjiogenezis faktörleri, asidik ve bazik fibroblast growt faktör, vasküler endotelyal growth faktör, plasental growth faktör ve onkostatin M’yi içerir.

Plak içindeki bu mikrodamarlar lökositlerin girişi ve çıkışı için geniş bir yüzey alanı sağlar (44). Bununla uyumlu olarak deneysel indüklenmiş aterosklerozlu farelere, anjiogenezis inhibitörleri uygulandığında lezyon yayılımı sınırlanır. Sonuç olarak, plak mikrodamarları kırılğan ve diabetik retinadaki yeni damarlar gibi rüptüre yatkındır. İn situ hemoraji ve trombozis, mikrovasküler parçalanmaya hemen komşu alanda matriks birikimi ve düz kas hücre proliferasyonunu başlatabilir.

2.1.3.6.Plak Mineralizasyonu

Plaklar geliştikçe, sıklıkla kalsifikasyon alanlarını büyütürler, aslında hem Virchow hem de Rokitansky aterosklerozisin ilk mikroskobik tanımlamalarında aterosklerotik plak içinde kemik formasyonunun morfolojik özelliklerini saptamışlardır. Son yıllardaki çalışmalarla aterosklerotik plakların gelişimi sırasındaki mineralizasyon mekanizması daha iyi anlaşılmıştır. Düz kas hücrelerinin

bazı subgrupları, kemik morfojenik proteinler, TGF- β homologu gibi sitokinlerin sekresyonunu arttırarak kalsifikasyonu büyütebilir. Ayrıca, ateromatöz plaklar kalsiyum sekestrasyonu için özelleşmiş γ -karboksilet glutamik asid kalıntıları gibi proteinler içerebilir ve böylelikle mineralizasyonu başlatabilir (45).

2.1.4.Aterosklerozun Komplikasyonları

2.1.4.1.Arteriyel Stenoz ve Klinik Etkileri

Plak yükü, arterin dışı doğru remodeling kapasitesini aştığında arteriyel lümeneye taşma başlar. Lezyon gelişiminin kronik asemptomatik veya stabil fazı sırasında büyüme muhtemelen sürekli olmayan, bazen duran bazen hızla yayılan şekilde olur. İnsan anjiyografik çalışmaları koroner arter darlıklarının bu sürekli olmayan büyüme şeklini desteklemektedir (46). Sonunda, stenozlar arterden kan akımını engelleyecek dereceye kadar ilerleyebilir. %60 dan fazla darlık oluşturan lezyonlar, artmış ihtiyaç durumunda akımın sınırlandırılmasına ve semptomlara neden olabilir. İntimal lezyonun kritik bir darlığa ilerlemesi yerine, trombozisin okluziv olmayan bir plağı komplike hale getirerek sıklıkla kararsız angina pectoris veya akut miyokard infarktüsüne (MI) yol açtığı bilinmektedir.

2.1.4.2.Trombozis ve Ateromun Komplikasyonları

Aterosklerotik plağın fiziksel parçalanmasının, akut trombozise yol açtığı bilinmektedir. Pek çok şekildeki plak parçalanması koroner trombüslerin çoğunu oluşturur. İlk mekanizma MI'ların 2/3'ünden sorumlu olan plağın fibröz başlığının fraktürünü içerir. Geri kalan olgularda ise intimanın yüzeyel erozyonu olayı başlatan mekanizmadır. Bu MI'ların 1/4'ünden sorumludur ve koroner ani ölüm sebebi olarak kadınlarda daha sık rastlanır (47).

2.1.4.3. Plak Rüptürü ve Trombozis

Plağın fibröz başlığının rüptürüne, düz kas hücrelerince azaltılmış denova kollajen sentezine ek olarak fibroz başlığı kapsayan ekstraselüler matriks makromoleküllerinin artmış katabolizması katkıda bulunur, böylece rüptür ve trombozise yatkın hale getirir. Düz kas hücre migrasyonu ve arteriyel remodelinge katkıda bulunduğu düşünülen aynı matriks yıkıcı enzimlerde, fibröz başlığın zayıflamasına katkıda bulunabilir. İlerlemış insan aterom plaklarında makrofajlar, arteriyel ekstraselüler matriksin kollajen ve elastinini yıkabilecek matriks metalloproteinazları ve elastolitik katepsinleri aşırı miktarda salgılar (48-49). Diğer bir deyişle, plağın fibröz başlığının dayanıklılığı, dinamik regülasyon altındadır. Azalmış kollajen sentezi ve artmış yıkımın sonucu olarak plağın fibröz başlığının incilmesi, niye patolojik çalışmaların ince fibröz başlığın rüptüre aterosklerotik plaklarla karakterize olduğu ve MI'a yol açtığını açıklayabilir (50).

Patolojik analizde tanımlanan ve “vulnerable” aterosklerotik plak denilen yapının, diğer bir belirleyici niteliği, düz kas hücrelerinin eksikliğidir. Düz kas hücrelerinin plak içindeki lokal inflamasyon bölgelerinden kopması plağın rüptür olduğu yerlerdeki düz kas hücrelerinin eksikliğine muhtemelen katkıda bulunmaktadır. Bu hücreler fibröz başlığın matriksinin devamlılığı ve onarım için gerekli olan yeni sentezlenmiş kollajenin kaynakları olan düz kas hücrelerinin eksikliği nedeniyle fibröz başlığın zayıflamasına ve böylelikle plağın rüptüre olma eğilimine katkıda bulunabilir (51).

“Vulnerable” plağın mikroanatomik özelliği, makrofajlar için önemli bir birikim yeri ve büyük bir lipit havuzu içermesidir. Biyomekanik bir görüşe göre, geniş bir lipit havuzu, fibröz başlığın rüptürünün sık olduğu yerler olan plağın omuz bölgeleri üzerindeki biyomekanik g leri konsantre etme işini yerine getirir. Metabolik olarak plağın çekirdek bölgesinde yer alan aktive makrofajlar, sırasıyla matriks katabolizması ve düz kas hücreleri apoptozisini regüle ettiği düşünülen matriks yıkıcı enzimler ve sitokinler üretir. Düz kas hücreleri gibi apoptotik makrofajlar da, spontan veya iyatrojenik plak ayrılması sonrası, mikrovasküler trombozisin potansiyel bir kışkırtıcısı olan özel doku faktörünü oluşturabilir. Riskli hastalarda, akut MI veya kararsız angina pectoris insidansını azaltmada lipit

düşürücü tedavinin başarısı lipit birikiminde azalma, plak trombojenitesinde ve inflamasyonda azalmadan kaynaklanabilir. Son hayvan çalışmaları ve insanlardaki inflamasyonun periferik markerlarının takibi bu görüşü desteklemektedir (52-57).

2.1.4.4.Plakların Yüzeysel Erezyonuna Bağlı Trombozis

Yüzeysel erezyon; kadınlarda, hipertrigliseridemi ve diyabeti olan bireylerde fatal akut MI'a yol açabilir. Ancak altta yatan moleküler mekanizmalar açık değildir. Endotelial hücrelerin apoptozisi yüzeysel erezyon alanlarında endotelial hücrelerin dökülmesine katkıda bulunabilir. Bazal membrandaki tip IV kollajen gibi non-fibriller kollajeni yıkmak için özgül bazı jelatinozlar olan matriks metalloproteinazları da endotelial hücrelerin dökülmesine katkıda bulunabilir.

Plak rüptürlerinin tekrarlayan döngüleri, insitu trombozis ve iyileşme, muhtemelen lezyon gelişimi ve plak büyümesine katkıda bulunmaktadır. Trombozis ve iyileşmenin böyle epizodları plağın öyküsündeki krizlerin bir tipini oluşturur, bu da düz kas hücre proliferasyonunda, migrasyonunda ve matriks sentezinde bir patlamaya yol açabilir.

Revaskülarizasyon stratejilerine ek olarak böyle bireylere, sıklıkla rekürren olaylara yol açabilecek çok sayıdaki yüksek riskli lezyonları stabilize etmek amaçlı sistemik tedavi verilmelidir.

2.1.5.Enfeksiyon ve Ateroskleroz

Son zamanlarda, enfeksiyonun ateroskleroza yol açabilme olasılığına ilgi artmıştır. Seroepidemiolojik kanıtlar aterosklerozun orjininde bazı bakterilerin (*Chlamydia pneumoniae* gibi), ve bazı virüslerin (cytomegalovirus (CMV) gibi), rolü olduğunu desteklemektedir (58–60). Ancak, sigara içenlerin *C. Pneumoniae*'ye bağlı bronşit insidansı daha fazla olabilir ve *C. pneumoniae* enfeksiyonunun kanıtları, aterosklerotik olaylar için bilinen bir risk faktörü olan tütün kullanımının belirteci olabilir. Ek olarak pozitif bulgusu olan çalışmalar negatiflere göre daha çok basılmaktadır, bundan dolayı seroepidemiolojik çalışmaların metaanalizinde

negatiflerin az bildirilmesinden dolayı pozitifler ön plana çıkmaktadır. Sonuç olarak, ateroskleroz gelişmiş ülkelerde sık ve aynı anda her yerde olan bir hastalıktır. Pek çok ülkede pek çok yetişkinde C. Pnömonia gibi solunumsal patojenlere ve CMV gibi herpes virüs enfeksiyonlarına önceden yakalandıklarına dair serolojik kanıtlar vardır. Çalışılan populasyonun çoğunda enfeksiyon ve ateroskleroz kanıtları olduğundan, bir koinsidans ortaya koymak zordur.

Ayrıca ekstrasvasküler enfeksiyonlar da ateromatöz lezyonların gelişimini etkileyebilir ve komplikasyonlarını provake edebilir (61–67). Örneğin, uzaktaki bir enfeksiyona yanıt olarak üretilen dolaşımdaki endotoksin veya sitokinler, uzaktaki enfeksiyonun arter duvarı seviyesindeki yansıması olarak, daha önceden varolan lezyonlarda vasküler hücreler ve lökositlerin aktivasyonunu başlatacak şekilde lokal olarak etki edebilirler.

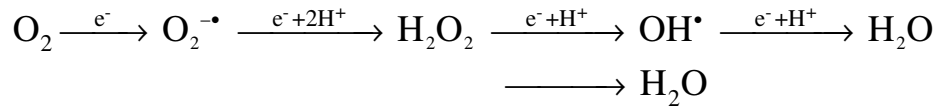
Akut enfeksiyonlar koroner olayları tetikleyebilecek hemodinamik değişiklikleri de üretebilir. Örneğin, taşikardi ve ateşe bağlı metabolik ihtiyaçlarda artış, kalbin oksijen gereksinimini arttırabilir. Bu da normalde kompanse bireyde iskemiye neden olabilir. Bu farklı senaryolar, aterom içindeki veya ekstrasvasküler enfeksiyonun, önceden varolan veya geleneksel risk faktörleri ile birlikte bulunan aterogenezi nasıl etkilediğini göstermektedir. Ancak son zamanlardaki klinik çalışmalar MI sonrası 12 hafta azitromisinle yapılan tedavinin rekürren koroner olayları azaltmadığını göstermiştir (68). Daha uzun süre antibiyotik tedavisi ile yapılan çalışmaların bulguları pozitif olsa da özel bir enfeksiyöz ajanın rol oynadığını ortaya koyamamakta, antibiyotiklerin test edilen ajanlar üzerine etkisi ispatlanamamakta ve etkilerinin antimikrobiyal etkisinden ilgisiz başka nedenlere bağlı olması ortaya konamamakta ve bu nedenle bir fayda sağlamamaktadır (69–70).

2.2.Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Son yörüngelerinde eşlenmemiş elektron içeren çoğu çift elektronlu, az sayıda ise tek elektronlu molekül, iyon ve bileşikler, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden elektron alır ya da ona bir elektron verirler. İşte bu tür moleküllere "serbest radikaller" denmektedir (71).

Bu moleküller proteinleri denatüre ederek, nükleik asitleri hasara uğratarak ve lipid membranlarda yağ asitlerinin çifte bağlarını doyurarak, sonuçta membran yapı ve fonksiyonunu değiştirerek doku hasarına sebep olabilmektedirler. Serbest radikal hasarının amfizem, kardiyovasküler ve inflamatuvar hastalıklar, katarakt ve kanser gibi bir çok hastalığın etyolojisinde yer aldığına ilişkin güçlü kanıtlar bulunmaktadır (72-75).

Normal koşullar altında biyolojik sistemlerde var olan moleküler oksijenin çoğu aerobik glikoliz ile ATP üretmek maksadıyla bir dizi reaksiyon sonucunda suya indirgenir. Bu olaylar sırasında bir miktar moleküler oksijende kaçak meydana gelmektedir. Bu oksijenin redüksiyonu ile süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif ürünler açığa çıkmaktadır.



2.2.1.Süperoksit Radikali

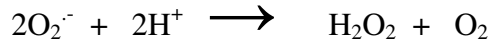
Aerobik organizmalarda oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) meydana gelir.

Diğer radikallere göre reaktivitesi daha azdır ve oluşumlarına neden olduğu diğer radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır.

Haber-Weiss adı verilen reaksiyon sonucunda hidroksil radikalinin oluşması, süperoksit anyon radikallerinin doku hasarına yol açmasında esas tehlikeli mekanizmadır.

2.2.2.Hidrojen Peroksit

H₂O₂ (Hidrojen Peroksit), membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olmaktadır. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri içinde yer alır ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zararlı serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere yıkılabilmesi ona bu önemi vermiştir (Haber-Weiss reaksiyonu) (76).

2.2.3.Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali (OH[·]), hidrojen peroksidin, geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu da hidroksil radikali oluşabilmektedir. Yarılma ömrü çok kısadır, oksijen radikalleri içinde en reaktif ve en toksik etkili olanı hidroksil radikali dir. Bu radikal membran yapısında yeralan ansatüre yağ asitlerini ve esterlerini peroksidasyona uğratarak lipit peroksidlerin ve endoperoksidlerin oluşumuna neden olmaktadır.



Bu reaksiyon demir iyonlarının katalizlediği bir reaksiyondur ve Fenton reaksiyonu olarak da bilinmektedir.

2.2.4.Singlet (Tekli) Oksijen

Enerji absorpsiyonu ile uyarılan oksijenin paylaşılmamış dış elektronları, spinlerini değiştirerek ayrı ayrı ya da aynı orbitali işgal edebilir. Bu iki forma singlet oksijen adı verilmektedir. Gerçekte bir serbest radikal değildir, fakat serbest radikal reaksiyonları sırasında üretilmesinden dolayı serbest oksijen radikalleriyle birlikte değerlendirilen reaktif oksijen ürünüdür (77–78).

2.2.5.Nitrik Oksit (NO[•])

Tek sayıda elektron içeren ve renksiz gaz şeklinde bulunan inorganik bir serbest radikaldir. NO, vertebralılarda sitokrom P-450 redüktaz homologu olan ve nitrik oksit sentaz (NOS) olarak adlandırılan enzimlerce enzimatik olarak oluşturulur. NO, NOS tarafından L-argininin L-sitrüline dönüşümü esnasında üretilir.

2.2.6.Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları

Bir dizi biyolojik işlevin normal yürütülebilmesi için serbest radikallerin yan ürün olarak oluştuğu reaksiyonlar gereklidir. Bir çok hücrel enzim katalitik aktivitesi ve elektron transport işlemleri, ortamda serbest radikal ürünleri oluşturan elektron transferlerini içerir. Aerobik organizmalarda elektronları her an kabul etmeye hazır moleküler oksijenin bol miktarda bulunması, oksijenden türev alan serbest radikallerin hücrel serbest radikal tepkimelerinin aracısı olmasına yol açmaktadır (79).

Organizmada reaktif oksijen türlerinin ve diğer serbest radikallerin oluşmasına yol açan endojen ve ekzojen kaynaklar tablo1’de gösterilmiştir (73).

Tablo 1: Serbest Radikal Kaynakları (73)

Endojen Kaynaklar	Ekzojen Kaynaklar
1. Mitokondrial ve endoplazmik retikulum elektron transport zinciri	1. İyonizan radyasyon (örn: X ışınları)
2. Nötrofil fagositoz sistemi (NADPH oksidaz)	2. Hepatotoksinler (örn: tiyoasetamid, karbon tetraklorür)
3. Ksantin oksidaz sistemi	3. Ksenobiyotikler
4. Araşidonik asit metabolizması	4. Redoks siklusu yapan maddeler (örn: alloksan parakuat)
5. Enzimatik olmayan reaksiyonlar	5. Kemoterapötikler (örn: adriamisin)
6. Lenfosit, fibroblast ve endotelden regülatuvar moleküller olarak salınma	6. Hava kirliliği
7. Diğer oksidazlar	7. Sigara

2.2.7.Serbest Radikallerin Etkileri

2.2.7.1.Proteinlere Etkileri

Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için; triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metyonin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Glutatyon redüktaz ve gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz gibi reaktiviteleri için yukarıdaki aminoasitlere bağımlı olan enzimler, serbest radikallerden kolaylıkla etkilenerek inhibe edilirler (80-82). Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalar meydana gelebilir. Bunlar da protein fonksiyonlarında bozulmalara yol açabileceği gibi, immun sistemi uyarabilecek antijenik değişiklikler de oluşturabilirler.

2.2.7.2.Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

DNA yapısında oksidatif hasara yol açan birçok faktör vardır. Bunlar (iyonize radyasyon, çeşitli kimyasallar) aşırı derecede serbest radikaller meydana getirip

direkt olarak DNA’da hasara yol açabilirler. Direkt etkinin yanında DNA’da tamir defektleri oluşturarak hasara yol açabilirler. Oluşan bu serbest radikaller, DNA’yı etkileyerek hücrede mutasyonlara ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite büyük oranda ya nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozomal değişikliklere, ya da DNA’daki diğer bozukluklara bağlıdır (83-84).

2.2.7.3.Membran Lipidlerine Etkileri

Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadırlar.

Lipit peroksidasyonu serbest radikallerin en önemli etkilerindedir. Lipit peroksidasyonu kuvvetli yükseltgeyici bir radikalın etkisiyle başlayan ve membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin yıkımıyla sonuçlanan kimyasal bir olaydır.

Lipit peroksidasyonu lipit hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle son bulur. Bu ürünlerden başlıcaları olan malondialdehit ve hidroksinonenal, proteinlere ve DNA’ya bağlanarak kalıcı değişiklikler oluştururlar.

2.2.8.Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için canlılar antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirler. Antioksidanların değişik şekillerde sınıflandırılması mümkündür. Serbest radikalın meydana gelişini engelleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde bir sınıflama olabileceği gibi, enzim yapısında olanlar ve olmayanlar şeklinde de bir sınıflandırma yapılması mümkündür (85-86).

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki” denir. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif

şekle dönüştüren olaya “bastırıcı etki” denir. Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak (hemoglobinin gibi) zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye “zincir kırıcı etki” denmektedir (86).

A) Doğal Antioksidanlar (Endojen):

Enzimler:

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, glutatyon-S-transferaz.

Enzim Olmayanlar:

Lipit fazda bulunanlar: α -tokoferol, β -karoten

Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar: Askorbik asit, urat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, miyoglobinin, hemoglobinin, ferritin, albumin, bilirubin, glutatyon.

Hem sıvı hem de lipit fazda bulunanlar: Melatonin

B) Ekzojen Antioksidanlar:

Ksantin Oksidaz İnhibitörleri: Allopürinol, oksipürinol, folik asit, pterin aldehit.

Soya Fasüyesi İnhibitörleri: Ksantin dehidrogenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.

NADPH Oksidaz İnhibitörleri: Adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflatuar ilaçlar.

C) Gıda Antioksidanları:

Butylated hidroksitoluen (BHT), butylated hidroksiyanisol (BHA), sodyum benzoat, etoksikuin, propil galat, Fe-süperoksit dismutaz.

2.2.8.1.Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir. SOD enzimi, süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol üstlenmektedir (87–88).

Bu reaksiyon spontan olarak meydana gelebilir, fakat SOD tarafından katalizlendiğinde reaksiyon hızı yaklaşık 10^4 kat artabilmektedir. İnsanda SOD'ın üç tipi bulunmaktadır. Bunlardan ikisi sitozolde bulunan dimerik, bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren izomer (Cu/Zn-SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik mangan (Mn) ihtiva eden izomerdir (Mn-SOD). Üçüncü tip ise ekstraselüler SOD'dır. SOD'ın ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür. Genel olarak, hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu/Zn-SOD'dır (89).

SOD aktivitesini homosistein azaltırken, anjiotensin II ve hipertansiyon arttırmaktadır (90–91).

Enzimin primer fonksiyonu, hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korumaktır. Bu şekilde hücrelerdeki lipid peroksidasyonu da inhibe edilmiş olur (92).

SOD, fagosite edilen bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle, SOD granülosit fonksiyonu için de çok önemlidir.

2.2.8.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-PX)

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Tetramerik yapıdadır ve 4 selenyum atomu ihtiva etmektedir.

Diyetteki selenyum desteği enzim aktivitesini modüle etmektedir. Enzim aktivitesi heksoz monofosfat yolunda üretilen NADPH'a (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 , öncelikle GSH-PX tarafından temizlenir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyona çevrildiği ortamda hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile detoksifiye etmektedir. Redükte glutasyonun (GLUT) okside glutasyon (GSSG) haline dönüştüğü reaksiyonda GSH-PX enzimiyle hidrojen peroksit suya indirgenmiş olur. Daha sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak, okside glutasyon redükte hale dönüştürülür.

GSH-PX'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-PX, serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GSH-PX aktivitesi düşük olan makrofajlarda başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksit salınımının arttığı

gösterilmiştir (93). Eritrositlerde de GSH-PX oksidan strese karşı en etkili antioksidandır (94). GSH-PX aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (95).

2.2.8.3.Katalaz (CAT)

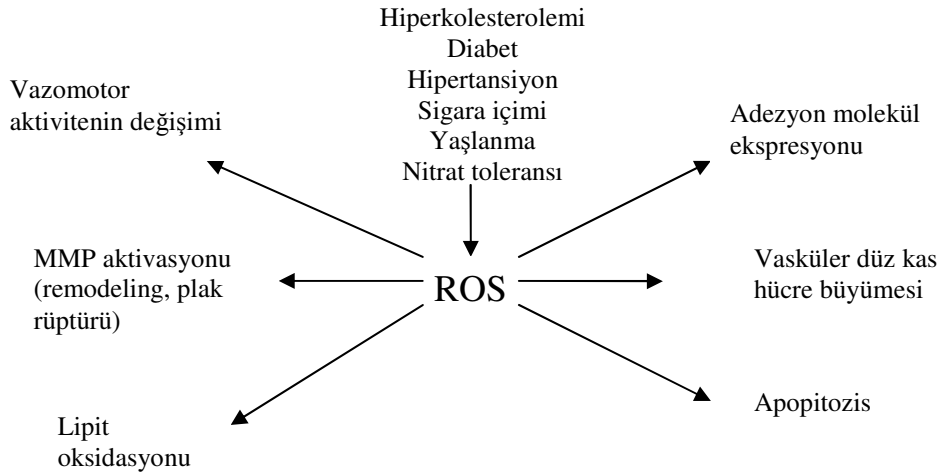
Glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Her biri ferriprotoporfirin grubu içeren dört adet alt üiteden oluşmuştur.

Eritrositler yüksek oranda CAT içermekte olup, CAT aktivitesinin %98'den fazlasını sağlarlar (96). CAT enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular karaciğer ve böbrek dokularıdır. Enzim, dokularda başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunmaktadır. Bundan başka endoplazmik retikulum ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. CAT, okside edici enzimlerin etkisiyle ortamda oluşan hidrojen peroksidi direkt olarak suya dönüştürür. Ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksidi substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-PX) devreye girerek hidrojen peroksidi ortamdaki uzaklaştırırlar. Aynı etkileri gösteren CAT ve GSH-PX enzimleri, hücre içi yerleşimleri ve etki yerleri bakımından farklılıklar gösterirler. CAT enzimi peroksizomlarda daha etkin iken, GSH-PX enzimi başlıca sitozol ve mitokondride etkindir.

2.2.9.Koroner Kalp Hastalığında Oksidatif Stresin Rolü

İlk kez 1989'da Steinberg ve ark tarafından aterosklerozisin oksidatif modifikasyon hipotezi ortaya atılmıştır (9). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu, oksidatif stresin koroner ateroskleroz patogenezinde ve onun komplikasyonlarında önemli bir role sahip olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda, ateroskleroz için önemli bir risk faktörü olan serbest oksijen radikallerinin endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri ve adventisyal hücreler tarafından üretiminin arttırıldığı gösterilmiştir. Ayrıca ateroskleroz için iyi bilinen risk faktörleri, hiperkolesterolemi, diyabet, hipertansiyon, sigara, nitrat intoleransı ve yaşlanma ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin arttığı saptanmıştır (97-100). Bunlar da

adezyon moleküllerinin ekspresyonu, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonunun uyarılması, endotelde apoptosisin uyarılması, lipitlerin oksidasyonu, matris metalloproteinazlarının aktivasyonu, vazomotor aktivitenin değişmesini içeren aterosklerozisin başlangıcında rol alan bazı yolların oluşmasını sağlar. (Şekil 1) (14).



Şekil 1: Vasküler hastalıkta reaktif oksijen türlerinin (ROS) rolü (14)

Hücrelerde meydana gelen oksidatif stres, oksidan üretimde artış, antioksidan korumada azalma, oksidatif hasarın tamirinde yetersizlik sonucudur. Oksidatif hasara bağlı gelişen hücre hasarı kısmen ROS yoluyla oluşur. ROS birçok dokuda normal hücre fonksiyonu olarak üretilir, ateroskleroz gibi vasküler hastalıklarda üretimi artar, artmış üretim nedeniyle patojenik olabilmektedir (101). Vasküler sistemde ROS; endotel hücrelerden, düz kas hücrelerinden ve makrofajlardan üretilir ki bunlar NO ile ilişkilerinden dolayı önemli ölçüde aterogenezis ile ilişkilidir (101). ROS ile reaksiyona giren NO, peroksinitrit oluşumuna neden olur bu da, doku ve hücreler için oldukça toksik hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur. Artmış ROS oluşumu nedeniyle vasküler sistemde oluşan önemli patofizyolojik sonuçlar şunlardır;

- 1-Dengesiz organ perfüzyonu ve sistemik hipertansiyona bağlı endotel bağımlı dilatasyonda azalma,
- 2- Hüresel hasar ve inflamasyonun indüklenmesi,
- 3- Apoptosizin uyarılması,

4- Bazı intraselüler sinyal yollarının başlatılmasıdır (101).

Normal koşullarda, pek çok hücrel antioksidan sistem, oksidatif strese karşı ve hücrenin redoks dengesini devam ettirmek için bulunmaktadır. ROS hücrelerden, SOD, katalaz, glutatyon peroksidazı içeren enzimatik sistemle veya vitamin E, vitamin C, glutatyon ve ürik asid gibi enzimatik olmayan sistemlerle temizlenir. Antioksidan savunma sisteminin üstesinden gelecek şekilde aşırı artan ROS oksidatif stresi oluşturur. Önemli boyuttaki hücrel hasar, membran lipitlerindeki poliansatüre yağ asidleri, esansiyel proteinler ve DNA gibi makromoleküllerde ki ROS'a bağlı, değişiklikler sonucudur (102).

Hipertansiyon ve hiperlipidemi gibi ateroskleroz için bazı risk faktörleri ROS üretimini arttırabilir. Yine benzer şekilde sigara içimi ve diyabet oksidatif strese katkıda bulunur. Artan kanıtlara göre, daralmış aterosklerotik arterlerde sık sık gelişen iskemi-reperfüzyon durumu da ROS üretimini arttırmaktadır. Moleküler seviyede, pro-aterojenik ajanların gereksinimlerine yanıt olarak gelişen sinyaller aynı zamanda ROS gelişimine de sebep olurlar. Pro-aterojenik ajanlar çok geniş çeşitlilikte molekülleri içerir. TNF- γ , interferon- γ , interlökin-1-6 ve anjiotensin II (AT II) gibi sitokinler ROS'un intraselüler oluşumunu uyarır. Yüksek seviyede LDL, özellikle ox-LDL, intraselüler ROS üretimini arttırır. Ayrıca, PDGF, epidermal büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri ve insülin gibi hormonlar da intraselüler ROS üretimini oldukça arttırır (103).

İntraselüler ROS üretim mekanizması, NADPH oksidaz, amin oksidaz, oksalat oksidaz ve peroksidaz gibi birçok enzim sistemlerini içerir. NADPH oksidaz vasküler hücrelerde en önemli ROS kaynağıdır. NADPH oksidaz üretim ve aktivitesi yukarıda bahsedilen birçok uyarıcı tarafından kontrol edilir (14).

Aterogenez süreci boyunca, endotelial disfonksiyonun açık olduğu erken basamağın başlangıcında oksidatif stresin etkisi tanımlanmıştır (104). Aterogenez sürecinde aterosklerotik plağı oluşturan diğer unsurlar gibi inflamatuvar hücrelerde büyük miktarda ROS salmaya başlar, bu aterogenezisi daha da kolaylaştırır. Genel olarak artmış ROS üretimi aterogenezise katkıda bulunan 4 temel mekanizmada etkisini gösterir; LDL oksidasyonu, endotelial hücre disfonksiyonu, vasküler düz kas hücre proliferasyonu, monosit migrasyonu (105).

Birçok çalışma ROS'un lipitleri okside ettiğini ve okside modifiye LDL'nin doğal modifiye olmamış LDL'den daha potent proaterosklerotik bir mediatör olduğunu göstermiştir (106). Aterosklerozlu hastalarda okside LDL'nin (ox-LDL) yüksek plazma seviyeleri saptanmıştır, ayrıca aterosklerozlu birçok hastanın plazmasında ox-LDL'ye karşı antikör saptanmıştır. Ox-LDL'nin proaterojenik rolü üzerine birçok çalışmada ox-LDL'nin arter duvarının çeşitli komponentleri üzerine zararlı etkileri gösterilmiştir. Örneğin, ox-LDL endotelial hücreleri aktive ederek, monosit/makrofajların adezyonunu kolaylaştıran bazı adezyon moleküllerin ekspresyonunu sağlar. Ox-LDL ayrıca, inflamatuvar hücreleri aktive eder ve monosit/makrofajlardan birçok büyüme faktörünün salınımını kolaylaştırır. Vasküler düz kas hücreleri, ox-LDL'ye maruz kaldığında yoğun bir proliferasyon sergiler. Ox-LDL vasküler endotelial hücrelerdeki ve fibroblastlardaki matriks metalloproteinazların oluşumunu artırır (103). Böylece oksidatif stres, yumuşak plağın rüptürüne yol açar. Ayrıca ox-LDL, kendinin endotelial reseptörü LOX-1 ve çoğunlukla makrofaj/monositler üzerinde eksprese olan scavenger reseptörlerin up-regülasyonunu sağlar. Bu reseptörlerin artmış ekspresyonu, ox-LDL'nin alımından ve köpük hücre oluşumundan sorumludur, bu aterogenezisin erken basamağını oluşturur. Ox-LDL'nin pro-aterojenik aktiviteleri tablo 2'de gösterilmiştir (107).

Tablo 2: Okside-düşük dantiteli lipoprotein potansiyel pro-aterojenik etkileri (107)

-
- Okside LDL, makrofaj köpük hücre oluşumunu sağlar
 - Okside LDL deriveleri, monosit ve T hücreleri için kemotaktik, doku makrofajları için kemostatiktir.
 - Okside LDL deriveleri, sitotoksiktir ve apoptozisi uyarabilir.
 - Okside LDL, düz kas hücreleri ve makrofajlar için mitojeniktir.
 - Okside LDL, vasküler hücrelerde inflamatuvar gen ekspresyonunu değiştirir.
 - Okside LDL, makrofaj scavenger reseptörlerinin ekspresyonunu arttırabilir.
 - Okside LDL, immünojeniktir, otoantikör oluşumuna yol açar ve T hücrelerini aktive eder.
 - Okside LDL, agregasyona yol açabilir, bu da bağımsız bir şekilde uptake'ı arttırır.
 - Okside LDL, sifingomiyelinaz için substrattır, bu da LDL agregasyonuna neden olur.
 - Okside LDL, doku faktörü ekspresyonunu ve platelet agregasyonunu uyarır.
 - Okside LDL ürünleri, NO biyoaktivitesini bozar.
 - Okside LDL, C-reaktif proteine bağlanarak kompleman yolunu aktive eder.
-

Endotelyal disfonksiyon; endotelin değişmiş antikoagülan ve anti-inflamatuvar özellikleri, bozulmuş vasküler büyüme, vasküler remodelingin düzensizliğini içeren geniş anlamalı bir terimdir (108). Ayrıca, endotelyal disfonksiyonun en önemli karakteristiği endotelyal NO'nin bozulmuş sentez, salınım ve aktivitesidir. Yapılan çalışmalarda NO'nin aterosklerozdaki birçok süreci inhibe ettiği gösterilmiştir. Örneğin NO, vasküler relaksasyonu düzenler ve platelet agregasyonunu, vasküler düz kas hücre proliferasyonunu, endotel-lokosit etkileşimini inhibe eder.

2.2.10.Hiperlipidemiye Bağlı Oksidatif Stres ve Ateroskleroz

Hiperlipideminin ateroskleroz için major bir risk faktörü olarak kabul edildiğinden bu yana, tedaviler antiaterojenik etkiye sahip olabilecek hiperlipidemi modülasyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışmalarda antihiperlipidemik ajanların

plazma LDL kolesterol seviyesini düşürmede etkin olduğu gösterilmiştir. Bu ajanların anti-aterosklerotik etkinliklerinden LDL seviyelerini düşürücü etkileri sorumlu olabilir. Bununla birlikte bir çok çalışmada, anti-aterosklerotik etkilerinin yalnızca lipit düşürücü etkilerine değil aynı zamanda direkt antioksidan etkilerine de bağlı olduğu gösterilmiştir (109). 3-hidroksi 3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri endotelial stabilizasyon sağlarlar, düzelmiş endotelial disfonksiyon, ox-LDL'ye bağlı serbest radikallerin azalmasına sekonder endotelial NO sentaz ekspresyon ve aktivitesinde artışa bağlı olabilir. Ayrıca HMG-CoA redüktaz inhibitörleri LDL'nin oksidasyonunu da azaltırlar (110). Bu da, bu ajanların, lipit düşürücü etkilerinden bağımsız olarak, antioksidan etkileri olduğunu göstermektedir.

Vasküler dokulara ox-LDL'nin etkileri monosit/makrofaj ve düz kas hücrelerindeki spesifik reseptörler aracılığı ile olmaktadır (111). Bu reseptörler yoluyla ox-LDL'nin uptake'i, köpük hücre oluşumuna, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonuna ve neointimal oluşuma neden olur. Bu scavenger reseptörlerin inhibisyonu, azalmış aterosklerozis ile ilişkilidir (112).

Hiperlipidemi ile birlikte hipertansiyon aterogenez patogenezinde sinerjistik bir rol oynar. AT II ve ox-LDL, aterosklerotik plaklardaki makrofajlarda birlikte yerleşiktir, ayrıca hiperlipidemik insanların aterosklerotik arterlerinde AT II konsantrasyonu artmış olarak tespit edilmiştir. AT II ve ox-LDL'nin aterogenezis üzerine etkileri, birbirinden bağımsız değildir. AT II ve ox-LDL oksidatif stres üzerinde sinerjistik etkilidir. Reninanjiotensin sisteminin Anjiotensin 1 (AT1) reseptör blokerleri veya ACE inh ile ve hiperlipideminin statinlerle tedavisi endotelial disfonksiyonda, monosit adezyonunda, düz kas hücre migrasyonunda ve dolayısıyla aterogenezde azalma ile sonuçlanır (113).

ROS'un ateroskleroz progresyonunda rolünün olduğu bilindiğinden beri, antioksidan tedavilerin aterogenezise karşı oldukça etkili ve umut verici stratejilerden biri olması şaşırtıcı olmamıştır. Günümüzde değişen derecelerde de olsa, antioksidan etkileri ile anti-aterosklerotik etki gösteren ajanlar bulunmaktadır. Bunlar; probukol, HMG-CoA redüktaz inhibitörleri, AT1 reseptör blokerleri ve ACE inhibitörleri, Vitamin E ve C, peroksizom proliferatör-aktivatör reseptör- γ ligantlarıdır (114).

2.2.11. Vitamin E ve Ateroskleroz

E vitamini, yağda eriyen, dolaşımında β -lipoproteinlere bağlanan, zincir kırıcı antioksidandır (115). Hücre membranında da bulunan vitamin E, oksidatif strese karşı güçlü bir savunma sistemidir. E vitamini, 2 grup vitamini içerir, tokoferoller ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) ve tokotrienoller ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) (116). İnsanlarda baskın olan α -tokoferoldür ve vitamin E'nin içinde en aktif olan formudur. Bundan dolayı α -tokoferol ve vitamin E terimleri karşılıklı olarak birbirinin yerine kullanılır.

E vitamini bir süre "antisterilite vitamini" olarak refere edilmiş, ancak daha sonraki yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda bu vitaminin eksiklik belirtileri kapsamlı olarak ortaya konmuş ve önemi anlaşılmıştır (117).

Ateroskleroz patogeneğinde, oksidatif stres ve inflamasyon merkezi rol oynar. Özellikle LDL'nin ROS ile oksidasyonuna ilişkin büyük ölçüde literatür bulunmaktadır. E vitamininin aterosklerotik süreç üzerine etkisi temel olarak oksidatif stres üzerine etkisi ile olmaktadır (118). E vitaminin, ateroskleroz üzerine inhibe edici etkisinin potansiyel mekanizmaları tablo 3'de gösterilmiştir (119).

Tablo 3: E vitaminin ateroskleroz üzerine inhibe edici etkisinin potansiyel mekanizmaları (119).

-
- LDL oksidasyonunda azalma, ox-LDL'nin makrofaj tarafından uptake'inde azalma
 - Endotel hücre hasarında azalma,
 - Adezyon molekülü ekspresyonunda azalma,
 - İmmun/endotel hücre adezyonunda azalma,
 - İnflamatuvar sitokin ve kemokinlerde azalma
 - Düz kas hücre proliferasyonunda azalma
 - Platelet adezyon ve agregasyonunda azalma,
 - NO üretiminde ve arteriyel dilatasyonda artma,
 - PGI₂ de artma, TXA₂ de azalma.
-

İlk deneysel çalışmalarda α -tokoferol ile ilgili çelişkili sonuçlar elde edilse de sonrakilerde α -tokoferol ile aterosklerozun ilerleyişinin yavaşlatıldığı ve önlendiğine dair çokça veri mevcuttur.

E vitamini ile ilgili ilk epidemiyolojik çalışmalardan MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) çalışmasında iskemik kalp hastalığı ve inme ile E vitamini seviyesi arasında negatif korelasyon gözlenmiştir. Üç büyük prospektif, epidemiyolojik çalışmada α -tokoferol ile koroner arter hastalığı riskinde azalma gözlenmiştir. Yaşlılarda E vitamini verilmesi ile koroner arter hastalığı mortalitesinde %41, total mortalite de %37 azalma sağlanmıştır (223).

İlk klinik çalışmalardan biri, Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)'de anjiyografik olarak koroner arter hastalığı olduğu kanıtlanan hastalarda, kardiyovasküler ölüm ve non-fatal miyokard infarktüsü insidansında E vitamini alan grupta anlamlı azalma saptanmıştır (120). GISSI (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico) ve HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) çalışmalarında ise ölüm, miyokard infarktüsü ve inme insidansında E vitamini alan grupla almayan grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır (121–122). Büyük çaplı kohort çalışmalarında, bir antioksidan olarak E vitaminin proaterojenik etkileri gösterilmesine karşın, kontrollü çalışmalarda çelişkili sonuçlar alınmıştır. Veriler, E vitaminin sekonder korumadan çok primer korumada daha etkin olduğunu düşündürmektedir. Bu tarz çelişkili sonuçlar nedeniyle E vitamininin kardiyovasküler hastalıklar üzerine etkisini belirlemek için daha fazla çalışmaya gereksinim vardır (123).

2.2.12. Vitamin C ve Ateroskleroz

Vitamin C, 6 karbonlu bir laktondur, birçok memelinin karaciğerinde glukozdan sentezlenebilmesine rağmen insanda, askorbik asid sentezi için esas olan gulonolakton oksidaz enzimi olmadığı için sentezlenememektedir. İnsanda çoğunlukla indirgenmiş formu olan askorbik asid şeklinde bulunur. Vitamin C'nin bilinen fizyolojik ve biyokimyasal işlevleri, bir elektron vericisi olarak hareket etmesinden kaynaklanmaktadır (124).

Vitamin C reversible bir indirgeyici ve antioksidan olarak insandaki 8 enzimin fonksiyonu için gereklidir (125). Askorbik asid, in vivo olarak, elektron vermesi ve kolayca yeniden oluşması nedeniyle etkili bir antioksidandır, ayrıca vitamin C güçlü bir şekilde reaktif oksijen ve nitrojen türlerini nötralize edebilir (126). Vitamin C, glutatyon, vitamin E ve flavanoidlerin yeniden eski formlarına dönüşümlerini sağlayarakta dolaylı olarak antioksidan etki gösterebilir.

Vitamin C, özellikle α -tokoferolle birlikte aterosklerotik plak oluşumunda rolü kanıtlanmış LDL'nin oksidasyonunu inhibe eder (127). Bazı epidemiyolojik çalışmalarda plazma askorbik asid düzeyi ile koroner arter hastalığı ve inme arasında ters ilişki saptanmıştır (126–128). In the Second National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES II)'de yüksek serum askorbat konsantrasyonlarında kardiyovasküler hastalık ve inmede %26 rölatif risk azalması sağlanmıştır (126). Plasebo kontrollü çalışmalarda tek başına vitamin C'nin kardiyovasküler hastalıklar üzerine azaltıcı etkisi saptanmamıştır (129). Vitamin C'nin primer ve sekonder korumadaki yeri üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.3.Homosistein

2.3.1.Homosisteinin Metabolizması

Homosistein (Hcy) besinlerle alınamayan, insan vücudunda bilinen hiçbir proteinin yapısında bulunmayan ve metioninin demetilasyonu ile oluşan sülfürlü bir aminoasittir. İlk kez 1932 yılında De Vigneaud tarafından metiyonin metabolizmasının bir ara ürünü olarak bulunmuştur. McCully, 1969 yılında, otopsi sonucunu değerlendirirken, yoğun arteriyel tromboz ve ateroskerozu olan çocuklarda plazma ve idrarda yüksek homosistein düzeylerinin görüldüğünü rapor etmiştir. Bu gözlemlerine dayanarak, yüksek plazma homosistein düzeyleri ile vasküler hastalıklar arasında bir ilişki olabileceği hipotezini ortaya atmıştır. Bu yayını, homosisteinin vasküler hastalıklardaki fizyolojik ve patofizyolojik rolünü araştıran pek çok çalışma takip ve teyit etmiştir. Sonuçta hafif plazma homosistein

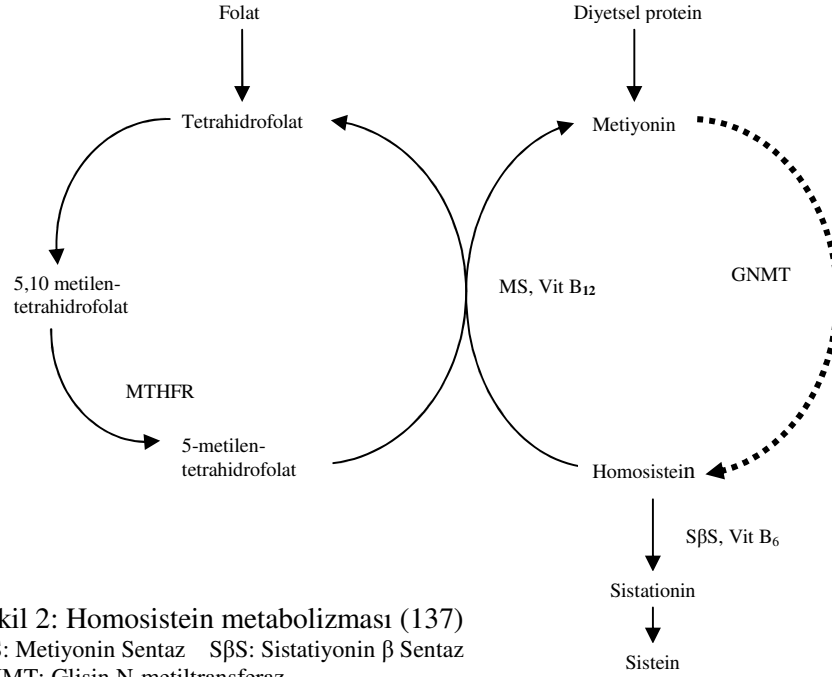
düzeylerindeki artışın, prematüre vasküler hastalıklara (serebral, koroner, periferik) yönelik, vasküler lezyonların oluşumunu tetiklediği ve diğer risk faktörlerinin bulunmaması durumunda dahi, tek başına risk oluşturduğu öne sürülmüştür (130-134).

HücreSEL homosistein metabolizması, metiyonin kullanılabilirliği, homosisteinin metiyonine remetilasyonu ve sisteine transsülfürasyonu ile regüle edilir.

Remetilasyon ve transsülfürasyonun her biri, homosistein metabolizmasında yaklaşık %50'şer paya sahiptir. Sisteinden farklı olarak, homosistein protein sentezi esnasında polipeptidlerle birleşmez.

Remetilasyon döngüsünde; homosistein, genellikle metiyonin sentaz (N^5 -metiltetrahidrofolat: homosistein metiltransferaz) tarafından katalizlenen bir reaksiyonla bir metil grubu alarak metiyonini oluşturur; metiyonin sentaz, B_{12} vitaminine bağımlı bir enzimdir. Vitamin B_{12} bu reaksiyonda kofaktör görevi yapmaktadır. Reaksiyonda N^5 -metil-tetrahidrofolat, metil donörüdür ve N^5,N^{10} -metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) katalizör görevi görür. Bir kısım homosistein ise, karaciğerde alternatif bir yol ile remetilasyona uğrar, bu reaksiyonda metil donörü betaindir (135-137) (Şekil 2).

Transsülfürasyon yolunda; fazla miktarda metiyonin varlığında veya sistein gerektiğinde, homosistein transsülfürasyon yoluna girer. Transsülfürasyon yolunda, Vitamin B_6 ya bağımlı sistationin β -sentaz (SBS) katalizatörlüğünde homosistein, bir başka amino asit olan serinle irreversibl olarak bağlanır ve bu sülfokonjugasyon olayıyla sistationin oluşur. Sistationin, sonunda başka bir Vitamin B_6 bağımlı enzim olan γ -sistationaz katalizörlüğünde sisteine ve α -ketobütirata metabolize olur. Yeni oluşan sistein, hücreler tarafından sentezlenen proteinlerin yapısına girer, glutatyon yapısına katılır ya da sülfata dönüşerek glikozaminoglikanların (heparan sülfat, kondroitin sülfüt gibi) sentezinde kullanılır ve idrarla atılır. Sistein, aynı zamanda homosistein ile birleşerek miks disülfid sisteinhomosistein formunu oluşturur (135-136).



Şekil 2: Homosistein metabolizması (137)
 MS: Metiyonin Sentaz SPS: Systationin β Sentaz
 GNMT: Glisin N-metiltransferaz
 MTHFR: Metilentetrahydrofolat redüktaz

2.3.2. Homosisteinin Dolaşımdaki Formları

Toplam homosistein, dolaşımdaki bütün homosistein formlarını kapsar (134,138). Dolaşımdaki homosisteinin yaklaşık %80'i proteinlere, başlıca albümine bağlıdır. Proteinlere bağlı olmayan serbest homosisteinin sülfidril grubu diğer moleküllerin sülfidril gruplarıyla birleşerek disülfidleri oluşturur. Dolaşımdaki homosisteinin ancak %1'i serbest formdadır. Plazma homosistein düzeyi olarak adlandırdığımız değer, plazma total hcy düzeyidir. Açlık homosistein düzeyinin normal sınırları 5–15 mikromol/L'dir ve bütün homosistein formlarını içerir (138,139). Plazma homosistein konsantrasyonu, hafif hiperhomosisteinemide 16–30 mikromol/L, orta derecede hiperhomosisteinemide 31–100 mikromol/L, ağır hiperhomosisteinemide ise >100 mikromol/L'dir (140,141).

2.3.3. Hiperhomosisteinemi nedenleri

Plazma homosistein konsantrasyonları, genetik ve beslenme faktörleri tarafından regüle edilir. Hiperhomosisteinemi, metabolizmasında rol oynayan

enzimlerdeki genetik bir defektten veya nutrisyonel olarak vitamin yetmezliğinden yada her ikisinin birlikte bulunmasından oluşur. Hiperhomosisteineminin nedenleri günümüzde ayrıntılı biçimde düzenlenmiştir (Tablo 4) (131).

Tablo 4: Hiperhomosisteineminin nedenleri (131)

Genetik Nedenler	
	Sistationin β -sentaz yetmezliği
	MTHFR yetmezliği yada defekti
	Metiyonin sentaz defekti
	Vit B ₁₂ transport defekti
	Vit B ₁₂ koenzim sentaz defekti
Edinsel Nedenler	
	Vitamin Eksikliği; Folik asid, Vitamin B6, Vitamin B12
	Kronik Hastalıklar; Kronik Böbrek Yetersizliği, Hipotiroidi, Psöriazis
	Malignensi
	İlaç Kullanımı; Antikonvülzanlar, Metotraksat, Nitroz oksit ve teofilin

Metiyoninden zengin olan hayransal gıda ağırlıklı beslenmenin hiperhomosisteinemi yaptığı bildirilmiştir. Sigara, alkol alımı, kahve tüketimi de yine hiperhomosisteinemi ile ilişkilidir (142).

Genetik faktörlerden en önemlisi sistatyonin β -sentaz aktivitesindeki defekten kaynaklanan, otozomal resesif geçiş gösteren homosistinüridir. Miyokard enfarktüsü, pulmoner emboli gibi ölüme yol açabilen ciddi damar patolojileri birlikte bulunur ve plazma Hcy düzeyleri 250 mmol/L gibi çok yüksek değerlerdedir. Ayrıca iskelet anamolileri, lens dislokasyonu, mental retardasyon eşlik eder. Diğer genetik faktörler ise metionin sentaz ve metilen tetrahirofolat redüktaz enzimlerinin defekti veya eksikliğidir (142).

Folat ve kobalaminin yetersiz alınması en sık görülen nutrisyonel hiperhomosisteinemi nedenleridir. Vitamin B₆'nın yetersiz alımı da, özellikle transsülfürasyon yolu bozukluğuna yol açmaktadır.

Edinsel hiperhomosisteinemi nedenlerinden ikinci grubu ise, farklı hastalıklar oluşturur. Bunların içinde en önemlisi böbrek fonksiyonlarıdır. Glomerüler filtrasyon hızı ile kan homosistein konsantrasyonu arasında negatif korelasyon vardır. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda kreatinin artışı ile birlikte kan homosistein düzeyi artarak, genelde normalin 4 katına kadar çıkabilmektedir. Bu artış son dönem böbrek

yetmezlikli hastalarda ateroskleroz oluşumundaki hızlanmayı kısmen açıklayabilmektedir (143).

Bunun dışında, birçok çalışma ile hipotiroidizimli hastalarda, hiperhomosisteinemi gösterilmiştir. Hipotiroidide artmış vasküler hastalık insidansında hiperhomosisteineminin rol alabileceği belirtilmektedir. Çeşitli malignitelerde (meme, over, pankreas) hiperhomosisteinemi gösterilmiştir. Transforme hücrelerin homosisteini kullanamadığı ve proliferen olan hücrelerin endojen homosisteini metabolize edemediği belirtilmektedir. Pernisiyöz anemili hastalarda da, hiperhomosisteinemi saptanmıştır ve homosistein yüksekliği hastalığın tanısını koymakta yardımcı olmaktadır. Okado ve ark. yaptıkları bir çalışmada tip II diyabetli hastalarda plazma homosistein düzeylerini yüksek bulmuşlardır (144). Homosistein düzeyi yüksek diyabetik hastalarda; retinopati, nefropati ve kalp makrovasküler veya bacak damarlarındaki hastalıkların sıklığının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Psöriyazisli vakalarda da hiperhomosisteinemi saptanmıştır (145-148).

Pek çok ilaç kullanımı; metotraksat, karbomazepin, valproik asit, fenitoin, folat metabolizmasını bozmakta ve hiperhomosisteinemi oluşturmaktadır. Azaribin, Vitamin B₆ metabolizmasını bozmakta, 6-Azauridin ve isoniazid, SBS aktivitesini etkilemektedir. Teofilin (fosfodiesteraz inhibitörü), piridoksal fosfat sentezini antagonize ederek hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır. Sigara, piridoksal fosfat sentezini azaltır. Sigara içen kadınlarda % 23, erkeklerde %12 daha yüksek plazma homosistein düzeyi saptanmıştır (139,145,149-150). Östrojen, N-asetil sistein, kolin ve penisilamin ise plazma Hcy düzeyini düşürebilir (151).

2.3.4.Hiperhomosisteinemiye Bağlı Koroner Aterosklerozun Patofizyolojisi

Plazma homosistein düzeylerindeki artışın ateroskleroz için yalnızca bağımsız bir risk faktörü olmadığı, aynı zamanda ateroskleroz miktarı ve yaygınlığı ile de ilişkisinin olduğunu destekleyen veriler artmaktadır (17–21).

Aterosklerozda plazma kolesterolündeki yükselme ile plazma homosistein düzeyindeki yükselme arasında korelasyon bulunmaktadır. Homosistein

katabolizmasını kolaylaştıran mikrobeyinler plazma homosistein, kolesterol, trigliserit ve LDL düzeylerini azaltmaktadır (22).

Ateroskleroz tanısı alan kişilerin bir kısmında hipertansiyon, diabetes mellitus, hiperkolesterolemi ve sigara gibi konvansiyonel risk faktörleri yokluğunda dikkatler alternatif risk faktörlerine odaklanmıştır. Artan koroner arter hastalık riski sadece ileri derecede hiperhomosisteinemi olan hastalarla sınırlı değildir, risk hafif-orta derecede serum homosistein düzeyi artmış kişilerde de artmıştır (152–156).

Homosisteinle indüklenen tromboz ve ateroskleroz gelişimini açıklamaya yönelik araştırmalarda muhtemel mekanizmalardan biri, homosisteinin in vivo serum lipidlerinin oksidasyonunu katalizleyebileceği ve LDL modifikasyonuna neden olabileceğidir (157).

Hiperhomosisteinemiye bağlı vasküler hasarın olası mekanizması hala araştırılan bir konudur. Homosisteinin endotel, vasküler düz kas hücresi, bağ dokusu, pıhtılaşma faktörleri ve trombositler üzerine etkisini inceleyen araştırmalar yapılmıştır. Homosisteine bağlı vasküler hasarın ortak son noktası endoteldir.

2.3.4.1.Homosistein ve Endotel

Homosisteininin neden olduğu endotel hasarı için öne sürülen mekanizmalar şunlardır:

-Homosistein düzeyi arttığında biyolojik tiyollerle etkileşir ve fazla miktarda homosistein-tiyolakton molekülü yapılır, bu molekül düşük dansiteli lipoprotein ile birleşir ve birikir. Bu partiküller vasküler makrofajlar tarafından alınır ve erken aterosklerotik plak içinde köpük hücrelerine dönüşür. Daha sonra köpük hücreleri homosistein-tiyolakton molekülünü endotel alanına bırakır ve serbest radikal oluşumu başlar (158).

-Nitrik oksit de homosistein gibi biyolojik tiyollerle etkileşir ve S-nitrosotiyol veya S-nitrosohomosistein oluşur. S-nitrosohomosisteinin vazodilatör ve antitrombositler etkileri vardır, ancak homosisteinemi varlığında nitrik oksit biyoyararlanımı azalarak koruyucu etkili S-nitrosohomosistein yapımı bozulur, sonuçta endotel bağımlı vazodilatasyon azalır (159-160).

-Homosisteinemi monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve interlökin-8 yapımını artırıp endotel bariyerinden nötrofil adezyonu ve göçünü arttırır (161).

-İndirgenmiş homosisteinin oksidasyonu sırasında oluşan serbest radikallerin yaptığı oksidatif stres doğrudan endotel hücrelerine zarar verebilir (162).

-Önemli hücre içi tamponları olan indirgenmiş glutatyon ve glutatyon peroksidaz hücre içindeki sülfidril gruplarının indirgenmiş formda kalmasını, hidrojen peroksidin detoksifiye edilmesini sağlar. Homosisteinemi varlığında hücre içi tamponların indirgenmiş aktivitesinde belirgin azalma görülür (163).

2.3.4.2.Homosistein, Düz Kas Hücresi ve Bağ Dokusu

Homosistein, aterosklerotik plakta vasküler düz kas hücresinin çoğalmasını ve kollagen liflerin depolanmasını arttırabilir (164). Hcy'nin, düz kas hücre proliferasyonunu, NFκB (nükleer faktör κ B) sentezini indükleyerek artırdığı interlökin-8 ve MCP-1'i artırarak inflamasyona katkıda bulunduğu, elastazı artırdığı ve kalsiyum birikimine neden olduğu ve bununda erken ateroskleroz gelişiminde rolü olduğu bildirilmiştir (165-166). Homosisteinin, erken aterosklerotik lezyonlarla uygunluk gösteren, vasküler düz kas hücrelerinde DNA sentezini artırdığı, endotelial hücrelerin rejenerasyonunu engellerken, düz kas hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (167).

2.3.4.3.Homosistein, Pıhtılaşma Faktörleri Ve Trombositler

Homosistein düzeyi arıışı ile endotelin antitrombotik ve fibrinolitik etkisi bozulur, protrombotik özellik kazanır. Homosistein; faktör V ve XII aktivasyonunu artırırken, antitrombin 3, protein C, trombomodülin aktivasyonunu azaltır. Kanda homosistein düzeyi 0.6 mmol/L'e ulaştığında endotel hücrelerdeki protein C aktivasyonu % 12 oranında azalmıştır. Homosistein düzeyinin kanda yükselmesi ile protein C'nin endotel hücrelerde trombotik etkisi görülmektedir (168).

Homosistein anneksin-II ile etkileşerek hücre yüzeyinde t-PA (doku plazminojen aktivatörü) için bulunan bağlanma noktalarını ve t-PA aktivitesini azaltır. Ek olarak homosistein von Willebrand faktörünün salınımını engelleyip, lipoprotein (a)'nın trombine olan ilgisini artırır (169-174).

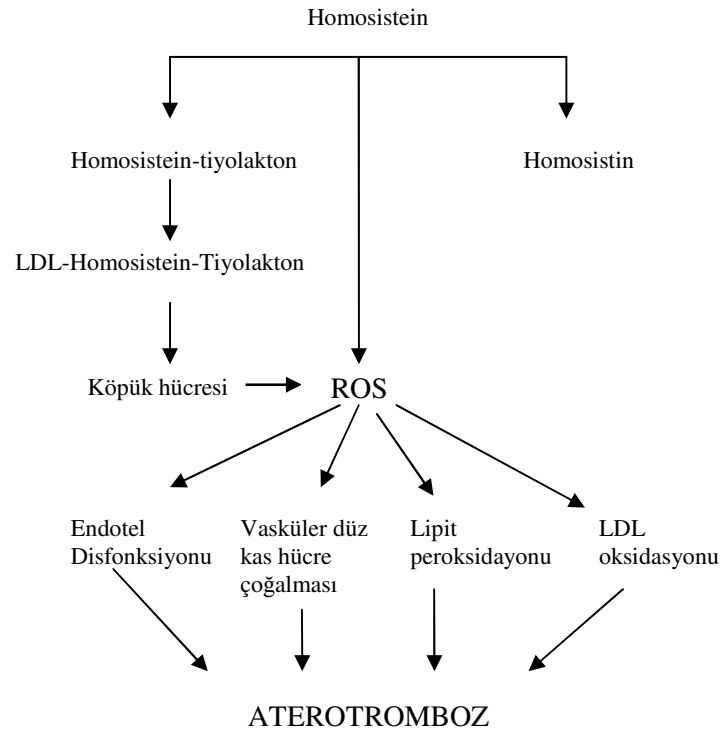
Homosisteinemi trombositlerde tromboksan B₂ ve diğer eikosanoitlerin yapımı ile trombosit adezyon ve agregasyonunu artırır, trombosit ömrünü azaltır.

2.3.5.Homosistein ve Oksidatif Stres

Homosisteinin oto-oksidasyonu, potansiyel sitotoksik pekçok reaktif oksijen türlerinin (hidrojen peroksit, süperoksit radikali, hidroksil radikali) oluşumuna neden olmaktadır. Homosisteinin, düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu arttırdığı ve okside LDL'nin de endotel fonksiyonlarını bozduğu, hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda bildirilmiştir. Bu mekanizmalardan biri, endotel hücrelerinin homosisteinin oksidatif potansiyelini NO üretimi ile modüle etmesidir. Hiperhomosisteinemi de bir diğer oksidatif stresten koruma mekanizması, hidrojen peroksidin ve lipid peroksidlerin redüksiyonunu katalizleyen antioksidan enzim, glutatyon peroksidazdır; homosisteinden peroksit üretimi ile *in vitro* endotel hücre toksitesi arasında korelasyon vardır ve glutatyon peroksidaz nitrik oksidin oksidatif inaktivasyonunu önlemektedir. Endotelial glutatyon peroksidaz aktivitesi, homosisteinin etkisinden sonra azalmaktadır ki, bu antioksidan mekanizmanın kronik hiperhomosisteinemi esnasında azaldığını düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda homosisteinin endotelde glutatyon peroksidaz ekspresyonunu suprese ettiği ve bu olayın lipid peroksidasyonunu arttırdığı gözlenmiştir (175-177).

Homosisteinin endotelial bariyer fonksiyonu üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalar, homosisteinin direkt kendisinin değil Cu⁺⁺ katalizli oksidasyonunun sonucu oluşan H₂O₂'in endotel hücre hasarına neden olabileceğini göstermiştir. Hücre hasarında potansiyel sebep olarak serbest radikallerin rolünü değerlendirmeye yönelik çalışmalarda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır; serbest radikal üretimi ve hücrel antioksidan savunma sistemi bakımından heterozigot sistatyonin β-sentaz yetersizliği olan hasta ve kontroller arasında bir farklılık gözlenmezken, hücrelerin

devamlı yıkımı sonucu meydana gelen lipit peroksidasyonunun ateroskleroz gelişimine katkısı olsa bile, hiperhomosisteinemi ile ilgili vasküler aksaklığın patogenezinde böyle bir mekanizmayı destekleyen deliller bulunamamıştır. Ancak Blundell ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada homosistein aracılı toksisitenin allopurinol ve radikal temizleyicilerle önlenmesi, hücre hasarına katkıda bulunan faktör olarak ksantin oksidazı işaret etmektedir (178). Başka çalışmalarda Hiperhomosisteinemiye (Hhcy) bağlı oluşan süperoksit radikalinin potansiyel vasküler kaynağı olarak ksantin oksidazın yanında NO sentaz ve NADPH oksidaz da gösterilmektedir, son çalışmalara göre koroner arterlerdeki en önemli süperoksit radikal kaynağının NADPH olduğu ileri sürülmüştür. Homosisteine bağlı vasküler hasar mekanizması şekil 3’de gösterilmiştir (158).



Şekil 3: Homosisteine bağlı vasküler hasar mekanizması (158).

Homosistein aracılı vasküler hasarda etkili olduğu düşünülen potansiyel faktörler tablo 5’de gösterilmektedir (179).

Tablo 5: Homosistein aracılı vasküler hasarda etkili faktörler (179).

Endotel Disfonksiyonu
NO üretiminde hasarlanma
ROS aşırı üretimi
VWF ve trombomodulin artışı
Doku faktörlerinin üretiminde artış
Antitrombin III üretiminde azalma
Vasküler Düz Kas Hücreleri
Proliferasyon artışı
Köpük hücre oluşumunda artış
Düşük Dansiteli Lipoproteinler
Tiolasyon
Fizikokimyasal özelliklerde değişme
Lipit peroksidasyonunda artma
Makrofajlar tarafından alınımında artma
Köpük hücre oluşumunda artma
Koagülasyon yolu
Trombasit yaşam süresinde azalma
Trombositlerden TxA ₂ üretiminde artma
Faktör I ve X aktivasyonunda artma
Fibrinojen düzeyinde artma
Serum antitrombin aktivitesinde azalma
Oksidatif stres
ROS'un sistemik artışı
Plazma antioksidan aktivitesinde azalma
Lipit peroksidasyonunda artma

2.3.6.Hiperhomosisteineminin tedavisi

Folik asid (0,5-5,7 mg) tek başına veya kombine verilen bir çalışmada; folik asid verilenlerde Hcy %25 düşmüş, yüksek doz B₆ (250 mg) alanda plasebodan fark gözlenmemiş ve ilave vitamin B₁₂ (0,02-1mg/gün) alan grupta da sadece folik asid alan gruba ilave %7 kadar Hcy düşmüştür (180).

Boushey ve ark yaptıkları çalışmada, koroner arter hastalığı riskinin %10'unun Hcy'e bağlı olduğunu ve folat ile Hcy'nin düştüğünü göstermişlerdir. Ayrıca onların folat ile zenginleştirilmesinin tablet vermekten daha etkili olduğu

sonucuna varmışlardır. Aterosklerotik kalp hastalığı ve nöral tüp defektlerinin önlenmesi için tahıl unlarının 100 gramına 350 mg folat eklenmesini, tablet verilecekse 1mg B₁₂ vitamini eklenmesini önermişlerdir (181).

Hcy düzeyi 10 mmol/L den fazla olanlarda folat, vitamin B₆ ve B₁₂'den zengin diyet (yeşil sebze, tahıl, mercimek, meyveler folattan; sığır eti, balık tavuk, tahıl vitmin B₁₂'den; et, fasulye, lahana, meyvelerde B₆'dan zengin) önerilmelidir.

Diyet tedavisine rağmen Hcy yüksek ise günlük 0,4 mg folik asit, 2 mg vitamin B₆ ve 0,006 mg vitamin B₁₂ verilmeli ve bir ay sonra tekrar Hcy ölçülmelidir (182).

Vitamin B₁₂ eksikliği varsa tek başına folik asid nörolojik hasarı arttırabileceğinden B₁₂ eksikliği tedavi edildikten sonra, 1mg folik asid, 25mg vitamin B₆ ve 0,5 mg vitamin B₁₂ ile tedavi edilebilir (183).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma, “0953-TU-04” proje numarası ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimince desteklenmiştir.

3.1.GEREÇLER

3.1.1.Deney Hayvanları

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 200–300 gram olan Wistar albino cinsi toplam 47 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (22° C)’da yeteri kadar su ve yem ile toplam 4.5 ay süreyle beslendiler.

Hayvanlar 7 gruba ayrıldı, ayrıldıkları gruplar, beslenme şekilleri ve aldıkları tedavi aşağıdaki şekilde ayarlandı.

Grup I (Plasebo grup, n:6): Bu gruptaki sıçanlar yem kurumu standart palet sıçan yemi ile beslendiler.

Grup II (Kontrol grup, n:6): Standart yem öğütülüp %2 oranında kolesterol eklenerek haftalık olarak oluşturulan kolesterollü yem ile beslendiler (184).

Grup III (n:7): Kolesterollü yeme ek olarak her gün 500 mikrogram/kg intramusküler B₁₂ uygulandı (185).

Grup IV (n:7): Kolesterollü yeme ek olarak her gün gavaj ile 10 mg/kg folik asid uygulandı (185).

Grup V (n:6): Kolesterollü yeme ek olarak her gün 500 mikrogram/kg intramusküler B₁₂ ve gavaj ile 10 mg/kg folik asid uygulandı (185).

Grup VI (n:7): Kolesterollü yeme ek olarak her gün 20 mg/kg intraperitoneal vitamin C uygulandı (186–187).

Grup VII (n:8): Kolesterolü yeme ek olarak her gün 100 mg/kg intraperitoneal vitamin E uygulandı (188).

Sıçanlar 4.5 ayın sonunda aldıkları diyet ve tedavi uygulamasının ardından 1 gece aç bırakılarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.) % 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında atan kalpten kanları ve sonrasında kalp ve aort damarı alınarak deney sonlandırıldı.

Organlar alındıktan sonra, önceden hazırlanmış içi 50 mM fosfat tamponu dolu tüplerine konuldu ve toplanan tüm numuneler (plazma, kalp, büyük damarlar), analizin yapıldığı tarihe kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

3.1.2.Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1- Soğutmalı santrifüj	: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2- Santrifüj	: Jouan B4İ (Fransa)
3- Derin dondurucu	: Uğur (Türkiye)
4- Hassas terazi	: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5- Vorteks	: Nüve NM 100 (Türkiye)
6- Otomatik pipetler	: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7- Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8- Cam-Teflon homojenizatör	
9- Sonikatör	: Bandelin Sonoplus (Almanya)
10- pH metre	: Hanna Instruments (Portekiz)
11- Manyetik karıştırıcı	: Nüve (Türkiye)
12- Elektroforez cihazı	: EC Apparatus Corporation 250-90 (ABD)
13- Homojenizatör	: Ultra Turrax T25 (Almanya)
14- Biyokimya analizörü	: Roche/Hitachi Modular P800 (Almanya)
15- UV Transilluminator 2000	: Biorad

3.2.YÖNTEM

3.2.1.Kalp ve damar Dokusunun Homojenizasyonu

Kalp ve damar doku örnekleri önce kanı uzaklaştırmak için soğuk distile suyla yıkandı. Dokular hassas terazide tartılıp, 1/10 oranında fosfat tamponu ile dilüe edildi. Daha sonra homojenizatörle 9600 devir/dk'da 60 saniye süreyle mekanik olarak homojenize edildi. Burada parçalanan numuneler 30 saniye süreyle sonifikasyon işlemine tabi tutuldular. Bu süre sonunda elde edilen % 10'luk homojenatlar, +4°C'de 5 dakika süreyle 3500 g'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu süpernatantlarda protein, malondialdehit düzeyleri ile GLUT, GSH-Px, SOD ve CAT aktiviteleri çalışıldı.

3.2.2.Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü

Deneyin prensibi Sun ve arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır (189).

Deneyin Yapılışı: 25 µl homojenattan alındı ve % inhibisyonun % 30-60 arasında olması için örnekler dilüe edilmedi. 0.025 ml homojenata, 0.850 ml 0.05 mM ksantin çözeltisi (0.025 mM İyodonitrotetrazolyum içeren) ve 40 mM'lık 3-(sikloheksilamino)-1-propan sulfonik asit (CAPS) (0.94 mM'lık EDTA (etilendinitrilo tetraasetik asit) içeren) ilave edildi. 0.125 ml ksantin oksidaz (80 U/L) ilave edildikten hemen sonra 505 nm'de 37 °C'de 30 saniyelik gecikme fazının ardından, havaya karşı başlangıç absorbansı (A₁) ve 3 dakika sonra da son absorbans (A₂) okundu. Aynı işlemler köre karşı denemeyle de tekrarlandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A(\text{numune})/\text{dk}}{\Delta A(\text{kör})/\text{dk}} \times 100$$

Standart (5.2 U/mL) çalışılarak hazırlanan % inhibisyon-konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar saptandı. Enzim aktivitesi U/ml olarak

bulundu. Bu değerler homojenizasyon sırasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpılıp dokunun protein değerine bölünerek U/gr birimi şeklinde sonuçlar verildi (190). İşlem hem doku hemde plazma değerlerini tespit etmek için uygulandı.

3.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-PX) Aktivitesinin Ölçümü

Deneyin prensibi Paglia ve Valentine'nin metoduna dayanmaktadır (191).

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpünde 1 ml; glutasyon (4 mM), glutasyon redüktaz (≥ 0.5 U/L) ve β -NADPH (0.34 mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 20 μ l numune karıştırılıp, ölçümden hemen önce 40 μ l kümen hidroperoksit (0.18 mM) ilave edildi. Enzim aktivitesini ölçmek için 340 nm'deki absorbands değişimi hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi, homojenizasyon esnasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpıldıktan sonra doku protein değerine bölünerek sonuçlar U/gr birimi olarak ifade edildi. İşlem hem doku hemde plazma değerlerini tespit etmek için uygulandı.

3.2.4. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü

Aebi metoduna dayalı olarak yapıldı (192).

Hazırlanan homojenat, fosfat tamponuyla 10 kat dilüe (0.2 ml homojenat + 1.8 ml fosfat tamponu) edildi. 2 ml'lik bu dilüe homojenat üzerine taze hazırlanan ve 30 mM H₂O₂ içeren fosfat tampon çözeltilisinden 1 ml eklendi. 240 nm'de ilk 30 saniye içinde 15'er saniyelik absorbands azalması bulunarak, k değeri aşığıdaki şekilde hesaplandı:

$$k = 2.3 / \Delta t \times (\log A_1/A_2) \times (a / b)$$

A₁: 240 nm deki başlangıç absorbandsı (t₁=0)

A₂: 240 nm deki 15. sn'deki absorbandsı (t₂=15)

a: dilüsyon faktörü

b: homojenatın protein miktarı

İşlem hem doku hemde plazma değerlerini tespit etmek için uygulandı.

3.2.5.Lipid Peroksidasyonunun Tayini

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan (Malondialdehit) MDA, Draper ve Hadley'in çift kaynatmalı tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü (193).

Deneyin yapılışı: 0.5 ml serum, üzerine 2.5 ml % 10'luk trikloroasetik asit eklenerek karıştırıldı. 15 dakika kaynatılıp soğutuldu. 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alınıp, üzerine 1ml % 0.67'lik tiyobarbitürik asit eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dakika kaynatıldı ve hemen soğutuldu. 532 nm'de absorbansları, numune yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı okundu. İşlem hem doku hemde plazma değerlerini tespit etmek için uygulandı.

Sonuçlar, MDA-tiyobarbitürik asit kompleksinin 532 nm'deki ekstinsiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) yararlanılarak nanomol/mg protein olarak hesaplanıp, $\mu\text{mol/gr}$ protein olarak ifade edildi. İşlem hem doku hemde plazma değerlerini tespit etmek için uygulandı.

Sonuçlar aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$A = a \times b \times c$$

$$c = A / a \times b$$

$$c = \frac{A \text{ mol cm} \times 1 \times 10^9 \text{ nmol} \times L}{1.56 \times 10^5 \text{ L cm mol } 10^3 \text{ ml}}$$

$$c \text{ (nmol/ml)} = A \times 57.69$$

A = absorbans

a = ekstinsiyon katsayısı

b = ışık yolu

c = konsantrasyon

3.2.6.Glutasyon (GLUT)Tayini

Tietze metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. (194)

Deneyin Yapılışı; 50 µL (mikrolitre) eritrosit üzerine 450 µL distile su ve 750 µL metofosforik asid çözeltisinden eklenip, tüpler vortekste karıştırıldı. 5 dk süreyle buzlu suda bekletilip 3000 devir/dakikada 10 dk santrifüjlemenin ardından her bir süpernatandan 500'er µL başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 2 ml Na₂HPO₄ çözeltisinden eklenip vortekste karıştırıldıktan sonra üzerine 250 µL DTNB (ditio-bis nitrobenzoik asid) çözeltisinden ilave edildi ve 412 nm'deki absorbansları ölçüldü, absorbans değerleri standartlara göre çizilen kalibrasyon grafiğinden değerlendirilmiştir. Sonuçlar kan örnekleri için mg/gr Hb, doku örnekleri için mg/g protein cinsinden ifade edildi. İşlem hem doku hemde plazma değerlerini tespit etmek için uygulandı.

3.2.7.Serum Kolesterol, Vitamin B₁₂, Folik Asid ve Plazma Homosistein Düzeyinin Tespiti

Serum kolesterol seviyeleri, modüler P800 (Hitachi, Roche Diagnostics, Germany) cihazı ile enzimatik kolotimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. Birimi mg/dl olarak ölçüldü.

Serum Vitamin B₁₂ düzeyi, Immulite 2000 Diagnostics Products Corporation (Los Angeles, LA, 90045 USA) cihazı kullanılarak kemiluminesans enzim immunoassay yöntemi le çalışıldı. Birimi pg/ml olarak ölçüldü.

Serum folik asid düzeyi, Architect İ2000 (Abbott, USA) cihazı kullanılarak kemiluminesans enzim immunoassay yöntemiyle çalışıldı. Birimi ng/ml olarak ölçüldü.

Plazma homosistein düzeyi, ELISA yöntemiyle diazyme laboratories, homocysteine microtiter plate assay kiti kullanılarak tespit edildi. Birimi µM/L olarak ölçüldü.

3.3.İstatistiksel Değerlendirme

Toplanan veriler Statistical Package for Social Sciences 13.0 programı ile değerlendirildi. Bulguların değerlendirilmesinde non-parametrik test uygulandı, ortalama değerler dikkate alındı. İekli grupların birbiri ile karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. $P < 0.05$ 'in altındaki değerler anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Deney grubundaki hayvanlarda 4.5 aylık beslenme sonrasında belirgin ağırlık artışı saptandı, ancak gruplar arasındaki ortalama ağırlıklar benzerdi.

4.1.Grup I ve Grup II'nin Kan Değerlerinin Karşılaştırılması

Kolesterollü diyetle beslenen grup II'de total kolesterol (TK) ve trigliserid (TG) düzeyleri normal diyetle beslenen grup I'den anlamlı olarak daha yüksek tespit edildi. Grup I ve II'deki TK ortalamaları sırasıyla 93 ± 6.06 ve 117.5 ± 8.52 olarak ölçüldü. Grup I ve II'deki TG ortalamaları ise 81.66 ± 10.8 ve 117.5 ± 8.52 olarak ölçüldü. Grup I ve grup II'de elde edilen TK ve TG değerleri arasındaki farklılıklar tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6: Grup I ve II den elde edilen Total Kolesterol ve Trigliserid değerleri

	Grup I (n:6)		Grup II (n:6)	
	TK (mg/dl)	TG (mg/dl)	TK (mg/dl)	TG (mg/dl)
Ort \pm SD	93 ± 6.06	81.66 ± 10.8	117.5 ± 9.04	117.5 ± 8.52
Medyan	92 ♥	79 ♣	118 ♥	117 ♣
Min	85	69	107	107
Max	101	98	133	129

♥ P = 0.004

TK: Total kolesterol

Grup I : Normal yemle beslenen

♣ P = 0.004

TG: Trigliserid

Grup II : Kolesterollü yemle beslenen

Kolesterollü diyetle beslenen grup II ve normal diyetle beslenen grup I arasındaki antioksidanlar ve MDA düzeyleri tablo 7'de gösterilmiştir. Kolesterollü diyetle beslenen grupta lipit peroksidasyonu parçalanma ürünü olan MDA anlamlı olarak daha yüksekti. Çalışmada değerlendirilen anti-oksidan sistem elemanlarının hepsinin oksidatif stres altında olan yani kolesterollü diyetle beslenen grup II'de normal diyet verilen grup I'e göre anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi.

Tablo 7: Grup I ve II arasındaki antioksidan ve malondialdehit değerleri

	MDA (nmol/gr Hb) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>(min-max)</i>	CAT (U/gr Hb) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>(min-max)</i>	GLUT (mg/gr Hb) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>(min-max)</i>	SOD (U/gr Hb) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>(min-max)</i>	GSH-PX (U/gr Hb) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>(min-max)</i>
Grup I	124.05 ± 5.2 121.78 119.36-132.96	22.68 ± 4.5 23.38 15.90-27.76	2.72 ± 0.38 2.60 2.35-3.41	4129.8±258.3 4071.91 3898.7-4488.8	91.63 ± 5.3 91.96 84.5-99.16
Grup II	195.43 ± 9.28 194.39 186.25-210.87	30.24 ± 5.1 31.06 24.16-36.68	2.0 ± 0.25 2.04 1.64-2.37	4948.5±358.8 4924.49 4518-5394.1	106.6 ± 6.4 105.33 99.6-118.7
P değeri	0.004	0.025	0.006	0.004	0.004

MDA : Malondialdehit

CAT : Katalaz

Grup I : Normal yemle beslenen

GLUT : Glutatyon GSH-PX : Glutatyon Peroksidaz

SOD : Süperoksid Dismutaz

Grup II : Kolesterolü yemle beslenen

Kolesterolü diyetle beslenen Grup II ile normal diyetle beslenen Grup I arasındaki homosistein değerleri tablo 8’de gösterilmiştir. Kolesterolü diyet verilen grup II’de homosistein (Hcy) düzeyi anlamlı olarak daha yüksek tespit edilmiştir.

Tablo 8: Grup I ve grup II arasındaki homosistein değerleri

	Grup I	Grup II	P değeri
Hcy (µM/L) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	12.14 ± 0.93 12.140 11.05-13.62	17.11 ± 0.99 16.765 15.93-18.43	0.004

Hcy : Homosistein Grup I : Normal yemle beslenen Grup II : Kolesterolü yemle beslenen

4.2. Grup II İle Tedavi Alan Diğer Grupların Kan Değerlerinin Karşılaştırılması

Kolesterolü diyetle beslenen grup II ile kolesterolü diyete ilaveten verilen B₁₂, folik asid, B₁₂ + folik asid, C vitamini ve E vitamini verilen grupların antioksidan ve MDA değerleri tablo 9’da gösterilmiştir. MDA düzeyleri; tedavi verilen grup III, V ve VII’de grup II ‘ye göre anlamlı olarak daha az tespit edildi. Grup IV ve VI’da elde edilen MDA düzeyleri ile grup II MDA düzeyi arasında anlamlı değişiklik saptanmadı. CAT düzeyleri; grup III, IV ve V’de grup II’ye göre

anlamli olarak daha yuksek saptanmasina ragmen, grup VI ve VII'de ise anlamlı değişiklik saptanmamıştır. GLUT düzeyleri; grup II'de grup I'e göre daha düşük iken, tedavi alan grupların hepsinde grup II'ye göre daha yüksek saptanmıştır. SOD seviyeleri; grup I'e göre grup II'de daha yüksek iken grup IV, VI ve VII de ise grup II'dekinden daha yüksek tespit edilmiştir, grup III ve V'de ise grup II'ye göre fark saptanmamıştır. GSH-PX seviyeleri; grup I'e göre grup II'de daha yüksek olarak tespit edilirken grup V'de grup II'ye göre daha daha yüksek tespit edilirken, grup III'de daha düşük olarak saptanmıştır. Grup IV, VI ve VII ile grup II arasında GSH-PX değerleri arasında fark tespit edilmemiştir.

Tablo 9: Grup II, III, IV, V, VI ve VII arası antioksidan ve Malondialdehit değerleri ve karşılaştırılması

	MDA <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	CAT <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	GLUT <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	SOD <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	GSH-PX <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>
Grup II	195.4 ± 9.2 194.39 186.2-210.8	30.24 ± 5.1 31.06 24.16-36.68	2.0 ± 0.25 2.04 1.64-2.37	4948.5±358.8 4924.49 4518-5394.1	106.6 ± 6.48 105.33 99.64-118.74
Grup III	155.01 ± 32 162.25 98.37-185.6	40.91 ± 5.7 40.85 33.67-50.80	2.61 ± 0.31 2.66 2.08-2.98	4508.8±752.9 4608.69 3029.7-5523	95.92 ± 8.8 97.05 81.46-108.23
Grup IV	198.83 ± 32 198 163.02-260.42	48.04 ± 11.02 50.86 35.63-63.98	3.5 ± 0.48 3.39 3.07-4.46	7195.8 ± 1001 6786.80 6064.5-8619.8	101.41 ± 9.7 99.75 6064.5-8619.8
Grup V	163.97 ± 20.8 162.94 131.19-189.68	60.11 ± 15.7 56.59 45.19-81.96	3.54 ± 0.8 3.61 2.47-4.34	5305.2 ± 692 5437.14 4407.6-6008.8	130.36 ± 9.9 129.92 120-144.95
Grup VI	208.6 ± 22.74 203.53 181.25-244.52	40.29 ± 10.67 43.20 27.17-57.86	3.51 ± 0.98 3.36 2.44-4.91	5722.9 ± 676 5727.27 5015.3-6916.6	100.37 ± 9.87 102.71 86.75-111.12
Grup VII	171.55 ± 22.8 176.40 125.36-191.36	34.89 ± 6.6 32.81 27.76-45.27	3.79 ± 0.51 3.79 2.88-4.61	6945.7 ± 1053.5 6609.12 6130.4-9080.6	97.66 ± 8.9 97.89 87.03-108.7
P ₁	0.003	0.010	0.010	0.199	0.032
P ₂	0.668	0.007	0.003	0.003	0.391
P ₃	0.01	0.004	0.004	0.423	0.004
P ₄	0.391	0.116	0.003	0.032	0.391
P ₅	0.039	0.197	0.002	0.002	0.121

Grup II-III'ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₁ MDA: Malondialdehit
 Grup II-IV'ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₂ CAT: Katalaz
 Grup II-V'in karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₃ GLUT: Glutasyon
 Grup II-VI'nın karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₄ SOD: Süperoksid Dismutaz
 Grup II-VII'nin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri: P₅ GSH-PX: Glutasyon Peroksidaz
 Grup II: Kolesterolü yemle beslenen, Grup III: Kolesterolü yem+ B₁₂, Grup IV: Kolesterolü yem +
 Folik asid, Grup V: Kolesterolü yem + folik asid + B₁₂, Grup VI: kolesterolü yem + Vit C,
 Grup VII: kolesterolü yem + Vit E.

Grup II-VII arasındaki Hcy değerleri ve aralarındaki fark tablo 10'da gösterilmiştir. Homosistein düşürücü tedavi verilen grup III, IV ve V'de grup II'ye göre Hcy düzeyleri anlamlı olarak daha düşük saptandı, homosistein üzerine etkisi olmayan, anti-oksidan vitamin tedavisi verilen grup VI ve VIII'de grup II'ye göre Hcy düzeylerinde anlamlı değişiklik saptanmadı.

Tablo 10: Grup II, III, IV, V, VI ve VII arasındaki homosistein değerleri

	Grup II <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup III <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup IV <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup V <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup VI <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup VII <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>
Hcy	17.1 ± 0.99 16.765 15.93-18.43	12.6 ± 0.95 12.66 11.46-13.85	13.98 ± 0.68 14.21 12.73-14.59	13.99 ± 2.1 13.15 12-17.41	17.83 ± 3.4 17.77 13.02-23.40	18.61 ± 2.73 18.05 15.71-22.92
P değeri		0.003 (P1)	0.003 (P2)	0.025 (P3)	0.775 (P4)	0.366 (P5)

Grup II-III'ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₁ Hcy: Homosistein
 Grup II-IV'ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₂
 Grup II-V'in karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₃
 Grup II-VI'nin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₄
 Grup II-VII'nin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri: P₅

Grup II, III, IV, V, VI ve VII arasındaki total kolesterol ve trigliserid değerleri ve farklılıkları tablo 11'de özetlenmiştir. Tedavi alan tüm gruplarda TK ve TG düzeyleri grup II'ye göre anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır.

Tablo 11: Grup II, III, IV, V, VI ve VII arasındaki total kolesterol ve trigliserid değerleri

	Grup II <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup III <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup IV <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup V <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup VI <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	Grup VII <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>
TK	117.5 ± 9.04 118 107-133	90.71 ± 8.4 89 82-105	85.14 ± 9.8 89 70-97	82 ± 10.8 79 71-99	83.42 ± 11.7 80 71-98	92.12 ± 14 95.5 67-109
TG	117.5 ± 8.05 117 107-129	73.8 ± 16.5 75 46-100	64 ± 18.6 59 42-89	65 ± 24 65.5 34-92	74.14 ± 25.7 68 43-109	92.12 ± 14.7 69.5 42-116
P değeri		0.003 (P1) 0.003 (P6)	0.003 (P2) 0.003 (P7)	0.004 (P3) 0.004 (P8)	0.003 (P4) 0.004 (P9)	0.003 (P5) 0.007 (P10)

Grup II-III'ün TK değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₁ TK : Total Kolesterol
 Grup II-IV'ün TK değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₂ TG : Trigliserid
 Grup II-V'in TK değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₃
 Grup II-VI'nın TK değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₄
 Grup II-VII'nin TK değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri: P₅
 Grup II-III'ün TG değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₆
 Grup II-IV'ün TG değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₇
 Grup II-V'in TG değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₈
 Grup II-VI'nın TG değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₉
 Grup II-VII'nin TG değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri: P₁₀

4.3.Kalp ve Damar Dokusu Homojenat Değerlerinin Karşılaştırılması

Kalp dokusuna ait, MDA ve diğer antioksidan sistem elemanlarının değerleri ve farkları tablo 13'de gösterilmiştir. Grup I ve II arasında MDA'da grup II lehine anlamlı artış saptandı. Grup I ve II arasında GSH-PX dışındaki anti-oksidan sistem elemanlarında anlamlı değişiklikler saptandı. Grup II'de GLUT azalırken CAT ve SOD'de artış saptandı. MDA seviyesi, tedavi alan grup III, IV, V, VI ve VII'de grup II'ye göre anlamlı olarak daha düşüktü. CAT seviyesi, grup III, IV, V, VI ve VII'de grup II'ye göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı. GLUT seviyesi, grup III, IV, V, VI ve VII'de grup II'ye göre anlamlı olarak daha yüksek ölçüldü. SOD seviyesi grup II'de I'e göre artmış olarak saptanırken, grup III, IV, V, VI ve VII'de grup II'ye göre anlamlı olarak daha düşük saptandı. GSH-PX seviyelerinde arasında fark saptanmadı.

Tablo 12: Grup I-II ve II, III, IV, V, VI ve VII arası kalp dokusu antioksidan ve Malondialdehit değerleri ve karşılaştırılması

	MDA (nmol/mgprot) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	CAT (U/mg prot) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	GLUT (mg/gr prot) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	SOD (U/gr prot) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	GSH-PX (U/gr prot) <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>
Grup I	23.84 ± 1.75 24.30 21.403-25.601	90.36 ± 8.97 88.73 80.09-103.9	11.25 ± 1.32 11.32 9.65-13.10	888.28 ± 41.75 876.63 849.45-949.21	211.14 ± 18.41 216.69 179.14-233.4
Grup II	29.25 ± 1.67 28.90 27.40-31.81	123.95 ± 12.4 123.82 105.4-138.1	2.93 ± 1.25 3.30 1.40-4.53	1076.4 ± 166.6 1033.71 913.2-1326.1	215.12 ± 21.78 218.86 186.7-246.8
Grup III	24.16 ± 3.63 22.63 19.93-29.91	142.41 ± 16.3 144.84 114.96-163.2	9.17 ± 6.5 6.56 2.94-21.59	614.72 ± 180.8 572.03 400.8-973.09	209.4 ± 11.8 209.7 195.07-231.3
Grup IV	23.51 ± 3.1 23.41 19.49-27.42	174.68 ± 22.6 176.75 148.3-206.06	15.37 ± 2.86 14.99 11.4-20.1	632.48 ± 150.2 605.86 499.83-892.7	226.43 ± 23.83 233.96 190.72-255.77
Grup V	25.17 ± 1.82 25.56 22.15-26.84	159.2 ± 9.64 157.81 145.7-175.6	10.29 ± 1.2 10.13 8.45-12.05	574.62 ± 54.76 556.68 512.3-650.98	226.19 ± 6.77 227.43 214.89-232.44
Grup VI	24.3 ± 2.67 25.25 20.28-27.62	200.4 ± 33.78 193.03 162.9-250.6	10.8 ± 2.08 10.61 8.92-14.72	664.9 ± 82.38 640.98 539.2-780.7	225.76 ± 19.09 221.23 203.5-259.9
Grup VII	25.41 ± 3.11 25.75 21.18-29.65	446.7 ± 55.2 425.35 395.7-557.2	18.52 ± 3.02 18.94 11.86-21.12	626.23 ± 99.93 624.92 438.79-758.1	223.71 ± 26.69 219.17 195.5-274.1
P ₁	0.004	0.004	0.004	0.016	0.423
P ₂	0.022	0.015	0.015	0.007	0.568
P ₃	0.004	0.003	0.003	0.003	0.317
P ₄	0.004	0.004	0.004	0.004	0.262
P ₅	0.004	0.003	0.003	0.003	0.475
P ₆	0.028	0.002	0.002	0.002	0.519

Grup I-II'nin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₁ MDA : Malondialdehit
 Grup II-III'ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₂ CAT : Katalaz
 Grup II-IV'ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₃ GLUT : Glutatyon
 Grup II-V'in karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₄ SOD : Süperoksid Dismutaz
 Grup II-VI'nin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₅ GSH-PX : Glutatyon Peroksidaz
 Grup II-VII'nin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₆

Damar dokusuna ait, MDA ve diğer antioksidan sistem elemanlarının değerleri ve farkları tablo 14'de gösterilmiştir. Grup II'de lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA grup I'e göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. Tedavi alan grup III, IV, V, VI ve VII'de MDA değerleri grup II'ye göre azalmış olarak saptanmıştır. CAT seviyesi grup II'de grup I'den anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Grup III ve V ile grup II arasında katalaz seviyeleri bakımından fark saptanmazken, grup IV, VI ve VII'deki CAT seviyeleri grup II'de olduğundan düşük

saptandı. Oksidatif strese maruz kalan grup II'de I'e göre glutatyon seviyesi anlamlı olarak daha düşüktü. Grup V dışındaki, tedavi alan diğer gruplarda ise glutatyon seviyeleri anlamlı olarak artmış saptandı. SOD seviyesi grup II'de I'e göre daha yüksek saptandı. Grup II ve III arasında anlamlı fark saptanmazken, grup II ile tedavi alan diğer gruplar arasındaki fark anlamlıydı, grup IV'de diğerlerinden farklı olarak SOD seviyesi daha yüksek ölçüldü. GSH-PX seviyesi grup I'e göre grup II'de anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Grup III'de II'ye göre daha düşük saptanırken, grup IV'de daha yüksek GSH-PX seviyesi saptandı. Tedavi alan diğer gruplarla grup II arasında anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 13: Grup I-II ve II, III, IV, V, VI ve VII arası damar dokusu antioksidan ve malondialdehit değerleri ve karşılaştırılması

	MDA <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	CAT <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	GLUT <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	SOD <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>	GSH-PX <i>Ort ± SD</i> <i>Medyan</i> <i>Min-max</i>
Grup I	107.64 ± 5.61 107.02 101.31-117.68	69.05 ± 18.28 64.91 44.80-90.27	47.16 ± 3.14 46.21 44.34-51.54	8619.8 ± 835.4 8391.31 7800.8-9914.2	73.43 ± 17.95 66.96 55.71-98.64
Grup II	118.58 ± 6.19 117.64 112.48-129.94	107.31 ± 8.88 108.46 93.6-120.21	41.90 ± 1.7 41.75 40.09-43.89	11480 ± 1912.2 11172.41 9202.6-14943.4	112.76 ± 17.68 107.77 93.03-141.46
Grup III	71.78 ± 14.46 77.79 48.43-87.54	103.32 ± 19.1 110.07 77.04-126.53	65.24 ± 8.38 60.20 57.17-76.91	11700 ± 1623.5 11609 1093.2-14670.5	71.78 ± 14.46 77.79 48.43-87.54
Grup IV	70.04 ± 12.2 64.36 58.28-87.13	65.9 ± 10.98 63.73 48.78-82.65	60.96 ± 9.99 61.03 44.93-74.18	16241 ± 2967.1 16737.5 12084.5-20857.7	221.96 ± 17.56 218.64 201.27-257.09
Grup V	85.44 ± 8.7 81.58 78.36-100.51	88.29 ± 18.96 87.37 70.66-110	43.30 ± 8.4 41.13 34.46-58.85	8420.7 ± 1616.6 8103.07 7169.4-11525	91.58 ± 20.07 92.41 63.56-115.38
Grup VI	49.67 ± 17.22 51.03 31.18-78.79	56.46 ± 18.82 51.18 31.67-86.48	66.34 ± 8.74 67.37 53.87-77.15	8013.3 ± 1362.5 7840 5701.6-9931.5	108.43 ± 11.92 104.83 94.07-125.05
Grup VII	45.26 ± 10.7 45.49 30.92-58.42	65.74 ± 19.56 62.52 43.51-91.57	83.07 ± 8.5 81.79 71.5-96.13	8522.8 ± 1836.8 9161.16 5910.8-10692.3	110.26 ± 19.09 109.53 81.63-144.0
P ₁	0.016	0.004	0.004	0.010	0.006
P ₂	0.003	1.0	0.003	0.886	0.004
P ₃	0.003	0.003	0.003	0.007	0.003
P ₄	0.004	0.078	0.631	0.025	0.150
P ₅	0.003	0.003	0.003	0.004	0.568
P ₆	0.002	0.002	0.002	0.014	0.897

Grup I-II'nin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₁
 Grup II-III'ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₂
 Grup II-IV'ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₃
 Grup II-V'in karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₄
 Grup II-VI'nin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₅
 Grup II-VII'nin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P₆

MDA : Malondialdehit
 CAT : Katalaz
 GLUT : Glutatyon
 SOD : Süperoksit Dismutaz
 GSH-PX : Glutatyon Peroksidaz

5.TARTIŞMA

Ateroskleroz, multifaktöriyel bir hastalıktır ve gelişimi heterojenite gösterir. Ateroskleroz gelişiminde sigara, diyabet, hiperlipidemi, mekanik stres ve inflamasyon gibi birçok hazırlayıcı etmen rol alır. Aterosklerozun gelişiminde bugüne kadar yapılmış birçok çalışma, serbest radikallerin önemli etkisi olduğunu kanıtlamıştır (195).

Lipit peroksidasyonu aterosklerozun önemli bir bileşeni olarak tanımlanmıştır. LDL'nin peroksidasyonu ox-LDL gelişimine neden olur, bu ise makrofajların scavenger reseptörleri için bir substrattır. Makrofajların fagositozu ile aterosklerotik lezyonların erken göstergesi, köpük hücreleri meydana gelir. Ox-LDL deneysel hayvan ve insan aterosklerotik lezyonlarından izole edilmiştir. Birçok antioksidanın hayvan modellerinde ateroskleroz üzerine yavaşlatıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu da lipit peroksidasyonunun aterosklerozu ilerlettiğini desteklemektedir. Epidemiyolojik çalışmalar diyetdeki antioksidan miktarının artırılmasının koroner arter hastalığı riskinde azalmaya neden olduğunu gösterse de, antioksidanlarla yapılan klinik çalışmalardaki sonuçlar çelişkilidir (196).

Endotel ve düz kas hücreleri, nötrofiller, monositler ve trombositler hiperkolesterolemide ROS kaynağıdır (199–200). ROS sitotoksik etkilerini membran fosfolipitlerinin peroksidasyonuna neden olarak ortaya çıkarır. Bu da membran akışkanlığını, geçirgenliğini arttırmakta ve membran bütünlüğünü bozmaktadır. Hasarlanmanın erken döneminde endotel hücrelerinden yoksun arteriyel yüzey, trombosit tabakası ile kaplanır. Saatler içinde, mononükleer hücreler hasarlı bölgeye göç ederler ve plateletleri aktive ederler, düz kas hücre göçünü ve çoğalmasını aktive ederler. Bu inflamasyona birçok ROS'un dahil olduğu ve düz kas hücre çoğalmasını uyardığı ve endotelyal disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir. Arteriyel hasarlanma, inflamasyon ve oksidatif stresin birlikte oluşturdukları bu durum, birçok çalışmada gösterilmiş ve antioksidanların bu proliferatif cevabı, mekanizması henüz tam olarak anlaşılmayan bir yolla sınırlandırdığı tespit edilmiştir (196).

Birçok epidemiyolojik kanıt, orta derecedeki hiperhomosisteinemi ile koroner, serebral ve periferik ateroskleroz arasındaki ilişkiyi kesin olarak desteklemektedir (197). Diğer bir deyişle, Hhcy artmış inme, kalp krizi ve venöz tromboz riski ile ilişkilidir (198). Bazı olumsuz prospektif çalışmalara rağmen hiperhomosisteinemi, koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörüdür. Norwegian çalışmasında, (197) homosistein seviyesinin 9 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde olması ile koroner arter hastalığındaki mortalite arasında güçlü bir ilişki saptanmıştır.

Deneysel çalışmalar, homosisteinin vasküler endotel üzerine oksidatif stres yolu ile oluşturduğu toksik etki sayesinde aterogenezi ilerletebildiğini desteklemektedir. Folik asid tek başına veya diğer B vitaminleri ile kombine kullanıldığında plazma homosistein seviyesini azaltmada oldukça etkilidir. C ve E vitamini gibi diğer antioksidan vitaminler homosisteine bağlı vasküler hasar üzerinde adjuvan bir etki gösterebilirler. Henüz folik asid tedavisinin kardiyovasküler riski azalttığına dair randomize kontrollü bir çalışma olmamasına rağmen, gözlemsel çalışmalar B vitaminlerinin kardiyovasküler riski ve karotis aterosklerozunu azalttığını desteklemektedir (197).

Çalışmamızda, ateroskleroz gelişiminde önemli rolü olan serbest oksijen radikalleri oluşumunu hiperkolesterolemik diyet ile arttırarak, verdiğimiz antioksidan ve homosistein düşürücü tedavinin, antioksidan sistem elemanları üzerine olan etkisini araştırdık. Yaptığımız çalışmada yüksek kolesterolü diyetle beslenen ve tedavi verilmeyen grup II'de homosistein düzeyinin arttığını saptadık. Artmış Hcy seviyesi de hiperkolesteroleminin neden olduğu oksidatif strese katkıda bulunmaktadır.

Tedavi verilmeyen grup II'ye ait sonuçların değerlendirilmesi: Çalışmamızda hiperkolesterolemik ateroskleroz sürecinde oksidasyonun indirekt göstergesi olarak belirlediğimiz thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) düzeyini MDA ölçümleri ile belirledik. Kolesterolü diyetle beslenen grup II'de, serum MDA değerleri grup I'e göre daha yüksekti. Bu bulgular birçok araştırmacı tarafından öne sürüldüğü gibi hiperkolesteroleminin ROS üretimini arttırdığını ve ateroskleroz sürecini başlatan endotel hücre hasarına neden olduğunu desteklemektedir. Tavşanlarda yapılan çalışmalarda serum ve dokularda MDA artışı gösterilmiştir (184). Ratlarda yapılan çalışmalarda hiperkolesterolemik diyetle MDA artışı

çoğunlukla saptanmasına rağmen artışın gösterilemediği çalışmalarda mevcuttur (184). Kumar SA ve ark.'nın (207) yaptıkları çalışmada, oluşturdukları hiperkolesterolemik rat grubunda kontrole göre MDA seviyesinde artış saptanmıştır. Çalışmamızdaki MDA bulguları Gökkuşu C. ve ark.'nın (184) hiperkolesterolemi oluşturarak yaptıkları çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur. Benzer şekilde, Vasu VT ve ark.'nın (201) yaptıkları çalışmada da MDA seviyesi kolesterolü diyetle beslenen grupta daha yüksek saptanmıştır.

Hiperkolesterolemide artmış ROS üretiminin bir göstergesi olarak MDA'da gözlenen artışın yanı sıra antioksidan parametrelerde de değişiklik gözlenmiştir. Hiperkolesterolemiye bağlı gelişen oksidatif stresin ateroskleroz patogenezindeki rolü açıktır. Çalışmamızdaki gruplarda antioksidan parametreler olarak; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, glutatyon peroksidaz düzeyleri hem plazma hem de kalp ve damar dokusunda ölçülmüştür. Yüksek kolesterolü diyetle beslenen grup II'de I'e göre CAT, SOD ve GSH-PX aktiviteleri yüksek, GLUT düzeyi ise daha düşük saptanmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda alınan sonuçlar arasında çelişkiler mevcuttur. Kumar SA ve ark.'nın (207) yaptıkları çalışmada, oluşturdukları hiperkolesterolemik rat grubunda kontrole göre SOD, CAT, GSH-PX ve GLUT seviyelerinde azalma tespit etmişlerdir. Vasu VT ve ark.'nın (201) yaptıkları çalışmada, hiperkolesterolemi oluşturdukları rat grubunda CAT ve SOD aktivitelerinde kontrol grubuna göre artış saptamışlardır, bu bulgular bizim çalışmamızla uyumludur. Yine çalışmamıza benzer şekilde GLUT düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük saptanmıştır. Erdinçler DS ve ark.'nın (203) yaptığı çalışmada, kontrol grubuna göre hiperkolesterolemik ratlarda SOD seviyesi ve anlamlı olmasa da GSH-PX aktivitesi daha yüksek saptanmıştır. Artmış SOD aktivitesini, normalde plazmada düşük seviyede bulunan SOD'nin oksidatif stres tarafından uyarılmasına bağlamışlar ve oksidatif stres altında SOD'nin son derece uyarılabilir olduğunu gözlemlemişlerdir. GSH-PX'in ise plazmada normalde zaten bol miktarda bulunduğu ve oksidatif stresle çok fazla uyarılmadığı veya oksidatif stres tarafından tüketildiği görüşüne varmışlardır. Ayrıca 1 aylık çalışma süresinin daha uzun olması halinde antioksidan enzim sisteminin oksidatif stres tarafından azaltılacağı hatta tüketilebileceğini öne sürmüşlerdir. Buczynski A ve ark (204) 41 koroner arter hastasında yaptıkları çalışmada, trombosit CAT, SOD ve GSH-PX

seviyelerini sağlıklı bireylere göre daha düşük saptamışlardır. Mahfouz MM ve ark.'nın (206) yaptığı çalışmada, yüksek kolesterolle beslenen tavşanlarda GSH-PX aktivitesinde artış saptanırken, SOD aktivitesinde değişiklik saptanmamış, CAT aktivitesi artmış olarak tespit edilmiştir. Fakat yüksek kolesterolle beslenen ratlarda ölçülen enzim aktivitelerinde değişiklik saptanmamışlardır. Bu çalışmada %1 oranında kolesterolle zenginleştirilmiş diyet kullanılmıştır, bu ise sonuçların bizim çalışmamızdakinden farklı çıkmasının bir nedeni olabilir.

Çalışmamızda, grup II'de grup I'e göre yüksek seviyede tespit edilen SOD, CAT, GSH-PX enzim aktivitelerinin, hiperkolesterolemiye sekonder olarak artan oksidatif stresi kompanse etmek amacıyla olduğu kanısındayız. Enzimatik olmayan antioksidan GLUT seviyesi lipid peroksidasyonunun artmış olduğu ortamda azalmaktadır, ayrıca süperoksit radikalının SOD üzerine yıkıcı etkisini önleyerek SOD'nin artışına katkı sağlamaktadır (207). Bu bulgular, konu üzerine yapılmış birçok çalışmayla tam, bir bölümü ile kısmen uyumludur. Deneysel ateroskleroz oluşturulmuş çeşitli çalışmalarda antioksidan enzim aktivitelerindeki artma ve azalmalarla ilgili farklı sonuçlar karşımıza çıkmaktadır, bu bize hiperlipidemik diyetin antioksidan savunma mekanizmalarında değişik modifikasyonlar oluşturduğunu göstermektedir. Farklı sonuçların nedeni hiperkolesterolemi oluşturma yöntemi, kullanılan kolesterol miktarı, oksidatif stresin derecesi ve süresi olabilir. Grup II'de lipid peroksidasyonunun göstergesi, MDA seviyesinin grup I'e göre anlamlı olarak yüksek olması da oluşan oksidatif strese karşı gelişen kompensasyon sonucu antioksidan enzim sistemindeki artışı açıklamaya yardımcı olmaktadır.

Homosistein düşürücü tedavinin, grup III, IV ve V'in sonuçlarıyla değerlendirilmesi: Çalışmamızda oluşturduğumuz oksidatif strese karşı homosistein düşürücü tedavi olarak folik asid ve B₁₂ kullandık. Folik asid serbest radikal temizleyicisi olarak değerlendirilebilir. Fizyolojik konsantrasyonlarda biyolojik yapıları serbest radikal hasarına karşı koruyabilir Folik asid ve B₁₂'nin birlikte uygulanması oksidatif strese karşı sinerjistik etki oluşturmaktadır (209). Biz de çalışmamızda B₁₂ ve folik asidin hem homosistein düşürücü etkisinden hem de antioksidan etkisinden faydalanmayı amaçladık.

Bizim çalışmamızda hiperkolesteroleminin ve artan homosistein düzeyinin oluşturduğu oksidatif strese karşı B₁₂ verilen grup III ve B₁₂ ile birlikte folik asid

verilen grup V'de MDA düzeyleri tedavi sonunda, grup II'den anlamlı olarak daha düşük tespit edilmiştir. Fakat sadece folik asid verilen grup IV'de MDA düzeyi, grup II'den istatistiksel olarak farklı saptanmamıştır. Grup III, IV ve V'in Hcy düzeyleri ise grup II'den anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlardan farklı olarak gerek Diez N ve ark.'nın (225), gerekse Mukherjee S ve ark.'nın (209) yaptığı çalışmada MDA düzeyi yalnız folik asid tedavisi verilen gruplarda daha düşük saptanmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuca benzer şekilde Lawrence M ve ark.'nın (197) yaptığı klinik çalışmada, tek başına folik asid tedavisi alan grupta MDA seviyesi başlangıca göre değişiklik göstermemiştir, yine de çalışmamızla benzer şekilde Hcy seviyesi başlangıca göre folik asid tedavisi ile düşmüştür. Grup IV'de MDA düşüşünün gözlenmemesi, folik asidin Hcy artışına bağlı lipid peroksidasyonunu baskılayabilmesine karşın hiperkolesterolemiye bağlı lipid peroksidasyonunu baskılayamadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda grup II ile karşılaştırıldığında katalaz seviyesi grup III, IV ve V'de daha yüksekti. SOD seviyesi grup III ve V'de grup II'ye göre anlamlı değişiklik göstermezken, grup IV'de daha yüksek tespit edildi. GSH-PX seviyesi grup III'de II'ye göre daha düşük, grup V'de daha yüksek iken, grup IV'de anlamlı değişiklik saptanmadı. Glutasyon seviyeleri grup III, IV ve V'de grup II'ye göre anlamlı olarak daha yüksekti. Folik asid ve B₁₂ tedavilerinin antioksidan enzimleri ve GLUT seviyelerini farklı gruplarda farklı şekilde etkiledikleri gözlemlendi. Hcy seviyesi grup III, IV ve V'de grup II'ye göre anlamlı olarak düşük saptandı.

Mukherjee S ve ark.'nın (209) çalışmasında oluşturulan oksidatif stres sonrası azalmış SOD, GLUT ve CAT enzimlerinde folik asid ve B₁₂ tedavisi sonrasında artış saptanmıştır. Bizim çalışmamızda CAT ve GLUT seviyesi, verilen tedavi ile artarken, SOD seviyesi grup III ve V'de grup II'ye göre anlamlı değişiklik göstermemiş, grup IV'de ise artış saptanmıştır. Mukherjee S ve ark.'nın (209) çalışmasında oksidatif stres sonrası azalan CAT enzim değeri tedavi sonrası düzeldirken çalışmamızda grup I'e göre zaten yüksek olan grup II'deki değer tedavi verilen gruplarda daha da artış göstermiştir. Grup III ve V'de artan CAT ve GLUT seviyesi, verilen tedavi ile azalan oksidatif stres sonucunda antioksidan enzimlerin tüketiminin azaldığı şeklinde algılanabilir.

Yükselmiş plazma homosistein seviyesi ateroskleroz sürecinin çeşitli basamaklarında etkili olmakta ve ateroskleroz oluşumunu hızlandırmaktadır. Zhang R ve ark.'nın (202) yaptıkları çalışmada, metiyonin ile orta derecede Hhcy oluşturulan ratlarda, aterosklerozun başlangıç aşamalarında etkili olan ICAM-1, MCP-1 ve nükleer faktör κ B (NF κ B) seviyelerinin artmış olduğunu saptamışlardır. Mukherjee S ve ark.'nın (209) çalışmasında, ateroskleroz patogeneğinde rolü olan TNF- α ve interlökin-6 seviyelerinin, tek başına folik asid tedavisi ile anlamlı olarak azalmamasına rağmen folik aside ek olarak verilen B₁₂ tedavisi ile anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Li M ve ark (210), folik asid tedavisi ile homosistein seviyesinde azalmayla birlikte aort dokusunda artan VCAM-1 ekspresyonunun azaldığını saptamışlar ve bunun folik asidin anti-inflamatuvar etkisine bağlı olduğunu savunmuşlardır.

B vitaminleri üzerine yapılan klinik çalışmaların sonuçları arasında ise farklılıklar vardır. Tip II diyabetli ve Hhcy'si olan hastalarda folik asidin endotel disfonksiyonu üzerine etkisini araştıran Man S. ve ark.'nın (211) yaptığı çalışmada, Hcy seviyesinde azalma sağlanmasına rağmen endotel disfonksiyonu göstergelerinde anlamlı düzelme saptanmamıştır. NORVIT (The Norwegian Vitamin) çalışmasında akut kalp krizi sonrası sekonder korumada B vitaminleri ile homosistein düşürücü tedavinin etkisi araştırılmıştır; B vitamin kombinasyonu veya tekli tedavi alan gruplarda kardiyovasküler ölüm ve komplikasyonlarda azalma saptanmamıştır, hatta beklenenin aksine kombine tedavi alan grupta klinik son noktalarda artış saptanmıştır. Kalp krizi sonrasında B₆ ile birlikte veya yalnız başına folik asid tedavisi, tekrarlayan kardiyovasküler olaylarda veya ölümden azalma sağlamamıştır, bundan dolayı, böyle bir tedavi kalp krizi ve koroner stent işlemi sonrası sekonder korumada önerilmemektedir (212). Bizim çalışmamızda tek başına folik asid lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA seviyesinde azalma sağlamamıştır. Bu sonuç belki de folik asidin sekonder korumadaki yetersizliğinin nedeni olabilir.

Antioksidan tedavinin, grup VI ve VII'nin sonuçlarıyla değerlendirilmesi:

Çalışmamızda oluşturduğumuz oksidatif strese karşı antioksidan tedavi olarak C ve E vitaminini kullandık. C vitamini serbest radikalleri etkisiz kılan ilk sıra koruyucu ajanlardandır. C vitamini fizyolojik konsantrasyonlarda vasküler hücrelerde, LDL lipid peroksidasyonunu inhibe eder (9).

Çalışmamızda kolesterolü diyetle beslenen grup VI'ya C vitamini verildi. Plazma MDA değerleri arasında grup II ve VI arasında fark saptanmadı. Günel E ve ark.'nın (186) oluşturdukları oksidatif strese karşı verilen C vitamini sonrası MDA değeri, bizim çalışmamıza benzer saptanmıştır. Mahfouz MM ve ark.'nın (213) yaptığı çalışmada Hhcy oluşturulan ratlarla, normal Hcy seviyesine sahip kontrol grubu MDA değerleri arasında fark saptanmamıştır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da Hcy seviyesi yüksek olan grup VI ve düşük olan grup IV arasında MDA seviyeleri açısından fark saptanmadı (P=0.565).

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda C vitaminin lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi tartışmalıdır. Oksidatif strese bağlı lipit peroksidasyonunu azalttığına dair çalışmalar çoğunlukta olmasına rağmen etkisiz olduğunu rapor eden çalışmalar da mevcuttur (220). Hiperkolesterolemik diyetle ateroskleroz oluşturulan bazı hayvan çalışmalarında vitamin C, E ve probukol ile ateroskleroz oluşumu azaltılmıştır, fakat bu etkinin yalnızca vitamin C'nin antioksidan etkisine bağlı olup olmadığı net değildir (220). Ancak C vitaminin bu tür olumlu etkileri fizyolojik dozların üzerinde saptanmıştır, bu nedenle bu bulguların klinik olarak anlamı açık değildir.

Bizim çalışmamızda C vitamini verilen grup VI ile grup II arasında plazma CAT ve GSH-PX değerleri açısından anlamlı fark yoktu. Plazma glutatyon ve SOD değerleri ise grup II'den anlamlı olarak daha yüksekti. Murugesan P ve ark.'nın (214) yaptıkları çalışmada, C vitaminin oluşturulan oksidatif stres üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada verilen C vitamini ile oksidatif stres nedeniyle azalan antioksidan enzimlerin yeniden eski düzeylerine gelmesi sağlanmıştır ayrıca MDA seviyesi de C vitamini tedavisi ile düşürülmüştür. Bizim çalışmamızda MDA seviyesinde anlamlı değişiklik oluşmamasına rağmen SOD ve GLUT seviyeleri C vitamini tedavisi verilen grupta, grup II'ye göre daha yüksek tespit edilmiştir. Murugesan P ve ark.'nın yaptıkları çalışmada CAT ve GSH-PX seviyelerinde iyileşme sağlanırken, çalışmamızda grup II'ye göre grup VI'da bu parametrelerde değişiklik saptanmamıştır.

C vitamini kaynağı diyetle alınan sebze ve meyveler olan bazı epidemiyolojik çalışmalarda; C vitaminin kardiyovasküler mortalite üzerine hem olumlu hem de nötr etkili olduğu çelişkili sonuçlar saptanmıştır. Olumlu etkilerin tek başına C vitaminine

bağlı olup olmadığı açık değildir. Küçük çalışmalarda C vitaminin yararlı etkileri rapor edilmiş olmasına rağmen, büyük kontrollü ve prospektif çalışmalarda bu yararlı etki gösterilememiştir (220). Analizler, C vitaminin koruyucu rolünü desteklese de, insanda C vitaminin antioksidan aktivitesi veya klinik yararı kesin olarak gösterilememiştir.

The Health Professions Follow-up (40 000 erkek hasta, 4 yıl takip), The Rotterdam (5 000 kişi, 4 yıl takip), The Iowa Women's (35 000 postmenapozal, koroner arter hastalığı olmayan kadın, 7 yıl takip), EPESE (The Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly) (11 000 kişi, 6 yıl takip) ve C vitamini ile ilgili tek randomize çalışma olan The Chinese Cancer Prevention çalışmasında (30 000 kişi 5 yıl takip) C vitaminin kardiyovasküler ölüm, ölümcül olmayan kalp krizi ve koroner revaskülarizasyon üzerine olumlu etkisi saptanmamıştır. The Scottish Heart Health çalışmasında, (12 000 hasta üzerinde 8 yıl takip) C vitaminin yeni koroner arter hastalığı gelişimi ve tüm nedenlere bağlı ölüm üzerine etkisi araştırılmış, olumlu etki saptanmamıştır (221). Bu olumsuz çalışmalara rağmen C vitaminin yararlı etkisinin gözlemlendiği çalışmalarda vardır. The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I) (11 000 kişi 10 yıl takip), ve The Finnish (5 000 kişi 14 yıl takip) çalışmalarında C vitamini ile kardiyovasküler ölüm oranında azalma sağlanmıştır.

Antioksidan etkisinin güçlü olduğu birçok deneysel çalışma ile kanıtlanmış olan E vitamini antioksidan tedavi grubumuzun diğer elemanıdır. E vitamini ROS'u engelleyerek LDL kolesterol oksidasyonunu engeller, arteriyel duvarda LDL birikimini, endotele monosit adezyonunu azaltır ve trombosit aktivasyonunu inhibe eder (221).

Çalışmamızda kolesterolü diyetle beslenen grup VII'ye E vitamini verildi. Lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA değeri, tedavi almayan sadece kolesterolü diyetle beslenen grup II'ye göre grup VII'de, anlamlı olarak daha düşüktü. Bu bulgumuz E vitaminin lipit peroksidasyonu üzerine etkisini araştıran çalışmaların büyük kısmı ile uyumludur. E vitamini verdiğimiz grup VII'de CAT ve GSH-PX seviyelerinde grup II'ye göre anlamlı bir değişiklik saptamadık, fakat GLUT ve SOD seviyelerinin grup II'ye göre daha yüksek olduğunu tespit ettik. Gökkuşu C ve ark.'nın (184) yaptığı çalışmada hiperkolesterolemi ile oluşturulan

oksidatif strese karşı kullanılan E vitamini MDA seviyesini düşürmüştür. GLUT seviyesi çalışmamızda ve Gökkuşu C ve ark.'nın yaptığı çalışmada E vitamini tedavisi alan grupta daha yüksekti. Gökkuşu C ve ark.'nın yaptığı çalışmada GSH-PX seviyesi, tedavi alan grupta plazmada azalmış, SOD seviyesi ise değişiklik göstermemiştir, bizim çalışmamızda ise GSH-PX seviyesi anlamlı olarak değişmemiş fakat SOD seviyesi grup II'ye göre daha yüksek tespit edilmiştir. Bansal AK ve ark.'nın (215) yaptıkları çalışmada oksidatif strese karşı E vitaminin koruyucu antioksidan etkisi araştırılmış, MDA seviyesinin tedavi verilen grupta azaldığı tespit edilmiştir. CAT, GLUT ve GSH-PX seviyesi tedavi alan grupta daha yüksek tespit edilmiş, SOD seviyesinde değişiklik izlenmemiştir. Günel E ve ark.'nın (186) yaptığı çalışmada, oluşturdukları oksidatif strese E vitaminin etkisini incelemişler ve tedavi alan grupta MDA seviyesinin azaldığını tespit etmişlerdir. Dillioğlugil MO ve ark.'nın (216) verdikleri bir ajana bağlı oluşan oksidatif strese karşı E vitaminin etkisini araştırdıkları çalışmada, E vitamini tedavisi verilen grupta MDA seviyesinin düştüğü, GLUT ve SOD seviyelerinin ise tedavi verilmeyen gruba göre arttığı saptanmıştır. Seven A ve ark.'nın yaptığı çalışmada, deneysel diyabete bağlı gelişen oksidatif strese E vitaminin etkisi araştırılmıştır (217). MDA seviyesi açısından gruplar arasında fark saptanmamıştır.

Birçok deneysel çalışmada faydası gösterilen E vitaminin ateroskleroz üzerine etkisini araştırmak için pek çok klinik çalışma yapılmıştır. İlk epidemiyolojik çalışma olan MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) çalışmasında plazma E vitamini seviyesi ile iskemik kalp hastalığı ve inme riski arasında negatif korelasyon saptanmıştır (222). The US Nurses' Health (87 000 hasta, 8 yıl takip) ve The Health Professions (40 000 hasta, 4 yıl takip) (221) çalışmalarında E vitamini ile koroner arter hastalığı ve ölüm riskinde anlamlı olmayan bir azalma saptanmıştır. Finnish (5 000 kişi 14 yıl takip) ve CLAS (Cholesterol-Lowering Atherosclerosis Study) (223) çalışmalarında koroner ölümün anlamlı olarak E vitamini ile azaldığı saptanmıştır. The Scottish Heart Health çalışması ve The Rotterdam (221) çalışmasında yeni koroner arter hastalığı oluşumu ve ölüm üzerine E vitaminin azaltıcı etkisi gösterilememiştir.

E vitamini ile ilgili ilk randomize çift kör çalışma ATBC (The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention) (224) çalışmasında E vitamini

ölümcül olmayan kalp krizi riskini azaltmasına rağmen koroner arter hastalığına bağlı ölümlerde anlamlı olmayan bir artışa sebep olmuştur. Koroner arter hastalığı kanıtlanmış 2 002 hastanın alındığı CHAOS (The Cambridge Heart Antioxidant Study) (224) çalışmasında ölümcül olmayan kalp krizinde azalma sağlanmasına rağmen kardiyovasküler ölümlerde anlamlı azalma saptanmamıştır. The Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI) ve HOPE (The Heart Outcomes Prevention Evaluation) (224) çalışmalarında E vitaminin kardiyovasküler olaylar üzerine olumlu etkisi saptanmamıştır.

C ve E vitaminin kullanıldığı birçok deneysel ve klinik çalışma sonuçları arasında farklılıklar olduğunu, bizim çalışma sonuçlarına benzer bulgular olduğu gibi farklılıkların da sonuçlara yansıdığını gördük.

Yapılan çalışmaların sonucunda E vitamini, primer korumada, çalışmalarda yüksek riskli hastaların değerlendirildiği sekonder koruma çalışmalarına göre daha etkin gibi gözükmektedir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda E vitaminin endotel disfonksiyonunu ve plak rüptürünü engellediği gösterilmiştir. Elde edilen bu gibi sonuçlar, E vitamininin sekonder korumada da etkili olabileceğini düşündürmektedir (224).

Kalp ve damar dokusuna ait sonuçların değerlendirilmesi: Kalp ve damar dokusunda, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri grup II'de, normal yemle beslenen grup I'e göre daha yüksek saptandı. Verilen vitamin tedavileri ile dokularda artan MDA seviyelerinin düştüğünü, diğer bir deyişle doku seviyesinde oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonunun azaldığını saptadık. Sudhakar V ve ark. (208) yaptıkları çalışmada, hiperkolesterolemik ratların kalp dokusunda MDA değerini çalışmamızdaki benzer şekilde yüksek tespit etmişlerdir. Kumar SA ve ark.'nın (207) yaptıkları çalışmada, oluşturdukları hiperkolesterolemik rat grubunda çalışmamıza benzer şekilde kontrole göre doku MDA seviyesinde artış saptanmıştır. Hagar HH ve ark.'nın (185) yaptığı çalışmada oluşturulan oksidatif strese karşı verilen B₁₂ ve folik asid tedavisi sonrası, çalışmamızdaki sonuca benzer şekilde kalp dokusu MDA seviyesi azalmıştır. Gökhan M ve ark.'nın (218) yaptıkları çalışmada oluşturulan oksidatif strese karşı verilen E vitamini ile kalp dokusunda artan MDA seviyelerinde azalma sağlanmıştır. Loo BVD ve ark.'nın yaptığı çalışmada kalp ve aort dokusunda, ilerleyen yaşla birlikte artan oksidatif stresi

dengelemek için E vitamini seviyesinin genç ratlara göre arttığını tespit etmişlerdir (219).

Grup II'de kalp dokusuna ait CAT ve SOD seviyeleri yüksek GLUT seviyesi düşük tespit edilmiştir. GSH-PX seviyesinde anlamlı değişiklik olmamıştır. Sudhabar V ve ark.'nın (208) yaptıkları çalışmada hiperkolesterolemik ratların kalp dokusunda SOD, CAT ve GSH-PX seviyeleri kontrole göre daha düşük saptanmıştır. Kalp dokusuna ait tedavi verilen grupların hepsinde, artmış CAT seviyesinin daha da arttığı, artan SOD seviyesinin azaldığı ve azalan GLUT seviyesinin arttığını saptadık. GSH-PX seviyesinde anlamlı değişiklik saptanmadı. Gökhan M ve ark.'nın (218) yaptıkları çalışmada E vitamini ile kalp dokusunda oksidatif stres nedeniyle azalan GLUT düzeyi artmıştır. Hagar HH ve ark.'nın (185) yaptığı çalışmada verilen B₁₂ ve folik asid tedavisi sonrası azalan kalp dokusu GLUT seviyesi çalışmamıza benzer şekilde artmıştır. Bu çalışmanın sonucunda diyetle fazla miktarda folik asid ve B₁₂ alınmasının kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğu vurgulanmıştır.

Grup II'de damar dokusuna ait CAT, SOD ve GSH-PX seviyeleri artmış, GLUT seviyesi ise azalmış olarak tespit edilmiştir. Sharma RC ve ark. (205) immunohistokimyasal doku çalışmasında, aterosklerotik tavşan aort dokusunda SOD, CAT ve GSH-PX aktivitelerini çalışmamıza benzer şekilde artmış olarak saptamışlardır. Çalışmamızda verilen vitamin tedavisi ile artan CAT seviyesi grup IV, VI ve VII'de azalmış, grup II ve V'de değişiklik saptanmamıştır. Azalan GLUT seviyesi grup III, IV ve VII'de artmasına rağmen grup V'de değişiklik saptanmamıştır. Grup II'de artan SOD seviyesi grup III'de değişmemiş, diğer tedavi gruplarında ise daha da artmıştır. Grup II'de artan GSH-PX seviyesi grup III'de azalmış, grup IV'de artmış olarak tespit edilirken grup V, VI ve VII'de değişiklik saptanmamıştır.

Literatürde hiperkolesterolemi ve hiperhomosisteinemi sonrası artan oksidatif strese karşı, çalışmamızdaki gibi düzenlenmiş tedavi rejiminin olduğu yeterli sayıda çalışma olmaması nedeniyle sonuçlarımızla diğer çalışma sonuçları arasında daha fazla karşılaştırma yapılamadı.

Çalışmamızı genel olarak toparlayacak olursak; antioksidan etkisi birçok çalışmayla kanıtlanmış C ve E vitamini ile homosistein düşürücü ve antioksidan

etkisi bilinen folik asid ve B₁₂'nin ateroskleroz patogenezinde çok önemli olan oksidatif stres üzerine etkisini araştırdık. Yapılmış çalışmalarda bu vitaminlerin antioksidan sistem üzerine etkileri farklılık göstermektedir. Öyle ki verilen vitamin antioksidan sistemde azalma oluşturursa, bu bulgu verilen vitaminin oksidatif stresle mücadele ettiği ve biyolojik antioksidan sistemin refleks olarak artışının bu nedenle görülmediği şeklinde yorumlanabilmektedir. Yine eğer verilen vitamin antioksidan sistemde artış oluşturuyorsa, bu da verilen vitaminin oksidatif stresle mücadele ederek, refleks olarak artmış biyolojik antioksidan sistemin oksidatif stres tarafından tüketilmesini engellediği şeklinde yorumlanabilmektedir. Bize göre her iki yorum da doğrudur, nitekim bizim çalışmamızda da verilen tedavi ile antioksidan sistem elemanlarında plazma ve doku seviyesinde birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu konularda yapılmış birçok çalışmada bu bulguyu destekleyici niteliktedir. Önemli olan doku ve plazma antioksidan sistemindeki bu değişikliklerin kliniğe nasıl yansıdığıdır. Vitaminlerin kardiyovasküler klinik faydaları üzerine yapılan primer ve sekonder koruma ile ilgili çalışmalarda olumlu ve olumsuz sonuçlar elde edilmiştir. Klinik çalışmalardaki gruplar birbiri ile homojen olmadığı için bu çalışmaların sonucunda vitaminlerin kardiyovasküler klinik üzerine faydalı etkileri olmadığını söylemek doğru olmayacaktır.

Sonuç olarak; aterosklerozun önemli bir basamağını oluşturan oksidatif strese karşı biyolojik olarak var olan antioksidan sistemlere destek olarak verilen vitaminler, antioksidan sistemlerle birlikte hareket ederek oksidatif stresi kısmen de olsa baskılayabilmektedir. Çalışma verilerimiz, vitaminlerde ateroskleroz gelişimini engelleyebilme ya da yavaşlatabilme potansiyeli olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda oksidatif strese karşı var olan savunma sistemimizi güçlendirmek için vitaminden zengin beslenmeyi önermek doğru bir yaklaşım olacaktır.

ÖZET

Deneysel Ateroskleroz Modelinde Homosistein Düşürücü ve Antioksidan Tedavinin Anti-Aterosklerotik Etkinliği

Birçok deneysel çalışmada, sadece endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve adventisyal hücreler tarafından üretilen serbest oksijen radikallerinin ateroskleroz için önemli bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Hiperkolesterolemi, diyabet, yüksek tansiyon, sigara ve yaşlanma ile ROS artmaktadır. Hiperkolesterolemi, ateroskleroz ve aterosklerozun neden olduğu kardiyovasküler hastalıklarda çok önemli rol oynar. Hiperkolesteroleminin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu arttırdığı ve bu şekilde endotelial hücre hasarı meydana getirerek ateroskleroz basamağında yer aldığını gösteren birçok çalışma mevcuttur.

Bazı olumsuz prospektif çalışmalara rağmen, kanıtların çoğu hiperhomosisteineminin ateroskleroz için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Deneysel çalışmalar homosisteinin, oksidatif stress nedeniyle olduğu düşünülen vasküler endotele toksik etkisiyle aterogeneze neden olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda antioksidan ve homosistein düşürücü tedavinin ateroskleroz üzerine etkisini incelemeyi amaçladık. Antioksidan olarak vitamin C ve vitamin E'yi, homosistein düşürücü tedavi olarak folik asid ve B₁₂'yi kullandık.

Çalışmada Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen Wistar albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarı ve biyokimya laboratuvarı imkanları kullanıldı. Sıçanlar 4.5 aylık çalışma dönemi sonrası kan ve doku örneklerinden antioksidan enzimlerin çalışılması için öldürüldü. SOD, CAT, GLUT ve GSH-PX seviyeleri, Hcy, TK, TG seviyeleri çalışıldı.

Antioksidan enzim seviyelerinin, tedavi verilen gruplarda değiştiği saptandı. Bu değişiklik, antioksidan vitaminlerin oksidatif stresi kısmende olsa baskılayabileceğini göstermiştir. Bu bulgular antioksidan vitaminlerin ateroskleroz gelişimini yavaşlatabileceğini belki de durdurabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, antioksidan vitaminler oksidatif strese karşı etkilidir, fakat bu faydalı etki klinik olarak açıkça tespit edilmemiştir. Bu konu üzerine daha çok, primer ve sekonder koruma çalışmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler; Ateroskleroz, Oksidatif stres, Homosistein

SUMMARY

Anti-Atherosclerotic Effect of Antioxidant and Homocysteine Lowering Therapy in Experimental Atherosclerosis Model

A large number of studies in experimental animals have shown that the common risk factors for atherosclerosis increase production of free oxygen radicals, not only by endothelial cells but also by vascular smooth muscle cells and adventitial cells. Hypercholesterolemia, diabetes, hypertension, smoking and aging increase production of reactive oxygen species. Hypercholesterolemia plays an important role in atherosclerosis and related cardiovascular disease. There are most study, which are strong evidence that hypercholesterolemia increases production of free oxygen radicals and leads to endothelial cell injury, which sets the stage for atherosclerosis.

Despite a number of negative prospective trials, the evidence overall indicates that hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for atherosclerosis. Experimental studies suggest that homocysteine may promote atherogenesis through its toxic effects on the vascular endothelium, which is likely mediated through oxidative stress.

We aimed to search that the effect of antioxidant and homocysteine reducing therapy on atherosclerosis in this study. We used vitamin C and vitamin E as antioxidant, and used folic acid and B₁₂ as homocysteine reducing therapy.

Wistar albino rats which were supplied from Akdeniz University Experimental Animals laboratory were used. This study was carried out in Suleyman Demirel University Experimental Animals laboratory and Biochemistry laboratory. After all the animals were sacrificed at the end of 4.5 months, blood and tissue samples were collected to analyze SOD, CAT, GLUT, GSH-PX, Hcy, TG, total cholesterol.

In treated groups, antioxidant enzymes were determined various levels. The changes of antioxidant enzymes shown that, antioxidant vitamins decreased oxidative stress also as partly. This finding was thought that, antioxidant vitamins might have slowed or perhaps stopped atherogenesis.

In conclusion, antioxidant vitamins are effective to prevent oxidative stress induced by hypercholesterolemia, but this beneficial effect has not to be definitively proven in clinical study. Therefore, we need more primary and secondary prevention study about of this subject.

Key Words: Atherosclerosis, Oksidative stress, Homocysteine.

KAYNAKLAR

1. Levy D, Wilson PW. Atherosclerotic cardiovascular disease: An epidemiologic perspective. In Topol EJ ed. Textbook of Cardiovascular Medicine, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers; 1997: 14
2. Goncalves LM. Angiogenic growth factors: Potential new treatment for acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 294–302
3. Çakır S, Özme Ş, Ciliv G, Renda N. 50 yaş altında enfarktüs hikayesi olan ailelerin çocuklarında aterosklerotik hastalık risk faktörleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1991;34: 115–120.
4. Özme Ş. Ateroskleroz ve kalp hastalığı. *Katkı Dergisi* 1998; 19: 560–566.
5. Russell R. Mechanism of Disease: Atherosclerosis; an inflammatory disease. *N EngJMed* 1969;340: 115–126.
6. Mahley RW, Palaoğlu KE, Atai ZE. et al. The Turkish Heart Study. Lipids and lipoproteins. *J Lipid Res.* 1995; 36: 839–859.
7. Kannel WB, Damber TR, Kağan A, et al. Factors of risks in the development of coronary heart disease-six year follow-up experience: The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961; 55: 33–50.
8. Sansoy V. Koroner ateroskleroz için risk faktörleri. *T Clin J Cardiol* 2000; 13: 33–38.
9. Stocker R, Keaney JF. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004; 84: 1381–1478.
10. Schnackenberg CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 121–125
11. Maytin M, Leopold J, Loscalzo J. Oxidant stress in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep* 1999; 1: 156–164
12. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;103: 1955–1960
13. Tsutsui T, Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 957–96
14. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, et al. Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91(suppl):7A–11A
15. Masser A.P. Taylor, L.M.; Porter, J.M. Importance of Elevated Plasma Homocysteine Levels as a Risk Factor for Atherosclerosis. *Ann.Thorac. Surg.* 58:1240-1246,1994
16. Boers, G.H.J, Smals A.G.H, Trijbels F.J.M. et al. Heterozygosity for homocystinuria in Premature Peripheral and Cerebral Occlusive Arterial Disease. *N.Engl.J.Med.* 313(12):709-715, 1985.
17. Montalescent G, Ankri A, Chadefaux-Vekemans B, et al. Plasma homocysteine and the extent of atherosclerosis in patients with coronary disease. *Int J Cardiol.* 1997;60: 295–300.
18. Schnyder G, Pin R, Roffi M, et al. Association of plasma homocysteine with the number of major coronary arteries severely narrowed. *Am J Cardiol.* 2001;88: 1027–30
19. Chao CL, Tsai HH, Lee CM et al. The graded effect of hyperhomocysteinemia on the severity and extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1999;147: 379–386.
20. Verhoef P, Kok FC, Kruyssen DACM, et al. Plasma total homocysteine, B vitamins and risk of coronary atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17: 989–995.
21. Yoo JH, Park JE, Hong KP, et al. Moderate hyperhomocysteinemia is associated with the presence of coronary artery disease and the severity of coronary atherosclerosis in Koreans. *Throm Res.* 1999; 94: 45–52
22. Olszewski A.J. Szostak W.B. Bialkowska, M.Reduction of Plasma Lipid and Homocysteine levels by Pyridoxine, Folate, Cobalamin, Choline, Riboflavine, and Troxerutin in Atherosclerosis. *Atherosclerosis,* 75: 1–6, 1989.
23. Ueland M. Refsum H. Plasma Homocysteine, a Risk Factor for Vascular Disease: Plasma Levels in Health, Disease, and Drug Therapy. *J.Lab.Clin.Med.* 114(5):473-481, 1989.
24. Libby P. The Vascular Biology of Atherosclerosis In: Braunwald's Heart Disease. 7th ed. Philadelphia, 921–958, 2005.
25. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, et al: Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: Pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 139:205, 1998.

26. Williams KJ, Tabas I: The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 9:471, 1998.
27. Witztum JL, Berliner JA: Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 9:441, 1998.
28. Rong JX, Rangaswamy S, Shen L, et al: Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 18:1885, 1998.
29. Tabas I: Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Ann Rev Nutr* 19:123, 1999.
30. Ley K: The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 9:263, 2003.
31. Ley K, Huo Y: VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest* 107:1209, 2001.
32. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al: A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107:1255, 2001.
33. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, et al: The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102:145, 1998.
34. Murry CE, Gipaya CT, Bartosek T, et al: Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am J Pathol* 151:697, 1997
35. Gimbrone MA Jr, Resnick N, Nagel T, et al: Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 811:1, 1997.
36. Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, et al: Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 78:423, 1998.
37. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al: Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 91:281, 2002.
38. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, et al: Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 8:1218, 2002.
39. Geng YJ, Libby P: Progression of atheroma: A struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 22:1370, 2002.
40. Littlewood TD, Bennett MR: Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 14:469, 2003.
41. Nagai R, Suzuki T, Aizawa K, et al: Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: Dissection of transcriptional regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 947:56, 2001.
42. Manabe I, Nagai R: Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep* 5:214, 2003.
43. Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR: Tumor necrosis factor-(alpha) promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 23:1553, 2003.
44. Libby P: Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104:365, 2001.
45. Bini A, Mann KG, Kudryk BJ, et al: Noncollagenous bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 19:1852, 1999.
46. Yokoya K, Takatsu H, Suzuki T, et al: Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: A study based on four serial coronary arteriograms per year. *Circulation* 100:903, 1999.
47. Virmani R, Burke AP, Farb A, et al: Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* 44:349, 2002.
48. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, et al: Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 102:576, 1998.
49. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, et al: Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 99:2503, 1999.
50. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, et al: The thin-cap fibroatheroma: A type of vulnerable plaque: The major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* 16:285, 2001.
51. Bezerra HG, Higuchi ML, Gutierrez PS, et al: Atheromas that cause fatal thrombosis are usually large and frequently accompanied by vessel enlargement. *Cardiovasc Pathol* 10:189, 2001
52. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, et al: Lipid lowering by diet reduces matrix metallo-proteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: A potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 97:2433, 1998.

53. Aikawa M, Sugiyama S, Hill C, et al: Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation* 106:1390, 2002.
54. Aikawa M, Voglic SJ, Sugiyama S, et al: Dietary lipid lowering reduces tissue factor expression in rabbit atheroma. *Circulation* 100:1215, 1999.
55. Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, et al: Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 103:993, 2001.
56. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, et al: Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 100:230, 1999.
57. Libby P, Aikawa M: Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 8:1257, 2002.
58. Danesh J: Coronary heart disease, *Helicobacter pylori*, dental disease, *Chlamydia pneumoniae*, and cytomegalovirus: Meta-analyses of prospective studies. *Am Heart J* 138:S434, 1999.
59. Libby P, Egan D, Skarlatos S: Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: An assessment of the evidence and need for future research [review]. *Circulation* 96:4095, 1997.
60. O'Connor S, Taylor C, Campbell LA, et al: Potential infectious etiologies of atherosclerosis: A multifactorial perspective. *Emerg Infect Dis* 7:780, 2001.
61. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, et al: Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage TNF-alpha and matrix metallo-proteinase expression. *Circulation* 98:300, 1998.
62. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, et al: Chlamydial and human heat shock protein 60s Q activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 103:571, 1999.
63. Kalayoglu MV, Byrne GI: Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 177:725, 1998.
64. Kalayoglu MV, Byrne GI: A *Chlamydia pneumoniae* component that induces macrophage foam cell formation is chlamydial lipopolysaccharide. *Infect Immun* 66:5067, 1998.
65. Kalayoglu MV, Hoerneman B, LaVerda D, et al: Cellular oxidation of low-density lipoprotein by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 180:780, 1999.
66. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, et al: Heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 164:13, 2000.
67. Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI: *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *JAMA* 288:2724, 2002.
68. O'Connor CM, Dunne MW, Pfeffer MA, et al: Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: The WIZARD study: A randomized controlled trial. *JAMA* 290:1459, 2003.
69. Cannon CP, McCabe CH, Belder R, et al: Design of the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy (PROVE ITJ-TIMI 22 trial. *Am J Cardiol* 89:860, 2002
70. Grayston JT: Secondary prevention antibiotic treatment trials for coronary artery disease. *Circulation* 102:1742, 2000.
71. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991; 161(4): 488–503.
72. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 1987; 107(4): 526–45.
73. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1987; 1(6): 441–5.
74. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 300(2): 535–43
75. Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu Rev Nutr.* 1992;12: 139–59.
76. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology.* 104: 129–140, 1995.

77. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91: 3527–61.
78. Sonbahar Okulu, Hücre-II kurs notları. Oksidan stres ve hücre hasarı. Kızılcıhamam 1993.
79. Tamirisa P, Frishman WH, Kumar A. Endothelin and endothelin antagonism: roles in cardiovascular health and disease. *Am Heart J*. 1995;130: 601–10.
80. Erden M, Bor NM. Changes of reduced glutathione, glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochemical Med*. 31: 217–227, 1984.
81. Erden M. Changes of hexose monophosphate pathway and methemoglobin reductase enzyme activity after radiation guinea pigs. *Comp Biochem Physiol*. 86: 629–633, 1987.
82. Mitchell JB, Russo A. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *Br J Cancer*. 55: 96–104, 1987.
83. Blakely WF. Hydrogen peroxide induced base damage in DNA. *Radiat Res*. 121: 338–343, 1990.
84. Mason RP. Free radical reactions with DNA and its nucleotids. *Basic Life Sci*. 52: 119, 1990.
85. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull*. 49(3): 479–80, 1993.
86. Isbir T. Antioksidan Sistemler. Endotel. İzmir Tabib Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu. 92–98, 1994.
87. Marklund SL. Analysis of extracellular süperoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. *Methods Enzymol*. 186: 260–265, 1990.
88. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, consequence? *The Lancet*. 344: 721–724, 1994.
89. Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*. 105: 93–104, 1984.
90. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, et al. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation* 104: 1165–1170, 2001.
91. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, et al. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res* 85: 23–28, 1999.
92. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: Correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood*. 76: 835–841, 1990.
93. Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: Essential nutrient and antioxidant component of the immun system. *Adv. Exp. Med. Biol*. 262: 145–158, 1990.
94. Forslid J, Björkstén B, Hagersten K, Hed J. Erythrocyte-mediated scavenging of reactive oxygen metabolites generated by human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *Inflammation*. 13: 543–551, 1989.
95. Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, et al. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia*. 37: 264–269, 1994.
96. Bleecker J, Lison D, Abeele KV, Willems J, Reuck J. Acute and subacute organophosphate poisoning in the rat. *Neuro Toxicology*. 15(2): 341–348, 1994.
97. Schnackenberg CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 121–125
98. Maytin M, Leopold J, Loscalzo J. Oxidant stress in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep* 1999; 1: 156–164
99. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;103: 1955–1960
100. Tsutsui T, Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 957–962
101. Galle J, Heermeier K. Angiotensin II and oxidized LDL: an unholy alliance creating oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2585–2589
102. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999; 31: 273–300
103. Chen J, Metha JL. Role oxidative stress in coronary heart disease. *Indian heart J*. 2004;56: 163–173.

104. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999; 99: 2027–2033
105. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 707–727
106. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low-density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998; 141: 1–15
107. Neale ML, Fiera RA, and Matthews N. Involvement of phospholipase A2 activation in tumour cell killing by tumour necrosis factor. *Immunology* 64: 81–85, 1988.
108. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840–844
109. Doggrell SA. Statins in the 21st century: end of the simple story? *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10: 1755–1766
110. Bellocost S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 2000; 32: 164–176
111. Zhou YF, Guetta E, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE. Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996; 98: 2129–2138
112. Jalkanen J, Leppanen P, Narvanen O, Greaves DR, Yla-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted decoy human macrophage scavenger receptor (SR-AI) in LDL receptor knock-out mice. *Atherosclerosis* 2003; 169: 95–103
113. Singh BM, Mehta JL. Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia: relevance in the therapy of hypertension and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1296–1304
114. Matkovic A. Antioxidants and vascular diseases. *Orv Hetil* 2003; 144: 475–481
115. Parks E, Traber MG. Mechanisms of vitamin E regulation: research over the past decade and focus on the future. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2: 405–12.
116. O'Byrne D, Grundy S, Packer L, et al. Kramer K, Jialal I, Traber MG. Studies of LDL oxidation following α -, γ -, or δ -tocotrienyl acetate supplementation in hypercholesterolemic humans. *Free Radic Biol Med*, 2000.
117. Goodman and Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9. ed. The Mc Graw-Hill Com. 1996
118. Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med*. 2000;28: 141–164.
119. Meydani M. Vitamin E and Atherosclerosis: Beyond Prevention of LDL Oxidation. *J. Nutr.* 131: 366S–368S, 2001.
120. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347: 781–6.
121. GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999; 354: 447–55.
122. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 154–60.
123. Blumberg JB. An Update: Vitamin E Supplementation and Heart Disease. *Nutr Clin Care*, 2002; 5: 50–55
124. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22: 18–35, 2003.
125. Englard S, Seifter S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr.* 1986;6: 365–406.
126. Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Institute of Medicine. Chapter 5: Vitamin C. In: *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. A Report of the Institute of Medicine*. Washington, DC: National Academy Press; 2000: 95–185.
127. Harris JR, ed. Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology. In: *Subcellular Biochemistry*. New York, NY: Plenum Press; 1996:vol. 25.

128. Levine M, Rumsey S, Wang Y. Vitamin C. In: Ziegler EE, Filer LJ, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 7th ed. Washington, DC: ILSI Press; 1996:146–159.
129. Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen R, et al. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med*. 2000;248:377–386
130. Prasad K. Homocysteinemia a risk factor for cardiovascular disease. *Int J Angiol*. 1999; 8: 79-86
131. Fallest-Strobl PC, Koch DD, Stein JH, et al. Homocysteinemia: A new risk factor for atherosclerosis. *Am Fam Physician* 1997; 56: 1607-1610
132. Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, et al. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with Vitamin B₆, B₁₂ and folate. *Am J Epidemiol* 1996;143: 845-859
133. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the diagnosis of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128
134. Mayer E, Jacobsen DM, Robinson M. Homocysteinemia and coronary atherosclerosis. *JACC*. 1996; 27: 517-527.
135. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total Homocysteine in plasma or serum methods applications. *Clin Chem*. 1993; 39: 1764-1779.
136. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris DJ. Methionin Metabolism in Mammals the methionine-sparing effect of cysteine. *J Biol Chem* 1988; 263: 1750-1754.
137. O'Grady H, Kelly C et al. Homocysteine and occlusive arterial disease. *British Journal of Surgery*. 2002; 89: 838–844
138. Mudd SH, Levy HL. Plasma homocyst(e)ine or homocysteine? *N Eng J Med*. 1995; 333: 325
139. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, et al. Homocysteine and Cardiovascular Disease. *Annu Rev Med*. 1998; 49: 31-62
140. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B vitamins and coronary artery disease. *Med of N Am*. 2000; 84: 215–237
141. Kang SS, Wong PWK, Manilow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 279–98.
142. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Brattstrom L, Ueland PM. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Intern Med* 1999; 246: 425–54.
143. Chauveau P, Chadefaux B, Coude M, et al. Hyperhomocysteinemia, a risk factor artherosclerosis in chronic üremic patient. *Kidney Int*. 1993; 11: S72-S77
144. Okada E, Oida K, Hiroshi T, et al. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for coronary arteriosclerosis in Japanase Patients with type II Diabetes. *Diabetes Care*. 1999; 22: 484-490.
145. Welsh GN, Lojcalzo J. Homocysteine and Atherosclerosis. *N Eng J Med*. 1998; 45: 290-292.
146. Refsum H, Wesenber F, Ueland PM. Plasma Homocysteine in Children with Acute Leukemia: Changes During a Chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991; 51: 828-835.
147. Green HR, Jacopsen DW, Faiman C. Normalization of hyperhomocysteinemia with L-thyroxine in hypothyroidism. *Ann Intern Med*. 1999; 131: 348-351.
148. Rosenberg ICH. Homocysteine, vitamins and arterial occlusive disease. *J Nutr*. 1996; 126: 1235-1237.
149. Tokgozoglu L. Aterosklerozda patoloji ve patogenez. *T Clin J Cardiol*. 2000; 13: 29–32
150. Miner SES, Eurovski J, Cole DEC. Clinical chemistry and molecular biology at homocysteine metabolism: An update. *Clin Biochem*. 1997; 30: 189–201
151. Giltay EJ, Hoogeveen EK, Elbers JM et al. Effects of sex steroids on plasma homocysteine levels: a study in transexuel males and females. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 550–3.
152. Stampfer MJ, Malinow MR, Willet WC, et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infaction in US physicians. *JAMA*. 1992; 268: 877-881.
153. Wald NJ, Watt HC, Law MR, et al. Homocysteine and ischemic herat disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med*. 1998; 158: 862-867.
154. Arnesen E, Refsum H, Bonaa HK, et al. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol*. 1995; 24: 704-709.
155. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, et al. A quantitative assesment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995; 274: 1049-1057.

156. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. *JAMA*. 1997; 277: 1775-1781.
157. Havel R. Triglyceride-rich Lipoproteins and Atherosclerosis-new Perspectives. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59: 795-799
158. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med*. 1996; 2: 386-389.
159. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*. 1993; 91:308-318.
160. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2001; 104: 2569-2575.
161. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, et al. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: Implications for vascular disease. *Circulation*. 2001; 103: 2717-2723.
162. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest*. 1986; 77: 1370-1376.
163. Welch GN, Upchurch Jr. GR, Keaney Jr. KF, et al. Homocysteine decreases cell redox potential in vascular smooth muscle cells. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 27: 164
164. Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease: Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vase Biol*. 1997; 17: 2074-2081.
165. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease *Cell Death and Differentiation* 2004; 11: 56–64.
166. Ridker PM, Manson JE, Buring JE et al. Homocysteine and risk of cardiovascular disease among postmenopausal women. *JAMA* 1999;281:1817–1821.
167. Tsai J, Perella MA, Yoshizumi M, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: A link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91: 6369-6373.
168. Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein-C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*. 1990; 101: 895-901.
169. Nappa F, DeRosa N, Marfella R, et al. Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA*. 1999; 281: 2113-2118.
170. Hajjar KA. Homocysteine induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest*. 1993; 91: 2873-2879.
171. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest*. 1986; 77: 1909-1916.
172. Lentz SR, Sadeler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest*. 1991; 88:1906-1914.
173. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest*. 1993; 92:1381-1386.
174. Hayashi T, Honda G, Suzuki K. An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood*. 1992; 79: 2930-2936.
175. Misra HP. Generation of superoxide free radical during the autooxidation of thiols. *J Biol Chem*. 1974; 249: 2151-2155.
176. Morel DW, Hesselr JR, Chlson GH. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res*. 1983; 210: 70-76
177. Hugher H, Matheus B, Lenz MI. Cytotoxicity of oxidized LDL to porcine aortic muscle cells is associated with the oxysterols 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 1177-1185.
178. Jones BG, Rose FA. Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity. *Atherosclerosis*. 1994; 105: 165-170.
179. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem*. 1999; 45: 290-292.
180. Homocysteine Lowering Trialist' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *Br Med J* 1998; 316: 894–8.

181. Boushey C, Shirley A, Beresford A. A quantitative assesment of plasma homocysteine as a risk faktor of vascular disease. *JAMA* 1995;274:1049–1057.
182. Robinson K. Homocysteine, B vitamins and risk of cardiovascular disease. *Heart* 2000;83: 127–130.
183. Ubbink JB, Van der merve et al. Hyperhomocysteinemia and response to vitamin supplementation. *Clin Invest* 1993;71: 993–998.
184. Gökkuşu C, Mostafazadeh T. Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. *Clinica Chimica Acta* 2003; 328: 155–161.
185. Hagar HH. Folic acid and vitamin B₁₂ supplementation attenuates isoprenaline-induced myocardial infarction in experimental hyperhomocysteinemic rats. *Pharmacological Research*. 2002; 46: 213–220.
186. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, et al. Effect of antioxidant therapy on collagen synthesis in corrosive esophageal burns. *Pediatr Surg Int*. 2002; 18: 24–27
187. Hsu CH, Han BC, Liu MY, et al. Phosphine-induced oxidative damage in rats: attenuation by melatonin. *Free Radical Biology* 2000; 28: 636–642.
188. Heim C, Kolasiewicz W, et al. Behavioral alterations after unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the striatum, effect of α -tocopherol. *Pol J Pharmacol*. 2001; 53: 435–448.
189. Sun Y, Larry WO, Ying Li. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 34(3): 497-500, 1988.
190. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folinphenol reagents. *J Biol Chem*. 193: 265–275, 1951.
191. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 70(9): 158-169, 1967.
192. Aebi H. Catalase in vitro. *Enzymol*. 105: 121-126, 1984.
193. Drapper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186: 421-431, 1990.
194. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*. 1969; 27: 502–522.
195. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91: 3527–61.
196. Upston JM, Witting PK, Brown AJ, et al. Effect of vitamin E on aortic lipid oxidation and intimal proliferation after arterial injury in cholesterol fed rabbits. *Free Radical Biology*. 2001; 31: 1245–1253.
197. Title LM, Cummings PM, Giddens K, et al. Effect of Folic Acid and Antioxidant Vitamins on Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. 2000, 36: 758–65
198. Lentz SR, Piegors DJ, et al. Supplementation of Atherogenic Diet With B Vitamins Does Not Prevent Atherosclerosis or Vascular Dysfunction in Monkeys. *Circulation* 2001;103;1006–1011.
199. Ohara Y, Peterson TE, Sayegh HS, et al. Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. *Circulation* 1995; 92: 889–903.
200. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clinical Invest*. 1993; 91: 2546–51.
201. Vasu VT, Modi H, Thaikootathil JV, et al. Hypolipidaemic and antioxidant effect of *Enicostemma littorale* Blume aqueous extract in cholesterol fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 101: 277–282.
202. Zhang R, Ma J, Xia M, et al. Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes. *J Nutr*. 2004; 134: 825–30.
203. Erdinçler DS, Seven A, Inci F, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals: Effect of aging and hypercholesterolemic diet. *Clinica Chimica Acta*. 1997;265: 77–84.
204. Buczynski A, Wachowicz B, Kedziora K, et al. Changes in antioxidant enzymes activities, aggregability and malonyldialdehyde concentration in blood platelets from patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 1993; 100: 223–8.

205. Sharma RC, Crawford DW, Kramsch DM, et al. Immunolocalization of native antioxidant scavenger enzymes in early hypertensive and atherosclerotic arteries. Role of oxygen free radicals. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 403–15.
206. Mahfouz MM, Kummerow FA. Cholesterol rich diets have different effect on lipid peroxidation, cholesterol oxides and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 293–303.
207. Kumar SA, Sudhabar V, et al. Attenuation of serum lipid abnormalities and cardiac oxidative stress by eicosapentaenoate-lipoate derivative in experimental hypercholesterolemia. *Clinica Chimica Acta* 2005; 355: 197–204.
208. Sudhabar V, Kumar SA, et al. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life Sciences* 2006; 78: 1329–35.
209. Mukherjee S, Das D, Mukherjee M, et al. Synergistic effect of folic acid and B₁₂ in ameliorating arsenic induced oxidative damage in pancreatic tissue of rat. *J Nutr Biochem* 2005.
210. Li M, Chen J, Li YS, et al. Folic acid reduces adhesion molecules VCAM-1 expression in aortic of rats with hyperhomocysteinemia. *Int J Cardiol.* 2005; 106: 285–88.
211. Man S, Brouwer CB, et al. No effect of folic acid on markers of endothelial dysfunction or inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus and mild hyperhomocysteinemia. *J Med.* 2004; 62: 246–253
212. Bonna KH, Njolstad I, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006; 354.
213. Mahfouz MM, Kummerow FA. Vitamin C or Vitamin B₆ supplementation prevent the oxidative stress and decrease of prostacyclin generation in homocysteinemic rats. *Int J Biochem.* 2004; 36: 1919–1932.
214. Murugesan P, Muthusamy T, et al. Studies on the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl induced oxidative damage in leydig cells. *Free Radical Research* 2005; 39: 1259–1272.
215. Bansal AK, Bansal M, Soni G, et al. Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chemico Biological Interact.* 2005; 156: 101–111.
216. Dilliogluligil MO, Kir HM, Gulkac MD, et al. Protective effects of increasing Vitamin E and doses of cisplatin induced oxidative damage to kidney tissue in rats. *Urol Int* 2005, 75: 340–344.
217. Seven A Guzel S, Seymen O, et al. Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. *Yonsei Med J* 2004; 45: 703–710.
218. Metin G, Atukeren P, Gumustas KM; et al. The effect of vitamin E treatment on oxidative stress generated in trained rats. *Tohoku J Exp Med.* 2002; 198: 47–53.
219. Loo BVD, Laugger R, Aebischer CP, et al. Cardiovascular aging is associated with vitamin E increase. *Circulation* 2002;105:1635–1638.
220. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, et al. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 2003; 22: 18–35
221. Duvall WL. Endothelial Dysfunction and antioxidant. *The Mount Sinai J Med.* 2005; 22: 71–80.
222. Pratico D. Vitamin E: Murine studies versus clinical trials. *Ital Heart J* 2001; 2: 878–81.
223. Kaul N, Devaraj S, Jialal I. α -tocopherol and atherosclerosis. *Exp Biol Med* 2001; 226: 5–12.
224. Blumberg JB. An update: Vitamin E supplementation and heart disease. *Nutr Clin Care.* 2002; 5: 50–5.
225. Diez N, Perez R, Hurtado V, et al. Hyperhomocysteinemia induced by dietary folate restriction causes kidney oxidative stress in rats. *Br J Nutr.* 2005; 94: 204–10.