

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ

**NORMAL DİYET VE METİYONİNDEN ZENGİN DİYETLE
BESLENEN SIÇANLARDA SERUM ASİMETRİK DİMETİL
ARGİNİN (ADMA) DÜZEYLERİ ÜZERİNE VİTAMİN E,
VİTAMİN C, VİTAMİN B₆ VE FOLİK ASİDİN ETKİLERİ**

(Doktora Tezi)

Alev TUNCER

EDİRNE – 2008

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ

**NORMAL DİYET VE METİYONİNDEN ZENGİN DİYETLE
BESLENEN SIÇANLARDA SERUM ASİMETRİK DİMETİL
ARGİNİN (ADMA) DÜZEYLERİ ÜZERİNE VİTAMİN E,
VİTAMİN C, VİTAMİN B₆ VE FOLİK ASİDİN ETKİLERİ**

(Doktora Tezi)

Alev TUNCER

Destekleyen Kurum: TUBAP-725

Tez No :

EDİRNE – 2008

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ. danışmanlığında doktora öğrencisi .Alev TUNCER tarafından tez başlığı “Normal diyet ve metiyoninden zengin diyetle beslenen sıçanlarda serum asimetrik dimetil arginin (ADMA) düzeyleri üzerine vitamin E, vitamin C, vitamin B₆ ve folik asidin etkileri” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı/..../2008 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Doktora Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

İmza
Unvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Beni doktora programına kabul ederek bilgi ve becerilerimin artmasına olanak sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ'ye, doktora çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, desteğini ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ'a, bugüne kadar desteğini her zaman hissettiğim Sayın Hocam Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e, tezimin deney aşamasında bana yardımcı olan Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm asistan arkadaşlarıma,

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Her zaman yanımda olan sevgili aileme,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----|
| GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 3 |
| NORMAL ENDOTELİN YAPISI VE FONKSİYONU | 3 |
| ENDOTEL DİSFONKSİYONU | 6 |
| NİTRİK OKSİT | 10 |
| NİTRİK OKSİT ÜRETİMİ | 11 |
| ASİMETRİK DİMETİL ARGİNİN | 15 |
| ASİMETRİK DİMETİL ARGİNİN METABOLİZMASINI ETKİLEYEN İLAÇLAR... .. | 18 |
| HOMOSİSTEİN | 20 |
| HOMOSİSTEİN METABOLİZMASI | 21 |
| HOMOSİSTEİN METABOLİZMASINDA ROL OYNAYAN VİTAMİNLER | 25 |
| GEREÇ VE YÖNTEMLER | 37 |
| BULGULAR | 41 |
| TARTIŞMA..... | 49 |
| SONUÇ | 55 |
| ÖZET | 56 |
| İNGİLİZCE ÖZET | 58 |
| KAYNAKLAR..... | 60 |
| ÖZGEÇMİŞ | 70 |
| EKLER | 71 |

SİMGE ve KISALTMALAR

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| ADMA | Asimetrik dimetil arginin |
| BH₄ | Tetrahidrobiopterin |
| Ca⁺⁺ | Kalsiyum |
| CaM | Kalmodulin |
| cGMP | Siklik guanozin monofosfat |
| DDAH | Dimetilaminohidrolaz |
| DMA | Dimetil arginin |
| EDRF | Endotel kaynaklı gevşetici faktör |
| eNOS | Endotelyal nitrik oksit sentaz |
| nNOS | Nöronal nitrik oksit sentaz |
| GC | Guanilat siklaz |
| GMP | Guanozin monofosfat |
| GTP | Guanozin trifosfat |
| H₂O₂ | Hidrojen peroksit |
| Hcy | Homosistein |
| iNOS | İndüklenebilir nitrik oksit sentaz |
| LDL | Düşük dansiteli lipoprotein |
| L-NMMA | N-monometil L-arginin |
| MTHF | 5-metiltetrahidrofolat |
| Myr | Miristoylasyon |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat |
| NO | Nitrik oksit |

| | |
|-------------------------|----------------------------|
| NO⁻ | Nitroksil |
| NOS | Nitrik oksit sentaz |
| ONOO⁻ | Peroksinitrit |
| PABA | p-Aminobenzoik asit |
| PRMT | Protein arginin transferaz |
| SAH | S-adenozilmetiyonin |
| SAM | S-adenozil homosistein |
| SDMA | Simetrik dimetil arginin |

GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlıklı endotel, özellikle nitrik oksid (NO) olmak üzere çeşitli otokrin ve parakrin etkili moleküllerin sentezini ve sekresyonunu yapan, damar tonusunun ayarlanmasında rol alan, metabolik olarak aktif bir organ olarak kabul edilir (1). Endotel hücrelerinin disfonksiyonu aterosklerotik sürecin başlangıcını oluşturur ve endotel fonksiyonlarının test edilmesi pre-klinik dönemde bile damarsal patolojilerin varlığının araştırılmasında önem kazanır (2). Endotelden kaynaklanan NO, siklik guanozin monofosfat (cGMP) aracılığı ile damar tonusunu ve kan akımını ayarlar (3). Farmakolojik olarak NO inhibisyonu, endotele bağımlı vazodilatasyonu bozar ve vasküler rezistansı artırır (4). NO, L-arginin'den nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile sentez edilir; asimetrik dimetil arginin (ADMA) ve N-monometil L-arginin (L-NMMA), NOS'un endojen inhibitörleridir (5). İlk kez 1992 yılında ADMA'nın endojen olarak endotele bağımlı vazodilatasyonu azalttığı gösterilmiştir (6). Bunu takiben yapılan çalışmalarda ADMA'nın vasküler hastalıklarda arttığı ve muhtemelen vasküler hastalıkların oluşumunda bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmüştür (7-10).

Endotelial disfonksiyonun gelişiminde reaktif oksijen türevlerinin (serbest radikaller) önemli etkileri gösterilmiştir. Metiyoninden zengin diyetle beslenen sıçanlarda serum homosistein düzeyleri yükselmekte ve buna bağlı olarak serum ADMA düzeyleri dolaylı yoldan arttığı bildirilmektedir (11). Oksidatif stresi azaltan tedavi girişimlerinin endotel disfonksiyonunun düzelttiği gösterilmiştir. Özellikle vitamin E ve vitamin C'nin önemli antioksidan özellikleri olduğu ve bozulmuş endotel fonksiyonlarını düzelttiği bildirilmiştir (12). Günümüze kadar yapılan çalışmaların

verileri, antioksidan faktörlerin endotel disfonksiyonunu düzeltici etkilerinin büyük oranda serbest radikalleri azaltmasına bağılı olarak ortaya çıktığına işaret etmektedir. Ancak antioksidanların, NO sentezini inhibe eden ADMA moleküllerinin plazma düzeylerini etkileyip etkilemediğı hakkında henüz yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Biz de çalışmamızda vitamin E, vitamin C, folik asit ve B₆ vitamininin normal diyet ve metiyoninden zengin diyetle beslenen sıçanlarda serum ADMA düzeylerini etkileyip etkilemediğini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

NORMAL ENDOTELİN YAPISI VE FONKSİYONU

Endotel hücreleri, uzun yıllar yalnızca kan ve damar düz kası arasında yarı geçirgen ve damar duvarını koruyucu bir bariyer olarak düşünülmüştür (13).

1976'da Moncada ve ark. endotel kaynaklı etkin vazodilatör ve antiagregan özellikleri olan prostasiklini keşfetmişlerdir. Dört yıl sonra Furchgott ve Zawadzki asetilkolinin yalnızca sağlam endotelli arterlerde vazodilatasyon yaptığını ve "Endotel kaynaklı gevşetici faktör" (*Endothelial derived relaxant factor*, EDRF) diye isimlendirdikleri bir faktörün burada rol oynadığını söylemişlerdir. Daha sonra 1987'de Moncada ve ark. tarafından bu maddenin nitrik oksit (NO) olduğu gösterilmiştir. Kısa sürede bu gevşetici faktörün (EDRF-NO) bilinen en güçlü vazodilatörlerden biri ve periferik vasküler direncin önemli denetleyicisi olduğu anlaşılmıştır (14).

Endotel tüm damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir skuamoz epitel tabakasıdır. Vazodilatör ve vazokonstriktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan bir endokrin organdır. Dinamik bir doku olan endotel, vazoaktif maddelerin sekresyonunda ve düzenlenmesinde, vasküler düz kasların kontraksiyon ve gevşemesinde, koagülasyonun düzenlenmesinde, lökosit adezyonunda, solid ve sıvı maddelerin transvasküler diffüzyonunda bir bariyer olarak görev alır. Endotel, kan hücrelerinin adezyonunu inhibe ederek, damarları dilate ederek ve vasküler düz kas proliferasyonunu inhibe ederek vasküler koruyucu etki gösteren, yaklaşık 1800 gr

ağırlığında, vücuttaki en büyük endokrin organ olup total endotel hücre sayısı 1 trilyondur (15,16).

Vasküler homeostazın ana düzenleyicisi olan endotel, vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon, düz kas hücre proliferasyonu ile migrasyonunun inhibisyonu ve stimülasyonu, trombogenez ve fibrinoliz arasındaki dengeyi sağlar (17,18).

Normal endotel kan akımına karşı hem trombozezistan bir yüzey görevi görürken, hem de kan ve damar duvarı arasında makromoleküler bir bariyer görevi yapar. Endotel hücreleri morfolojik yapıları ve stratejik anatomik pozisyonları dolayısı ile vasküler düz kas hücreleri ile kan dolaşımının komponentleri arasında (trombosit, monosit, enzimler, hormonlar v.b) selektif geçirgen (permeable) bir bariyer oluşturur (16). Bunun için endotel hücrelerinin luminal yüzeyi dolaşım için nonadheziv bir yapıda olmalıdır. Bu görevi yanında endotel hücrelerinin damar tonusunun düzenlenmesi, koagülasyon, hücre büyümesi ve ölümü, lökosit migrasyonu gibi çeşitli olaylarda rol oynar (19).

Endotel Hücrelerinin Fonksiyonları (16)

1. Dolaşım ve damar duvarı arasında selektif geçirgen bir bariyer oluştururlar.
2. Dolaşımda nontrombojenik bir yüzey vazifesi görürler.
3. Çeşitli vazoaktif maddeler üretirler.
4. Damar düz kas hücresi proliferasyon ve migrasyonunu düzenlerler.
5. Koagülasyon ve fibrinolitik olaylarda modülatör rol oynarlar.
6. İnflamatuar ve immünolojik olaylarda rol oynarlar.
7. Metabolik aktiviteleri vardır (lipid oksidasyonundaki rolü).

Vasküler tonusun sağlanması, tablo 1’de de görüldüğü gibi birçok dilatör ve konstriktör maddenin salınmasıyla düzenlenir. Endotelden salınan major vazodilatör, önceden endotel kökenli gevşetici faktör (EDRF) olarak bilinen nitrik oksit (NO). Diğer endotel kaynaklı vazodilatörler; prostasiklin ve bradikinindir (20), (Tablo 1).

Endotel, bilinen en güçlü vazokonstriktör olan, endotelin ve angiotensin II (AT II) gibi vazokonstriktör maddeleri de üretir (21).

Tablo 1. Endotel hücrelerinden salgılanan maddeler (16).

| | |
|--|---|
| 1- Vazokonstriktörler -Angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) -Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3) -Angiotensin II -Tromboksan A2 -Asetilkolin, araşidonik asit, PGH ₂ , trombin, nikotin | 4- Büyüme modülatör / mediyatörleri a) Büyüme uyarıcıları -PDGF -Basic FGF -IGF-1 -IL-1 -Endotelin -A-II b) Büyüme inhibitörleri -Heparin sülfat -TGF β -NO -Bradikinin -Prostasiklin |
| 2- Vazodilatörler -Nitrikoksit (NO=EDRF) -Adrenomedüllin -Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörler -Prostasiklin (PGI ₂) -Bradikinin, asetilkolin, serotonin, histamin, P maddesi | 5- İnflamatuvar mediyatörler -Adezyon molekülleri; Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM) -İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM) -Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM) -Antijenler ; Major histokompatibilite kompleks 2 (MHCII) |
| 3- Antitrombotik (homeostaz) maddeler -Trombomodülin -Plazminojen aktivatör inhibitör tip I (PAI-1) | 6-Redoksisite |

Endotelden salınan maddeler dışında, damar içerisindeki akım hızı ve basıncı da düz kas tonüsünü etkilemektedir. Akım hızındaki artış (shear stress) iyon kanallarını (kalsiyum, potasyum ve sodyum) etkileyerek endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimini aktive eder ve endotel hücrelerinden nitrik oksit sentezini uyarır. Nitrik oksidin azalması veya kaybı öncelikle ateroskleroz için zemin hazırlamaktadır (15, 22).

Bu ilişkinin kesin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte üç teori ileri sürülmüştür:

1-Hücre membranındaki lipid içeriğinin değişimi: Hücre membranındaki bu değişikliğin sonucunda yeterli NO üretimine karşın nitrik oksidin düz kas hücrelerindeki etkisi sınırlıdır. Hiperlipidemi olgularında aşırı düşük dansiteli lipoprotein

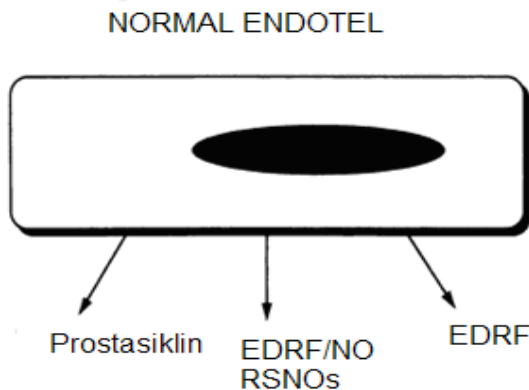
(LDL) üretimi, okside LDL oluşumunu artırarak endojen NOS enziminin yıkımına neden olmaktadır.

2-Katabolizmanın artması: Vücuttaki NO'nun yarılanma ömrü oksijene-hemoglobin ve süperoksid ile reaksiyonuna bağlıdır. Süperoksid ile NO'nun reaksiyonu sonucu peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelmektedir. Peroksinitrit düşük konsantrasyonlarda NO benzeri (vazodilatasyon, trombosit agregasyonu ve damar duvarına lökosit adezyonunu azaltmak gibi) etkiler gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermektedir (22, 23).

3-Biyoyararlanımın azalması: Büyük ve küçük koroner arterlerin tonüsü, plazmayla taşınan (epinefrin, vazopresin), trombositlerden salınan (serotonin, adenozin) veya damar adventisyasındaki sinir uçlarından açığa çıkan (norepinefrin) vazoaaktif ajanlar tarafından sağlanmaktadır. Bu faktörler ayrıca damar endoteli tarafından lokal olarak da salınabilmektedir. Endotel yüzeyinde nitrik oksidin biyoyararlanımının azalması ile, gerek dolaşımdaki gerekse lokal vazokonstriktör faktörlerin daha baskın hale gelmesi sonucu endotel kökenli vazodilatasyon bozulmakta ve ateroskleroz için zemin hazırlanmaktadır (15, 22).

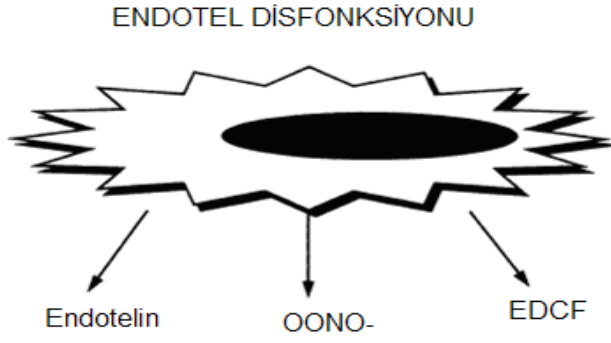
ENDOTEL DİSFONKSİYONU

Vasküler hemostazın ana göstergesi olarak endotelyum, vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon arasındaki dengeyi sağlamaktadır. Bu denge bozulduğunda endotelial disfonksiyon oluşur (20). Normal endotel ve endotel disfonksiyonundaki salgılanan maddeler şekil 1 ve şekil 2'de gösterilmiştir.



Prostasiklin=Prostaglandin I, EDRF/NO=Endotel kaynaklı gevşetici faktör/nitrik oksit, RSNOs=S-nitrosotiöl, EDHF=Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör

Şekil 1. Normal endotelden salgılanan maddeler.



EDCF=Endotel kaynaklı kasıcı faktör, OONO-=Peroksinitrit

Şekil 2. Endotel disfonksiyonundaki vazokonstriktör maddeler (24).

Endotel disfonksiyonu terimi genellikle endotel bağımlı vazodilatasyondaki bozulmayı tanımlamak için kullanılmasına rağmen lökosit, trombosit ve düzenleyici maddelerle endotel arasındaki ilişkideki anormalliklerle, normal dışı endotel aktivasyonuna yol açan durumları da kapsar (2).

Endotelial disfonksiyonda ilk görülen, NO aracılığı ile olan endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasıdır. NO üretimi veya aktivitesindeki bozukluğun endotelial disfonksiyonun ana mekanizması olduğu ve ateroskleroza tetiklediği öne sürülmektedir (20).

Vasküler biyologlar arasındaki fikir birliği, endotelin hasarlanması sonucu meydana gelen disfonksiyonun, aterosklerozun başlangıç lezyonu olduğudur (25). Sağlıklı endotel, kardiyovasküler sistemin kontrolünde anahtar rol oynar. Koroner iskemik durumlarda önemli rol oynar. Endotel disfonksiyonunu ilk defa Ludmer ve arkadaşları insan koroner arterlerinde göstermişlerdir (2).

Sağlıklı endotelde, asetilkolin, endotel bağımlı NO aracılığı ile vazodilatasyon meydana getirir. Ancak, sağlıklı endotelde NO'nun etkisi azalmıştır ve karşılıksız muskarinik düz kas hücrelerinin aktivasyonu vazokonstriksiyona yol açar. Ateroskleroz, ayrıca asetilkolinin indüklediği koroner kan akım artışını da bozar. Aterosklerozda disfonksiyonun bir nedeni de azalmış NOS aktivitesidir (2).

Tablo 2. Endotel disfonksiyonuyla ilgili hastalıklar.

| | |
|-------------------------------|--|
| Ateroskleroz | Tip I ve Tip II diyabet |
| Hiperkolesterolemi | Hiperglisemi |
| Düşük HDL kolesterol | Akut postprandial hiperglisemi |
| Yüksek Lpa | Aktif-pasif sigara içiciliği |
| Küçük yoğun LDL | Dilate kardiyomyopati |
| Hipertansiyon | Chagas hastalığı |
| Hiperhomosisteinemi | Koroner arter hastalığı için aile öyküsü |
| Yaşlanma | Post menopozal kadınlar |
| Vaskülitler | Kawasaki hastalığı |
| Transplantasyon ateroskleroza | Gebeliğin indüklediği hipertansiyon |
| Sendrom X | Preeklampsi |
| Varyant angina | Pulmoner hipertansiyon |
| İnsülin rezistansı | Metiyonin yüklemesi |

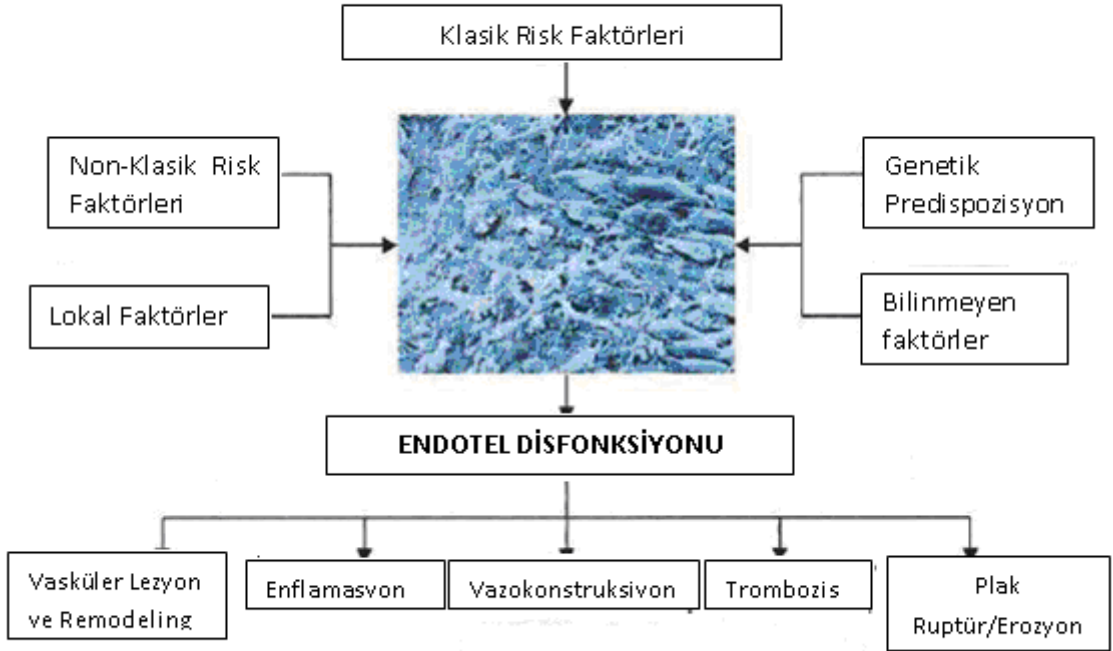
Endotel disfonksiyonu sistemik bir hastalıktır ve ateroskleroz oluşumunu hızlandırır. Endotel disfonksiyonunun aracılık ettiği sistemik hastalıklar tablo 2'de gösterilmiştir (2).

-Oksidatif stres endotel fonksiyonunun değişmesinde önemli rol oynamaktadır. Düşük molekül ağırlıklı lipoproteinlerin (LDL) oksidatif değişikliğinin aterosklerozun gelişiminde merkezi rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca son çalışmalarda, okside LDL'nin anormal endotel damar gevşemesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (2). Okside LDL'nin endotel fonksiyonu üzerine zararlı etkileri lizofosfatidilkolin, protein kinaz C ve G proteinleri ile hafifletilebilir (2, 26).

Ek olarak, serbest oksijen radikalleri, NO'nun direk inaktivasyonu ile endotel fonksiyonlarını zayıflatır. Okside LDL hücre kültürleri ve sağlam kan damarlarında endotelin üretimini de artırır (2).

-Tetrahidrobiopterin NOS'un kofaktörüdür ve L-argininin NO'ya dönüştürülmesinde hız sınırlayıcı basamaktır. Tetrahidrobiopterinin rölatif yokluğu, bazı durumlarda endotel disfonksiyonuna katkıda bulunabilir (27).

-Hiperkolesterolemi, vasküler hemostazda NO aktivitesinin azalması, süperoksit oluşumunun, endotelin immünoreaktivitesinin, adezyon moleküllerinin artması ve endotel bağımlı vazodilatasyonun zayıflamasını içeren bir takım değişikliklere neden olabilir (2).



Şekil 3. Endotel disfonksiyonu: Tüm risk faktörlerinin ortak noktası (32).

-Diabetes mellitus ve hipertansiyonun beraberliği monosit adezyonuna ilave katkı sağlamaktadır (28).

-Kolesterolün uyardığı endotel disfonksiyonu, LDL oksidasyonunun derecesi ile ilişkilidir (29).

-Serbest yağ asitlerinin ve trigliseridlerin hızla yükselmesi, birkaç saat için vazodilatör yanıtı zayıflatır (2).

-Akut hiperglisemi (6 saatte) vazomotor yanıtı zayıflatır (30).

-Kadınlarda postmenopozal durum, aynı yaştaki erkeklerden daha belirgin bir düzeyde endotel fonksiyonlarında azalmaya neden olmaktadır. Vücuttaki östrojen azlığının endotele bağımlı vazodilatasyonda azalma ile ilişkili olduğu ve östrojen tedavisi ile bu durumun düzeldiği gösterilmiştir (31).

Sonuçta; şekil 3'te de görüldüğü gibi endotel bağımlı yanıtın zayıflaması birçok kardiyak ve non-kardiyak durumun ortaya çıkmasına yol açmaktadır.

NİTRİK OKSİT

Endotelden salınan en güçlü ve önemli mediyatörlerden biri nitrik oksit (NO)'tir. İlk olarak 1980 yılında Furchgott ve Zawadzki, izole tavşan aortasında asetilkoline bağlı gevşemenin, ancak sağlam endotel hücrelerinin varlığında gerçekleşebileceğini gösterdiler. Endotele bağlı bu gevşeme endotelden salınan gevşetici faktör (EDRF) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Endotel devamlılığı bozulduğunda ise asetilkoline bağlı vazodilatasyon yetersiz kalmaktadır (22). Daha sonra 1987'de Moncada ve ark. tarafından bu maddenin nitrik oksit (NO) olduğu gösterilmiştir (14).

NO, renksiz bir gazdır. Yüksek konsantrasyondaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabil olup suda erime özelliği gösterir iken, düşük konsantrasyondaki NO oksijen varlığında dahi stabildir. Havadaki NO, kısa sürede oksijenle oksitlenerek nitrojen dioksit'e dönüşür. Nitrojen dioksit dokular için oldukça zararlı bir bileşiktir. Nitrik oksitin, üzerinde yük taşıyamaması ve çiftlenmemiş elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda NO, taşıdığı çiftlenmemiş elektron nedeniyle bir radikal molekül olarak isimlendirilebilir. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. NO, bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekül özelliği kazanmaktadır (33).

NO diğer serbest radikaller gibi çok kısa yarılanma ömrüne sahip olup, 2-30 saniye içinde daha stabil bir yapı olan nitrate oksitlenir (34). NO'un sentezi, argininden yapısı sitokrom P-450'ye benzeyen bir kan enzimi olan nitrik oksit sentaz aracılığı ile olur. NADPH, oksijen, demir, tetrahidrobioptrin, flavin adenin dinükleotid ve flavin mononükleotid varlığında nitrik oksit sentaz, arginini redüksiyondan sonra hidroksiarginine daha sonra da NO ve sitruline dönüştürür (35).

Başlıca 3 tip NOS enzimi bulunur:

- 1) Nöronlarda ve epitel hücrelerde bulunan tip I izoenzim
- 2) Değişik tip hücrelerde sitokinlerin indüksiyonu ile ortaya çıkan tip II izoenzim
- 3) Endotel hücrelerde bulunan tip III izoenzim (35).

Tablo 3. Nitrik oksit sentezleyen genler (36).

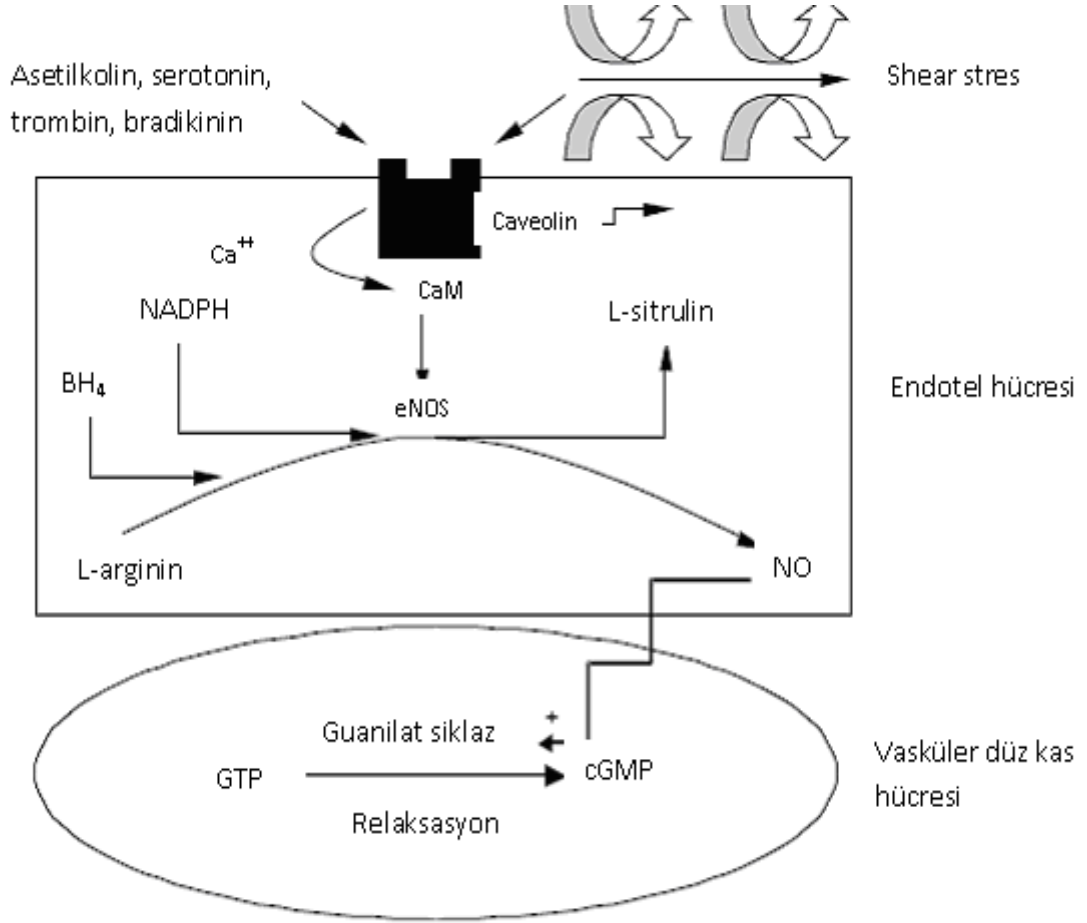
| NOS izoform | Diğer adı | Salınım | Kaynak | Regülasyon | NO miktarı | Kromozom |
|-------------|-----------|-----------------|---|--|------------------|----------|
| Tip I | nNOS | Devamlı | Sinir hücreleri | Ca ⁺⁺ a bağımlı | Düşük (pikomol) | 12 |
| Tip II | iNOS | İndüklendiğinde | Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epitelyumu | Sitokinler, endotoksin ve oksidanlar tarafından indüklenme | Yüksek (nanomol) | 17 |
| Tip III | eNOS | Devamlı | Vasküler endotel hücreleri, trombositler, miyokard ve endokard, mast hücreleri, nötrofiller | Ca ⁺⁺ a bağımlı | Yüksek (nanomol) | 17 |

NO: nitrik oksit, NOS: nitrik oksit sentezleyen enzim, nNOS: nöral NOS, iNOS: indüklenebilen NOS, eNOS: endotel kökenli NOS

Kromozom 7 (endotelyal NOS-eNOS), 12 (nöral NOS-nNOS) ve 17 (indüklenebilen NOS-iNOS) üzerinde nitrik oksit sentezleyen bu izoenzimlere özgü genler tablo 3’de gösterilmiştir. Nitrik oksit sentezleyen enzim-I ya da nNOS ve NOS-III ya da eNOS sürekli, ancak az miktarda ve kalsiyuma bağımlı olarak (enzim aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekir) salınır. Nöral dokularda NOS-I ve vasküler endotelde ise NOS-III bulunur. Solunum yolu epitelinde ve çeşitli diğer hücrelerde kalsiyuma bağımlı olmayan NOS-II ya da iNOS bulunur (36).

NİTRİK OKSİT ÜRETİMİ

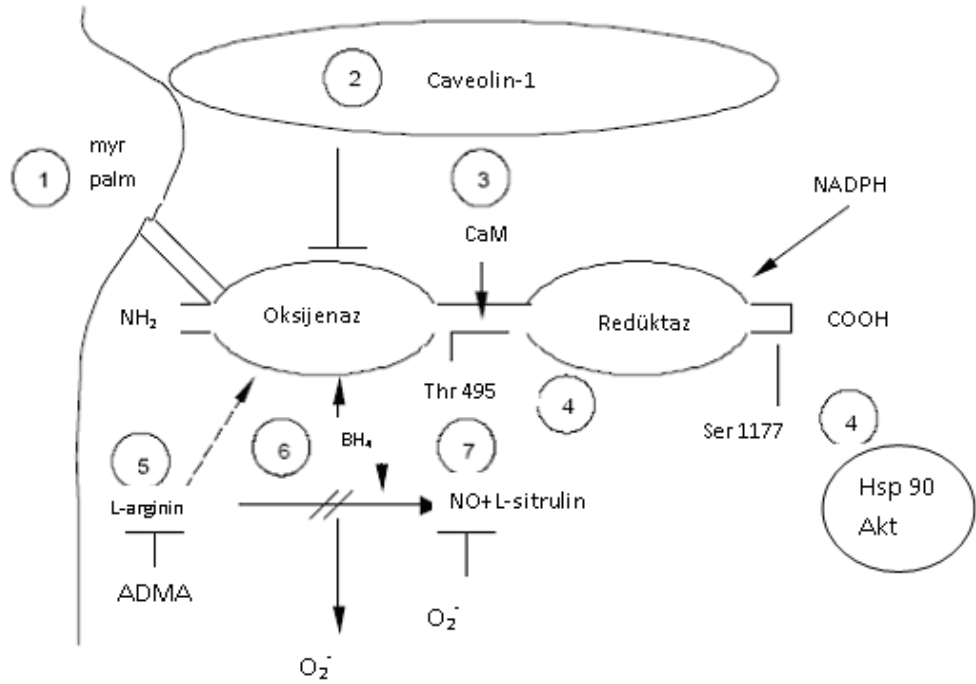
Nitrik oksit; endotel hücrelerinde caveolae’da (hücre membranındaki invajinasyonlar) lokalize endotelyal NO sentaz’ın (eNOS), enzimatik etkisiyle prekürsörü olan L-argininden sentezlenir. Kaveolin-1, kalmodulin’e bağlanır ve eNOS aktivitesini inhibe eder. Kalsiyumun (Ca⁺⁺) kalmodulin’e bağlanması kaveolin-1’i ayırır ve eNOS’u aktive ederek, NO üretimine yol açar. Tetrahidrobiopterin (BH₄) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) gibi kofaktörler de NO üretiminde rol alır (Şekil 4) (20).



NO: Nitrik oksit, eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz, BH₄: Tetrahidrobiopterin, NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, CaM: Kalmodulin, GTP: Guanozin trifosfat, cGMP: Siklik guanozin monofosfat, Ca⁺⁺: Kalsiyum

Şekil 4. Endotel hücreleri tarafından nitrik oksit üretimi.

Şekil 4'te de şematize edildiği üzere; NO, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin etkisi ile L-argininden üretilir. Bu reaksiyon tetrahidrobiopterin (BH₄) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) gibi kofaktörler kullanır. Vazodilatör agoniste veya shear stres'e yanıt olarak artan intrasellüler kalsiyum (Ca⁺⁺), kaveolin'i kalmodulin'den (CaM) ayırır; böylece eNOS uyarılmış olur. NO vasküler düz kas hücrelerine difüze olur ve guanilat siklaz (GC) enzimini aktive eder. Guanozin trifosfat c(GTP) siklik guanozin monofosfata (GMP) dönüşür ve gevşeme gerçekleşir.



Şekil 5. Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) sinyalizasyonu.

(Hsp 90: Isı şok protein 90, Thr 495: treonin 495, O₂⁻: Süperoksit, ser 1177: Serin artığı 1177, ADMA: Asimetrik dimetilarginin, myr: Miristoylasyon, palm: Palmitoylasyon)

Şekil 5’de de görüldüğü gibi eNOS, 2 globuler protein modülünden oluşmaktadır (redüktaz ve oksijenaz segmentleri), bu iki segment esnek protein yapı ile birbirine bağlanmıştır. Redüktaz segmenti, NO sentezi için NADPH’a bağlanarak dehidrojenasyonu katalize etmek için gerekli olan elektronları üretir. Elektronlar esnek protein yapıdan oksijenaz segmentine transfer edilir. Bu elektron transferi kalmodulinin (CaM), esnek protein parçasındaki spesifik bağlanma bölgesine kalsiyum aracılığıyla bağlanmasıyla aktive edilir. Oksijenaz segmenti, NO üretimi için gerekli olan katalitik merkezden oluşur ve hem’i, L-arginini, tetrahidrobiopterini (BH₄) bağlar (20).

Şekil 5’te görülmekte olan optimal NO üretiminin gerçekleşmesi için gerekli olan süreç aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1-eNOS’un kaveolae’ya (hücre membranındaki invajinasyonlar) lokalizasyonu, etkili NO sentezi için gereklidir ve miristoylasyon (myr) kotranslasyonuna gerek duyduğu gibi, eNOS’un posttranslasyonel palmitoylasyonuna da (palm) gerek duyar.

2-Kaveolae'nın major dış proteini olan kaveolin-1, eNOS ile birleşerek eNOS'un inhibisyonuna neden olabilir. Bu inhibitör bağlanmanın engellenmesi eNOS aktivasyonu için gereklidir.

3-CaM, eNOS'un temel allosterik aktivatörüdür. CaM'in spesifik bölgesine bağlanması, eNOS'un redüktaz segmentinden katalitik merkezine olan elektron transfer hızını artırır.

4-eNOS aktivitesi, serin 1177 (ser 1177) parçasının fosforilasyonu ile regüle edilir. Fosforilasyonun aktivasyonu kinaz Akt ve ısı şok proteini 90'na (Hsp 90) ihtiyaç duyar. Hsp 90, eNOS ve Akt arasında köprü vazifesi görür.

5-Substrat L-arginin'in, eNOS'un katalitik bölgesine bağlanması, kompetitif antagonisti olan asimetrik dimetil arginin (ADMA) tarafından inhibe edilir.

6-NO sentezi için BH₄ kofaktör olarak gereklidir. BH₄'ün azalması; eNOS'un ayrışmasına yol açar, bu da eNOS tarafından oluşturulan NO yerine süperoksit (O₂-) üretimiyle sonuçlanır.

7-NO düzenli bir şekilde oluşturulsa dahi devamında oluşan süperoksit anyonu tarafından inaktive edilir (özellikle yüksek oksidan stres durumlarında). *Shear stres*, eNOS ekspresyonunu artırır. Asimetrik dimetilarginin (ADMA), NO'yu inhibe eder, artmış ADMA düzeyleri de endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz ile ilişkilidir.

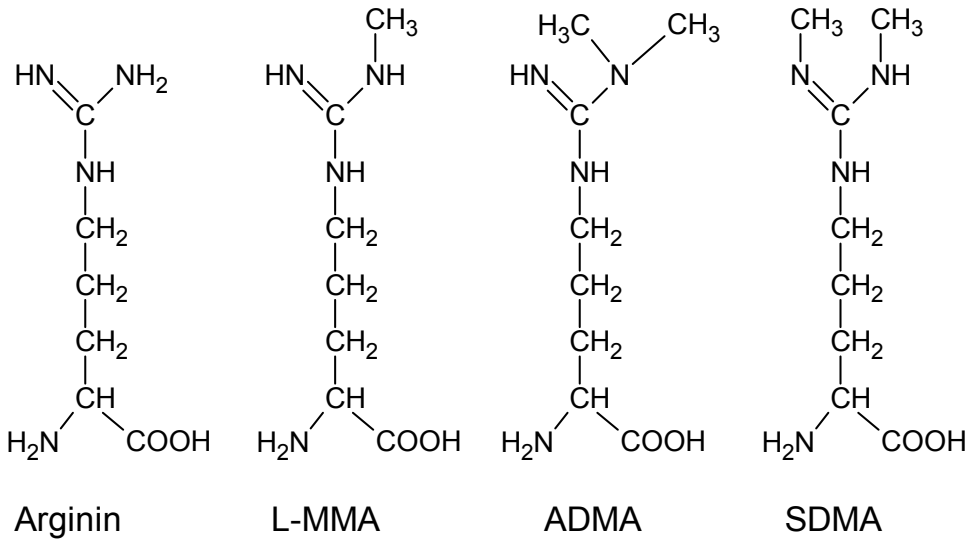
Nitrik oksit, endotel bağımlı vazodilatasyonu, AT II ve endotelin gibi endotel kaynaklı vazokonstriktörlerin etkisine karşı koyarak sağlar. Aynı zamanda trombosit agregasyonu ve adezyonu, lökosit adezyon ve infiltrasyonu ile vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. NO, LDL kolesterolün (LDL-C) oksidatif modifikasyonunu engeller (20). LDL oksidasyonu, ateroskleroz gelişiminde major mekanizma olarak düşünülmektedir (37). Bunun yanında koroner plakta, plazmanın ve makrofajların okside LDL içeriği akut koroner sendromun şiddeti ile ilişkilidir (38). NO üretimi ya da aktivitesindeki bozulma; vazokonstriksiyon, trombosit agregasyonu, düz kas hücre proliferasyonu, lökosit adezyonu ve oksidatif stres gibi aterosklerozu artıran etkilere yol açar (39). Okside LDL-C, eNOS'u inaktive ederek NO üretimini inhibe eden kaveolin-1 sentezini artırır. Oksidatif stres, LDL'den bağımsız birkaç mekanizma ile NO üretimi ve aktivitesiyle yarışır, örneğin serbest radikal süperoksit anyonları NO'yu çabucak inaktive eder ve NO sentezinde kofaktör olan BH₄'ü ortadan kaldırırlar (20).

ASİMETRİK DİMETİL ARGİNİN (ADMA)

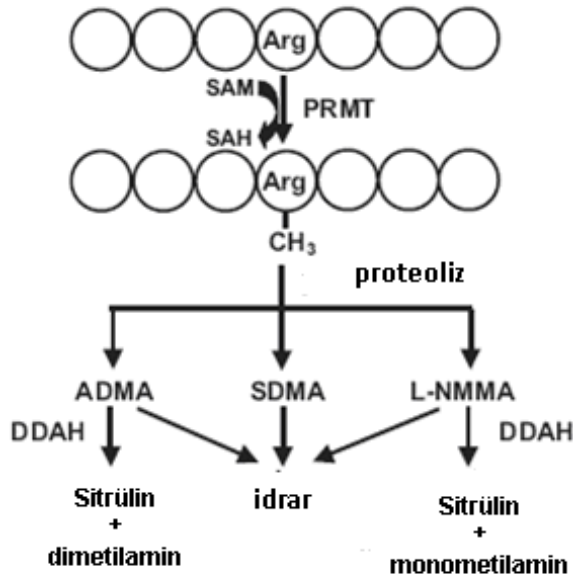
1992 yılında Vallance ve arkadaşları asimetrik dimetil arginin'i (ADMA) ilk (Şekil 6) olarak insan plazma ve idrarında NO sentazın endojen inhibitörü olarak tanımlamışlardır (40).

Arginin rezidülerinin metillenmesi esnasında PRMT (protein arginin metil transferaz) enzimi tarafından sentezlenir. ADMA'dan başka SDMA (simetrik dimetil arginin) ve L-NMMA (N-monometil L-arginin) de sentezlenir (Şekil 6 ve Şekil 7). ADMA kadar güçlü olan L-NMMA'nın (Şekil 6) plazmadaki konsantrasyonları ADMA'dan 10 kat daha düşüktür. SDMA'nın plazmadaki konsantrasyonları ADMA kadar olsa da, NOS üzerinde herhangi bir etkisi yoktur.

ADMA, SDMA ve L-NMMA'nın üçü de PRMT enzimleri tarafından sentezlenir. Bu enzim sistemi, S-adenozilmetiyoninden (SAM) bir metil grubunu S-adenozil-homosistein (SAH) oluşturmak üzere arginine transfer eder. Daha sonra da homosisteine hidrolize olur.



Şekil 6. Arginin, L-NMMA, ADMA ve SDMA'nın kimyasal yapıları.



Şekil 7. ADMA sentez ve metabolizması.

PRMT enziminin 2 tipi tanımlanmıştır. PRMT-1 (protein arginin metil transferaz-1) histon, RNA binding proteini metillerken ADMA ve L-NMMA oluşturur, oysa PRMT-2 (protein arginin metiltransferaz-2) sadece miyelin basic proteini metiller ve SDMA ve L-NMMA oluşturur. Şekil 7’de de görüldüğü gibi ADMA ve L-NMMA, DDAH (dimetil aminohidrolaz) ile sitrülün ve dimetilamin ya da monometilamine indirgenir. DDAH’ın 2 formu vardır. DDAH-1 çoğunlukla nNOS içeren dokularda, DDAH-2 ise eNOS ya da iNOS içeren dokularda bulunur. Farmakolojik olarak DDAH’ın inhibisyonu ADMA’yı artırırken NO üretimini azaltır. DDAH, endotel hücreleri, beyin, pankreas gibi birçok organda bulunurken, ADMA metabolizmasından sorumlu başlıca organlar karaciğer ve böbreklerdir.

ADMA, NOS’un üç formunun da kompetitif inhibitörüdür ve yüksek L-arginin konsantrasyonlarında geri dönüşmektedir.

ADMA düzeylerindeki artışı 4 teorik mekanizmayla açıklayabiliriz.

- PRMT tarafından artmış protein metilasyonu
- Uzamış proteoliz ve önceden oluşturulmuş metilarginin salınımı
- Bozulmuş renal atılım
- DDAH’ın bozulmuş metabolizması

PRMT regülasyonu hakkında çok az şey bilinmektedir. Gene de shear stresin PRMT ekspresyon ve aktivitesini artırdığı ve kültüre edilen endotel hücrelerinde transkripsiyon faktörü “nükleer faktör (κ -B)”ü aktive ederek ADMA üretimini stimüle ettiği bilinmektedir. Shear stres, kalp, böbrek yetmezliği, yüksek tuz içeren diyet gibi hipervolemik şartlarda ADMA düzeylerinde artışa eşlik edebilir. Artan proteoliz, endotoksemi, hipertiroidizm, musküler distrofi gibi hiperkatabolik durumlar da ADMA artışına eşlik edebilir.

ADMA birikimine öncülük eden mekanizma bozulmuş DDAH metabolizmasıdır. Birçok deneysel çalışmada ADMA birikimi azalmış DDAH aktivitesi ile birlikte bulunur. Sisteinden indirgenen sülfhidril (SH) grubu DDAH aktivitesi için önemli olup, bu enzim de oksidatif strese duyarlıdır. Oksidatif stres ayrıca, ADMA oluşumunu, endotel hücrelerinde artmış PRMT-1 ekspresyonuyla aşırı serbest oksijen türleri açığa çıkararak stimüle edebildiğini açıklamaktadır. Ayrıca DDAH, SH grubunun nitrozotillere nitrozilasyonu ile, iNOS tarafından aşırı miktarda NO üretimi olduğunda inaktive edilebilir. iNOS tarafından proinflamatuvar sitokinler oluşturulduğunda NO üretimini sınırlayabilir ve bu da ADMA'nın birikimine öncülük edebilir. DDAH aktivitesindeki artış, NO üretimini daha da artırır ki, bu da ADMA konsantrasyonunda azalmayla sonuçlanır (41).

ADMA'nın endotel disfonksiyonu için yeni bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir. ADMA, NOS'un kompetitif inhibitörüdür. Plazma ADMA düzeylerinin ateroskleroz, konjestif kalp yetmezliği v.b birçok kardiyovasküler rahatsızlıklarda yükseldiği gösterilmiştir (42).

Artmış ADMA konsantrasyonları hiperkolesterolemi, hiperhomosisteinemi, diyabet, periferik arteriyel oklüzif hastalık, hipertansiyon, koroner arter hastalığı, kronik kalp yetmezliği, preeklampsi, erektil disfonksiyon ve diğer klinik durumlarla ilişkilidir (40).

Homosisteinin ateroskleroza neden olma mekanizmaları; artmış oksidatif stres, fibrinolitik aktivite ve koagülasyonun modülasyonu, damar düz kas hücre proliferasyonu ve endotelial disfonksiyonunu kapsayabilmektedir.

Bu mekanizmalardan bazılarının, NOS'un endojen inhibitörü olan ADMA'nın neden olduğu anormal NO üretimi aracılığı ile olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda ADMA oluşumunun homosistein metabolizması ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir; bundan dolayıdır ki hiperhomosisteinemi ADMA konsantrasyonlarında artışa neden olabilmektedir. Hiperhomosisteinemi ve artmış ADMA düzeyleri arasındaki bağ,

hiperhomosisteinemi olan maymunlarda ve oral metiyonin yüklemesinden sonra insanlarda bildirilmiştir (43).

ADMA hakkında bilinenler

- NOS'un kompetitif inhibitörü.
- Protein turnover ürünü.
- DDAH tarafından metabolize edilir.
- Böbreklerden atılır.
- Doku kültüründe ve hayvan deneylerinde ekzojen ADMA verilmesi NO-oluşumunu inhibe eder.
- İnsan ön koluna intraarteriel ADMA infüzyonu, endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe eder.
- İnsanlarda ADMA infüzyonu, kardiyak output'u azaltır, sistemik vasküler direnci artırır.
- Plazma ADMA konsantrasyonu, endotelial disfonksiyon ve/veya azalmış NO-üretimi ile ilişkili hastalıklarda artar (44).

ASİMETRİK DİMETİL ARGİNİN METABOLİZMASINI ETKİLEYEN İLAÇLAR

Antioksidanlar

Oksidatif stres, aterosklerozda özellikle plazma lipoproteinlerinin oksidatif modifikasyonlarında önemli rol oynamaktadır. Bununla beraber, bugüne kadar yapılan klinik çalışmalarla akut kardiyovasküler vakalarda E ya da C vitamin supplementasyonunun durumu iyileştirme ya da kötüleştirme üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ortaya konulmuştur. Bunun yanında az sayıda klinik çalışma antioksidanların artmış oksidatif stresi olan hastalarda kardiyovasküler prognozu düzeltebileceğini belirtmiştir.

Deneysel çalışmalar, birçok antioksidanın LDL, hiperglisemi ve homosistein gibi farklı prooksidan ajanlarla DDAH aktivitesini korumasına, ADMA oluşumunun azalmasına neden olduğunu göstermektedir.

Sıçanlarda, E vitamini ile ön tedavi (100 mg/gün 5 gün süreyle) LDL enjeksiyonuyla oluşturulan ADMA düzeylerinin artışını önlemiştir.

Saran ve arkadaşları, E vitamininin (800 U/gün 8 hafta) kronik renal yetmezliği olan 8 hastada ADMA düzeyini %14 düşürdüğünü gözlemlerken, kontrol grubunda tedaviden sonra ADMA konsantrasyonları anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Renal yetmezliği olan hastalara karşılık, sağlıklı bireylerde E vitamininin herhangi bir etkisi yoktur. Kronik böbrek hastalığı olanlarda plazma SDMA düzeyleri iki kat daha fazla olmasına rağmen E vitaminiyle azaltılamamıştır.

Homosisteini Azaltan Vitaminler

Homosistein, metiyonin metabolizmasının ara ürünü olan bir aminoasittir. Artmış homosistein konsantrasyonları, ateroskleroz, Alzheimer hastalığı, intrauterin büyüme geriliği ve konjenital nöral tüp defektleri gibi birçok hastalıkla ilişkilidir. Birçok çalışma, kültüre elmiş hücrelerde homosisteinin ADMA oluşumunu stimüle ettiğini ve plazma ADMA düzeylerinin hayvanlarda ve insanlarda hiperhomosisteinemiyle arttığını göstermiştir. Homosistein plazma konsantrasyonları, homosistein metabolizmasındaki enzimlerin kofaktörleri olan folik asit, B₆ ve B₁₂ vitaminleriyle düşürülebilir. Bununla beraber son yapılan randomize çalışmalar, bu vitaminlerin homosistein düzeyini düşürmesine rağmen, akut kardiyovasküler vakaları önlemede başarısız olduklarını işaret etmektedir.

Bugüne kadar, bir hayvan, dört klinik çalışma homosistein düşürücü vitaminlerin plazma ADMA düzeyleri üzerindeki etkisine değinmiştir.

Metiyoninden zengin diyetle hiperhomosisteinematik yapılan maymunlara 6 ay (plazma homosisteinde 2.7 kat artış) folik asit (5 mg/kg), B₁₂ vitamini (4 mg/kg) ve B₆ vitamini (20 mg/kg) verilmesi plazma homosistein düzeyini düşürmüştü, fakat ADMA konsantrasyonu üzerinde hiçbir etki oluşturmamıştır.

Hiperhomosisteinemiyle birlikte periferik arteriyel okluzif hastalığı olan 27 kişiye 8 hafta folat (10 mg/kg), B₁₂ vitamini (0.2 mg/kg) ve B₆ vitamini (20 mg/gün) verilmesi, plazma homosistein düzeylerini yaklaşık %50 oranında düşürürken, ADMA ya da SDMA konsantrasyonlarında hiçbir etki oluşturmamıştır.

Çift kör, randomize bir çalışmada, hiperhomosisteinemisi olan hastalara B vitamin karışımı 6 hafta süreyle (folik asit 5 mg/gün+B₆ 50 mg/gün+B₁₂ 0.05 mg/gün+B₁ 50 mg/gün) verilmesi plazma homosisteinini yaklaşık %30 düşürürken, arginin, ADMA ya da SDMA'yı etkilememiştir.

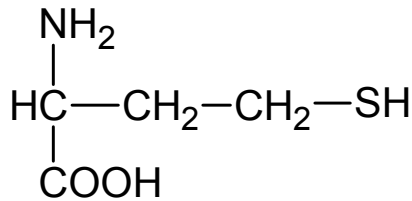
Bugüne kadar sadece bir çalışma folik asitle ADMA düzeylerinde anlamlı azalma olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada hiperhomosisteinemi olan 21 hastaya bir hafta 5 mg/gün folik asit uygulamasını takiben 37 hafta 1 mg/gün, son 14 hafta için 0.4 mg/gün uygulanmıştır (B₆ ve B₁₂ kullanılmamıştır). 6 hafta ve 12 ay sonra plazma homosistein seviyeleri yaklaşık %50 oranında düşmüştür. 6 ve 12. haftadaki ortalama plazma ADMA düzeyleri başlangıç değerine göre %70 ila 85 daha düşüktür (41).

HOMOSİSTEİN

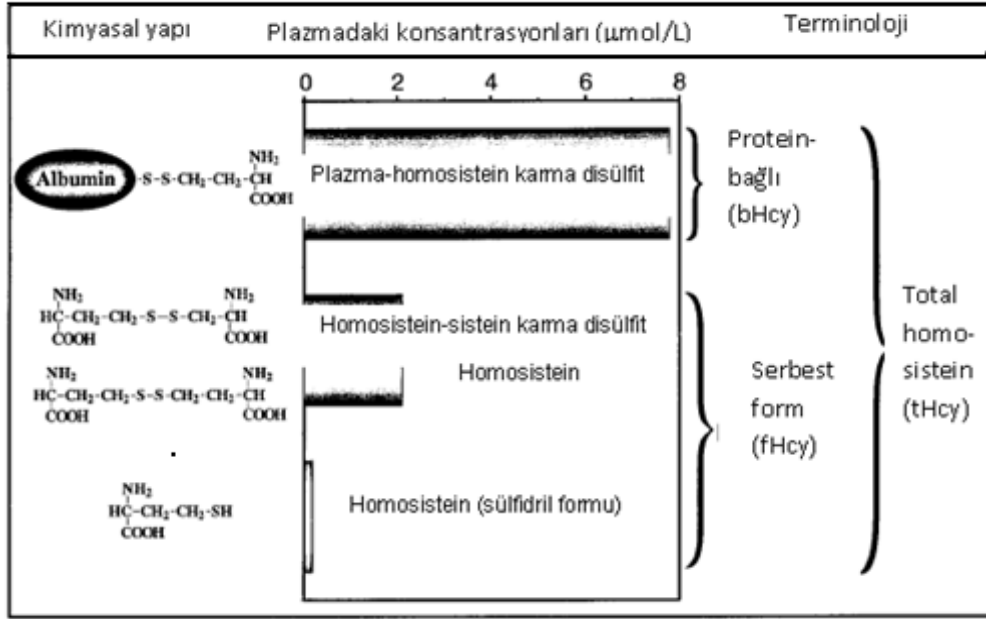
Homosistein (Hcy) ilk olarak 1932 yılında Butz ve Du Vigneaud tarafından tanımlanan sülfür içeren bir aminoasittir (Şekil 8) (45).

Serbest sülfhidril grubu taşıyan bir aminoasit olan homosistein diyetle alınmaz, proteinlerin yapısına katılmaz ve sadece metiyonin metabolizmasının bir ara ürünü olarak vücutta oluşturulur (45).

Remetilasyon yoluyla tekrar metiyonine dönüşerek ya da transsülfürasyon yoluyla sistein, metilmalonik asid ve 2-metilsitrik aside dönüşerek metabolize edilir. Homosisteinin (Hcy) plazmada bulunduğu dört formu şekil 9'da yer almaktadır: 1- %1- 2'si serbest form, 2-%70-80'i plazma proteinlerine özellikle de albumine bağlı form, 3-%20-30'u homosistein dimerleri oluşturmak üzere kendi kendisiyle bağlı form ya da 4- sistein gibi diğer tiol yapılarıyla birleşmiş homosistein-sistein karma disülfid formu (46), (Şekil 9).



Şekil 8. Homosisteinin kimyasal yapısı.

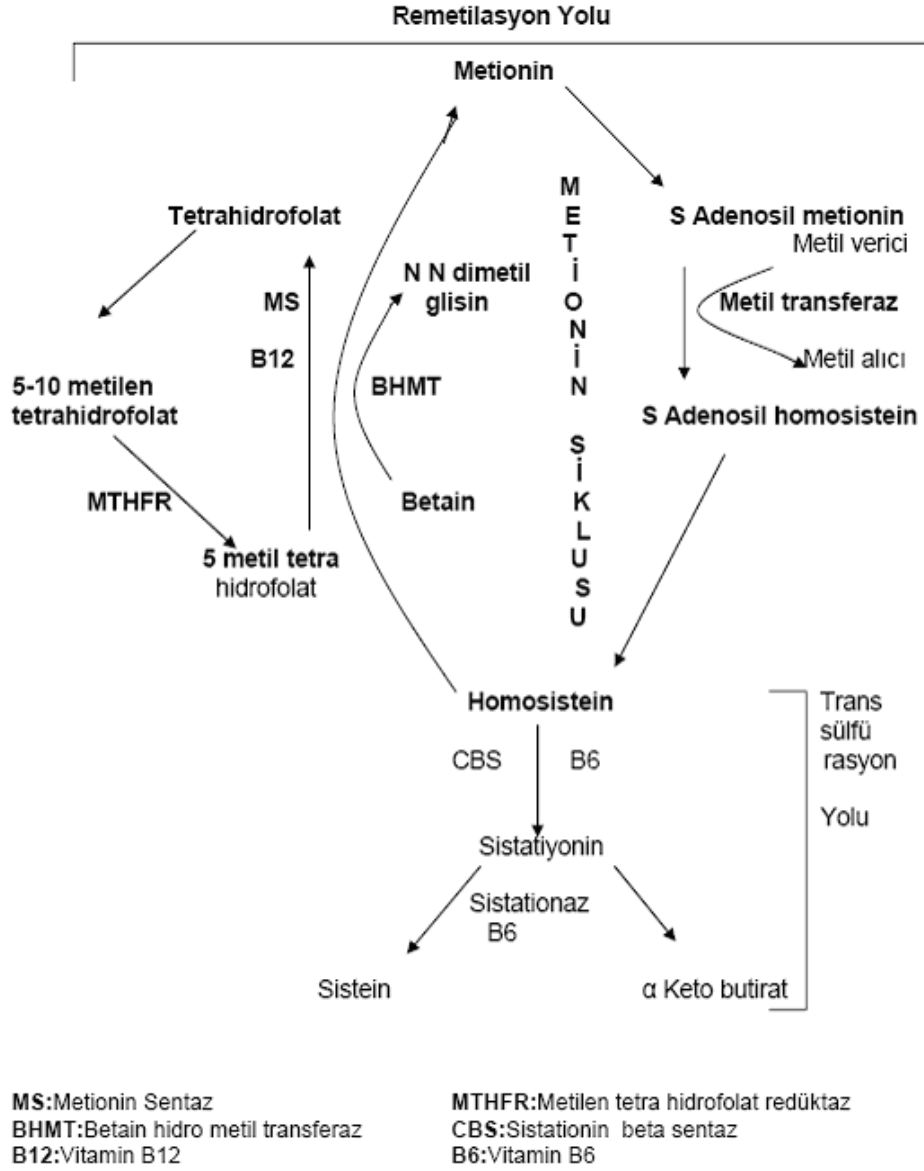


Şekil 9. Homosisteinin plazmadaki formları.

Diyetle alınan metiyonin organizmada metiyonin adenozil transferaz enziminin etkisiyle önce S-adenozil metiyonine (SAM) daha sonra da S-adenozil homosisteine (SAH) dönüşür. SAH, homosisteini oluşturmak üzere hidrolize olur. SAM, nükleik asitler, nörotransmitterler, fosfolipidler ve bazı hormonlar için metil donörüdür. Aynı zamanda SAM, homosisteinin hangi metabolik yola gireceğinin belirlenmesinde önemli bir regülatördür.

HOMOSİSTEİN METABOLİZMASI

Metiyoninin demetilasyonu ile oluşan Hcy iki farklı metabolik yola girer: Şekil 10'da remetilasyon ve transsülfürasyon yolları gösterilmiştir. **I)Remetilasyon:** Bu yolda Hcy, kofaktör olarak vitamin B₁₂ (kobalamin)'nin, substrat olarak da 5-metiltetrahidrofolatın (MTHF) kullanıldığı ve metiyonin sentaz enziminin görev yaptığı bir reaksiyonla metillenir ve metiyonine tekrar dönüşür. Bu metabolik yolun substratı olan 5-MTHF, termolabil metilentetrahidrofolat redüktaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla metilentetrahidrofolattan (diyetle alınan folattan derive edilen) sentezlenir ve dolayısıyla folik asit eksikliklerinde remetilasyon yolu için gerekli substat miktarı da azalır.



Şekil 10. Homosistein metabolizması (48).

II)Transsülfürasyon: Bu metabolik yolda Hcy, kofaktör olarak vitamin B₆'yı (piridoksin) kullanan sistationin P sentaz (CpS) enzimi aracılığıyla sistationine çevrilir. Sistationin, vitamin B₆'nın kofaktörlüğünde sistationinaz enzimi ile sistein ve α-ketobutirata çevrilir, α-ketobutirat ise 2-metilsitrik asit ve metilmalonik asite parçalanır (47).

Tablo 4. Hiperhomosisteinemi nedenleri (48).

| | |
|---|--|
| Genetik faktörler 5-10–Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) eksikliği Sistasyonin beta sentetaz eksikliği Vitamin B ₁₂ koenzim sentezi ve transport defekti Metiyonin sentetaz eksikliği Homosisteinüri | Hastalıklar Vitamin yetmezliği (folat, vitamin B ₁₂ , vitamin B ₆) Kronik böbrek yetmezliği Hipotroidizm Diabet Pseuriyazis Malignensiler (meme, over, pankreas karsinomu) |
| Fizyolojik faktörler Erkek cinsiyet Menapoz Azalmış glomeruler filtrasyon hızı Artmış kas kitlesi | İlaçlar Kolesterol düşürücüler (kolestiramin, nikotinik asit, fibrik asit) Antikonvülzanlar (fenitoin, karbamezepin) Seks hormonları (androjen) Diğerleri: Siklosporin, diüretik, L- Dopa, teofilin, trimetoprim, metotraksat, levodopa, metiyonin yüklemesi (oral, parenteral, peritonal), teofilin, trimetoprim |
| Yaşam tarzı: Fiziksel aktivite | |

Homosistein düzeyi artışının metabolik etki mekanizmalarıyla ilgili değişik görüşler vardır. Hiperhomosisteineminin nedenleri beş ana başlık altında toplanmıştır (Tablo 4).

Cook S ve arkadaşları endotelial disfonksiyon ve aterotromboz gibi vasküler etkileri, homosisteinin otooksidatif potansiyeline bağlamışlardır (49).

Homosistein, primer olarak metiyonin demetilasyonunda sentezlenir. Burada SAM (S adenzil metiyonin), SAM metiltransferazla, SAH (S adenzil homosistein)'a çevrilir. SAH ise SAH hidrolaz ile homosisteine dönüştürülür. Tyagi N. ve arkadaşlarının bulguları şunlardır: Homosistein birikimi sellüler oksidatif strese öncü

artırıcıdır; sellüler oksidatif stresi, mitokondrial tioredoksin ve peroksiredoksin düşürür, NADH oksidaz aktivitesi artırır (50).

Stamler JS. ve arkadaşları yüksek düzeydeki homosisteinin, ateroskleroz ve tromboz riskini artırmasının moleküler temelinde homosisteinin sülfhidril grubunun reaktivitesinin rolü üzerinde durmuşlardır. Vazodilatör ve antitrombosit etkili S-nitrosotioller artan sayıdaki kanıtlarca, NO ve EDRF varlığında oluşmaktadır. Bu nedenle homosisteinin S-nitrosolanmasının tirole bu yararlı aktiviteleri verdiğini ve patojenitesini durdurduğunu öne sürmüşlerdir. Endotel hücrelerinin homosisteine uzun süre (> 3 saat) tabi tutulması ile EDRF yanıtında bozulma oluşturduğunu saptadılar. Çalışma sonucuna göre normal endotel EDRF salarak homosisteinin potansiyel kötü etkilerini, kompleks S-NO-homosistein oluşturarak ayarlar. Süregen endotelial disfonksiyon, NO ile homosistein düzeyleri arasındaki süregen dengesizlik homosisteinin kötü vasküler etkilerine sebep olabilir (51).

Yine homosistein H_2O_2 (hidrojen peroksit)'i artırıp, NO'yu ise oksidatif inaktivasyona daha duyarlı hale getirerek endotelial hücrelerin H_2O_2 'yi detoksifiye etme yeteneğini azaltır (52).

Homosistein plazma ile karıştırıldığında hızla kendi kendine okside olarak homosistin, karma disülfidler ve homosistein tiolaktone dönüşür (53).

Homosistein'in kendi kendine oksidasyonu (oto-oksidasyonu) esnasında açığa çıkan superoksit ve hidrojen peroksit gibi oksijen serbest radikallerinin, hiperhomosisteineminin vasküler toksisitesinde rol aldıkları sanılmaktadır (53).

Homosistein'in oto-oksidasyonu süperoksit anyonu ve hidroksil radikalleri gibi diğer sitotoksik reaktif oksijen radikallerini de açığa çıkarır. Süperokside bağlı oluşan hidroksil radikallerinin endotel plazma membranında ve lipoprotein partiküllerinde lipid peroksidasyonunu başlattığı gösterilmiştir. Yine homosistein oto-oksidasyonunun düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu süperoksit anyon radikalleri aracılığı ile desteklediği gösterilmiştir (53).

Endotele bağlı nitrik oksit de homosistein tarafından olumsuz yönde etkilenir. Normal endotel hücreleri oksijen varlığında nitrik oksit üreterek homosisteini, Snitroso- homosisteine çevirerek non-toksik hale getirir (51).

Homosistein vasküler fonksiyonu bozarak aterosklerozda komplikasyon riskini artırır (54). Hiperhomosisteineminin ateroskleroza yol açma mekanizmalarından bir tanesi de NO yolağıdır (51). Endotelyal NO vazodilatördür ve anti-trombosit etkileri

vardır. Hiperhomosisteinemide endotel bağımlı gevşemenin bozulması NO'nun biyoyararlanımının azalması sonucunda olmaktadır. Biyoyararlanımın azalması başlıca; üretiminin azalmasından, yıkımının artmasından veya nitrozotiyol türevlerinin oluşmasından kaynaklanmaktadır. Homosisteinin NO üretimini etkilemesi bilinen bir konu olmasına rağmen mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (55).

ADMA, özellikle endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO yolağının önemli bir endojen regülatörüdür. ADMA düzeyindeki artışın, endotel disfonksiyonunun derecesi ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir ve ADMA'nın endotel disfonksiyonunun yeni bir belirteci olabileceği ileri sürülmektedir (54). ADMA, çoğunlukla endotel hücrelerde ve böbrekte bulunan dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından L-sitrüline ve dimetilamine metabolize olur. ADMA düzeyinin artmasının önemli bir nedeni DDAH fonksiyon yetersizliğidir (56, 57).

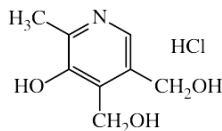
HOMOSİSTEİN METABOLİZMASINDA ROL OYNAYAN VİTAMİNLER (58)

Vitamin B₆

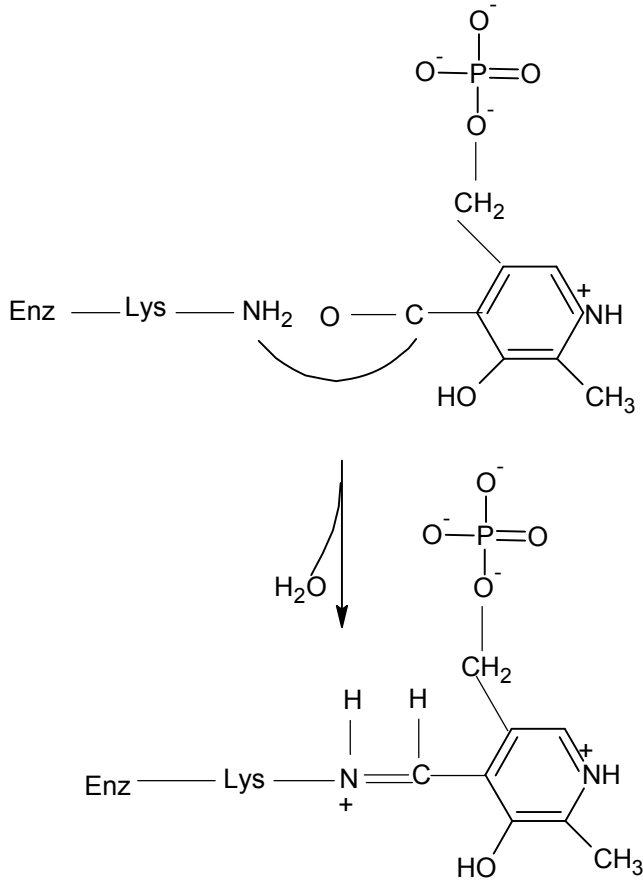
Vitamin B₆, doğal olarak oluşan piridoksol (piridoksin), piridoksamin ve piridoksalin ortak adıdır (Şekil 11).

Piridoksol ısıya dayanıklı olduğu halde piridoksamin ve piridoksal yüksek sıcaklıkta hızla yıkılırlar. Bu maddeler, ışıkta özellikle UV altında bozunurlar.

Vitamin B₆ en fazla maya, pirinç kabukları, yumurta sarısı, tahıl ve sebzelerde; daha az miktarda karaciğer, böbrek, balık ve sütte bulunur. Vitamin B₆ bağırsaklardan kolayca emilir ve sitoplazmik piridoksal kinazın katalizlediği reaksiyonda ATP tarafından fosforillenir.



Şekil 11. Vitamin B₆'ın kimyasal yapısı.



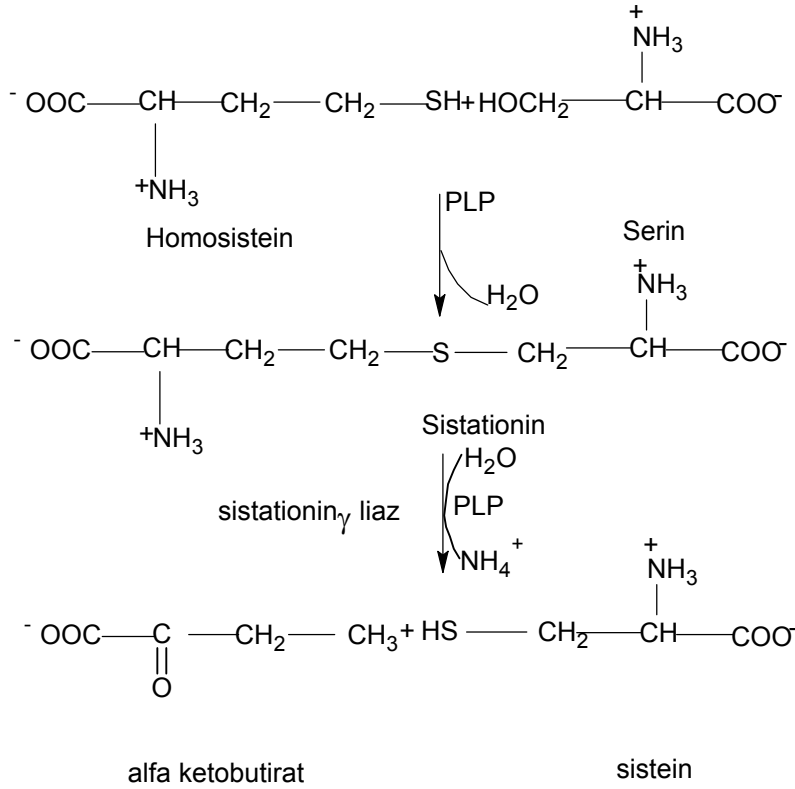
Şekil 12. Schiff bazı.

Piridoksol, piridoksal ve piridoksamin insan ve hayvan organizmasında birbirine değişebilir, dokularda fosfat esterleri halinde bulunurlar, etkili şekli piridoksal ve özellikle piridoksal fosfattır.

Piridoksal fosfat ve piridoksamin fosfat koenzim olarak aktiftirler. Koenzim piridoksal fosfat, apoenzimine Schiff bazı (-CH=N-) yoluyla ve bir tuz köprüsü yoluyla bağlanır. Substrat yokken piridoksal fosfatın 4-aldehit grubu apoenzimin lizil kalıntısı ile Schiff bazı (Şekil 12) bağlantısı içinde bulunur.

Substrat olarak bir amino asidin α-amino grubu, enzimdeki lizil kalıntısının ε-amino grubunu yerinden çıkararak yeni bir Schiff bazı oluşturur; koenzim enzime tuz köprüsü ile bağlı kalır.

Piridoksal fosfat amino asitlerin ara metabolizma reaksiyonlarında rolü olan enzim sistemlerinin kofaktörlerini oluşturur; bu enzimler, α-amino asitlerin transaminasyonu, dekarboksilasyonu ve rasemizasyon reaksiyonlarını katalize ederler.



Şekil 13. Piridoksal fosfat'ın koenzim olarak görev aldığı homosisteinden sistationin, α-ketobutirat ve sistein oluşum reaksiyonu.

Şekil 13'te görüldüğü gibi piridoksal fosfat, homosistein-sistein arasında kükürtlü grup taşınmasında ve sisteinden -SH grubunun çıkarılmasında da koenzim olarak görev alır.

Piridoksal fosfat, amino asitlerin hücreye girmesini ve hücrede toplanmasını sağlayan faktörlerden biridir.

İnsanlarda fazla miktarda alınan vitamin B₆, 4-piridoksik aside oksitlenir ve bu şekilde idrarla atılır.

İnsanlarda günlük vitamin B₆ gereksinimi 2 mg olarak tahmin edilmektedir; bağırsak kanalındaki mikroorganizmaların sentez ettiği vitamin B₆, günlük ihtiyacın bilinmeyen bir bölümünü karşılar. Vitamin B₆ amino asit metabolizması ile yakından ilgili olduğu için proteince zengin besinler vitamin B₆ gereksinimini artırır. İleri yaşlarda da vitamin B₆ gereksinimi fazladır.

Erişkin insanlarda vitamin B₆ eksikliğine bağlı olarak oluşan spesifik hastalık sendromu bilinmemektedir. Ancak tüberküloz tedavisinde kullanılan izoniazid verilmesiyle vitamin B₆ eksiklik belirtileri meydana getirilmiştir ki, bunlar, mikrositer

hipokrom anemi ve çocuklarda konvülziyonlardır. İnsanlarda ve memeli hayvanların çoğunda vitamin B₆ eksikliğinde 10 gram triptofan yüklenmesinden sonra idrarla ksantürenik asit atılması olur ve bu bileşik FeCl₃ ile koyu yeşil renkli bir kompleks oluşturur.

Sıçanlarda vitamin B₆ eksikliği, büyümenin durması, kuyrukta, kulaklarda, ağızda, pençelerde ödem ve pullanma ile birlikte seyreden dermatitis ile karakterizedir; sıçanlar gürültüye karşı çok duyarlıdırlar, epileptiform nöbetler görülür.

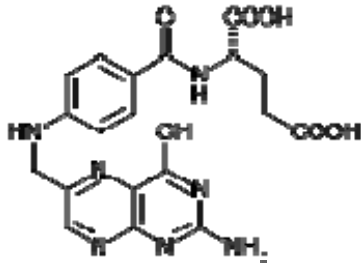
Folik Asit

Folik asit (Şekil 14), pteroilmonoglutamik asittir; pteroik asit kısmı, birbirine metilen köprüsü ile bağlı substitue bir pteridin halka sistemi ve p-aminobenzoik asitten (PABA) ibarettir.

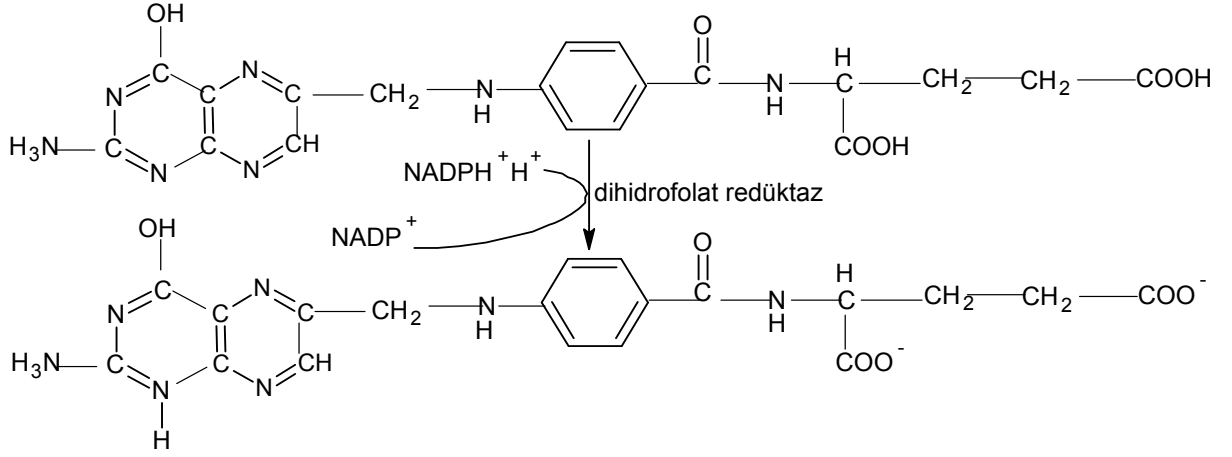
Folik asit, doğada en çok yeşil yapraklarda ve karaciğerde bulunur; pişirmekle besinlerdeki folik asidin yarısı kaybolur.

Folik asit bitkilerde γ -glutamil bağları ile bağlanmış pteroilheptaglutamat şeklinde, karaciğerde ise pteroilpentaglutamat şeklinde bulunur. Pteroilheptaglutamat ve pteroilpentaglutamat, spesifik bir grup ince bağırsak enzimi ile parçalanırlar ve folik asit, pteroilmonoglutamat şeklinde ince bağırsaktan emilir.

İnce bağırsaktan emilen folik asidin büyük kısmı bağırsak hücresi içinde 7,8-dihidrofolat (H₂-folat) üzerinden 5,6,7,8-tetrahidrofolata (H₄-folat) indirgenerek aktiflenir (Şekil 15).



Şekil 14. Folik asidin kimyasal yapısı.



Şekil 15. Tetrahidrofolik asidin kimyasal yapısı.

Tetrahidrofolik asit, metil ($-\text{CH}_3$), hidroksimetil ($-\text{CH}_2-\text{OH}$), metilen ($-\text{CH}_2-$), metenil ($-\text{CH}=\text{}$), formimino ($-\text{CH}=\text{NH}$), formil ($-\text{CHO}$) gibi tek karbon atomlu grupların bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayan enzimlerin kofaktörüdür. Tek karbon atomlu gruplar tetrahidrofolik asidin 5 veya 10 numaralı azot atomlarına (N^5 veya N^{10}) veya her ikisine ortak olarak (N^5 veya N^{10}) bağlanabilirler ve tetrahidrofolik asidin taşıdığı tek karbon atomlu gruplar enzimatik reaksiyonlarla birbirlerine dönüşebilirler.

N^5 , N^{10} - metilentetrahidrofolat, tetrahidrofolat metabolizmasında çok önemli bir rol oynar; başlıca serin ile tetrahidrofolat arasındaki reaksiyon sonucu oluşur; tetrahidrofolat için tek karbon atomlu grupların başlıca kaynağı serindir. N^5 , N^{10} - metilentetrahidrofolat, DNA sentezi için gerekli bir ön madde olan timidilat oluşması için 2ⁱ-deoksiuridilata metil grubu sağlamaktadır.

Timidilat oluşması, tetrahidrofolatın oksidasyon ile dihidrofolata dönüşmesini sağlayan tek bir karbon atomlu grup transferi reaksiyonudur.

N^5 -formiminotetrahidrofolat, tetrahidrofolata histidinin yıkılması sırasında oluşan formiminoglutamat (FİGLU) tarafından formimino grubunun transferiyle oluşur ki folik asit eksikliğinde histidinin ağızdan verilmesi durumunda N^5 -formiminotetrahidrofolat oluşamaz ve FİGLU birikimi olur. Folik asit eksikliğinin tanısı için histidin yüklemesi yapılır; folik asit eksikse biriken FİGLU idrarla atılır ve idrarda saptanır.

N^5 -metiltetrahidrofolat, genellikle tetrahidrofolata metil kaynakları olan kolin ve betainden metil transferi ile oluşur. Bu olay bağırsak hücresi içinde olmaktadır, sağlıklı insanlarda ağız yoluyla folik asit alındıktan sonra plazmada N^5 -

metiltetrahydrofolat geçici olarak artmaktadır. N⁵-metiltetrahydrofolat, vitamin B₁₂ varlığında homosisteine metil vericisi olarak davranır.

Vitamin B₁₂ ve diğer bazı faktörlerle birlikte folik asit, kan hücrelerinin yapımının düzenlenmesinde görev yapmaktadır; folik asit ve vitamin B₁₂ eksikliğinde megaloblastik anemi ortaya çıkar. N¹⁰-tetrahydrofolat, pürin sentezinde görev alır.

Folik asit bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olduğundan eksiklik haline pek rastlanmaz. Sığırlarda folik asit eksikliği, diyetle sulfonamid eklemek suretiyle, olasılıkla bağırsak bakterileri tarafından p-aminobenzoik asitten folik asit sentezinin inhibisyonu sonucu olarak kolaylıkla oluşturulabilir. Folik asit eksikliğinde pürin biyosentezi ve dolayısıyla nükleik asit biyosentezi bozulur; bu durum, kan tablosuna yansır, megaloblastik anemi, lökopeni ve trombositopeni ortaya çıkar. Folik asit eksikliğinin lökosit oluşumunu önlediğinin gözlenmesi, folik asit antagonistlerinin lösemi tedavisinde kullanılmasına yol açmıştır; aminopterin ve bunun N¹⁰-metil türevi olan ametopterin, folik asit antagonistleri olarak pürin sentezini ve dolayısıyla lösemideki lökosit proliferasyonunu önlerler.

Vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂, yapısında porfirin halka sistemine benzeyen korrin halka sistemi ve bir nükleotid bulunan kırmızı renkte ve kristalli bir bileşiktir. Vitamin B₁₂, sadece özel şartlarda izole edilebilir ve genellikle izolasyon artefaktı olarak kobalta bir siyano (-CN) grubu bağlı bulunur ki, bakteriyel fermantasyon yoluyla elde edilen doğal vitamin B₁₂, siyanokobalamin olarak bilinir. Hayvanlar ve bitkiler siyanokobalamin sentez edemezler. Normal hayvan karaciğerinde kobalamin, metilkobalamin, 5ⁱ-deoksiadenozil kobalamin ve hidroskobalamin halinde bulunur. 5ⁱ-deoksiadenozil-kobalamin, koenzim B₁₂'dir ki, bu bileşikte 5ⁱ-deoksiadenozil grubunun C-5ⁱ atomu, merkezdeki kobalt atomuna kovalent bir bağ ile bağlıdır.

Vitamin B₁₂ etkisini gösteren maddeler en çok karaciğer ve böbrekte olmak üzere et, süt, yumurta ve balıkta bulunur; bağırsak bakterileri de vitamin B₁₂ sentezleyebilirler.

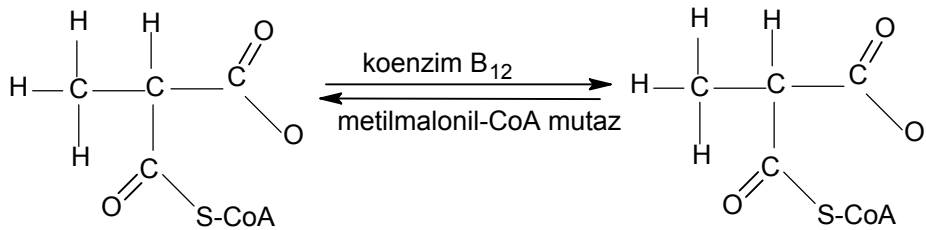
Vitamin B₁₂, ince bağırsağın ileum kısmından emilir. Vitamin B₁₂'nin emilimi için, kobalaminin mide mukozasının paryetal hücreleri tarafından salgılanan ve ileri derecede spesifik bir glikoprotein olan intrinsik faktöre bağlanmış olması gerekir. Tükürük bezleri ve mide tarafından salgılanan, R proteinleri diye bilinen proteinler asit

pH'da intrinsik faktörden 50 kat sağlam bir şekilde kobalamini bağlarlar. R proteinlerinin bağladığı kobalamin, pankreas kökenli proteazlar tarafından R proteinlerinin parçalanması suretiyle serbestleştirilir ve sonra intrinsik faktöre bağlanır. Pankreas yetmezliğinde kobalamin molekülleri normal emilim için intrinsik faktöre bağlanmak üzere R proteinlerinden serbestleşemezler ve vitamin B₁₂ emilemez. Kobalamin-intrinsik faktör kompleksi ileum mukozasını geçerken intrinsik faktör serbest bırakılır ve kobalamin, transkobalamin II denen bir taşıyıcı proteine transfer olur. Kobalamin-transkobalamin II kompleksi, spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanır ve endositoz yoluyla hücreye girer; hücre sitoplazması içinde kobalamin, hidroksikobalamin halinde serbestleşir. Transkobalamin I denen bir başka taşıyıcı protein, vitamin B₁₂'nin çoğunu sitoplazmada taşır, transkobalamin I'in karaciğerde vitamin B₁₂'yi depo etme görevi olduğu gösterilmiştir. Karaciğerde depolanan kobalamin, safra içinde salgılanır ve enterohepatik dolanıma katılır; enterohepatik dolanımın bozulduğu durumlarda eksojen kobalamin gereksinimi artar.

Vitamin B₁₂'nin metabolizma reaksiyonlarında etkili olan şekli koenzim B₁₂'dir. Şekil 16'da da görüldüğü gibi koenzim B₁₂, metiyonin biyosentezinde, metilmalonil-CoA'nın süksinil-CoA'ya dönüşümünde ve ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere indirgenmesinde rol alır.

Megaloblastik anemide gözlenen nörolojik bozukluk, nisbi bir metiyonin eksikliğine bağlı sekonder bir olay olabilir.

Mideden yeterli intrinsik faktör salgılanmadığı durumlarda vitamin B₁₂ eksikliğine bağlı pernisiyöz anemi diye tanımlanan megaloblastik anemi tablosu ortaya çıkar. Hayvansal kaynaklı besinlerle beslenmeyen insanlarda da vitamin B₁₂ eksikliği gözlenmiştir; insanlarda günlük vitamin B₁₂ ihtiyacı 2,5 µg kadardır.



Şekil 16. L-metilmalonil-CoA'nın süksinil-CoA'ya dönüşüm reaksiyonu.

Hayvanlarda doğal olarak meydana gelmiş vitamin B₁₂ eksikliği saptanmamıştır. Vitamin B₁₂ eksikliğinde domuzlarda büyümenin durduğu, ishal, kusma, hareket bozuklukları, ağız mukozasında yangı; genç tavuklarda büyümenin durduğu, yetişkin tavuklarda yumurta veriminde ve yumurtadan kuluçka çıkmasında azalma görülür.

Vitamin C (Askorbik Asit)

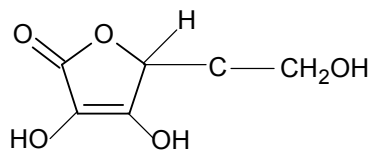
Askorbik asit, kimyasal yapı bakımından gulonik asidin endiol laktonudur (Şekil 17); suda çözünen vitaminler arasında en az stabil olanıdır, ısıya karşı özellikle dayanıksızdır.

Askorbik asit, insanlarda ve diğer primatlarda ve kobayda esansiyeldir; incelenen diğer bütün hayvanlarda ve bitkilerde D-glukozdan, glukuronik asit üzerinden sentezlenir. Askorbik asit, memelilerde karaciğerde; kuşlar, kurbağalar ve sürüngenlerde ise böbreklerde sentezlenir. Mikroorganizmalar askorbik aside gereksinim duymazlar ve sentez etmezler.

Hayvansal dokulardan böbrek üstü bezi, karaciğer ve süt en yüksek askorbik asit konsantrasyonuna sahiptir. Bitkiler aleminde en önemli askorbik asit kaynakları yeşil sebzeler, meyveler, domates, acısız bir kırmızı biber olan paprika ve turunçgillerdir.

Askorbik asit, ince bağırsaklardan kolayca emilir, hücre zarını geçmesi, olasılıkla lipide çözünebilir dehidroaskorbik asit şeklinde olur; dehidroaskorbik asit hücre içine girdikten sonra askorbik asit şekline indirgenir.

İnsanlarda kan plazmasındaki askorbik asit miktarı %1 mg kadardır; fazla miktarda askorbik asit alınmasından sonra %1,5 mg olan böbrek eşiğini aşabilir. Ağız yoluyla 9 gram askorbik asit alınmasından sonra idrarla atılan oksalik asit iki katına çıkar; askorbik asit insanda oksalata çevrilebilir ve idrarla atılan oksalatın kalsiyum tuzu böbrek taşları oluşturabilir.



Şekil 17. Vitamin C'nin kimyasal yapısı.

Askorbik asit, bazı oksidoredüksiyon olaylarında kosubstrat olarak görev alır; tirozin metabolizmasında dopaminden noradrenalin sentezi, tirozin metabolizmasında p-hidroksi fenil pirüvatın homogentizata oksidasyonu ve homogentizatin maleoylasetoasetata oksidasyonu, karnitin biyosentezi, kolesterolden primer safra asitlerinin sentezi, kollajen sentezinde prolinin hidrosilasyonu, folik asidin H₄-folata enzimatik indirgenmesi olaylarında etkilidir.

Askorbik asit, demirin ince bağırsaklardan emilimini ve depolardan mobilizasyonunu artırır; glukozdan glikojen oluşumunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir; antienfeksiyöz etkisinden de söz edilmektedir.

İnsanlarda günlük askorbik asit gereksiniminin 30-40 mg olduğu kabul edilir; süt çocuklarında 30 mg yetişkinlerde 70 mg olduğunu kabul edenler de vardır. Gebelik ve laktasyon sırasında, stres ve ateş hallerinde askorbik asit gereksinimi artar.

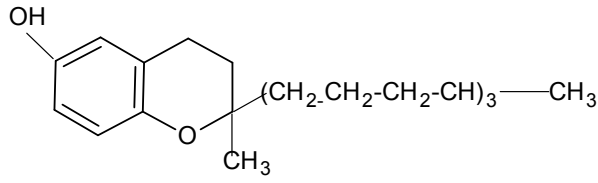
Askorbik asit eksikliğinde insanlarda skorbüt hastalığı meydana gelir. Skorbüt hastalığında, kolajen metabolizması bozukluğuna bağlı olarak kemik yapımı ve büyümesinde değişiklikler; subperiosteal kanamalar; dişlerin gevşemesi ve düşmesi; deride sertlik ve çatlaklar görülür. Gizli askorbik asit eksikliğinin belirtileri, ilkbahar yorgunluğu, enfeksiyonlara yakalanma riskinin artmasıdır. Vitamin C eksikliğinde sekonder bir H₄-folat eksikliği de gelişebilir.

Kronik olarak aşırı derecede yüksek doz Vitamin C alınması, kalsiyum oksalat taşları oluşmasına ve gastrointestinal kanaldan diğer vitaminlerin ve ilaçların emilmesinin engellenmesine neden olabilir.

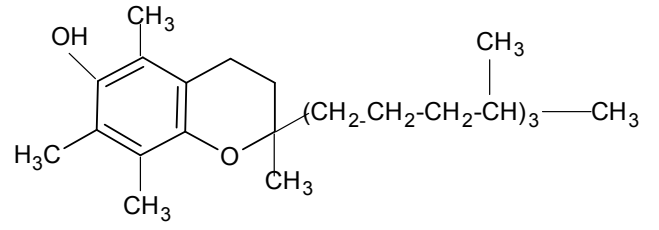
Askorbik asit eksikliği olan hayvanlar iştahlarını kaybederler, eklemleri şişer ve duyarlılık kazanır; arka ayaklarını uzatarak yatarlar.

Vitamin E

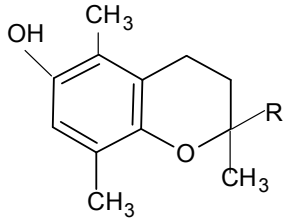
Vitamin E, doğal olarak oluşan yedi tokoferolü ifade eden jenerik bir isimdir. Tokoferoller, tokol çekirdeğinden türemişlerdir; aralarındaki farklılık, tokol çekirdeğinin farklı yerlerine farklı sayıda metil grubu eklenmiş olmasından ileri gelmektedir (Şekil 18).



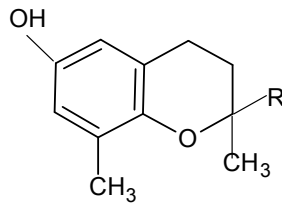
Tokol



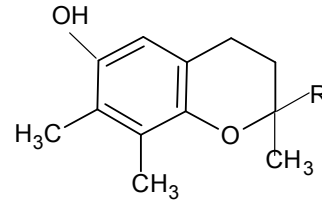
α tokoferol



β tokoferol



δ tokoferol

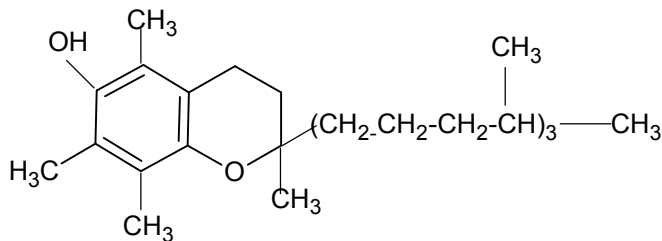


γ tokoferol

Şekil 18. Tokol, α -tokoferol, β -tokoferol, δ -tokoferol ve γ -tokoferolün kimyasal yapıları.

Tokoferoller sarımsı yağlardır; suda çözünmezler, yağda çözünürler; oksitlenmeye karşı duyarlıdırlar; oksijensiz ısıya 200°C'ye kadar dayanırlar; UV ışıkta yıkılırlar.

Çeşitli tokoferollerin biyolojik etkinlikleri arasında farklar vardır. Bir vitamin olarak doğada en yaygın şekilde dağılmış bulunan ve en büyük biyolojik aktiviteye sahip olan tokoferol, α -tokoferoldür (Şekil 19).



Şekil 19. α -tokoferolün kimyasal yapısı.

α -tokoferol, bitkilerde olasılıkla mevalonik asit üzerinden sentez edilir; özellikle çimlenmekte olan tahıl tohumu tokoferol bakımından zengindir.

Tokoferoller, yağda çözünen vitaminler olarak lipidlerle birlikte dışarıdan besinlerle alınırlar. α -tokoferol ince bağırsaktan kolayca emilir; olasılıkla şilomikronlar içinde karaciğere ve buradan periferik dokulara lipoproteinler içinde taşınır. Mitokondri fosfolipidleri, endoplazmik retikulum ve plazma membranı α -tokoferole karşı spesifik afiniteye sahiptir; vitamin E, buralarda konsantre olarak depolanır.

Vitamin E'nin en az iki metabolik rolü vardır; doğanın en güçlü yağda çözünen antioksidanı olarak hareket etmek ve selenyum metabolizmasında spesifik fakat tam olarak anlaşılmamış bir rol oynamaktadır.

Vitamin E, vitamin A'yı, karotenleri, doymamış yağ asitlerini ve tiyol gruplarını oksitlenmeye karşı korur. Vitamin E, sellüler ve subsellüler membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturuyor gibi gözükmemektedir; tokoferoller, fenolik bir hidrojeni, peroksidasyona uğramış bir poliansatüre yağ asitlerindeki serbest peroksit radikaline aktarabilmelerinin sonucu olarak serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırarak antioksidan bir davranış ortaya koymaktadırlar.

Yeterli miktarda vitamin E varlığında bile oluşan peroksitler, selenyum gerektiren glutatyon peroksidaz tarafından yok edilirler.

Vitamin E, en azından deney hayvanlarında selenyumun vücuttan kaybını önleyerek veya onu aktif bir şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır. Selenyum, normal pankreas fonksiyonu ve dolayısıyla vitamin E dahil lipidlerin sindirilmesi ve emilimi için gereklidir; glutatyon peroksidazın bir komponenti olarak peroksitlerin yok edilmesine yardım eder ve dolayısıyla lipid membranların poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonunu azaltır; bilinmeyen bir yolla vitamin E'nin plazma lipoproteinleri içinde tutulmasına yardım eder.

Günlük vitamin E gereksinimi vücut ağırlığının kg'ı başına yetişkinler için 0,1-0,2 mg ve süt emen çocuklar için 0,5 mg kadardır. İnsanlarda vitamin E eksikliğinin belirtileri, kreatinüri, kas güçsüzlüğü ve dayanıksız eritrositlerdir.

Bütün hayvanlar, günde yedikleri yemin kuru maddesinin kilosu başına 20-30 mg vitamin E'ye ihtiyaç gösterirler. Taze ve kurutulmuş tırfıl (yabani yonca), çayır otu önemli vitamin E kaynaklarıdır.

Laboratuvar hayvanlarında vitamin E eksikliği belirtileri oldukça değişiklik gösterir. Vitamin E eksikliğinin sıçanlarda görölen klasik belirtisi infertilitedir. Protein ve vitamin E'den yoksun doymamış yağ asidinden zengin diyetle beslenen sıçanlarda akut karaciğer nekrozu meydana gelir. Vitamin E eksikliği sıçanlarda arka bacakların ilerleyen felci, kas kreatin konsantrasyonunda düşme, kreatinüri, kreatinin atılmasında hafif azalma ile birlikte seyreden muskuler distrofi meydana getirir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deneylerde Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminden temin edilen 200-300 g ağırlığında 100 adet iki aylık erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı.

Çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (11.08.2005/10/6).

Deney süresinde genel durumu bozulan sıçanlar çalışma dışı bırakılmıştır.

Deney Protokolü

100 sıçan, 10 ayrı gruba ayrılarak her grupta 10 hayvan bulunacak şekilde dağıtılmak suretiyle çalışma planlandı. 4 hafta süre ile ilk 5 gruba normal diyet ve su verilirken, diğer 5 gruptaki hayvanlara normal diyet yanında içme suları aracılığı ile metiyonin yüklemesi yapıldı.

Her 100 mL içme suyuna 1,25 g metiyonin denk gelecek şekilde hayvanların metiyonini içme sularından almaları sağlandı. Ağırlık ölçümleri, çalışmanın 1. gününde ve 4. haftanın sonunda yapıldı.

Çalışmanın son haftasında 1 hafta süre ile gruplara aşağıdaki tedaviler uygulandı:

| Grup No | Metiyonin Yüklemesi | Uygulanan Tedavi | |
|----------|---------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | | Tedavi | Dozaj |
| 1. grup | Yok | serum fizyolojik | 0,1 ml/100 g vücut ağırlığı |
| 2. grup | Yok | vitamin E | 2 mg/kg/gün, i.p. |
| 3. grup | Yok | vitamin C | 250 mg/kg/gün, i.p. |
| 4. grup | Yok | B ₆ vitamini | 5 mg/kg/gün, i.p. |
| 5. grup | Yok | folik asit | 4 mg/kg/gün,i.p. |
| 6. grup | Var | serum fizyolojik | 0,1 ml/100 g vücut ağırlığı |
| 7. grup | Var | vitamin E | 2 mg/kg/gün, i.p. |
| 8. grup | Var | vitamin C | 250 mg/kg/gün, i.p. |
| 9. grup | Var | B ₆ vitamini | 5 mg/kg/gün, i.p. |
| 10. grup | Var | folik asit | 4 mg/kg/gün,i.p. |

4 haftanın sonunda sıçanlar ketamin (100 mg/kg, i.p.) + ksilazin (10 mg/kg, i.p.) ile anesteziye edildi, intrakardiyak yolla kan alındıktan sonra servikal dislokasyon yapıldı.

Intrakardiyak yolla sıçanlardan alınan kanlar EDTA'lı tüplere konulduktan sonra, EDTA'lı tüp içine alınan kan buzda soğutulularak hemen santrifüj (10 dak. 3000 g) edildi, plazma eppendorf tüplerine (en az 2 ayrı tüp içine) konuldu ve analizler yapılan dek -80 °C sıcaklıkta saklandı.

İstatistiksel Analiz: Analizler Graphpad Prism programında yapıldı. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü ANOVA ; post hoc analizler Bonferroni testi ile yapıldı. p<0.05 anlamlı kabul edildi.

HPLC yöntemi ile ADMA ölçümleri (59)

Ekipman: ADMA düzeyleri Waters Alliance 2690 XE Separation Module ve Model 474 fluorescence dedektör ve Millennium 32 Software kullanılarak ölçüldü. Örnekler solid faz ekstraksiyonu (20 kolon kapasiteli vakum manifoldlu SPE, Waters) uygulandı.

Standart Çözeltiler: Arginin, homoarjinin, ADMA ve simetrik dimetil arginin (SDMA)'in 1 mM'lık stok çözeltileri 10 mM HCl solüsyonu içinde hazırlanarak, bu stok çözeltilerden 10 mM HCl içinde 100 µM arginin ve 10 µM homoarginin, ADMA ve SDMA içeren bir kombine çalışma standardı oluşturuldu. 1mM'lık bir monometil arginin (MMA) internal standart stok çözeltisi 10 mM HCl içinde hazırlanarak, 40

μM 'lık bir *çalışma çözeltisi* internal standart'tan PBS (10 mM sodyum fosfat, 140 mM NaCl, pH 7.0) ile dilüe edilerek elde edildi.

Derivatizasyon Reageni: 10 mg orto-ftaldialdehid (OPA) 0.2 ml metanol içinde çözüldürülüp, 1.8 ml 200 mM potasyum borat tampon (pH 9.5) ve 10 μl 3-merkaptopropionik asit eklenerek bir stok çözelti oluşturuldu. Derivatizasyondan kısa bir süre önce stok çözelti borat tamponla 5 kez dilüe edilerek bir miktar *çalışma çözeltisi* hazırlandı.

Örneğin Temizlenmesi ve Derivatizasyon: Santrifüj (3000g x10 dakika) ile elde edilen serum örnekleri ve standartlara SPE uygulandı. Rutin protokol, 0.2 ml örnek veya standart 0.1 ml internal standart ve 0.7 ml PBS ile karıştırılarak, ön koşullama yapılmaksızın Oasis MCX SPE kolonları kullanımı şeklindeydi. Tüm yıkama ve elution basamakları vakumlama ile gerçekleştirildi. Örneklerin uygulanmasından sonra kolonlar sırayla 0.1 ml, 100 mM HCl ve 1.0 ml metanol ile yıkandı. Analitler 3.0 ml'lik tüplere, 1.0 ml konsantre amonyak/su/metanol (10/40/50) ile elüe edildi. Solvent 60-80 °C'de nitrojen ile uçurulup, kalan, 0.1 ml suda çözüldürülüp; 0.1 ml OPA reageni eklenerek ve karıştırılıp otosampler viyallere aktarıldı. Kromatografide örnek kompartmanı 7 °C'ye ayarlandı.

Kromatografi: Kromatografi Symmetry C18 kolon (3.9x150 mm; 5 μm partikül büyüklüğü; 100 Å pore büyüklüğü) ve 3.9x20 mm Sentry Symmetry C18 guard kolon üzerinde alındı. Mobil faz A %8.7 asetonitril içeren 50 mM potasyum fosfat tampon (pH 6.5); mobil faz B ise asetonitril/su (50/50, v/v) olarak, seperasyon izokratik koşullarda, %100 mobil faz A ile, 1.1 ml/dak hız ve 30 °C kolon sıcaklığı değerlerinde yapıldı. Son analitin çıkışından sonra güçlü bir şekilde retansiyona uğrayan bileşikler güçlü solvent akımı (%50 B mobil faz, 20-22 dakikalar arası) ile elüe edildi, 22. ve 23. dakikalar arasında gradient başlangıç değerlerine döndürülerek kolon 7 dakika daha dengelenmeye bırakıldı; böylece toplam çalışma süresi 30 dakika oldu. Enjeksiyon hacmi 20 μl seçilerek, fluoresans eksitasyon ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 340 ve 455 nm olarak ölçülmüştür. Elde edilen pikler, pik alanlarında göre değerlendirildi.

Kalibrasyon: Metod validasyonu için kalibrasyon 9 kombine kalibrasyon standardı kullanılarak (konsantrasyon aralığı arjinin için 1-200 μM ; ADMA, SDMA için 0.1-20 μM) yapıldı. İnternal standardın eklenmesinden sonra standartlara SPE, derivatizasyon ve kromatografi uygulanarak bunlara ait pikler alındı. Plazma

örneklerinin ölçümü için 100 µM arjinin ve 10 µM homoarjinin, ADMA ve SDMA ile tek-nokta kalibrasyonu yapıldı.

HPLC yöntemi ile total plazma homosistein düzeyi ölçümü (60)

Ekipman: Homosistein düzeyleri Waters Alliance 2690 XE Separation Module ve Model 474 fluorescence dedektör ve Millennium 32 Software kullanılarak ölçüldü.

Standart Solüsyonlar: L-homosistein, L-sistein 1, 5, 10, 25 ve 100 µM konsantrasyonlarda hazırlandı; internal standart olarak sistamin hidroklorür kullanıldı.

Derivatizasyon Reageni: Derivatizasyon için ammonium-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate (SBD-F) kullanıldı.

Örneğin Temizlenmesi ve Derivatizasyon: 50 µL plazma 25 µL internal standart ve 25 µL PBS pH 7,4 ve 10 µL TCEP (100 g/L) karıştırılarak, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Üzerine 90 µL trikloroasetik asit (100 g/L) eklendi. 13000 g'de 10 dakika santrifüj edilip 50 µL supernatant alınarak, 125 µL 0,125 M borat tampon (pH 9,5, 4 mM EDTA içeren), 10 µL 1,55 M sodyum hidroksid ve 50 µL SBD-F (1g/L) eklendi; 60 C'de 1 saat bekletildikten sonra 10 µL HPLC sistemine injekte edildi.

Kromatografi: Kromatografi Waters Spherisorb ODS2 kolon (4.6 x 150 mm; 5 µm) ve Waters Spherisorb ODS2 guard kolon (4.6x30 mm) üzerinde alındı. Mobil faz 0,1 M asetik asit – asetat tampon (pH 5,5), akış hızı 0,7 mL/dakika idi. Floresans eksitasyon ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 385 ve 515 nm olarak ayarlanarak, elde edilen pikler, pik alanlarında göre değerlendirildi.

Kullanılan ilaçlar: E vitamini (Evigen Ampul, Akın İlaç), C vitamini (Redoxon Ampul, Eczacıbaşı), B₆ vitamini (B₆ Vigen Ampul, Akus Farma), folik asit (Supelco), metiyonin (Fluka), Ketalar (Eczacıbaşı).

BULGULAR

100 sıçan, 10 ayrı gruba ayrılarak her grupta 10 hayvan bulunacak şekilde dağıtılmak suretiyle planlanan çalışmamızda; 4 hafta süre ile ilk 5 gruba normal diyet diğer 5 gruptaki hayvanlara ise metiyoninden zengin diyet uygulandı.

Ağırlık ölçümleri; çalışmanın 1. günü ve 4. haftanın sonunda yapıldı.

Kontrol grubunun ağırlığı çalışmanın başlangıcında 191.5 ± 16.06 gram iken 4 haftanın sonunda 197.9 ± 9.92 gram oldu. Herhangi bir grupta istatistiksel anlamlı derecede bir ağırlık artışı ya da kaybı yaşanmadı (Şekil 20).

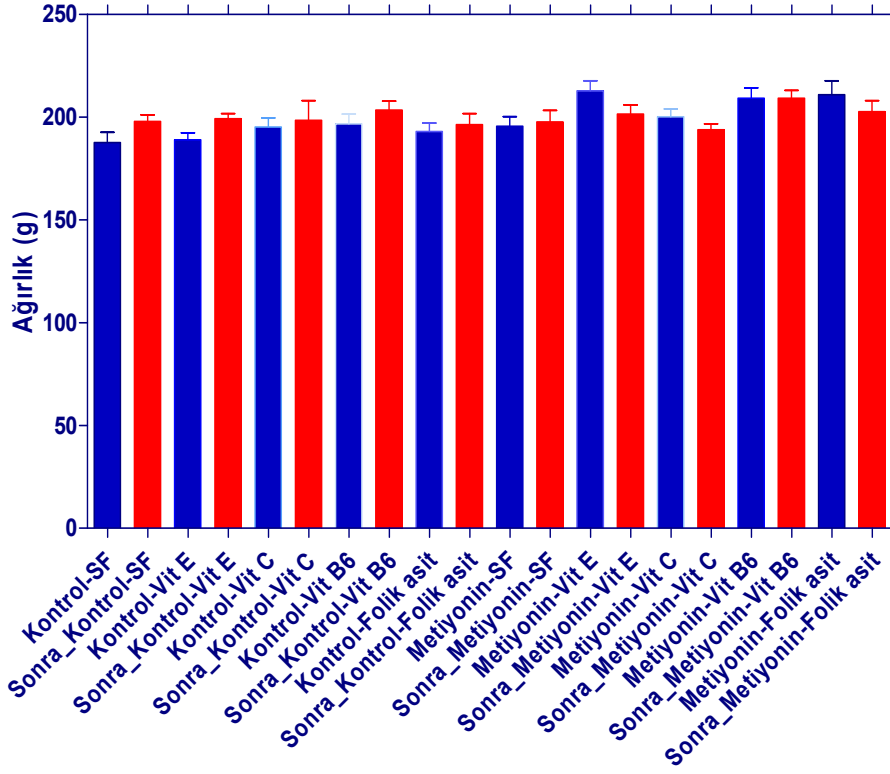
Kontrol grubu ile metiyonin yüklemesi yapılan grup ağırlık açısından kıyaslandığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Metiyonin yüklemesinin plazma homosistein, L-arginin, ADMA ve SDMA düzeyleri üzerine etkisi

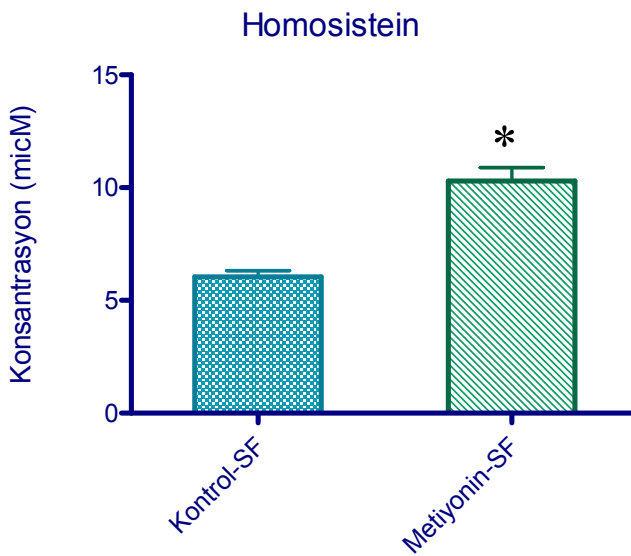
Metiyonin yüklemesinin plazma homosistein düzeyi üzerine etkisi

Homosistein düzeyi, metiyonin yüklemesi yapılan grupta kontrol grubuna göre %70,3 oranında artış gösterdi.

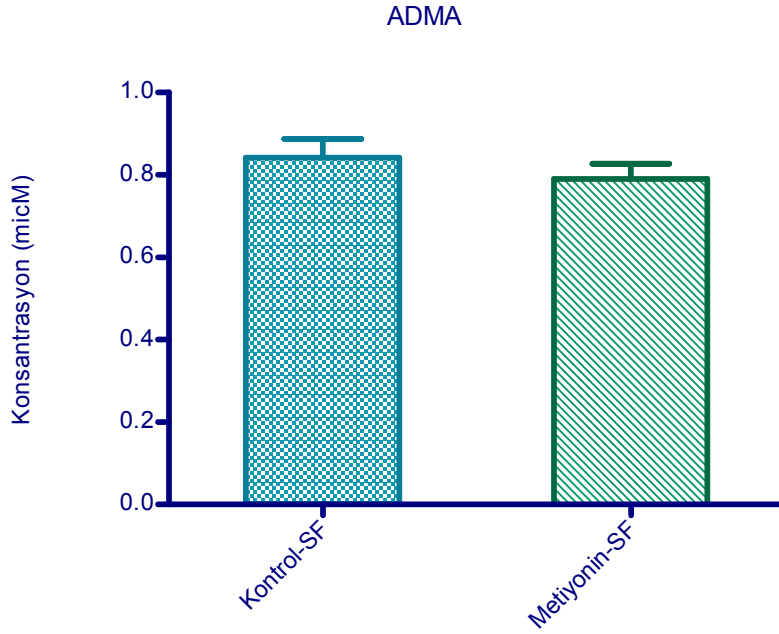
Kontrol grubunda plazma homosistein düzeyi 6.046 ± 0.871 micM değerlerinde saptandı. Gruplar plazma homosistein düzeyleri açısından kıyaslandığında metiyonin yüklemesi yapılan grupta elde edilen 10.30 ± 1.877 micM homosistein düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 21).



Şekil 20. Kontrol grubu ve metiyoninden zengin diyet uygulanan grupların ağırlık ölçüm değerleri.



Şekil 21. Kontrol grubu ve metiyonin yüklemesi yapılan grupta plazma homosistein düzeyleri (* $p < 0,05$, ANOVA, *post hoc* Bonferroni testi).



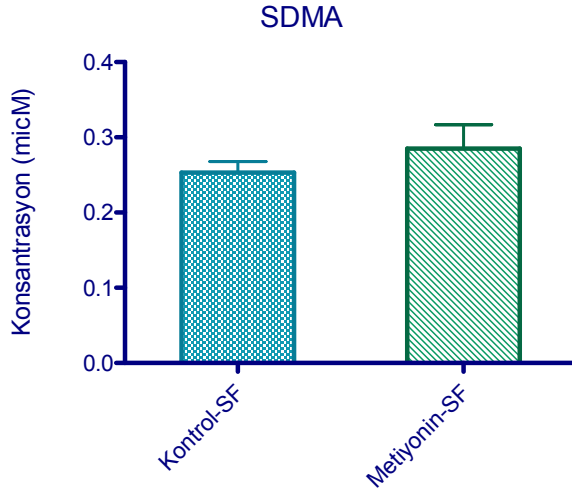
Şekil 22. Metiyonin yüklemesi yapılan ve yapılmayan gruplardaki plazma ADMA düzeyleri.

Metiyonin yüklemesinin plazma ADMA düzeyi üzerine etkisi

Kontrol grubunda plazma ADMA düzeyi 0.842 ± 0.145 micM olarak saptanırken metiyonin yüklemesi yapılan grupta bu değer 0.790 ± 0.118 micM olarak saptandı. Metiyonin yüklemesi her iki grubun plazma ADMA düzeyleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı saptandı (Şekil 22).

Metiyonin yüklemesinin plazma SDMA düzeyi üzerine etkisi

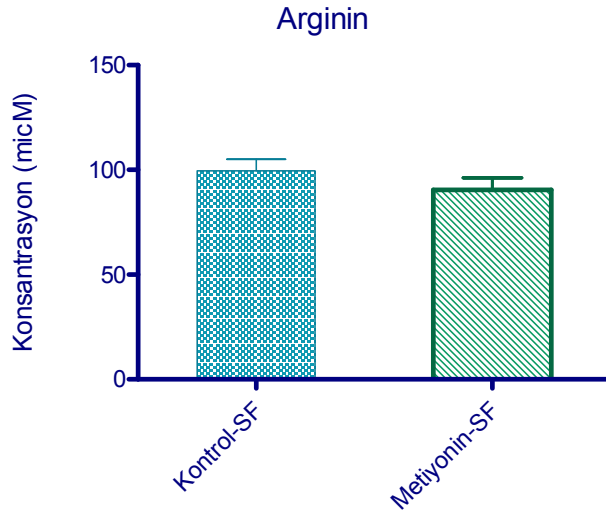
Kontrol grubunda plazma SDMA düzeyi 0.253 ± 0.047 micM olarak saptanırken, metiyonin yüklemesi yapılan grupta SDMA değeri ise 0.285 ± 0.100 micM olarak saptandı. Metiyonin yüklemesinin plazma ADMA düzeylerinde olduğu gibi SDMA düzeyleri üzerinde de her iki grup kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı saptandı (Şekil 23).



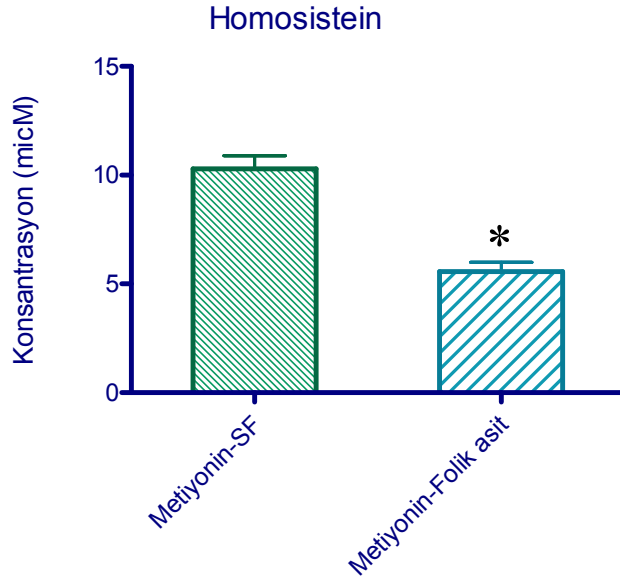
Şekil 23. Metiyonin yüklemesi yapılan ve yapılmayan gruplardaki plazma SDMA düzeyleri.

Metiyonin yüklemesinin plazma L-arginin düzeyi üzerine etkisi

Plazma L-arginin düzeyi kontrol grubunda 99.55 ± 17.50 micM düzeyinde iken metiyonin yüklemesi yapılan grupta 90.48 ± 17.45 micM değerinde idi; her iki grup kıyaslandığında metiyonin yüklemesinin plazma L-arginin düzeyleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki yaratmadığı ortaya çıktı (Şekil 24).



Şekil 24. Metiyonin yüklemesi yapılan ve yapılmayan gruplardaki plazma L-arginin düzeyleri.



Şekil 25. Folik asit uygulamasının plazma homosistein düzeyi üzerine etkisi (* $p < 0.05$, ANOVA, *post hoc* Bonferroni testi).

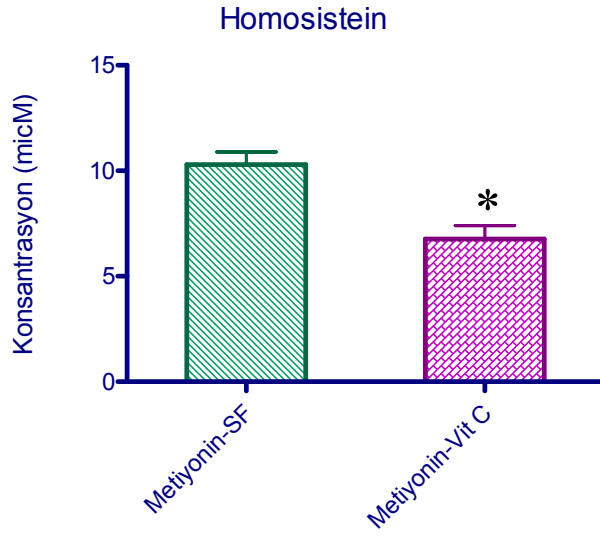
Metiyonin yüklemesinin oluşturduğu plazma homosistein düzeyi yükselmesi üzerine folik asit, vitamin B₆, vitamin C ve E vitamin uygulamalarının etkileri

Folik Asit

Metiyonin yüklemesiyle oluşturulan 10.30 ± 1.877 micM değerindeki homosistein düzeyine karşılık folik asit verilen grupta metiyonin yüklemesi plazma homosistein düzeyini 5.573 ± 1.331 micM düzeyine getirdi. Folik asit verilmesi plazma homosistein düzeyindeki artışı %45,9 oranında istatistiksel anlamlı derecede önledi (Şekil 25).

Vitamin C

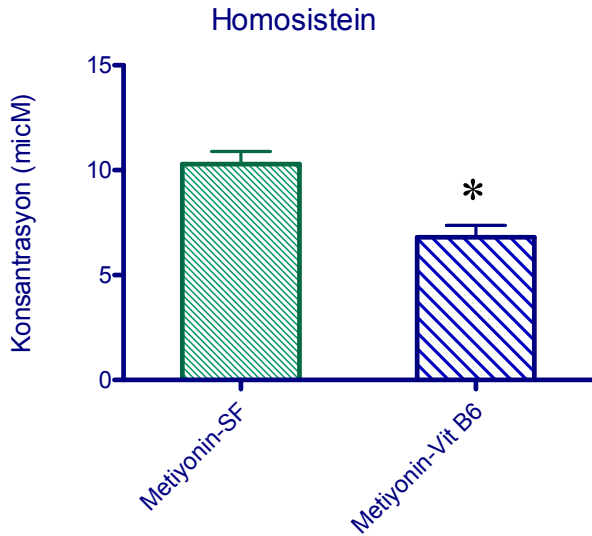
Metiyonin yüklemesinin oluşturduğu 10.30 ± 1.877 micM homosistein düzeyine karşılık vitamin C verilen grupta metiyonin yüklemesi plazma homosistein düzeyini 6.767 ± 2.020 micM değerine getirmiştir. C vitamin uygulaması plazma homosistein düzeyindeki artışı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 34,3 oranında önledi (Şekil 26).



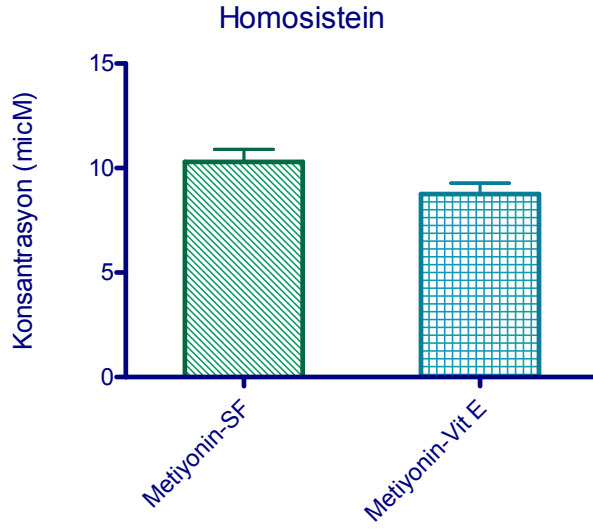
Şekil 26. Vitamin C uygulamasının plazma homosistein düzeyi üzerine etkisi ($p < 0,05$, ANOV, *post hoc* Bonferroni testi).

Vitamin B₆

Vitamin B₆ uygulanan grupta metiyonin yüklemesi ile elde edilen plazma homosistein düzeyi 6.802 ± 1.798 micM'dı. Plazma homosistein düzeyi vitamin B₆ verilmesiyle %34 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltıldı. (Şekil 27).



Şekil 27. Vitamin B₆ uygulamasının plazma homosistein düzeyi üzerine etkisi (* $p < 0,05$, ANOVA, *post hoc* Bonferroni testi).



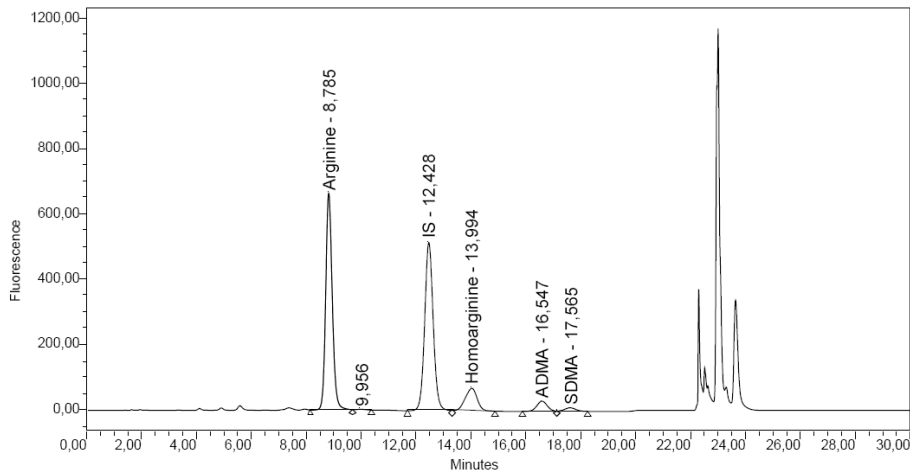
Şekil 28. Vitamin E uygulamasının plazma homosistein düzeyi üzerine etkisi.

Vitamin E

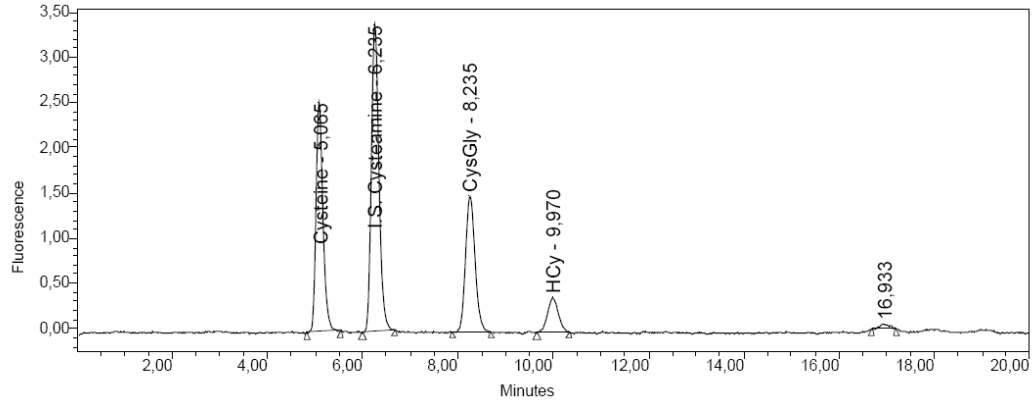
Vitamin E uygulanan grupta metiyonin yüklemesi ile elde edilen plazma homosistein düzeyi $8.751 \pm 1,681$ micM değerine ulaşmıştır. Vitamin E uygulaması metiyonin yüklemesinin homosistein düzeyi üzerine oluşturduğu etki üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadı (Şekil 28).

Plazma homosistein ve ADMA düzey ölçümlerine İlişkin Örnek Kromatogramlar

Plazma ADMA, SDMA ve arginin ölçümlerine ilişkin örnek kromatogram şekil 29'da, homosistein ölçümüne ilişkin örnek kromatogram ise şekil 30'da verilmiştir.



Şekil 29. ADMA, SDMA ve arginin ölçümüne ait örnek kromatogram.



Şekil 30. Homosistein ölçümüne ait örnek kromatogram.

TARTIŞMA

Vasküler tonus ve yapının sürdürülmesinde çok önemli rolü olan endotel hücrelerinin disfonksiyonunun aterosklerotik sürecin başlangıcını oluşturduğu bilinmektedir (2). Endotel disfonksiyonunun başlıca sebebi, L-argininden NOS aracılığıyla sentez edilen potent bir vazodilatör olan NO'un azalmış üretimidir (61). Endojen nitrik oksit sentaz inhibitörü olan ADMA'nın endotel disfonksiyon ve koroner kalp hastalığında yeni bağımsız bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür (62).

Böger RH ve arkadaşları maymunlarda yaptıkları 4 haftalık oral metiyonin yüklemesinin plazma homosistein ve ADMA düzeylerinde yaklaşık 3 katı bir artış oluşturduğunu bildirmişlerdir (63). Böger RH ve arkadaşları insanlarda yaptıkları başka bir çalışmada oral yoldan tek doz metiyonin yüklemesi ile (100 mg/kg) plazma homosistein ve ADMA düzeylerinin yükseldiğini saptadılar (64). Homosistein düzeylerindeki yükselmenin ADMA düzeyinin yükselmesine yol açtığını, bunun da ADMA düzeyinin yükselmesine neden olduğunu ve sonuçta NO üretimini azalttığını belirttiler (64). Buna karşılık Wanby P ve arkadaşları insanlarda gerçekleştirdikleri benzer bir araştırmada, 100 mg/kg oral metiyonin yüklemesinin plazma homosistein düzeylerinde bir artış oluşturduğunu, ancak ADMA düzeylerinde benzer bir artışın gerçekleşmediğini saptadılar (11). Çalışmamızda, 4 hafta süreyle yapılan oral metiyonin yüklemesinin plazma homosistein düzeylerinde bir artış oluşturduğunu saptadık. Buna karşılık plazma ADMA düzeylerinde paralel bir artış bulamadık. Böger ve arkadaşlarının (64) ve Wanby ve arkadaşlarının (11) insanlarda gerçekleştirdikleri çalışmalarda elde ettikleri sonuçlarla, bizim elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırmadan

önce, söz konusu çalışmaların insanlarda yapılmış olduğunu ve metiyonin yüklemesinin tek doz yükleme ile gerçekleştirildiğinin altını çizmek gerekmektedir. Tür ve metiyonin yükleme yöntemi yönünden farklılıkları göz ardı etmemek kaydı ile, plazma homosistein ve ADMA düzeyleri üzerinde elde ettiğimiz sonuçların, Wanby ve arkadaşları tarafından elde edilenlere benzer olduğunu söyleyebiliriz. Böger ve arkadaşlarının (64) maymunlarda yaptıkları 4 haftalık oral metiyonin yüklemesinin sonuçları ile karşılaştırıldığında, onların plazma homosistein ve ADMA düzeylerinde bir artış gözlemlediklerini, bizim ise sadece homosistein düzeyinde bir artış gözlediğimiz görülmektedir. Bu çalışmadaki sonuçlardan farklı sonuçlara ulaşmamızın bir açıklaması çalışmanın yapıldığı türlerin farklı olması veya Böger ve arkadaşlarının uyguladıkları metiyonin yüklemesi sırasında folik asit ve kolin içeriği azaltılmış diyet kullanmaları gibi farklılıklar olabilir. Çalışmamızda, sıçanların standart diyetlerinde herhangi bir değişikliğe gidilmeyip, sadece içme suları aracılığı ile metiyonin yüklemesi yapılmıştır.

Lawrence ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; hiperhomosisteinemili hastaları üç gruba ayırarak 4 ay süreyle bir gruba plasebo, diğer gruba tek başına folik asit (5 mg/kg/gün) ve diğer bir gruba da folik asit (5 mg/kg/gün) + C vitamini (2 g/kg/gün)+ E vitamini (800 IU/gün) kombinasyonu uyguladılar (65). Tek başına folik asit uygulanan grupta homosistein düzeyi başlangıca göre %11 oranında azalırken, folik asit, E ve C vitamin kombinasyonu alan grupta azalma %9 oranında azaldığını buldular. Folik asidin yükselmiş homosistein düzeyini düşürdüğünü ve folik aside eklenen vitamin E ve vitamin C'nin herhangi bir ilave etkisini olmadığını bildirdiler. Çalışmamızda folik asit, metiyonin yüklemesi ile oluşan plazma homosistein düzeyi yükselişini önlemiştir. Benzer bir önleyici etki vitamin C ve vitamin B₆ ile de saptanmıştır. Vitamin E'nin etkisi ise istatistiksel anlamlı değildir. Lawrence ve arkadaşları çalışmalarında vitamin C ve vitamin E'yi folik asit ile birlikte uygulamışlardır; tek başlarına bu ajanların verildiği gruplar yoktur. Kombinasyona eklenen vitamin C ve vitamin E'nin homosistein düzeyinde ilave bir azalma sağlamadığına bakılarak bir karara varılmıştır. Çalışmamızda, metiyonin yüklemesinin oluşturduğu plazma homosistein düzeyi artışını vitamin C de tek başına önlemiştir. Buna karşılık, vitamin E benzer bir koruyucu etki gösterememiştir. Homosistein düzeyi üzerindeki mekanizmalar tartışılırken folik asit ile ilgili mekanizmalar yanında, vitamin C (ve hatta vitamin B₆) ile ilişkili mekanizmalar da göz önünde bulundurulmalıdır.

Usui M ve arkadaşları hiperhomosisteineminin bağımsız bir kardiyovasküler risk faktörü olması nedeniyle, sağlıklı gönüllülerde metiyonin yüklemesi ile oluşturulan akut hiperhomosisteineminin endotele bağımlı vazodilatasyonu etkileyip etkilemediğini ve folik asidin bu fonksiyonlarda oluşabilecek bir bozulmayı düzeltip düzeltmeyeceğini araştırdılar (66). Akut metiyonin yüklemesinin plazma homosistein düzeyinde bir artış oluşturduğunu ve vazodilatasyonu azalttığını saptadılar. Ancak, birlikte verilen folik asidin, oluşan endotel disfonksiyonunu tamamen önlerken, beklenenin aksine plazma homosistein düzeyini etkilemediğini saptadılar (66). Bu ve daha önceki bulgulara dayanarak, hiperhomosisteineminin oksidatif stres ile aracılığı ile endotelial fonksiyonu bozduğu ve folik asit verilmesinin oksidatif stresi kaldırarak endotelial disfonksiyonu önlediğini öne sürdüler (66). Usui M ve arkadaşları tarafından gözlenen folik asidin hiperhomosisteinemi önleyememesi gözlemi gerek bizim gerekse Böger ve arkadaşları (64) ile Wanby ve arkadaşlarının (11) gözlemlerine uymamaktadır.

Ubbink ve arkadaşları hiperhomosisteinemili hastalarda plasebo, folik asit (0,65 mg) vitamin B₁₂ (0,4 mg) vitamin B₆ (10 mg) ve bu üç vitaminin kombinasyonunu 6 hafta süreyle kullanarak plazma homosistein düzeyleri üzerine etkilerini araştırdılar (67). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile karşılaştırmadan önce çalışmaların farklı türlerde gerçekleştirildiği, çalışma süresinin ve kullanılan dozların farklı olduğu vurgulanmalı ve sonuçlar bu farklılıkların ayırıcılığı olarak yorumlanmalıdır. Ubbink ve arkadaşları da folik asidin hiperhomosisteinemi azalttığını buldular (67). Bu bulgu diğer çalışmalarda ve bizim araştırmamızda ortak bir şekilde gözlenmiştir. Gözlenen azalma %41,7 olarak bildirilmiştir ve bizim çalışmamızda gözlenene (%45,9) oldukça benzemektedir. Ubbink ve arkadaşları vitamin B₆ desteğinin homosistein düzeyleri üzerine istatistiksel anlamlı bir azaltıcı etkisi olmadığını saptadılar, ancak bu bulgu çalışmamızda gözlediğimiz %34'lük istatistiksel anlamlı azalma ile örtüşmemektedir. Bunun bir açıklaması farklı dozların kullanılması olabileceği gibi, tür farklılıklarını ve çalışmaya alınan hastalardaki eşlik eden diğer fizyopatolojik süreçleri de göz ardı etmemek gereklidir. Çünkü Ubbink ve arkadaşlarının çalışması 20 ile 73 yaş arasındaki beyaz erkeklerde gerçekleştirilmiş olup, bu yaş aralığı oldukça geniş bir aralığı kapsamaktadır. Ayrıca çalışmamızda metiyonin yüklemesi ile sağlanan hiperhomosisteinemi durumu, hiperhomosisteinemili insanlardaki durumu tam olarak yansıtmayabilir ya da iki farklı durumda rol oynayan süreçler birbirinden farklı olabilir. Ubbink ve arkadaşları vitamin B₁₂'nin

plazma homosistein düzeyleri üzerine etkisini de incelemiş olup, %14.8'lik istatistiksel anlamlı bir azalma oluştuğunu saptamışlardır (67). Çalışmamızda vitamin B₁₂'nin etkisi incelenmemiştir. Ubbink ve arkadaşları folik asit ile birlikte vitamin B₆ ve vitamin B₁₂'yi kombine ederek plazma homosistein düzeyinin %49,8 oranında azaldığını, ancak bu azalmanın tek başına folik asidin sağladığından istatistiksel anlamlı olmadığını saptamışlardır (67). Çalışmamızda folik asit, vitamin B₆, vitamin C ve vitamin E kombine edilerek uygulanmamışlardır. Birlikte verilmesi durumunda daha farklı etkiler görülmesi olası olmakla birlikte, metiyonin yüklemesi ile homosistein düzeyi yükseltileen sıçanlarda gerekse kontrol sıçanlarda tek başlarına sağlamış oldukları etkiler, kombine edilmelerinin, plazma homosistein düzeylerini daha fazla düşürmeyeceğini düşündürmektedir.

B vitaminleri homosisteinin sistation β -sentaz aracılığıyla sisteine transülfürasyonu (folik asit, B₆) ve metiyonin sentaz ile homosisteinin metiyonine remetilasyonu (B₁₂) için önemli kofaktörlerdir. Yapılan bazı çalışmalar B vitaminleri ilave edilmiş diyetlerin plazma homosistein düzeylerini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü göstermiştir (67,68). Vitamin B₆ desteğinin bazal plazma homosistein konsantrasyonunu düşürmede başarısız olmasına karşın, bazı çalışmalarda oral metiyonin yükleme testinden sonra oluşan homosistein pikini azaltabildiği saptanmıştır (67). Vitamin B₆'nın yüksek dozlarda nöropati yapması, hiperhomosisteinemi önlemek veya düzeltmek için vitamin B₆'nın uzun süre yüksek dozda kullanımını kısıtlayıcı bir özellik olarak görülmüştür (68).

Sydow K ve arkadaşları periferik oklüzif arter hastalığı ve hiperhomosisteinemili hastalarda yaptıkları çalışmada folik asit (10 mg) vitamin B₁₂ (200 μ g) ve vitamin B₆ (20 mg) kombinasyonu ile 8 hafta tedavi edilen hastalarda plazma homosistein düzeyinin anlamlı derecede azaldığını saptadılar (68). Söz konusu çalışma toplam 27 hasta üzerinde yapılmış sınırlı bir çalışma olup, vitaminlerin tek başlarına verilerek oluşturdukları etkiler incelenmemiştir; gözlenen etkilerin kombinasyonun etkisi mi, yoksa kombinasyonu oluşturan vitaminlerden bir veya ikisinin oluşturduğu bir etki mi olduğu açık değildir. Söz konusu çalışmada plazma ADMA, SDMA ve L-arginin düzeyleri de ölçülmüş olup, istatistiksel anlamlı herhangi bir değişiklik bildirilmemiştir (68).

Benzer şekilde Ziegler S ve arkadaşları da, periferik arter hastalığı bulunan hiperhomosisteinemili hastalarda (15 kadın, 34 erkek) folik asit (5 mg), vitamin B₁ (50 mg), vitamin B₆ (50 mg) ve vitamin B₁₂ (0,05 mg) ile 6 hafta tedavinin etkilerini

incelediler (69). Plazma homosistein düzeylerinin anlamlı derecede düştüğünü, ancak ADMA, SDMA ve L-arginin düzeylerinin değişmediğini saptadılar. Bu çalışma da toplam 49 hasta üzerinde yapılmış sınırlı bir çalışmadır. Vitaminlerin tek başlarına verilerek oluşturdukları etkiler bu çalışmada da incelenmemiş olup gözlenen etkilerin kombinasyonun etkisi mi, yoksa kombinasyonu oluşturan vitaminlerden bir veya birkaçının oluşturduğu bir etki mi olduğu açık değildir (69).

Hanratty CG ve arkadaşları on sağlıklı gönüllü üzerinde gerçekleştirdikleri araştırmalarında oral metiyonin yüklemesi (100 mg/kg) ile toplam plazma homosistein düzeylerinin anlamlı derecede arttığını, ancak birlikte verilen vitamin C'nin bu artış üzerine herhangi bir etkisi olmadığını saptadılar (70). Az sayıda denek üzerinde gerçekleştirilmiş (sadece 10) olan bu çalışmanın insanlarda yapılmış olması ve gerek metiyonin yüklemesinin gerekse vitamin C verilmesinin akut verilmiş şeklinde olması, bizim çalışmamıza göre belirgin farklılıklardır. Cafolla ve arkadaşları İtalyan sigara içici ve düzenli kan verici 100 denekte folik asit desteğinin (5 mg/gün) plazma homosistein düzeyini düşürdüğünü, ancak vitamin C desteğinin (500 mg/gün) homosistein düzeylerini artırdığını bildirdiler (71). Krajcovicova-Kudlackova M ve arkadaşları Güney Slovakya'da gerçekleştirdikleri bir çalışmada Slovak ve Romen azınlıkta plazma homosistein düzeyi ile, folik asit, vitamin B₁₂ ve vitamin C arasında negatif bir korelasyon bulunduğunu bildirdiler (72). Brude IR ve arkadaşları da plazma homosistein düzeyleri ile diyetle alınan vitamin C ve vitamin E arasında negatif bir korelasyon olduğunu saptadılar (73). Son iki çalışmanın bulguları çalışmamızda vitamin C'nin oral metiyonin yüklemesinin plazma homosistein düzeyini artırıcı etkisinde yaptığı %34,3'lük azalma ile paralel görünmektedir. Ancak vitamin C desteğinin homosistein düzeyini düşürdüğünü doğrudan gösteren bir yayına rastlanamamıştır.

Jonasson TF ve arkadaşları iskemik kalp hastalığı olan hastalarda toplam plazma homosistein konsantrasyonu yüksek olan hastalarda plazma ADMA düzeylerinin, toplam plazma homosistein konsantrasyonu düşük olan hastalardakinden anlamlı bir farklılık göstermediğini bildirdiler (74). Ayrıca toplam plazma homosistein düzeyi yüksek hastalara 3 ay süreyle verilen folik asit, B₆ ve siyanokobalamin desteği ile plazma ADMA düzeylerinin değişmediğini, toplam plazma homosistein düzeyinde gerçekleşen belirgin azalmanın, ADMA düzeylerini etkilemediğini saptadılar (74). Brattstrom LE ve arkadaşları sağlıklı gönüllülerde 14 günlük siyanokobalamin (1 mg), piridoksin hidroklorür (40 mg) ve folik asit (5 mg) desteğinin toplam plazma

homosistein düzeylerine etkilerini araştırdılar (75). Siyanokobalamin ve piridoksin ile herhangi bir etki gözleyemezken, folik asidin belirgin homosistein-düşürücü etkiye (%52'lik azalma) sahip olduğunu saptadılar (75). Buna karşılık, Holven KB ve arkadaşları 21 hiperhomosisteinamik hasta ve 21 normal kontrol olarak, folik asit desteği uygulamış, tedaviden önce, 6 hafta ve 12 ay sonra ADMA düzeylerini ölçmüş, hiperhomosisteinamik grupta başlangıçta plazma ADMA ve arginin düzeylerini daha yüksek bulmuş, folik asit desteğinin plazma ADMA ve arginin düzeylerini düşürdüğünü bulmuşlardır (76). Çalışmamızda metiyonin yüklemesinin plazma homosistein düzeyini artırdığını, ancak ADMA düzeylerinde benzer bir artışın gerçekleşmediğini bulduk. Bulgularımız ADMA düzeylerinin homosistein düzeyindeki artıştan etkilenmediğini göstermektedir. Vitamin E, vitamin B₆, vitamin C ve folik asidin plazma ADMA düzeyleri üzerine herhangi bir anlamlı etkiye sahip olmadığını gözledik. Oral metiyonin yüklemesinin ADMA düzeylerinde artış oluşturmaması nedeniyle, vitamin E, vitamin B₆, vitamin C ve folik asidin yükselmiş plazma ADMA düzeylerini nasıl etkilediği hakkında elimizdeki bulgulara dayanarak bir yorumda bulunabilmek mümkün değildir.

Homosisteinin endotelial fonksiyon üzerindeki bozucu etkilerinin ADMA ile oluşturulabileceği öne sürülmüş, bunun iki mekanizma ile oluşabileceği ortaya atılmıştır (2). Homosistein, ADMA yıkımında rol oynayan dimetiarginin dimetilamino-hidrolaz aktivitesini inhibe edebilir (61), yükselmiş ADMA, metiltransferazların bir substratı olan metiyoninin ortamda daha fazla bulunmasından kaynaklanabilir. Ancak bizim çalışmamızda saptadığımızı paralel şekilde, farklı insan deneylerinde metiyonin yüklemesinin plazma ADMA düzeylerini etkilemediği belirlenmiştir (11). Yükselmiş plazma homosisteininin düşürülmesine plazma ADMA düzeylerinde bir azalma eşlik etmemiştir (69).

Sonuç olarak, çalışmamız sıçanlarda oral metiyonin yüklemesinin plazma homosistein düzeylerinde bir artışa yol açarken, plazma ADMA, SDMA ve L-arginin düzeylerini etkilemediğini saptadık. Metiyonin yüklemesinin yaptığı plazma homosistein düzeyi artışı folik asit (%45,9), vitamin B₆ (%34,0) ve vitamin C (%34,3) ile anlamlı derecede azaltıldı; vitamin E ise plazma homosistein düzeyleri üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı. Bu sonuçlara göre metiyonin yüklemesi ile oluşan plazma homosistein düzeyi artışı, ADMA düzeylerini yükseltici bir etkiye sahip değildir. Folik asit, vitamin B₆ ve vitamin C desteği homosistein düzeyindeki artmayı önlemektedir.

SONUÇ

Sıçanlarda oral metiyonin yüklemesi plazma homosistein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdi. Homosistein düzeyi, metiyonin yüklemesi yapılan grupta kontrol grubuna göre %70,3 oranında artış gösterdi.

Oral metiyonin yüklemesinin plazma ADMA, SDMA ve L-arginin düzeyleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadı.

ADMA düzeyleri homosistein düzeyindeki artıştan etkilenmedi. Vitamin E, vitamin B₆, vitamin C ve folik asit plazma ADMA düzeyleri üzerine herhangi bir anlamlı etki oluşturmadı.

Metiyonin yüklemesinin yaptığı plazma homosistein düzeyi artışı folik asit (%45,9), vitamin B₆ (%34,0) ve vitamin C (%34,3) ile anlamlı derecede azaltıldı; vitamin E ise plazma homosistein düzeyleri üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı.

Folik asit, vitamin B₆ ve vitamin C desteği homosistein düzeyindeki artışı önledi.

ÖZET

NORMAL DİYET VE METİYONİNDEN ZENGİN DİYETLE BESLENEN SIÇANLARDA SERUM ASİMETRİK DİMETİL ARGİNİN (ADMA) DÜZEYLERİ ÜZERİNE VİTAMİN E, VİTAMİN C, VİTAMİN B₆ VE FOLİK ASİDİN ETKİLERİ

Çalışmamızda vitamin E, vitamin C, folik asit ve B₆ vitamininin normal diyet ve metiyoninden zengin diyetle beslenen sıçanlarda serum asimetrik dimetil arginin düzeyi üzerine etkilerini saptamaya çalıştık.

Çalışmada 2 aylık 100 adet Wistar sıçan her grupta 10 sıçan bulunan 10 gruba ayrıldı. Sıçanlara 5 hafta süreyle normal diyet uygulandı, ilk 5 gruba metiyonin yüklemesi yapılmazken, diğer 5 gruptaki sıçanlara metiyonin yüklemesi (1 g/kg) içme suyuna eklemek suretiyle yapıldı.

Ağırlık ölçümleri çalışmanın birinci günü ve dördüncü haftasında yapıldı. Gruplar arasında ağırlık açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

Serum fizyolojik, vitamin E (2 mg/kg/gün), C (250 mg/kg/gün), B₆ (5 mg/kg/gün) ve folik asit (4 mg/kg/gün) hem normal hem metiyoninden zengin diyet uygulanan gruplara bir hafta süreyle intraperitoneal olarak uygulandı.

Oral metiyonin yüklemesi plazma homosistein düzeylerini artırırken (%70,3; p<0.05), plazma ADMA, SDMA ve L-arginin düzeylerini etkilemedi. Metiyonin yüklemesinin yaptığı plazma homosistein düzeyi artışı folik asit (%45,9; p<0,05), vitamin B₆ (%34,0; p<0,05) ve vitamin C (%34,3; p<0,05) ile istatistiksel anlamlı derecede azaldı. Buna karşılık vitamin E plazma homosistein düzeyleri üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı.

Sonuç olarak; oral metiyonin yüklemesi plazma homosistein düzeylerinde bir artışa yol açarken, plazma ADMA, SDMA ve L-arginin düzeylerini etkilememektedir. Metiyonin yüklemesinin yaptığı plazma homosistein düzeyi artışını folik asit, vitamin B₆ ve vitamin C azaltmakta, vitamin E etkilemektedir.

Anahtar kelimeler: Asimetrikdimetil arginin, homosistein, metiyonin, vitamin E, vitamin C, vitamin B₆, folik asit, sıan

SUMMARY

THE EFFECTS OF VITAMIN E, VITAMIN C, VITAMIN B₆ AND FOLIC ACID ON SERUM ASYMMETRIC DIMETHYL ARGININE (ADMA) LEVELS IN RATS FED BY NORMAL AND METHIONINE-RICH DIET

In our study we tried to establish the effects of vitamin E, vitamin C, vitamin B₆ and folic acid on plasma asymmetric dimethylarginine levels in rats fed by normal and methionine-rich diet.

In the study, 2 month old 100 Wistar rat were divided into 10 groups of 10 rats each. Rats were fed normal diet for 5 weeks; the first five groups of rats omitted methionine, the other 5 groups of rats excess methionine by adding (1 g/kg) to drinking water.

Weights were measured in the first day and 4th week of the study. No significant differences were observed between the groups in weight measurements.

Normal saline, vitamin E (2 mg/kg/day), C (250 mg/kg/day), B₆ (5 mg/kg/day) and folic acid (4 mg/kg/day) were administered intraperitoneally to normal and methionine-rich diet group for one week.

While oral methionine loading was increased plasma levels of homocysteine (%70,3; $p < 0.05$) it has no effect in the levels of plasma ADMA, SDMA and L-arginine. Elevation of plasma homocysteine levels which was induced by methionine loading was significantly decreased with vitamin B₆ (34%; $p < 0.05$), vitamin C (34.3%; $p < 0.05$) and folic acid (45,9%; $p < 0.05$). On the other hand, vitamin E has no significantly effect in the levels of homocysteine.

In conclusion; oral administration of methionine loading had no effect in the levels of plasma ADMA, SDMA and L-arginine while it caused an increase in the levels of homocysteine. Folic acid, vitamin B₆, vitamin C were decreased elevation of plasma homocysteine levels which was induced by methionine loading, but vitamin E has no effect.

Key words: Asymmetric dimethylarginine, homocystein, methionine, vitamin E, vitamin C, vitamin B₆, folic acid, rat

KAYNAKLAR

1. Abdu TAM, Elhadd T, Pfeifer M, Clayton RN. Endothelial dysfunction in endocrine disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2001; 12:257-265.
2. Anderson TJ. Assesment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:631-638.
3. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*. 1989; 28:997-1000.
4. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl. J Med* 1986; 315:1046-1051.
5. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2032-2037.
6. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of endogenous inhbitor of nitric oxide synthesis in choronic renal failure. *Lancet* 1992; 339:572-575.
7. Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997; 95:2068-2074.
8. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 1998; 62:2425-2430.
9. Surdacki S, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger R, Bode-Boeger S et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolits and increased plasma

- levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33:652-658.
10. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98:1842-1847.
 11. Wanby P, Brattstrom L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. *Scand J Clin Lab Invest*. 2003; 63(5):347-53.
 12. Duval WL. Endothelial dysfunction and antioxidants. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 2005; 72:71-80.
 13. By Douglas B. Cines, Eleanor S. Pollak, Clayton A. Buck, Joseph Loscalzo, Guy A. Zimmerman, Rodger P. McEver et al. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 10 (15): 3527-3561.
 14. S. Moncada. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Phil. Trans. R. Soc.* 2006; 361:735-759.
 15. Zoghi M, Nalbantgil İ. Hipertansiyon ve Endotel Fonksiyon Bozukluğu. *Ana Kar Der* 2002; 2:142-7.
 16. Torun E, Bayram F. Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelinin hipertansiyondaki rolü. *Erciyes Tıp Dergisi* 2004; 26(3):126-31.
 17. Lüscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997; 20(11 Suppl 2):3-10.
 18. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12(4):383-9.
 19. Victor J Dzau. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease: A Unifying Hypothesis. *Hypertension* 2001; 37:1047-52.
 20. Jean Davignon and Peter Ganz. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III-27-III-32.
 21. Drexler H. Endothelium as a therapeutic target in heart failure. *Circulation* 1998; 98:2652-55
 22. Vallance P. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 2001; 85:342-50.

23. Robert M.F. Wever, PharmD; Thomas F. Lüschler, MD; Francesco Cosentino, MD; Ton J. Rabelink, MD. Atherosclerosis and the Two Faces of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 1998; 97:108-112
24. Joseph Loscalzo. Endothelial Injury, Vasoconstriction, and Its Prevention. *Tex Heart Inst J* 1995; 22:180-4.
25. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher T. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97:2494-8.
26. Liao JK, Clark SL. Regulation of G-protein alpha i2 subunit expression by oxidized lowdensity lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 95:1457-1463.
27. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997; 99:41-46.
28. Tsao PS, Niebauer J, Buitrago R, Lin PS, Wang BY, Cooke JP et al. Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial adhesiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:947-953.
29. Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP et al. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation* 1996; 93:1647-1650.
30. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 1998; 97:1695-1701.
31. Virdis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation* 2000; 101:2258-2263.
32. Piero O. Bonetti, Lilach O. Endothelial Dysfunction: A Marker of Atherosclerotic Risk *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23:168-175.
33. Türköz Y, Özerol E. Nitrik Oksit'in Etkileri ve Patolojik Rollerini. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1997; 4(4): 453-61.
34. Charles J. Lowenstein; Jay L. Dinerman; and Solomon H. Snyder. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120(3): 227-237.
35. Dökmeci İ. Nitrik oksit ve NO-mimetik vazodilatörler. *Farmakoloji Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitabevleri* 2000; 305-314.
36. Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik oksit ve Akciğerler. *Toraks Dergisi*, 2003; 4(1):88-94.

37. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? *Circulation* 2002; 105:2107-2111.
38. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M et al. Elevated levels of low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 103(15):1955-1960.
39. Endres M, Laufs U, Huang Z, Tadashi Nakamura, Paul Huang, Michael A. Moskowitz et al. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:8880-8885.
40. Rainer H. Böger, MD, Eyal S. Ron. L-Arginine Improves Vascular Function by Overcoming the Deleterious Effects of ADMA, a Novel Cardiovascular Risk Factor. *Alternative Medicine Review* 2005; 10(1):14-23.
41. Jerzy Betowski, Anna Kêdra. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmalogical Reports* 2006; 58:159-178.
42. Kirsten B. Holven, Tor S. Haugstad, Torbjørn Holm, Pal Aukrust, Leiv Ose, Marit S. Nenseter. Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects. *British Journal of Nutrition* 2002; 89:359-363.
43. Hiromichi Kumagai, Miyuki Sakurai, Takako Takita, Yukitaka Maruyama, Shuichi Uno, Naoki Ikegaya et al. Association of Homocysteine and Asymmetric Dimethylarginine With Atherosclerosis and Cardiovascular Events in Maintenance Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis* 2006; 48:797-805.
44. Patrick Vallance, James Leiper. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24:1023-1030.
45. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM, Brattström L. Total homocystein and cardiovascular disease. *J Int Med* 1999; 246:425-454.
46. Mudd SH. Homocysteine and its Disulfide Derivatives. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20:1704-1706.
47. Friedman AN, Bostom AG, Selhub J, Levey AS, Rosenberg IH. The Kidney and Homocysteine Metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2181-2189.
48. Hankey GJ, Eikelboom JW, Ho WK, van Bockxmeer FM. Clinical usefulness of plazma homocysteine in vascular disisease. *Med J Aust* 2004; 181(6):314-318.

49. Cook S, Hess OM. Homocysteine and B vitamins. *Handb Exp Pharmacol*. 2005; (170):325-38.
50. Tyagi N, Moshal KS, Ovechkin AV, Rodriguez W, Steed M, Henderson B et al. Mitochondrial mechanism of oxidative stress and systemic hypertension in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem*. 2005; 96(4):665-71.
51. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*. 1993; 91(1):308-18.
52. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem*. 1997; 272(27):17012-7.
53. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest*. 1996; 98:5-7.
54. Akkiprik M, Çevik D, Özer A, Kaya Emerk. Homosisteinin insan göbek kordon ven endotel hücre kültüründe eNOS ve DDAH gen ekspresyonları üzerine etkisi. *Marmara Medical Journal* 2007; 20(3):144-149.
55. Zhang X. Effects of homocysteine on endothelial NO production. *Am. J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:F671-F678.
56. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996; 119:1533-1540.
57. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: Dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99:3092-3095.
58. Altınışık M. Vitaminler. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ders notları 1998-1999; 1-37.
59. Teerlink T, Nijveldt RJ, Jong S, van Leeuwen PAM. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological sample by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2002; 303:131-137.
60. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clinical Chemistry* 1999; 45(2):290-292.

61. Kurowska EM. Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr Pharm Des* 2002; 8(3):155-66.
62. Valkonen VP, Hannu Paiva, Jukka T Salonen. Risk of coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358:2127-28.
63. Rainer H. Böger, Stefanie M. Bode-Böger, Karsten Sydow, Donald D. Heistad, Steven R. Lentz. Plasma Concentration of Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, Is Elevated in Monkeys With Hyperhomocyst(e)inemia or Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1557-1564.
64. Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Hayens WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clinical Sci.* 2001; 100:161-167.
65. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ Jr, Nasar BA. Effect of Folic Acid and Antioxidant Vitamins on Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(3):758-65.
66. Michiaki Usui, Hidehiro Matsuoka, Hiroshi Miyazaki, Seiji Ueda, Seiya Okuda, Tsutomu Imaizumi. Endothelial dysfunction by acute hyperhomocyst(e)inaemia: restoration by folic acid. *Clinical Science* 1999; 96:235–239.
67. Johah B. Ubbink, J. Hayward Vermaak, Annatjie Vandermerwe, Piet J. Becker, Rhena Delpport and Hendrik C. Potgieter. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *J. Nutr.* 1994; 124:1927-1933.
68. Karsten Sydow, Edzard Schwedhelm, Naoshi Arakawa, Stefaine M. Bode Böger, Dimitrios Tsikas, Burkhard Hornig et al. ADMA and oxidative stres are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovascular Research* 2003; 57:244-52.
69. Sophie Ziegler, Friedrich Mittermayer, Christina Plank, Erich Minar, Michale Wolzt, Gerit-Holger Schernthaner. Homocysteine-Lowering Therapy Does Not Affect Plasma Asymmetrical Dimethylarginine Concentrations in Patients with Peripheral Artery Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 90(4):2175-78.
70. Colm G Hanratty, Lawrence T McGrath, Daniel F McAuley, Ian S Young, Dennis G Johnston. The effect on endothelial function of vitamin C during methionine

- induced hyperhomocysteinaemia. *BMC Cardiovascular Disorders* 2001; 1(1):1471-2261.
71. Cafolla A, Dragoni F, Girelli G, Tosti ME, Costante A, De Luca AM et al. Effect of folic acid and vitamin C supplementation on folate status and homocysteine level: a randomised controlled trial in Italian smoker-blood donors. *Atherosclerosis*. 2002; 163(1):105-11.
72. Krajcovicova-Kudlackova M, Ginter E, Blazicek P, Klvanova J. Homocysteine and vitamin C. *Bratisl Lek Listy*. 2002; 103(4-5):171-3.
73. Brude IR, Finstad HS, Seljeflot I, Drevon CA, Solvoll K, Sandstad B, et al. Plasma homocysteine concentration related to diet, endothelial function and mononuclear cell gene expression among male hyperlipidaemic smokers. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29(2):100-8.
74. Jonasson TF, Hedner T, Hultberg B, Ohlin H. Hyperhomocysteinaemia is not associated with increased levels of asymmetric dimethylarginine in patients with ischaemic heart disease. *Eur J Clin Invest*. 2003; 33(7):543-9.
75. Brattström LE, Israelsson B, Jeppsson JO, Hultberg BL. Folic acid an innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest*. 1988; 48(3):215-21.
76. Holven KB, Haugstad TS, Holm T, Aukrust P, Ose L, Nenseter MS. Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects. *Br J Nutr*. 2003; 89(3):359-63.

TABLULAR

Tablo 1. Endotel hücrelerinden salgılanan maddeler

Tablo 2. Endotelyal disfonksiyonuyla ilgili hastalıklar

Tablo 3. Nitrik oksit sentezleyen genler

Tablo 4. Hiperhomosisteinemi nedenleri

ŞEKİLLER

Şekil 1. Normal endotelden salınan vazodilatör maddeler

Şekil 2. Endotel disfonksiyonundaki vazokonstriktör maddeler

Şekil 3. Endotel disfonksiyonu

Şekil 4. Endotelyal hücreleri tarafından nitrik oksit üretimi

Şekil 5. Endotelyal nitrik oksit sentaz sinyalizasyonu

Şekil 6. Arginin, L-NMMA, ADMA ve SDMA'nın kimyasal yapıları

Şekil 7. ADMA sentez ve metabolizması

Şekil 8. Homosisteinin kimyasal yapısı

Şekil 9. Homosisteinin plazmadaki formları

Şekil 10. Homosistein metabolizması

Şekil 11. Vitamin B₆'nın kimyasal yapısı

Şekil 12. Schiff bazı

Şekil 13. Piridoksal fosfat'ın koenzim olarak görev aldığı homosisteinden sistationin, α -ketobutirat ve sistein oluşum reaksiyonu.

Şekil 14. Folik asidin kimyasal yapısı

Şekil 15. Tetrahidrofolik asidin kimyasal yapısı

Şekil 16. L-metilmalonil-CoA'nın süksinil-CoA'ya dönüşüm reaksiyonu

Şekil 17. Vitamin C'nin kimyasal yapısı

Şekil 18. Tokol, α -tokoferol, β -tokoferol, δ -tokoferol ve γ -tokoferolün kimyasal yapıları

Şekil 19. α -tokoferolün kimyasal yapısı

Şekil 20. Kontrol grubu ve metiyoninden zengin diyet uygulanan grupların ağırlık ölçüm değerleri

Şekil 21. Kontrol grubu ve metiyonin yüklemesi yapılan grupta plazma homosistein düzeyleri

Şekil 22. Metiyonin yüklemesi yapılan ve yapılmayan gruplardaki plazma ADMA düzeyleri

Şekil 23. Metiyonin yüklemesi yapılan ve yapılmayan gruplardaki plazma SDMA düzeyleri.

Şekil 24. Metiyonin yüklemesi yapılan ve yapılmayan gruplardaki plazma L-arginin düzeyleri

Şekil 25. Folik asit uygulamasının plazma homosistein düzeyi üzerine etkisi

Şekil 26. Vitamin C uygulamasının plazma homosistein düzeyi üzerine etkisi

Şekil 27. Vitamin B₆ uygulamasının plazma homosistein düzeyi üzerine etkisi

Şekil 28. Vitamin E uygulamasının plazma homosistein düzeyi üzerine etkisi

Şekil 29. ADMA, SDMA ve arginin ölçümüne ait örnek kromatogram

Şekil 30. Homosistein ölçümüne ait örnek kromatogram

ÖZGEÇMİŞ

21/07/74 Kırklareli doğumluyum. İlk öğrenimimi Kırklareli'nin Vize ilçesinde, orta ve lise öğrenimimi Kırklareli Anadolu Lisesi'nde tamamladım.

1993 yılında kazandığım Trakya üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 1997 yılında bölüm birincisi olarak tamamladım. 09/97-01/98 tarihleri arasında Eczacıbaşı İlaç Sanayii'nde Bakteriyoloji laboratuvarında biyolog olarak çalıştım. 1999-2002 yılları arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi kadrosunda yüksek lisansımı tamamladım. Aynı yılın Şubat döneminde Farmakoloji doktora programına başladım.

2003 yılının Haziran ayı'ndan itibaren Atlas İlaç Pazarlama Tic A.Ş'de pazarlama departmanında grup ürün yöneticisi olarak görev yapmaktayım.

EKLER




T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı : 40


Karar Tarihi : 11.08-2005


6-Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 11.08.2005 tarihinde "Normal Diyet ve Metioninden Zengin Diyetle Beslenen Sıçanlarda Serum Asimetrik Dimetil Arginin ADMA) Düzeyleri Üzerine Vitamin E, Vitamin C, Vitamin B6 ve Folik Asidin Etkileri" adlı TÜTFEK-2005/083 protokol no.lu çalışmayı incelemek üzere toplandı. Toplantıya Doç.Dr.H.Betül UĞUR ALTUN izni olması nedeniyle katılmadı ve diğer üyelerin katılımıyla çalışmanın incelenmesine geçildi.

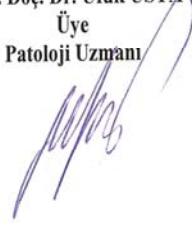
Yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Üniversitemiz Farmakoloji Anabilim Dalında yapılacağı ve yürütücüsünün Prof.Dr. Ç.Hakan KARADAĞ olduğu; araştırma protokolünün amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına Trakya Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından desteklenmesi koşuluyla yapılabileceğine mevcudun oybirliği ile karar verildi.



Doç.Dr.Selma SÜER GÖKMEN
BAŞKAN
Biyokimya Uzmanı

Doç.Dr.Betül UĞUR ALTUN
Klinisyen Üye
İç Hastahkları Uzmanı
(İZİNLİ)


Doç.Dr.Ümit Nusret BAŞARAN
Klinisyen Üye
Çocuk Cerrahisi Uzmanı


Doç. Dr. Dilek MEMİŞ
Klinisyen Üye
Anesteziyoloji Uzmanı


Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA
Üye
Patoloji Uzmanı


Doç.Dr.Dikmen DÖKMECİ
Üye
Farmakolog

Ecz.İmran OĞUZ
Üye
Eczacı


Doç. Dr. Betül BİNER ORHANER
Üye
Çocuk Sağlığı ve Hastahkları
Uzmanı

Posta Adresi :
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
Güllapoğlu Yerleşkesi
22030 EDİRNE

Tel (0-284) 235 76 41 (9 Hat) Fax: (0-284)2357652