



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

ERİTROSİTLERDE HOMOSİSTEİN TRANSPORTUNUN ARAŞTIRILMASI

ZÜLEYHA ÇİVİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Antakya/HATAY
ARALIK/2008**

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERİTROSİTLERDE HOMOSİSTEİN TRANSPORTUNUN ARAŞTIRILMASI

Züleyha ÇİVİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Deniz YILDIZ danışmanlığında hazırlanan bu tez 30 / 12 / 2008 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Deniz YILDIZ

Başkan

Doç. Dr. Suat ERDOĞAN

Üye

Yrd. Doç. Erol ATAY

Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Necat AĞCA
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
ÇİZELGE DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Homosistein.....	3
2.2. Homosisteinin Kimyasal Yapısı ve Biyokimyası.....	3
2.3. Total Homosistein Düzeyini Etkileyen Faktörler.....	6
2.3.1. Metabolizmadaki Genetik Bozukluklar.....	8
2.3.2. Kronik Hastalıklar.....	10
2.3.3. Vitamin yetersizliği ve beslenme bozuklukları.....	11
2.3.4. Fizyolojik etkenler.....	11
2.3.4.1. Yaş ve Cinsiyet.....	11
2.3.4.2. Menopoz ve Homosistein.....	12
2.3.4.3. Gebelik ve Homosistein.....	13
2.3.5. Yaşam Tarzı.....	13
2.3.5.1. Alkol Kullanımının Homosistein Düzeylerine Etkisi.....	13
2.4. Hiperhomosisteineminin Etkileri ve Hastalıklarla İlişkisi.....	15
2.4.1. Homosistein ve Kronik Böbrek Yetmezliği.....	17
2.4.1.1. Kronik Böbrek Yetmezliğinde Hiperhomosisteineminin Mekanizması...19	
2.4.1.2. Renal Transplantasyon Uygulanan Hastalarda Hiperhomosisteinemi...20	
2.4.2. Hiperhomosisteinemi ve Kardiyovasküler Hastalıklar İle Bağlantısı.....	22
2.4.3. Homosistein ve Serebral Vasküler Hastalıklar.....	26
2.4.4. Osteoporoz İle Homosistein Arasındaki İlişki.....	27
2.5. Eritrositler.....	28
2.5.1. Eritrosit membranı.....	29
2.5.2. Eritrosit Metabolizması.....	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1. Materyal.....	33

3.2. Yöntem ve Çalışmanın Aşamaları.....	39
3.2.1. İstatistiksel Analizler.....	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
KAYNAKLAR.....	57
TEŞEKKÜR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	62

ÖZET

ERİTROSİTLERDE HOMOSİSTEİN TRANSPORTUNUN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmadaki amaçlardan birisi plazmadaki homosistein konsantrasyonunun düzenlenmesinde eritrositlerin bir rol oynayıp oynamadığını araştırmak diğeri ise eritrositlerin homosistini homosisteine dönüştürüp dönüştürülmediğini araştırmaktır. Yapılan çalışmada eritrositleri farklı konsantrasyonlarda homosisteinle muamele edildi ve daha sonra hücre içi serbest -SH konsantrasyonlarını ölçüldü. Eritrositlerden homosistein çıkışını göstermek içinde çalışmada aynı yöntemden yararlanıldı. Yine çeşitli amino asitlerin varlığında da homosistein hücrelere girişinde değişiklik olup olmadığı belirlendi. Eritrositler 1 saat 1 mM homosisteinle muamele edildikten sonra serbest -SH değerleri 1.47 ± 0.01 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit, 3 mM homosistein ile muamele edildikten sonra ise bu seviyeler 2.01 ± 0.1 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit'e ulaşmaktadır. Sonuçlar homosistein çıkışının zamana ve konsantrasyona bağlı olduğunu göstermektedir. Homosisteinle ön muamele eritrositlerden yüksek konsantrasyonda homosistein çıkışı olduğu görülmektedir. 1mM homosistein ile ön muameleye tabi tutulan eritrositlerin süpernatantında serbest -SH konsantrasyonu 0.266 ± 0.02 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit, 3 mM homosistein ile ön muamele edilen eritrositlerin süpernatantında ise serbest -SH konsantrasyonu 0.64 ± 0.01 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit'e ulaşmıştır. Bunlara ilave olarak sonuçlar eritrositlerin ekstraselüler homosistinin homosisteine dönüştürülmesinde bir rol oynadıklarını göstermektedir. Sonuçlara bağlı olarak, eritrositlerin plazma homosistein seviyelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bunun dışında eritrositler homosistini homosisteine dönüştürmek yoluyla homosistinin plazmada birikmesini ve presipitasyonunu engelleyebilecek bir mekanizma üstlenmektedirler. Bu da mekanik endotelial hasarların önlenmesinde önemli olabilir.

2008, 62 Sayfa

Anahtar kelimeler: Homosistein, Homosistin, Eritrositler, Membran transportu.

ABSTRACT
AN INVESTIGATE OF HOMOSİSTEİN TRANSPORT IN ERYTHROCYTES

One of the main objective of the present study was to determine if erythrocytes play a role in the regulation of plasma homocysteine concentrations. Another objective was to investigate if erythrocytes convert homocystine into homocysteine. In the present study, we exposed erythrocytes to different concentrations of homocysteine and then measured the intracellular free -SH concentrations. Erythrocytes treated in the same manner were later utilized for the homocysteine efflux studies. We also determined the rate of homocysteine influx in the presence of different amino acids. Free -SH concentrations in erythrocytes treated with 1 mM homocysteine reached to 1.47 ± 0.01 $\mu\text{mol/ml}$ erythrocyte in 1 h whereas this concentration reached to 2.01 ± 0.1 $\mu\text{mol/ml}$ erythrocyte in 3 mM homocysteine treated erythrocytes. The homocysteine efflux is also determined to be time-and concentration-dependent. Erythrocytes that are pretreated with higher homocysteine concentrations displayed a higher efflux process. Outside concentration of free -SH in 1 mM homocysteine pretreated erythrocytes reached to 0.266 ± 0.02 $\mu\text{mol/ml}$ erythrocyte in 1 h whereas this concentration reached to 0.64 ± 0.01 $\mu\text{mol/ml}$ erythrocyte with 3 mM homocysteine pretreated erythrocytes. Our results also indicate that erythrocytes convert extracellularly applied homocystine into homocysteine. Depending on our results, it could be concluded that erythrocytes may play a significant role in the regulation the plasma homocysteine homeostasis. Erythrocytes may convert homocystine into homocysteine providing a protective mechanism against the precipitation of homocystine in the plasma. This may be significant in prevention of mechanical endothelial damage.

2008, 62 Pages

Key words: Homocysteine, Homocystine, Erythrocytes, Membrane transport

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
Ado-Met	S-adenozil metiyonin
Ado-Hcy	S-adenozil homosistein
ADP	Adenozin difosfat
ASC	Alanin, Serin, Sistein taşıma sistemi
ATP	Adenozin trifosfat
B ₆	Pridoksal 5-fosfat
B ₁₂	Kobalamin
BHMT	Betain-homosistein metil transferaz
C	Sitozin
CBS	Sistatyonin β sentetaz
CYS	γ -Sistatyonaz
DTNB	5,5'-dithiobis- (-nitrobenzoate)
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asit
G	Guanin
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GSSG	Okside glutatyon
GSH	Redükte glutatyon
GGT	γ -glutamil transpeptidaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
HPLC	Yüksek performanslı likit kromatografisi
Hb	Hemoglobin
HbA1c	Glikozillenmiş hemoglobin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KAD	Kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon
KVH	Kardiyovasküler hastalıklar
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	N-Metil D Aspartat
NO	Nitrik oksit

MAT	Metiyonil adenozil transferaz
MDA	Malondialdehid
MMA	Metilmalonik asit
MTHFR	Metilentetrahidrofolat redüktaz
MS	Metiyonin sentetaz
RNA	Ribonükleik asit
SDS-PAGE	Sodyumdodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SH	Sülfhidril
SOD	Süperoksit dismutaz
T	Timin
TCA	Trikloroasetik asit
tHcy	Total homosistein
2,3-BPG	2,3-bisfosfogliserat
5- metil THF	5-metil tetrahidrofolata
5,10-metilen THF	5,10-metilentetrahidrofolat

ÇİZELGELERİN DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Homosistein düzeylerini etkileyen ve hiperhomosisteinemiye neden olan faktörler.....	7
Çizelge 4.1. Homosistinin homosisteine dönüşmesinin sıcaklığa bağlılığı.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Homosisteinin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 1.2. Homosistein metabolizması.....	5
Şekil 1.3. Eritrosit metabolizması.....	32
Şekil 4.1. Eritrositlere homosistein girişi.....	47
Şekil 4.2. Eritrositlerden homosistein çıkışı.....	48
Şekil 4.3. Eritrositlere homosistein girişinin sıcaklığa bağlılığı.....	49
Şekil 4.4. Eritrositlere homosistein girişi üzerine amino asitlerin etkisi.....	50
Şekil 4.5. Eritrositlerden homosistein çıkışı üzerine amino asitlerin etkisi.....	51
Şekil 4.6. Homosistinin homosisteine dönüşmesi.....	52
Şekil 4.7. Sistinin sisteine dönüşmesi.....	54

1. GİRİŞ

Homosistein, serbest -SH grubu içeren bir amino asit olup protein sentezine katılmaz. Homosistein, esansiyel bir amino asit olan metiyonin metabolizmasının ara ürünüdür. Metiyoninden metiyonil adenzil transferaz (MAT) enzimi varlığında transmetilasyon reaksiyonu ile homosistein oluşur (Medina ve ark., 2001). Vücuttaki homosistein transsülfürasyon, remetilasyon ve homosisteinin hücre dışına taşınması yollarından birini kullanarak metabolize olur.

Transsülfürasyon yolunda pridoksal 5-fosfata (vitamin B₆) bağımlı bir enzim olan sistatyonin β sentetaz (CBS) enzimi görev yapar. Homosistein CBS katalizörlüğünde sistatyonine, o da sisteine hidrolize olur. Sistein de daha sonra sülfata hidrolize olarak idrarla atılır (Dikmen, 2004). Remetilasyon yolunda homosisteinden, metiyoninin yeniden sentezi (remetilasyon) iki farklı yolla gerçekleşir. Birinci yolda betain-homosistein metil transferaz (BHMT) enzimi, bir metil vericisi olan betainin metil grubunu, homosisteine aktararak metiyonin oluştururken kendisi dimetilglisine dönüşür. İkinci yolda ise 5-metiltetrahidrofolat, bir metil grubu vericisidir. 5,10-metilentetrahidrofolat, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi aracılığıyla 5-metiltetrahidrofolata dönüşür. 5-metiltetrahidrofolatın bir metil grubu, kobalamin (vitamin B₁₂) bağımlı enzim olan metiyonin sentetaz (MS) aracılığı ile homosisteine aktarılarak metiyonin oluşturulurken diğer taraftan da tetrahidrofolat meydana gelir. Bu tetrahidrofolat tekrar 5,10-metilentetrahidrofolata dönüşür (Dikmen, 2004).

Sağlıklı populasyonda normal total homosistein oranı, çeşitli çalışmalarda açlıkta plazmada 5-15 $\mu\text{mol/L}$ arasında, serumda 13-18 $\mu\text{mol/L}$ arasında olduğu bildirilmiştir. 15-25 $\mu\text{mol/L}$ hafif, 25-50 $\mu\text{mol/L}$ orta ve 50-500 $\mu\text{mol/L}$ üzeri ağır hiperhomosisteinemi olarak kabul edilmektedir (Jacobsen, 1998). Homosistein endojen bir bileşiktir ve fizyolojik düzeylerden daha yüksek serum düzeylerinde nörotoksiktir. Yüksek homosistein düzeylerinin tıkalıcı damar hastalıkları için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Homosistein oksidatif stres, DNA hasarı, apoptozisin uyarılması ve eksitotoksiste gibi nörodejenerasyonun bütün önemli mekanizmalarında işe karışır (Thambyrajah ve Townend, 2000).

İzole hücreler üzerindeki çalışmalar, intracellüler homosisteinin kısa bir yarı ömrünün bulunduğunu ve homosisteinin etkili bir şekilde ekstrasellüler ortama taşındığını göstermiştir. Bu taşınım, homosisteinin üretiminin arttığı durumlarda artış gösterdiği, üretiminin azaldığında ise inhibe olduğu şeklindedir. İzole hücrelerle yapılan bu çalışmalar çok önemlidir; çünkü plazma veya idrar gibi ekstrasellüler ortamdaki homosistein konsantrasyonu, hücre içi homosistein üretimi ile kullanımı arasındaki dengeyi yansıtır.

Bu çalışmada homosisteinin eritrositlere giriş çıkışını ve plazma ile eritrositler arasında bir homosistin-homosistein döngüsünün olup olmadığı araştırıldı. Çalışmadaki asıl amaç eritrositlerin plazma homosistein konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynayıp oynamadığını ortaya çıkarmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

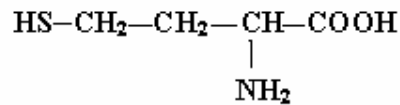
2.1. Homosistein

Vincent du Vigneaud, 1931’de homosisteini ilk defa tanımlayan bilim adamıdır. 1955’de Nobel Kimya ödülünü almıştır (Finkelstein, 2000). Homosistein esansiyel bir amino asit olan metiyonin metabolizmasına dayalı olarak oluşmaktadır. Çok hızlı metabolik kullanımı sebebiyle homosisteinin plazma düzeyi düşüktür. Yüksek homosistein düzeyleri ile hastalıklar arasındaki ilişki, 1962 yılında Carlson ve Neil tarafından gelişme geriliği olan bazı çocukların idrarında yüksek konsantrasyonda homosistein bulunması ile açığa çıkmıştır. Daha sonra 1969 yılında McCully yüksek plazma homosistein düzeyinin aterotrombotik ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya çıkarmıştır (Demirci ve ark., 2003). Daha sonraları ateroskleroz, venöz tromboz, koroner arter hastalıkları, kanser, nöral tüp defekti, demans, alzheimer ve diyabet gibi hastalıklarla ilişkileri araştırılmıştır.

2.2. Homosisteinin Kimyasal Yapısı ve Biyokimyası

Homosistein, esansiyel bir amino asit olan metiyonin metabolizması sırasında oluşan, proteinlerin yapısına girmeyen, sülfidril içeren bir amino asit olup; metiyoninden metiyonil adenozil transferaz enzimi varlığında transmetilasyon reaksiyonu ile oluşur (Medina ve ark., 2001).

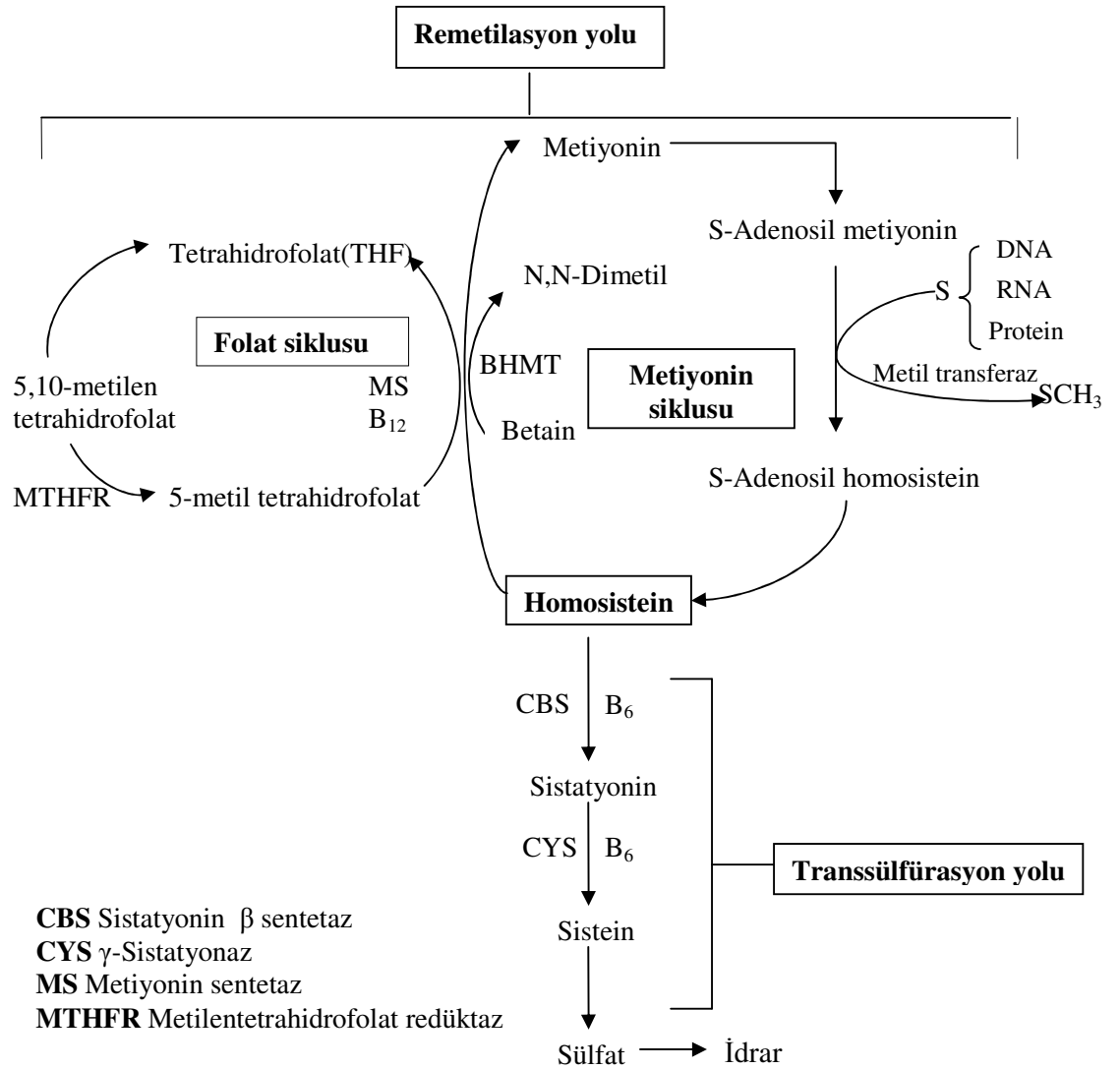
Homosistein serbest radikaller gibi etki gösteren ve son yıllarda oksidatif sisteme dahil olduğu kabul edilen, thiollü bir amino asittir (Çıkım ve ark., 2004).



Homosistein

Şekil 1.1: Homosisteinin kimyasal yapısı (Onat, 2002)

Total plazma homosisteinin yaklaşık % 80-90'ı disülfid köprüleriyle proteine bağlıdır. Bağlı olmayan homosistein türleri ise başlıca homosistein, homosistein-sistein, ve homosistein-homosistein (homosistin) disülfidleri şeklinde bulunur. Dolaşımdaki tüm homosisteinin yalnızca %1'i serbest homosistein şeklinde bulunur. Total homosistein (tHcy), bütün serbest ve bağlı biyokimyasal homosistein türlerinin toplamını tanımlar (Kocabalkan ve ark., 2000). Sağlıklı popülasyonda normal total homosistein oranı, çeşitli çalışmalarda açlıkta plazmada 5–15 $\mu\text{mol/L}$ arasında, serumda 13–18 $\mu\text{mol/L}$ arasında olduğu bildirilmiştir (Jacobsen, 1998). Vücuttaki homosistein transsülfürasyon, remetilasyon ve homosisteinin hücre dışına taşınması yollarından birini kullanarak metabolize olur.



Şekil 1.2: Homosistein metabolizması. Homosistein, 5-metil tetrahidrofolat varlığında B_{12} 'ye bağımlı metiyonin sentetaz (MS) tarafından metiyonine remetile olur. Daha sonra, 5,10-metilen tetrahidrofolat (CH_2THF), metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ile 5-metil tetrahidrofolata (CH_3THF) indirgenir. Karaciğer ve böbrekte homosistein remetilasyonu betain-homosistein metil transferaz (BHMT) aracılığıyla gerçekleşir. Metiyonin siklusunda, diyetle alınan metiyonin, metil transferaz için metil grubu vericisi olarak yardım eden S-adenozil metiyonin (SAM)'e dönüşür. Bu reaksiyonda oluşan diğer bir ürün, S-adenozil homosistein hidrolaz enzimi tarafından homosistein ve adenezine hidrolizlenen S-adenozil homosistein (SAH)'dir. Homosistein, ayrıca katabolik transsülfürasyon yoluna da girer. Bu yoldaki ilk enzim B_6 'ya bağımlı sistatyonin β sentetaz (CBS)'dir. Sistatyonin, B_6 'ya bağımlı CBS aracılığıyla sisteine dönüşür. Oluşan sistein daha sonra inorganik sülfata dönüşerek idrarla atılır (Temel ve ark., 2000).

2.3. Total Homosistein Düzeyini Etkileyen Faktörler

Genel olarak yükselmiş plazma tHcy konsantrasyonunun en sık edinsel sebepleri folat, B vitaminlerinin tam veya relatif eksikliği ve böbrek yetmezliğidir. Bu durum özellikle yaşlı kimseler için daha doğrudur. Yüksek tHcy seviyelerine sebep olan diğer klinik durumlar; malignensiler (meme ve over kanseri) ve psöriazisdir. Hipotiroidi ve birçok farmakolojik ajan da yükselmiş tHcy konsantrasyonundan sorumlu olabilir (Kocabalkan ve ark., 2000). Genetik bozukluklara bağlı olarak görülen eksiklikler genel popülasyonda veya vasküler hastalıklı kişilerde görülen yüksek seviyelerin muhtemelen sadece bir kısmının sebebi olarak düşünülmektedir. Homosisteinüriye en sık sebep olan genetik durum, yüksek tHcy seviyeleri ve prematüre kardiyovasküler hastalıklarla karakterize sistasyon β sentetaz eksikliğidir. Artmış tHcy' nin diğer genetik sebepleri; metiyonin sentetaz ve metilentetrahidrofolat redüktazın yokluğu ve bozukluğudur. Bu tablo popülasyonunun %15'inde görülen MTHFR'nin oldukça termomobil değişken bir formunu da içerir. Bu değişken form özellikle düşük folat seviyelerinin varlığında hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır. Yüksek riskli gruplar; yüksek tHcy seviyeleri olan kişiler, diğer risk faktörlerinin olmadığı durumlarda ateroskleroz için aile hikayesi olanlar ve arteriyel tıkalı hastalığı olanları içerir. Yüksek tHcy seviyesi; ilerlemiş yaş, aşırı sigara kullanımı, SLE, nikotinik asit, teofilin ve L-dopa gibi ilaçların kullanımı sırasında da görülebilir. Sigara pridoksal fosfat sentezini azaltır. Sigara içen kadınlarda % 23, erkeklerde ise %12 daha yüksek plazma homosistein düzeyi saptanmıştır (Kocabalkan ve ark., 2000).

METABOLİZMADAKİ GENETİK BOZUKLUKLAR
Transsülfürasyon bozuklukları Sistasyon β sentetaz eksikliği Remetilasyon bozuklukları Vitamin B ₁₂ transport bozukluğu Vitamin B ₁₂ koenzim sentez bozukluğu Metiyonin sentetaz bozukluğu 5, 10 MTHF eksikliği veya bozukluğu
VİTAMİN YETERSİZLİĞİ VE BESLENME BOZUKLUKLARI
Vitamin B ₁₂ eksikliği Vitamin B ₆ eksikliği
KRONİK HASTALIKLAR
Renal yetmezlik Hipotiroidi Akut lenfoblastik lösemi Hepatit Diyabet
İLAÇLAR
Metotreksat (Dihidrofolat redüktaz inhibitörü) Fenitoin veya karbamezepin (Folat antagonisti) Nitrik oksit (Metiyonin sentetaz inaktivatörü) Metilksantin (Vitamin B ₆ inhibitörü) Nikotinik asit
FİZYOLOJİK ETKİLER
Yaş Cinsiyet Menopoz Gebelik
YAŞAM TARZI
Kahve (Aşırı kullanımı) Alkol (Aşırı kullanımı) Sigara (Aşırı kullanımı)

Çizelge 2.1. Homosistein düzeylerini etkileyen ve hiperhomosisteinemiye neden olan faktörler (Medina ve ark., 2001)

2.3.1. Metabolizmadaki Genetik Bozukluklar

Homosistein metabolizmasının tek genli (monogenetik) bir eksikliği olan klasik homosisteinüri Carson, Neil, Gerritson ve arkadaşları tarafından 1962 yılında bildirilmiştir. Her 100.000 ile 200.000 doğumdan birinde meydana gelen bu nadir hastalık, sistatyonin β sentetaz, metilentetrahidrofolat redüktaz ve metiyonin sentetaz eksikliği ile ortaya çıkmakta ve otozomal resesif bir mekanizmayla kalıtsal olarak geçmektedir. Homosisteinürinin en sık sebebi homosisteinin sistatyonine dönüşümünü sağlayan CBS enziminde eksikliklerdir. CBS eksikliği genetik olarak heterojen olup homozigot CBS eksikliği daha sık görülür. Bu bireylerde, fibroblast ve lenfositlerdeki CBS aktivitesi normale göre % 0-10 oranında azalmıştır. Homozigot CBS eksikliği olan bireylerde transsülfürasyon yoluyla homosistein katabolizması bozulmuştur. Vücut sıvılarında metiyonin, homosistein ve prekürsörleri birikirken sistein ve sistin miktarı azalır (Dikmen, 2004).

Metiyonin miktarı normalde 0.45 mg/dL iken hiperhomosisteinüride 30 mg/dL'ye çıkmaktadır. İdrarda homosistein ve homosistein yanında metiyonin, metiyonin sülfoksit ve sistein gibi diğer sülfürlü amino asitler artar. Bu kişiler genellikle açken normal tHcy'e sahiptir. Fakat metiyonin yüklemesinden sonra tHcy seviyesi yükselebilir. Son genetik çalışmalarda CBS eksikliği için heterozigotluk vasküler hastalığı olan kişilerde seyrek olarak ortaya çıkar ve bu hafif genetik defekt hastalarda hiperhomosisteinemiye genellikle neden olmaz (Jacobsen, 1998).

Metilentetrahidrofolat redüktaz, folat metabolizmasında önemli bir enzimdir. İnsan MTHFR geni, kromozom 1p36.3'de lokalize olmuştur ve 656 aminoasitten oluşan MTHFR enzimini kodlar. MTHFR, 5,10-metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) irreversible olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür. 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. 5,10- metilen THF ise deoksiüridilata timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil tetrahidrofolata okside olmaktadır. MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon (en yaygın olanı C677T polimorfizmi) enzim aktivitesini azaltmaktadır. Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5-metil THF düzeyi azalmakta, 5,10-metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır. MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, enzimde inaktivasyona neden olarak, kardiyovasküler ve serebrovasküler

hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (Bailey ve ark., 1999) .

MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (Sitozin)'in →T (Timin)'e dönüşmesi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır. Bu durumda alanin yerine valin şifrelenir. Bu nokta mutasyonunun sonucu MTHFR aktivitesi azalır. Azalan MTHFR aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olur. MTHFR'nin C677T polimorfizminin, kardiovasküler hastalıklar, inme, nöral tüp defektleri, Down sendromu, meme ve endometrial kanser gibi hastalıklarda bir risk faktörü olduğu açıklanmıştır. C677T mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein seviyesi önemli oranda yükselir (Dikmen ve ark., 2004) .

MTHFR geninde belirlenen diğer bir mutasyon da, enzimi kodlayan gende 1298. nükleotid olan A (Adenin)'in → C (Sitozin)'e değişimi sonucu oluşan nokta mutasyonudur. Bu mutasyonda da diğer mutasyon tipinde olduğu gibi MTHFR aktivitesi azalır. A1298C polimorfizminin plazma homosistein artışını, C677T polimorfizmi kadar etkilemediği ileri sürülse de, bu polimorfizmin önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır. A1298C ve C677T mutasyonunun sıklığı A1298C ve C677T mutasyonlarının birlikte heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin normal homozigot olduğu durumlardaki enzim aktivitesinin %50-60'ı kadardır. MS enzim eksikliği de hiperhomosisteinemi nedenidir. MS genindeki mutasyonlar da tromboembolik olaylar için genetik bir risk faktörüdür. MS enzim geninde en yaygın olarak A2756G mutasyonu görülür. Bu genlerdeki mutasyonlar, farklı etnik gruplar ve coğrafik bölgeler arasında heterojen dağılım gösterirler (Bailey ve ark., 1999; Dikmen ve ark., 2004).

Homosisteinürinin klinik belirtileri mental retardasyon, iskelet anomalileri, ektopik lensler ve premature aterotrombotik hastalıklardır. Yeni doğanlarda, homosisteinüri semptomları gözlenmez. Ancak artan yaşla birlikte giderek belirginleşen göz, iskelet ve vasküler semptomlar ortaya çıkar. İlk birkaç yılda oküler lenslerde dislokasyon ve bunu takiben myopi, glokom ve retina dekolmanı tespit edilir. Osteoporoz, uzun kemiklerde incelme ve uzama, genu valgum ve sıklıkla göğüs,

vertebra ve ayak deformiteleri gibi iskelet anomalileri ortaya çıkar. Arteriyel ve venöz tromboza bağlı ciddi semptomlar nedeniyle erken yaşlarda ölüm görülebilir. Vakaların yarısından azında gözlenen mental retardasyonun da trombotik komplikasyonlardan kaynaklandığı sanılmaktadır. Bu bireyler, idrarları ile büyük miktarda homosistein atarlar ve plazmadaki total homosistein konsantrasyonları sağlıklı popülasyona göre 10-50 kat daha yüksek olup 50–500 $\mu\text{mol/L}$ arasındadır. Bu bireylerde görülen arterioskleroz ve aterosklerozun oldukça hızlı başlaması, total plazma homosisteini ile kardiovasküler hastalığın başlangıcı ve ilerlemesi arasında bir doz-zaman ilişkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, genel popülasyonda plazma homosisteininde hafif veya orta derecede yükselmenin ateroskleroza zemin hazırlayacağı hipotezi geliştirilmiştir. Bu hipotez, çok basit bir tedavi sonunda, özellikle oral B grubu vitamin verilenlerde plazma homosisteininin anlamlı oranda düşmesiyle ilgi odağı haline gelmiştir (Temel ve ark., 2000).

Yeni doğanlarda, sadece sistatyonin β sentetaz eksikliğinin taranmasının pratik değeri vardır. Plazmada metiyonin artışını saptamak için *Guthrie testi* yapılır. Pozitif test sonuçlarının dikkatli yorumlanması gerekir. *Guthrie* testinin pozitif olduğu kişilerde, metiyonin artması geçici olabilir veya karaciğer hasarı, tirozinaz ya da hepatik S-adenozil metiyonin sentaz eksikliğinden ileri gelebilir. Geçici hipermetiyoninemi insidensi, yenidoğan süt preparasyonlarına daha az protein eklenmesi sonucunda azalmıştır. Yeni doğanlarda tarama yapılmazsa, semptomların ortaya çıkmasına veya idrar testi yapılınca kadar homosistinürinin tanınma ihtimali yoktur (Kocabalkan ve ark., 2000). Enzim defekti tam olmayan hastalarda enzimi aktive etmek için yüksek doz piridoksin verilmesiyle biyokimyasal ve klinik cevap alınır. Enzim defekti tam olanlarda diyetteki metiyonin miktarı kısıtlanmalı ve sistin eklenmelidir (Dikmen ve ark., 2004).

2.3.2. Kronik Hastalıklar

Bazı hastalıklar homosistein metabolizmasını etkilemektedir. Kronik böbrek yetersizliği olan hastalarda kreatinin yükselmesine bağlı olarak plazma homosistein konsantrasyonu ortalamanın 4 kat üstüne çıkabilir. Yine hiperhomosisteinemiye hipertroidi, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, kronik gastirit, orak hücre anemisi ve

çeşitli kanser tipleri arasındaki ilişki ortaya konmuştur. *Helicobakter pylori* homosistein metabolizmasında rol oynayan vitamin B₁₂, B₆ ve folik asitin emiliminin azalmasına neden olduğundan homosistein metilasyonunun azalmasına ve dolaşımdaki homosisteinin artmasına neden olur. Hepatitli hastalarda da homosistin düzeyi yüksektir. Metiyonin metabolizmasının bir ara ürünü olan homosisteinin sentezinde ve metabolizmasında karaciğer merkezi bir rol oynar. Metiyoninin büyük çoğunluğu bu organda metabolize olur (Dikmen ve ark., 2004). Karaciğer, metiyonin ve homosistein metabolizmasında görev alan genlerin ekspresyonunda özel yere sahiptir. Homosisteinin metabolizmasında rol oynayan MAT 1A sadece karaciğerde eksprese oluyorken, BHMT ve CBS'in büyük çoğunluğu karaciğerde sentezlenmektedir. Bu nedenlerle karaciğer hasarı oluştuğunda homosistein metabolizmasında önemli değişiklikler meydana gelmektedir (Canoruç ve ark., 2006).

2.3.3. Vitamin yetersizliği ve beslenme bozuklukları

Homosistein metabolizması için gerekli olan kofaktör görevi yapan ve besinle alınan vitamin B₁₂, vitamin B₆ ve folat eksikliği hiperhomosisteinemiye neden olabilir. Normal kişilerde serum vitamin B₁₂, folat, vitamin B₆ konsantrasyonları ile plazma homosistein konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki vardır (Eikelboom ve ark, 1999).

2.3.4. Fizyolojik etkenler

2.3.4.1. Yaş ve Cinsiyet

Birçok çalışma tHcy ve yaş arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Kardiyovasküler hastalıklarla birlikte olan veya olmayan yaşlı popülasyonda plazma tHcy seviyeleri artar. Ayrıca folat, vitamin B₆ ve vitamin B₁₂ anormalliklerinin yaşlı kimselerdeki artmış tHcy düzeyinin patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Sağlıklı orta yaş ve yaşlı kişilerde plazma vitamin B₁₂ ve folat düzeyi, plazma tHcy'nin majör belirleyicisi olduğunu gösterir.

Çoklu vitamin kullananlar kullanmayanlardan daha düşük homosistein seviyesine sahiptir. Total homosistein ile vitamin B₆ ve folatın günlük diyetle alımıyla ve vitamin B₆, vitamin B₁₂, folatın plazma konsantrasyonları arasında doğrusal olmayan güçlü bir ilişki olduğunu gösterir. Ayrıca, standart laboratuvar kriteriyle çok yaşlı

kişilerdeki folat ve vitamin B₁₂ seviyeleri normal sınırlarda olanlarda, subklinik ve doku seviyesinde eksikliklerin olduğu yükselmiş tHcy metabolitlerinin ve metilmalonik asit (MMA) seviyeleri ile kanıtlandığı öne sürülmektedir. Bu iki maddenin (tHcy+MMA) doku seviyesi konsantrasyonlarının folat ve vitamin B₁₂ eksikliğinin daha sensitif ve spesifik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Elias ve ark, 2005).

Yaşlı kişilerdeki vitamin B₁₂ eksikliğinin sebepleri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Pernisyöz anemi gibi otoimmün olaylar küçük bir kısmında rol oynamaktadır. Muhtemel mekanizmalar; diyetle eksik alım, barsaktaki bakterilerin fazla çoğalması ve besinlerdeki vitamin B₁₂'nin serbest kalmasındaki bozukluk, azalmış asit ve pepsin sekresyonuyla birlikte olan gastrik atrofidir. Yaşlı kişilerde, sistatyonin β sentetazın yaşa bağlı azalması ve homosistein mekanizmasındaki diğer enzimlerdeki anormallikler plazma tHcy'sinin artmasına neden olur. Böbrek fonksiyonlarının yaşla birlikte giderek bozulması da, yaş ve yüksek plazma tHcy seviyeleri arasındaki korelasyonu göstermede yararlı olabilir (Elias ve ark., 2005) .

Östrojen, total homosistein konsantrasyonunu beslenme ve kas kitlesinden bağımsız olarak düşürdüğü için, erkeklerde homosistein kadınlara göre 1 μ mol/L daha yüksek olabilir.

2.3.4.2. Menopoz ve Homosistein

Postmenopozal kadınlarda plazma tHcy seviyeleri, premenopozal kadınlarla karşılaştırıldığında her zaman olmasa da genellikle yüksektir. Premenopozal kadınlarda görülen düşük tHcy seviyeleri, transülfürasyon veya demetilasyon yollarında metiyoninin daha etkili olmasına bağlı olabilir. Yüksek plazma östrojen seviyeleri de bu olgularda görülen düşük plazma tHcy'sinin sebebi olabilir. Premenopozal kadınlardaki total plazma homosistein ile serum 17- β estradiol arasında güçlü ve negatif bir korelasyon vardır. Postmenopozal kadınlardaki yüksek tHcy seviyeleri, menopozdan sonra görülen istenmeyen kardiyovasküler olayların sıklığındaki artışı da izah edebilir (Kocabalkan ve ark., 2000). Sağlıklı pre ve postmenopozal kadınlarda tek başına progesteron veya östrojen-progesteron kombine hormon replasman tedavisi plazma tHcy seviyelerini düşürür ki, bu da risklerin azaltılmasına yardımcı olabilir (Kocabalkan ve ark., 2000) .

2.3.4.3. Gebelik ve Homosistein

Plazma homosistein konsantrasyonu normal olarak gebelikte azalır. İlk trimesterde azalma gösterir, ikinci trimesterde minimum seviyeye iner, gebeliğin sonuna doğru hafif artarak ilk trimester değerine ulaşır. tHcy konsantrasyonundaki bu azalmadan sorumlu mekanizma bilinmemekle birlikte fetus tarafından metiyoninin artmış kullanımı olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda in vivo olarak ratlarda yapılan çalışmalarda; östrojen ve kortizol tedavisinin tHcy konsantrasyonunda azalma yarattığı görülmüştür. Bu hormonların gebelikte artması, tHcy konsantrasyonunda ki azalmayı açıklayabilir. Bunların dışında Refsum ve arkadaşları gebelikte albümin seviyesinin düşmesi, Chesley ve arkadaşları gebelikte B₁₂ vitamini ve folat seviyesi düşüklüğü, Obwegeser ve arkadaşları fizyolojik gebelik hemodilüsyonu ile ilişkilendirmişlerdir (Kılıççı, 2004).

Hiperhomosisteineminin gebelik üzerine etkileri geliştiği döneme göre değişir. Konsepsiyon ve implantasyon sırasında ise fetal kromozomal anomaliler, birinci trimesterde ise konjenital anomaliler ve tekrarlayan erken gebelik kayıpları, ileri gebelik haftalarında ise plesental vaskülopati (plesenta dekolmanı, plesental infarktlar) şeklinde görülür (Kılıççı, 2004) .

2.3.5. Yaşam Tarzı

2.3.5.1. Alkol Kullanımının Homosistein Düzeylerine Etkisi

Alkol bağımlılarında serum homosistein düzeylerinin normal popülasyona oranla daha yüksek olduğu bilinmektedir. Homosisteinin metiyonine dönüşümü homosistein düzeylerini etkilenmesi açısından önemli bir reaksiyondur ve bu yolaktaki homosisteinin metabolizması, aktif olarak içmeye devam eden alkol bağımlılarında yetersizdir. Kronik alkol tüketiminin homosistein metabolizması üzerinde olumsuz etkileri olduğu ile ilgili ilk hipotez Barak tarafından ortaya atılmıştır.

Alkolün homosistein metabolizmasına olan etkilerini araştıran çalışmalarda; farelere alkol verildiği zaman homosistein metabolizmasında ana rol oynayan metiyonin sentetaz enzim aktivitesi düştüğü, betain-homosistein metil transferaz enziminin

aktivitesinin arttığı görülmüştür. Alkol alımının metiyonin sentetaz enziminin aktivitesini azaltmasından alkolün yıkımı ürünlerinden biri olan asetaldehitin sorumlu olduğu belirtilmiştir. Bu şekilde homosistein yıkımı azalmakta ve hiperhomosisteinemi oluşmaktadır. Alkol bağımlılığı olan hastalardaki homosistein düzeyleri yüksekliği birçok çalışmada gösterilmiştir. Homosistein, kronik alkol kullanımında folat eksikliği ile birlikte betain üzerinden BHMT enzimi aracılığı ile yıkılır. Betain, kolin oksidaz enzimi aracılığı ile kolinden üretilen, ağırlıklı olarak karaciğerde depolanan ve 3 aylık süre sonunda deposu boşalan bir maddedir. Alkol bağımlılarında folat yokluğunda BHMT enzimi böylece artmakta ve homosistein düzeyi bir süre daha normal sınırlarda kalabilmektedir. Günümüzde betainin ve BHMT'nin alkol bağımlılığındaki önemi konusunda henüz fazla bilgi olmamasına rağmen yapılan çalışmalarda kolin oksidaz enzim eksikliği nedeniyle betain üretimi az olan kişilerin etanolün zararlı etkilerine daha duyarlı oldukları belirtilmektedir. Betainin hiperhomosisteinemi tedavisindeki yeri ile ilgili veriler henüz hayvan çalışmaları düzeyindedir. Kronik alkol tüketimi sağlanarak serum homosistein düzeyleri yükseltile Wistar fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada; bu farelere düzenli betain verilmesi ile homosistein düzeylerinin düşürüldüğü saptanmış ve betainin hiperhomosisteinemi tedavisinde potansiyel terapötik bir madde olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Uz ve ark., 2006).

B₁₂ ve B₆ vitaminlerinin alkol bağımlısı olan hastalardaki plazma seviyelerinin homosistein düzeylerine olan etkileri incelendiğinde bu vitaminlerin alkol bağımlısı olan hastalarda çoğu zaman normal değerlerde bulunduğu ve plazma homosistein konsantrasyonu ile ilişkili olmadığı saptanırken B₆ vitaminin özellikle bira ve kırmızı şarapta yüksek miktarlarda bulunduğu ve bu vitaminin ılımlı alkol tüketicilerinde homosistein düzeylerini azaltabileceği bildirilmiştir. Yoğun alkol kullanımının homosistein düzeyleri üzerindeki etkisini araştıran birçok çalışmada alkol tedavisi süresince alınan ölçümler, plazma homosistein seviyelerinde sürekli bir azalma olduğunu, 3-7 gün içerisinde normal değerlerine indiğini göstermiştir. Cravo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada plazma homosistein düzeyleri ile kronik alkol kullanımı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Alkol kullanımı olan ve olmayan iki grubu homosistein düzeyleri açısından karşılaştırdıklarında alkol kullanımı olan grupta alkol kullanımı olmayan gruba göre homosistein düzeylerinin 2 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Alkol bağımlılarındaki homosistein düzeyleri ile ilgili yapılan bir

çalışmada; alkol bağımlısı olan hastaların detoksifikasyon ünitesine kabul edildikleri ilk gün yapılan homosistein ölçümlerinde, hastaların %59.3'ünün homosistein düzeyinin normal serum düzeyi olan 5-15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üstünde olduğunu saptanmıştır. İlk homosistein ölçümü ortalaması; 18.86 ± 10.41 olarak belirlenmiş olup bu değer normal serum değerlerinden yüksek olarak saptanmıştır (Uz ve ark., 2006).

Alkol bağımlılığında homosistein düzeylerinin yüksekliği ile ilgili yapılan çalışmalara karşın alkolü ılımlı miktarlarda tüketenlerdeki homosistein düzeylerini araştıran çalışmalardaki sonuçlar çelişkilidir. Özellikle 2 alkollü içecek/gün alkol kullanmanın homosistein düzeylerini düşürebileceği belirtilmektedir. Dixon ve arkadaşlarının ılımlı miktarlarda alkol tüketen (100 g/hafta) ve hiç alkol tüketmeyen toplam 416 obez hastanın homosistein düzeylerini incelemişler ve ılımlı miktarlarda alkol kullanan hastalardaki homosistein düzeylerini belirgin olarak düşük bulmuşlardır. ılımlı miktarlarda kırmızı şarap tüketiminin beyaz şarap, bira tüketimine oranla homosistein düzeyini daha fazla düşürerek kardiyovasküler ve diyabetik hastalıklar açısından koruyucu etki oluşturabileceği düşünülmüştür (Uz ve ark., 2006) .

2.4. Hiperhomosisteineminin Etkileri ve Hastalıklarla İlişkisi

Hiperhomosisteinemi damar duvarında kompleks değişikliklere neden olmaktadır. Periferik sirkülasyonda bu değişiklikler oksidatif stres, tümör nekroz, faktör alfa ve nitrik oksid sentezini indükleyerek proinflamatuvar etkiler ile endotelial disfonksiyon şeklindedir. Antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalması süperoksit anyonların enzimatik etkisinde artma yapar, bu anyonlar multipl reaktif oksijen ve reaktif nitrojen ürünlerinin prekürsörüdür. Vasküler hasarı endotelial hücrelerde sitotoksik etki ve nöronal oksidatif hasar yaparak göstermektedir (Weissa ve ark, 2002).

Deneyisel incelemeler homosisteinde artmanın ateroskleroz gelişimine zemin hazırladığını göstermektedir. Ateroskleroz oluşumunu hızlandıran faktör burada serbest radikal oluşumuna neden olduğu gibi, N-Metil D Aspartat (NMDA) aktivasyonu ile eksitotoksikite yapmış olur. İntrasellüler Ca artımı, proapoptotik proteinlerde artma ile apoptozise zemin hazırlamış olur (Thambyrajah ve ark., 2000).

Homosistein artımı endotelial disfonksiyon yanında, prokoagulan aktiviteyi arttırma, platelet aktivasyonu ve trombus oluşumu gibi etkilere sahiptir. Endotelial

membranlarda fibrin birikimi ve intimal hasar gelişir. Endotel hasara bağlı vazodilatasyonda azalma, otoregülasyonun azalmasına neden olur ve enfarkt gelişmesine zemin hazırlar. Ayrıca hiperhomosisteinemi ateromatöz plak oluşumunda intimal makrofaj ve hücre birikimine zemin hazırlar, doku tamirinde rol oynayan DNA, RNA ve değişik proteinlerin remetilasyonunun artmasına neden olarak fonksiyonlarını bozar ve doku hasarına neden olur (Weissa ve ark., 2002).

Alzheimer hastalarında serum total homosistein artımı özellikle de hipokampal nöronlarda ölüme neden olan apoptozis ve nörofibriler patolojinin gelişimini hazırlayan bazı proteinlerin teşekkülünde rol oynamaktadır. Homosistein artışının bazı proinflamatuvar sitokinlerin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Endotelial hücrelerde interleükin artması, vasküler inflamasyon ve aterogenezisin oluşumuna önemli katkılar yapar (Karaman, 2006).

Homosistein artışı endotelial hücrelerde gelişimi durdurma, hücre yenilenmesini engelleme, hücrel metilasyonu değiştirme gibi etkileriyle doğrudan toksisiteye neden olur. Prokoagulan aktiviteyi doku faktörleri ve daha çok faktör V aktivitesinde artma ile yapar. Hücre yüzeyinde trombomodilin inhibisyonu, protein C seviyelerinde ve doku plazminojen aktivatörlerinde azalma, annexin II gibi endotelial hücre reseptörlerinde azalmalar olur. Endoplazmik retikülum (ER)'da sentez edilen proteinlerin salınımını ve agregasyonunu engeller. ER'da yüksek konsantrasyonlarda moleküler belirleyici proteinler vardır. Bu belirleyiciler proteinlerin düzgün bir şekilde sentezini kontrol eden ürünlerdir. Homosistein artımı ile bu proteinlerin salınımını artar ve yanlış bağlanmalarına neden olur ve değişik yan ürünler ortaya çıkar (transmembran protein kinaz tip-I, aktive edici transkriptin faktör 6 gibi). Lipit biyosentezi bozulur lipit komponentlerinin salınımı artar. Lipit yoğunluğu aterosklerotik patogeneze sorumludur (Thambyrajah ve ark., 2000).

Hiperhomosisteinematik ratlarda lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü olan malondialdehidin (MDA) artmış olduğunu tespit etmişlerdir. MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir. Artan homosistein miktarının, lipit peroksidasyon oluşumunu önleyen

ve antioksidan enzimlerden biri olan glutatyon peroksidazın (GSH-Px) aktivitesini azaltarak oluşturmaktadır. Gilad ve arkadaşları tarafından homosisteinin peroksinitritlere karşı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, homosisteinin hem GSH-Px aktivitesini inhibe ettiği hem de bu enzimin m-RNA' sını önemli olarak azalttığı bildirilmiştir. Ovrebo ve Svardal, ratlarda plazma homosistein miktarı ile plazma sistein ve glutatyon düzeyleri arasında negatif bir ilişkinin var olduğunu belirtmişlerdir (Temel ve ark., 2000). Yamamoto ve arkadaşları, endotel hücre yüzeyine hücre dışı süperoksit dismutazın (SOD) bağlanması üzerine homosisteinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, homosisteinin SOD etkinliğini azalttığını ifade etmişlerdir. Homosistein, SOD'ın endotel hücre yüzeyine bağlanmasını sağlayan endotelyal heparan sülfat proteoglikanını bozarak arteriyel endotel hücre yüzeyine SOD'ın bağlanmasını engellemektedir. Yüksek miktarda homosistein fibroblastarca ortama verilen SOD ekspresyonunu azaltmaktadır. Böylece homosistein endotel hücrelerinin özellikle süperoksit radikali olmak üzere serbest radikallere karşı savunma yeteneğini azaltmış olur (Kocabalkan ve ark., 2000).

Wyse ve arkadaşları homosistein uygulamasının ratlarda katalaz aktivitesinde azalmalara neden olduğunu tespit etmişlerdir (Temel, 2000). Endotel tarafından salınan birçok vazodilatör madde içerisinde en önemlilerinden biri nitrik oksittir (NO). Homosisteinin otooksidasyonu sırasında oluşan süperoksit ve hidrojen peroksit gibi potent reaktif oksijen molekülleri endotel üzerine oksidatif stres oluşturarak endotel hasarına yol açmaktadır. Süperoksit radikali NO'ı inaktive ederek onun etkinliğini azaltmaktadır. Hidrojen peroksidin NO yapımını stimule ettiği bilinmektedir. Ancak sonuçta NO yapımının azalmasına neden olan endotel hasarına yol açtığından NO azalır (Weissa ve ark., 2002).

2.4.1. Homosistein ve Kronik Böbrek Yetmezliği

Böbrek fonksiyonları plazma homosistein konsantrasyonu için önemli bir belirleyicidir ve azalan böbrek rezervi ile homosistein düzeyleri arasında yakın bir ilişki vardır. Böbrek yetmezliği gelişen hastalarda homosistein düzeyleri normal şahıslara oranla en az 3-4 kat artmakta normal popülasyonda %5-7 olan hiperhomosisteinemi prevalansı %85-90'a ulaşmaktadır (Friedman ve ark., 2001). Diyaliz tedavisi ile izlenen hastalarda hiperhomosisteinemiye geniş serili bir çalışmada Bostom tarafından dikkat

çekilmiş ve bu hastalarının % 83'ünde hiperhomosisteineminin saptandığı gösterilmiştir. Kronik periton diyalizi ile izlenen hastalarda da total homosistein düzeylerinin hemodiyaliz hastalarına göre daha düşük düzeylerde olmakla birlikte belirgin olarak yükseldiği gösterilmiştir (Friedman ve ark., 2001). Üremide homosistein metabolizmasında yer alan diğer aminoasit ve ara ürünler de etkilenmektedir. Hastaların metiyonin düzeyleri normal, buna karşın sistatyonin ve sistein gibi transsülfürasyon metabolitlerinin düzeyleri yüksek bulunmaktadır. S-adenozil metiyonin (Ado-Met) ve S-adenozil homosistein (Ado-Hcy) gibi ara ürünlerin plazma konsantrasyonlarının arttığı, Ado-Hcy'deki artışın daha belirgin olduğu ve buna bağlı olarak Ado-Met/Ado-Hcy oranının düştüğü gösterilmiştir. Aynı patern eritrositlerde de gösterilmiş, üremik hastalarda artmış plazma ve eritrosit homosisteininin eritrositlerde toksik bir bileşen olan Ado-Hcy birikimine neden olduğu saptanmıştır. Sistein-homosistein düzeylerinin böbrek yetmezliği olan hastalarda kreatinin düzeyleri ile korele olarak arttığı bilinmektedir (Bulucu ve ark., 1998).

Plazma homosistein konsantrasyonu ile kreatinin düzeyi arasında pozitif, kreatinin klirensi ile negatif korelasyon olduğu da gösterilmiştir. Buna karşın hiperhomosisteinemi ile primer böbrek hastalığı, diyaliz modalitesi, diyaliz süresi ve diyaliz yeterliliği arasında ilişki saptanamamıştır. Hiperhomosisteineminin ateroskleroz gelişimi ve kardiyovasküler morbidite/mortalite açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (Bakkaloğlu, 2002). Homosisteinin ateroskleroz patogenezindeki yerine ilk kez homosistinürlü bir hastaya ait otopside aterosklerozis varlığını gösteren McCully dikkat çekmiş ve devam eden araştırmalarla hiperhomosisteineminin sağlıklı populasyon ve kronik böbrek yetmezliği hastaları için kardiyovasküler risk faktörü olduğu kesinleşmiştir. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda % 85-90'a varan hiperhomosisteinemi prevalansı ve diğer pek çok predizpozan faktör nedeniyle aterosklerotik hastalıklar açısından oldukça yüksek risk söz konusudur. Total homosistein düzeyindeki 1 $\mu\text{mol/l}$ lik artış, üremik hastalarındaki vasküler riski %1 arttırmaktadır. Üremik çocuk hastalarda da hiperhomosisteinemiye bağlı vasküler komplikasyonlar gelişebilmektedir (Bakkaloğlu, 2002)

2.4.1.1.Kronik Böbrek Yetmezliğinde Hiperhomosisteineminin Mekanizması:

Tam olarak aydınlatılamamakla birlikte çeşitli hipotezler üzerinde durulmaktadır. Defektik renal klirens veya metabolizma idrarla homosistein klirensinin minimal (kreatinin klirensinin sadece % 0.3'ü veya günde 3-lmol/l) oluşu nedeniyle, renal yetmezliğe bağlı azalmış homosistein ekspresyonunun hiperhomosisteinemiden sorumlu tutulamayacağı düşünülmektedir. Kronik böbrek yetmezliğinde homosisteinin tübüler "uptake"inin azalabileceği ve üremik hiperhomosisteinemide tübüler hücrelerde aktif homosistein katabolizmasının bozulmasının neden olabileceği öne sürülmüştür. Ancak bu güne dek insanlarda bunu destekleyen kesin kanıt elde edilememiştir (Bakkaloğlu,2002).

Tüm vücut homosistein metabolizmasındaki sistemik bir bozukluk böbrek yetmezliğinde hiperhomosisteinemi için temel mekanizmanın defektif homosistein remetilasyonunu ve transmetilasyonu olduğu düşünülmektedir. Patogenezi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte üremik toksinlerin direkt inhibitor etkileri ve üremide değişmiş folat metabolizması potansiyel neden olarak düşünülmektedir. Üreminin eritrosit, plazma ve tüm vücutta biriken homosistein ve Ado-Hcy'nin transmetilasyon reaksiyonlarını inhibe ettiği de bilinmektedir (Friedman ve ark., 2001, Bakkaloğlu, 2002). Böbrek yetmezliğinde hiperhomosisteineminin böbrek dışı veya sistemik kaynaklı olabileceği yönündeki diğer çalışmalarda vitamin ve/veya substrat eksiklikleri, genetik bozukluklar, değişmiş total vücut homosistein "turnover"i araştırılmaktadır. Bu konuda en çok çalışılan vitaminler folat, kobalamin ve pridoksindir. Üremik hastalarda düzeyleri genellikle normal şuurlarda olduğu halde, hiperhomosisteinemi önlemede yetersiz kalmaktadırlar. Folat, plazma homosistein konsantrasyonunun en önemli determinantıdır. Böbrek yetmezliği olan hastalarda sadece folatla yapılan tedavilerle plazma homosistein konsantrasyonlarında düşüş elde edilmesi de bunu desteklemektedir (Bakkaloğlu,2002).

Bunların ötesinde genetik yapı da plazma homosistein düzeyi için önemli bir belirleyicidir. Homosistein metabolizmasında yer alan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizm homosisteinin plazma düzeyini belirlemektedir.

Çeşitli renal replasman tedavileri ile izlenen hastalarda da plazma homosistein düzeylerinin MTHFR C677T mutasyonundan etkilendiği, bu mutasyonu

homozigot olarak taşıyan hemodiyaliz, periton diyalizi ve renal transplantasyon alıcılarında hiperhomosisteineminin agreve olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda hastaların folat almıyor olması veya sadece düşük dozların verilmesi dikkat çekicidir. Bunun aksine günde 2 mg folat ilavesi ile MTHFR homozigot olan hastalarda plazma homosistein düzeylerinin etkilenmediği de gösterilmiştir. Renal transplant vericilerindeki 677T alelinin alıcıda hiperhomosisteinemi üzerine etkisinin olmadığı da belirtilmiştir (Friedman ve ark., 2001).

Son yıllarda homosistein metabolizmasındaki rolü tam olarak aydınlatılamamakla birlikte MTHFR geninde ekzon 7'de yeni bir mutasyon tanımlanmıştır. MTHFR A1298C polimorfizmi ile enzim aktivitesi normalin %60'ına indiği halde hiperhomosisteinemi veya folat eksikliği saptanamamaktadır. Bununla birlikte 677T ve 1298C MTHFR birleşik heterozigotlarında hiperhomosisteinemi ve folat eksikliği görülmektedir. Renal transplantasyon uygulanan 733 hastada MTHFR A1298C polimorfizminin plazma total homosistein ve folat düzeylerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada birleşik heterozigotların plazma homosistein düzeylerinin artmadığı, buna karşın bu hastalarda folat düzeyinin düşük olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada 677TT (1298AA) genotipinin plazma homosistein düzeylerini etkilediği ve bu hastaların plazma folat düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiştir (Bakkaloğlu,2002).

2.4.1.2. Renal Transplantasyon Uygulanan Hastalarda Hiperhomosisteinemi

Renal transplantasyon uygulanan hastalarda açlıkta ve metiyonin yüklemesi sonrasında hiperhomosisteineminin gelişme prevalansının %50–60 olduğu bildirilmiştir. Artmış plazma homosistein konsantrasyonunun azalan renal fonksiyonlarla paralel olarak arttığı belirtilse de bu konu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Bulucu ve ark., 1998).

Arnadottir ve arkadaşlarının (1999) transplantasyondan önce ve sonra plazma homosistein düzeylerini değerlendirdikleri bir çalışmada, transplantasyonu takiben glomerül filtrasyon hızı pretransplant döneme göre çok belirgin ölçüde yükseldiği halde, plazma homosistein düzeyinde beklenen ölçüde düşüş olmadığı saptanmıştır. Bunun aksini gösteren çalışmalar da vardır. Stein ve arkadaşları (2001) stabil renal

transplantasyon alıcılarında total homosistein düzeyini sağlıklı kontrollere oranla 2 kat, metabolitlerini ise 2-6 kat yüksek bulmuşlardır. Ayrıca bu metabolitlerin düzeyleriyle serum kreatinin düzeyi arasında anlamlı ilişki saptamış olmaları dikkat çekicidir. Yine aynı çalışmada akut ve kronik rejeksiyon atakları ile artmış plazma total homosistein düzeyi veya artmış metabolitlerinin düzeyleri arasında herhangi bir ilişki olmadığı da gösterilmiştir. Benzer şekilde 5 yıl süreyle izlenen renal transplantasyon alıcılarında hasta ve graft survisinin, graft fonksiyonunun ve histopatolojinin, pre veya posttransplant serum homosistein düzeylerinden etkilenmediği gösterilmiştir(Arnadottir, 1999).

Normal populasyon ve üremik hastalarla benzer şekilde renal transplant alıcılarında da hiperhomosisteineminin kardiyovasküler hastalıklar açısından potansiyel bir risk faktörü olduğuna ilişkin çalışmalar vardır. Bu hastalarda aterosklerotik kardiyovasküler hastalık mortalitesi iki kat, kardiyovasküler hastalık insidansı dört kat artmıştır. Ducloux ve arkadaşları (1998) , öyküsünde geçirilmiş kardiyovasküler hastalık olan renal transplantasyon alıcılarında plazma homosistein düzeyinin böyle bir öyküsü olmayan transplantlı hastalara göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Günter ve arkadaşları (2001) ise yeni saptanan veya öyküsünde kardiyovasküler hastalık olan 17 renal transplant alıcısı ile kardiyak sorunu olmayan 33 hasta arasında plazma total homosistein ve metabolitlerinin düzeyleri açısından fark olmadığını göstermişlerdir. Renal transplant alıcılarında gözlenen daha düşük kardiyovasküler hastalık oranlarının, diyaliz tedavisi ile izlenen hastalara oranla daha düşük homosistein düzeylerine sahip olmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Bakkaloğlu, 2002).

Renal transplantasyon alıcılarında homosistein düzeylerinin MTHFR TT genotipi ile ilişkisi çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. 189 renal transplantasyon alıcısının dahil olduğu bir çalışmada homozigot genotipi olan hastalarda anlamlı ölçüde yüksek plazma homosistein düzeyleri saptanmıştır. Kreatinin klirensi ve plazma folatın yanı sıra MTHFR 677 TT genotipinin de, bu hastalarda plazma homosistein konsantrasyonu için önemli bir belirleyici olduğu vurgulanmıştır. Diğer bir çalışmada 733 renal transplantasyon alıcısında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin homosistein ve folat düzeyleri üzerine etkisi değerlendirilmiş ve 677 TT (1298AA) genotipine sahip hastalarda homosistein düzeylerinin yüksek ve folat

düzeylerinin düşük olduğu, ayrıca birleşik heterozigot genotipinde olanlarda plazma folatın düşük düzeylerde olduğu saptanmıştır. Farklı MTHFR genotipleri ve hiperhomosisteineminin hasta ve graft sürvisine etkisi de araştırılmıştır. Ortalama iki yıllık izlemde 189 renal transplantasyon alıcısında plazma homosistein düzeyi ve MTHFR genotiplerinin hasta ve graft sürvisine etkisinin olmadığı, sadece kreatinin düzeyinin graft sürvisini etkilediği gösterilmiştir (Bulucu, 1998). Siklosporin A kullanımının hiperhomosisteinemi için ek bir risk olduğunu savunan çalışmaların aksine, siklosporin içeren ve içermeyen protokollerle tedavi edilen renal transplantlı hastaların homosistein düzeyleri arasında fark olmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Sikloporin kullanımı ile homosisteinin yanı sıra metabolitlerinin düzeylerinin de etkilenmediği gösterilmiştir (Bakkaloğlu,2002). Renal transplantasyon alıcılarında total homosistein ve metabolitlerinin düzeylerinin düşürülmesi ve bu yolla kardiyovasküler hastalıklardan daha etkin korunma sağlanabilmesi ve uzun dönem başarının artırılması konusunda araştırma ve çabalar sürmektedir (Bakkaloğlu,2002).

2.4.2 Hiperhomosisteinemi ve Kardiyovasküler Hastalıklar İle Bağlantısı

Hafif hiperhomosisteinemi ve kardiyovasküler hastalıklar (KVH) arasındaki ilişki sayısız retrospektif vaka-kontrol çalışmalarında belgelerle bildirilmiştir. 1976'da plazma total homosistein testlerinin gelişiminden önce Wilchen ve Wilchen metiyonin yüklemesinden 4 saat sonra kontrollerle karşılaştırılan, kronik arter hastalıklı şahısların plazmalarında homosistein-sistein daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu bildirmişlerdir. Kang ve arkadaşları da koroner arter hastalıklı bireylerde proteine bağlı homosisteinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. İlk çalışmalarında bazal plazma total homosistein ölçümü yapan Israelsson ve arkadaşları 55 yaşından önce myokardial infarktüs geçiren erkeklerde hiperhomosisteinemi insidensini %24 olarak bulmuşlardır. Boushey ve arkadaşları KVH ile homosisteinin ilişkisini gösteren ve plazma homosisteininin bir determinantı olarak folatla ilgili 11 çalışmanın bir metaanalizini yapmıştır. Artan total homosistein KVH için bağımsız bir artırıcı risk faktörü olarak belirlenmiş ve odds oranı erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 1,6 ve 1,8 olarak bulunmuştur. Total homosistein ve serum folatı arasında kuvvetli bir zıt korelasyon bulunmuştur. Son zamanlarda Graham ve arkadaşları 750 vaka ve 800 kontrolün

katıldığı multimerkezli Avrupa çalışmasına dayanarak, total homosistein artışının KVVH için sigara içimi ve hiperlipidemi kadar kuvvetli bir bağımsız risk faktörü olduğunu göstermiştir (Ragone, 2002).

Hiperhomosisteinemi ve KVVH ilişkisini kurmaya yönelik prospektif çalışma sonuçları karmaşıktır. Amerikada, Stampfer ve arkadaşları kontrollerle karşılaştırılan KVVH'lı hastalarda daha yüksek plazma total homosisteini bulmuşlardır (11.1-40'a karşı 10.5- 2.8 $\mu\text{mol/L}$); ayrıca myokard infarktüsü için nisbi risk 95. persentilde erkekler için 3.1 ve bir uyarı eşiği etkisi tespit edilmiştir. Arnesen ve arkadaşları bir diğer çalışmada plazma total homosisteininin, koroner arter hastalıkları için uyarı eşiği olmayan bir konsantrasyonla bağımsız bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir. Son zamanlarda plazma tHcy'nin kronik arter hastalıklı Norveçli hastalarda mortalitenin kuvvetli bir habercisi olduğu bildirilmiştir. Ancak Alftan ve Evans tarafından gerçekleştirilen prospektif çalışmalarda bu görüşün aksi savunulmuştur (Kocabalkan ve ark., 2000).

Homosisteinin kardiyovasküler hastalıktaki etkisi tartışmalı olduğu için homosisteinin vasküler hastalıklara neden olduğuna dair daha fazla veriye ve etki mekanizmasının açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Kozal bir faktör olarak tHcy'in etkisini açıklayan bir mekanizma gösterilmelidir. İleri sürülen mekanizmalarda, tHcy'in endotelial disfonksiyona, düz kas proliferasyonuna, ekstrasellüler matriks proliferasyonuna, lipid oksidasyonuna, sitotoksositeye veya koagülasyon ve trombositlere etkisi sonucu vasküler hasara neden olabileceği ileri sürülmüştür (Kocabalkan ve ark., 2000).

Homosisteinin aterogenez, ateroskleroz ve trombozda oynadığı roller bilinmemesine rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalar hiperhomosisteinemisinin direkt olarak vasküler endotel hücrelerinde hasara neden olabildiği, endotelin antikoagulan özelliğini prokoagülana dönüştürebildiği ve in vitro düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olabildiği gösterilmiştir. Homosistein, vasküler düz kas hücrelerinde mitogeneze ve sitotoksik etkiye de neden olabilir. Bazı araştırmacılar, güçlü bir vazodilatör ve trombosit agregasyon inhibitörü olan nitrik oksitin sıkı endotelial hücrelerinden salınımının bozulduğunu göstermişlerdir. Nitrik oksit salınımının ve/veya etkilerinin azalması, hiperhomosisteinemide gözlenen trombotik olaylara neden olabilir (Kocabalkan ve ark., 2000).

Aterosklerozda, endotel hasarı kritik öneme sahip olup hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenle, homosisteinin bazı etkileri endotel disfonksiyon ve daha spesifik olarak nitrik oksidin salınımı ve/veya etkilerinin azalması sonucu ortaya çıkmaktadır (Kocabalkan ve ark., 2000).

Endotel disfonksiyonda, damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon (KAD) azalmaktadır. Orta yaşlı Çinlilerden oluşan ve belirli bir vasküler risk faktörü saptanamayan 14 kişilik bir grupta yapılan çalışmada, damar içi KAD ölçümleri yapılmış ve hiperhomosisteineminin ($tHcy=34.8\mu\text{mol/L}$) endotel disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, ailesinde ateroskleroz anamnezi ve klinik bulguları olmayan hiperhomosisteinemi ($19.2\mu\text{mol/L}$) 26 yaşlı hastada da damar içi KAD ölçümlerinin azaldığı gösterilmiştir. Endotel disfonksiyon, klasik homosistinürlü çocuklarda gösterilmiş iken serbest homosistein ve metiyonin seviyeleri normal heterozigot CBS eksikliği olan çocuklarda gösterilememiştir. Son çalışmalarda, normal sağlıklı kişilere standart metiyonin yükleme (0.1 g/kg) ile zamana bağlı tarzda damar içi kan dolaşımına bağlı dilatasyonun bozulabildiği gösterilmiştir. Akut metiyonin yüklemesinin birkaç metabolik etkisi vardır. Plazma homosisteini yükseltebilmesine rağmen insanlarda homosisteinin endotel fonksiyonları üzerine toksik etkilerinin delili sayılmamaktadır. Hanratty ve ark., bir hafta süre ile günde 0.1 g/kg metiyoninle beslenen kişilerde endotel fonksiyonlarının bozulmadığı ancak $tHcy$ seviyelerinin anlamlı oranda yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, brakial arter endotel disfonksiyonun tespit edilmesinde farklı bir teknik (yüksek rezolusyonlu ultrason ve flow yerine venöz pletismografi ve agonistler) kullanıldığı için bu bulguları direkt olarak akut metiyonin yükleme çalışmaları ile karşılaştırmak zordur (Temel ve ark., 2000). Lambert ve arkadaşları prematür koroner, serebral veya periferik vasküler hastalıklı ve metiyonin yüklenmesinden sonra hiperhomosisteinemi tanısı konan 60'ı birbiri ile birinci dereceden akraba 123 sağlıklı kişide endotel disfonksiyon ve arteriyel distansibilite arasındaki ilişkileri incelemiştir. Bu çalışmada; endotel disfonksiyon, brakial arterin KAD'u ile damar duvarının fiziki özellikleri karotis arterinin arteriyel distansibilitesi ölçülerek tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan kişilerde açlık $tHcy$ ve metiyonin yükleme testi yapılmıştır. Hafif hiperhomosisteinemi kişilerden oluşan bu grupta, önceki raporların aksine brakial arterdeki KAD ile açlık $tHcy$ arasında ilişki bulunamamış ancak metiyonin yüklemesinden elde edilen veriler incelenince KAD ve

homosistein arasında zayıf fakat istatistiksel olarak anlamlı zıt bir ilişki tespit edilmiştir. Karotis arterinin arteriyel distansibilite ölçümleri ile hem açlık hem de metiyonin yüklemesinden sonra ölçülen plazma homosisteini arasında ilişki bulunamamıştır (Temel ve ark, 2000).

Erkek cinsiyet, total kolesterol, sigara içme, hipertansiyon gibi klasik risk faktörleri ile KAD arasında ilişki bulunamamış iken postmenopozdaki kadınlarda KAD ile ilişki bulunmuştur. KAD ve asemptomatik erkek ve kadınlardaki klasik risk faktörleri arasındaki ilişkiyi “multiple stepwise regression” analizi ile inceleyen diğer bir çalışmada, KAD’daki azalmanın sigara içen yaşlı erkeklerde daha büyük damarlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Toplam risk faktör skorunun KAD ile kuvvetli ilişki göstermesi, risk faktörlerinin birbirini karşılıklı etkileyebileceğini düşündürmektedir (Temel ve ark., 2000).

Birçok deneysel çalışmalar tHcy’in vasküler komponentlere, özellikle endotelyuma direkt etkilerini araştırmaya yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalara göre açlık hiperhomosisteinemisi aterotromboza meyli artırabilmektedir. Açlık tHcy’i normal ancak metiyonin yüklemesinden sonra yüksek olan bireylerde görülen vasküler hasarın mekanizması transsülfürasyon yolundaki anomalilere bağlı olabilir. Bu bireylerde, sadece nonfizyolojik oral metiyonin dozlarının (genellikle 6-7 gr) alınmasından sonra tHcy’de yükselme gözlenir. Bu nedenle, erişkinlerin günlük metiyonin alınması 0.9 gram civarında tutulmalıdır. Post prandial tHcy seviyesi değişebilmesine rağmen % 20’den fazla artışa rastlanmamıştır. Bir ay süre ile günde 4 defa 250 mg metiyonin alanlarda ne tHcy’de anlamlı artışa ne de endotelyal fonksiyonda bozulmaya rastlanmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle, yüksek metiyoninle beslenenlerin metiyonin yüklenmesine intolerans göstermeleri beklenmemelidir (Temel ve ark., 2000).

Klasik homosisteinüriye göre koroner arter hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve periferik vasküler hastalıkların eşlik ettiği hafif hiperhomosisteinemide homosisteinin oynadığı rol daha azdır. Ancak, önceden miyokard infarktüsü geçiren serebrovasküler trombozlu yaşlı erkeklerde tHcy’in 10 $\mu\text{mol/L}$ ’den yüksek olduğu tespit edilmiş, akut koroner sendromlu hastalarda pıhtılaşma faktörleri ile homosistein arasında ilişki bulunmuş ve koroner yetmezlikli hastalara folik asit ve antioksidan vitaminler verilerek tHcy konsantrasyonu azaltılabilmektedir. Bu nedenlerle, tHcy

konsantrasyonunun düşürülmesiyle KVH'nın mortalite ve morbiditesinin azaltılabileceği sanılmaktadır (Demirci ve ark., 2003).

Günümüzde, A.B.D. ve Avrupa'da başlatılan ikinci faz deneylerinde KVH'larda plazma total homosisteinin etkili bir şekilde düşürülüp takip edilen kişilerde mortalite ve morbidite sonuçlarının daha düşük olacağı tahmin edilmektedir. Bu ülkelerdeki deneyleri etkileyen en önemli faktör, total homosisteinin majör destekleyicisi olan folik asidin besin kaynaklarına eklenmesidir. Bu deneylerin sonuçları önümüzdeki birkaç yılda alınacaktır. Bu arada homosistein ve folik asid, B₁₂ ve B₆ arasındaki ilişkiyi anlamak daha uygun olabilir. Çünkü bu vitaminlerle optimal beslenen kişilerde daha düşük total plazma homosistein konsantrasyonu elde edilmektedir (Demirci ve ark., 2003).

2.4.3 Homosistein ve Serebral Vasküler Hastalıklar

İlk kez Mc Cully, tHcy düzeyi ile aterosklerotik vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiye dikkat çekerek hiperhomosisteineminin aterosklerotik hastalıklarla sonuçlandığını bildirmiştir. Şiddetli hiperhomosisteinemi hastalarda myokard infarktüsü, inme ve pulmoner embolizm gibi vasküler patolojiler sonucu yüksek sıklıkla erken ölümler saptanmıştır (Demirci ve ark., 2003). Artmış kan homosistein düzeylerinin homosistinürik çocuklarda arteriyel ve venöz tromboembolizm riskini artırdığı ifade edilmektedir. Kang ve Wong hafif ve orta homosistein bulunan hastalarda %12 ile % 14 arasında koroner, serebral ve oklüsif periferik arteriyel hastalık saptandığını bildirmişlerdir. Kuzey İrlanda da yapılan vaka-kontrollü bir çalışmada yüksek homosistein düzeyleriyle inme, vasküler demans ve Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki vurgulanmaktadır. Son dönemde Kelly ve ark. 1487 hastayı içeren bir metaanalizde orta ve yüksek hiperhomosisteinemi ile iskemik inme arasındaki ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Temel ve ark., 2000).

Genç hastalarda orta homosisteinemi ile birlikte serebrovasküler hastalık gözlenmesinin genetik olma olasılığı fazlayken, yaşlı hastalarda homosisteinemi genellikle edinseldir. Artmış plazma homosistein düzeylerinin özellikle yüksek serum kolesterol düzeyleri, yüksek kan basıncı ve sigara içimi gibi diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığında ateroskleroz için bağımsız risk faktörü olduğu bildirilmektedir.

Homosisteinemi hastalardaki beyin infarktlarında büyük intrakranial damarlarda ateromatöz oklüzyon gözlenmektedir. Bu damarlarda tipik aterosklerotik değışiklikler; fibröz plaklar, medial fibrozis ve internal elastik laminada kesintiler gözlenmiştir. Vaka kontrollü çalışmalarda iskemik inme % 30 hastanın plazma homosistein düzeyleri aynı yaş ve cinsiyetteki sağlıklı bireylere kıyasla en az 1.5 kat yüksek saptanmıştır (Demirci ve ark., 2003) . Malinow ve Nieto homosistein değerleriyle, karotik arter intima media kalınlığı arasında birliktelik saptadıkları çalışmada, hafif yüksek homosistein (> 10.5 mmol/L) düzeyleri saptanan asemptomatik yetişkinlerdeki karotik intimal kalınlığı, plazma homosistein düzeyi < 5.88 mmol/L olan hastalara kıyasla artmış olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada serum homosistein düzeyleri 14-16 mmol/L arasında olan yaşlı hastalarda < 10 mmol/L altında olanlara kıyasla stroke riski 2.8 kat artmış risk belirtilmektedir. Sen ve arkadaşlarının inme ve geçici iskemik ataklı hastalarda yaptıkları klinik çalışmada artmış homosistein düzeyleriyle aortik aterom progresyonu arasında ilişki bildirilmiştir (Dikmen ve ark., 2004).

Vasküler hastalıklar ile homosistein düzeyleri arasındaki ilişkiyle ilgili olarak birçok mekanizma öne sürülmüştür. Homozigot sistasyonin β sentetaz enzimi eksikliği sonucu olan ciddi hiperhomosisteinemiilerde Tromboxan-A₂'nin arttığı gözlenmiştir. Homosistinürlü hastalarda hiperhomosisteineminin derecesi ile ilgili olarak protein-C düzeyinde önemli derecede azalma saptanmıştır. İn vitro çalışmalarda hiperhomosisteineminin düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu indüklediği ve serbest radikal oluşumunu artırdığı gösterilmiştir. Homosisteinin endotel hücreleri üzerindeki toksik etkisi trombosit adezyonunda artışa, faktör V'in aktivasyonuna, doku plazminojen aktivatör aktivitesinin modülasyonuna ve heparan sülfat ekspresyonunun supresyonuna yol açabileceği ve bu etkileri ile venöz ve arteriyel oklüsif hastalıklara yol açabileceği bildirilmiştir (Temel ve ark., 2000) .

2.4.4.Osteoporoz İle Homosistein Arasındaki İlişki

Osteoporoz, kemik kütleinde azalma ve kemik dokusunun mikro-mimarisinde bozulma sonucu kemik kırılabilirliğinde artış ile karakterize bir iskelet sistemi hastalığıdır. tHcy'in osteoporoz etyopatogenezinde de rolü olabileceğini gösteren

kanıtlar elde edilmiş ve tHcy'in yaşlılarda gözlenen osteoporozda bağımsız bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (Özlem ve ark., 2006).

Homosisteinin kemik dokusu üzerindeki etkisi konusunda farklı görüşler öne sürülmüştür. Bunlardan birisi tHcy'in kollajenin solubilite ve stabilitesi için gerekli çapraz bağların (cross-link) oluşumunu bozduğu şeklindedir. Kollajenin çapraz bağlarının sentezlenebilmesi için aktif lizin ve hidroksilizin aldehid yapılarının olması gerekir. Bu aldehid gruplarının oluşumu için lizil oksidaz enzimi kullanılmaktadır. tHcy'in aktif metaboliti olan tiyolaktonun lizil oksidazı inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca tHcy'in bu aktif aldehid grupları ile stabil tiazin halkası oluşturduğu, böylece çapraz bağ yapısını bozduğu gösterilmiştir. Çapraz bağ yapısının bozulması kollajenin daha kolay yıkılmasına neden olabilir. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar, eskilerin aksine yeterli mineralizasyon için kemik matriks yapısının özellikle önemli olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, çapraz bağ yapılarının tHcy ile bozulması, kemik matriks yapısının ve mineralizasyonun bozulmasına ve dolaylı olarak da osteoporoza katkıda bulunabilir. Ayrıca, tHcy'in osteoblast fonksiyonlarını bozduğu, osteoklast aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Özlem ve ark., 2006).

2.5. Eritrositler

Eritrositler, gerek kolay elde edilebilmeleri, gerekse fonksiyonel önemleri ve birçok hastalıkta rol almaları nedeniyle yoğun şekilde üzerinde çalışılmış hücrelerdir. Eritrositlerin başlıca görevi, oksijen ve karbondioksitin taşınması ve kan pH'sının sürdürülmesidir. Kemik iliğinde öncü hücrelerden gelişip olgunlaştıktan sonra, dolaşıma salınan eritrositlerin yaşam süreleri yaklaşık 120 gündür (Onat ve ark., 2002). Eritrositler oldukça özelleşmiş hücrelerdir. Hemoglobinin %34'ünü kapladığı sitoplazmalarında çekirdek, mitokondri, lizozom, ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği gibi organeller bulunmaz. Olgun bir eritrositte nükleik asit ve protein sentezleri yoktur, sınırlı lipid metabolizmasının yanında plazma membranındaki iyon pompalarının, hemoglobinin ve hücre zarının esnekliği ve bütünlüğünün sürdürülmesinde kullanılan karbonhidrat metabolizması bulunur (Onat ve ark., 2002). Eritrositler yaşlandığında RES hücreleri tarafından dolaşımdan uzaklaştırılır ve hemoglobinleriyle birlikte yıkılır. Çekirdeksiz bikonkav disk şeklinde olan insan

eritrositinin çapı 6.0–9.0µm, kalınlığı merkezde 1.0 µm, kenarlarda 2.0-2.5 µm kadardır. Eritrosit membranı 6nm kalınlığındadır (Muray ve ark., 1996). Eritrositlerinde başlıca katyonu olan potasyum ile birlikte sodyum, kalsiyum ve magnezyum da bulunur. Anyonları klorür, bikarbonat, hemoglobin ve anorganik fosfat olup, başlıca fosfat bileşiği 2,3-bisfosfogliserattır. Eritrositler, iyonik dengelerini membran yapısında yer alan Na^+ , K^+ -ATPaz, Ca^{++} -ATPaz gibi enerji gerektiren enzimlerle sürdürürler. Hücre yaşlandıkça iyon pompalarının aktiviteleri azalarak hücre içi Ca^{++} ve Na^+ artar, K^+ ise azalır. Böylece hücre stabilitesi bozulur ve yıkımı uyarır (Onat ve ark., 2002).

2.5.1. Eritrosit Membranı

İkili fosfolipid tabakası temel yapısını gösteren eritrosit membranında %49-52 oranında protein bulunmaktadır. Membranda yaklaşık %40 oranındaki lipidlerin çoğunluğu fosfolipidler ve esterleşmiş kolesterol oluşturmaktadır. Fosfolipidler ve yağ asitleri asimetric dağılmaktadırlar. Bütün membranlarda olduğu gibi kolin içeren fosfolipidler (fosfotidilkolin ve sfingomiyelin) membranın dış yüzeyinde, yüklü amino grubu içeren fosfolipidler (fosfotidiletanolamin ve fosfotidilserin) ise sitoplazmik yüzeyde yer almaktadırlar (Onat ve ark., 2002). Organelleri bulunmadığından olgun eritrositlerde lipid sentezi yapılamamaktadır. Kaybolan membran lipidleri plazma lipoproteinlerinden sağlanmakta ve fosfotidilkolin ile kolesterol öncelikli değiştirilmektedir. Eritrosit membran proteinleri yerleşimlerine göre iki şekilde sınıflandırılır. İntegral proteinler çift katlı lipid tabakasına sıkıca gömülmüş olan proteinlerdir. Periferik (ekstremsel) proteinler integral membran proteinlerine nonkovalent olarak bağlanmışlardır (Muray ve ark., 1996).

Eritrosit membranının sağlamlığını ve esnekliğini sağlayan etkenler arasında integral proteinleri ile hücre iskeletini oluşturan periferik proteinler arasındaki bağlanma önem taşımaktadır. Yapısında spektrin, aktin, protein 4.1 ve tropomiyozinin hücre iskeleti plazma membranının sitoplazmik yüzeyinde yer almaktadır. Membrana integral membran proteinlerinden glikoforin C ve band 3 proteinleri ile bağlıdır. Band 3 membran proteini (integral protein) üçlü kompleksle (spektrin, aktin, band 4), diğer hücre iskeleti proteini olan ankrin ve glikoforin C ise band 4.1 proteini (hücre iskelet proteini) aracılığı ile bağlıdır. Bütün olarak incelendiğinde tipik bağlanmalar

sonucundaki kafes görünümündeki yapı eritrositlerin deformasyondan sonra orijinal durumlarına dönmesini sağlamaktadır (Onat ve ark., 2002). Eritrosit hücre iskeleti proteinlerinden spektrin, aktin, protein 4.1, sodyumdodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezindeki (SDS-PAGE) mobilitelerine göre adlandırılmaktadırlar. İki herterodimerden oluşan bir tetramer olan spektrin, 12 aktin monomeri ile birleşerek hegzagonal kafes oluşturmaktadır. İki proteinin bağlanmalarını protein 4.1 gerçekleştirmektedir. Bu kafes şeklindeki kauçuğa benzer yapı, deformasyon sonrasında eritrosit membranının tekrar eski şekline dönmesini sağlamaktadır. Hücre iskeleti proteinlerinin membrana bağlanmasında iki protein görev almaktadır: Spekrini, integral membran proteini olan band 3 dimerine ankrin, integral proteini glikoforin C yapısına ise protein 4.1 bağlamaktadır. Dimer veya tetramer formunda bulunan band 3 proteininin intrasitoplazmik bölgesi ankrin aracılığı ile spektrine bağlanmakta ve membran ilişkili bölgesi ise anyon değişimi fonksiyonuna aracılık etmektedir (Onat ve ark, 2002). Membran şekli ve mekanik özellikleri için önem taşıyan glikoforin C proteininin yanı sıra glikoforin A, B ve D yaygın olarak bulunan eritrosit membran proteinleridir. Glikoforinler aynı zamanda belirli bakteriler, viral ve parazitik organizmalarda reseptör görevi yapmaktadır. Membranda band 3 ve glikoforin A miktarının yarısı kadar bulunan ve bir transmembran protein olan band 4.5 proteini, glukoz transporteri olarak görev yapmaktadır (Onat ve ark, 2002).

2.5.2. Eritrosit Metabolizması

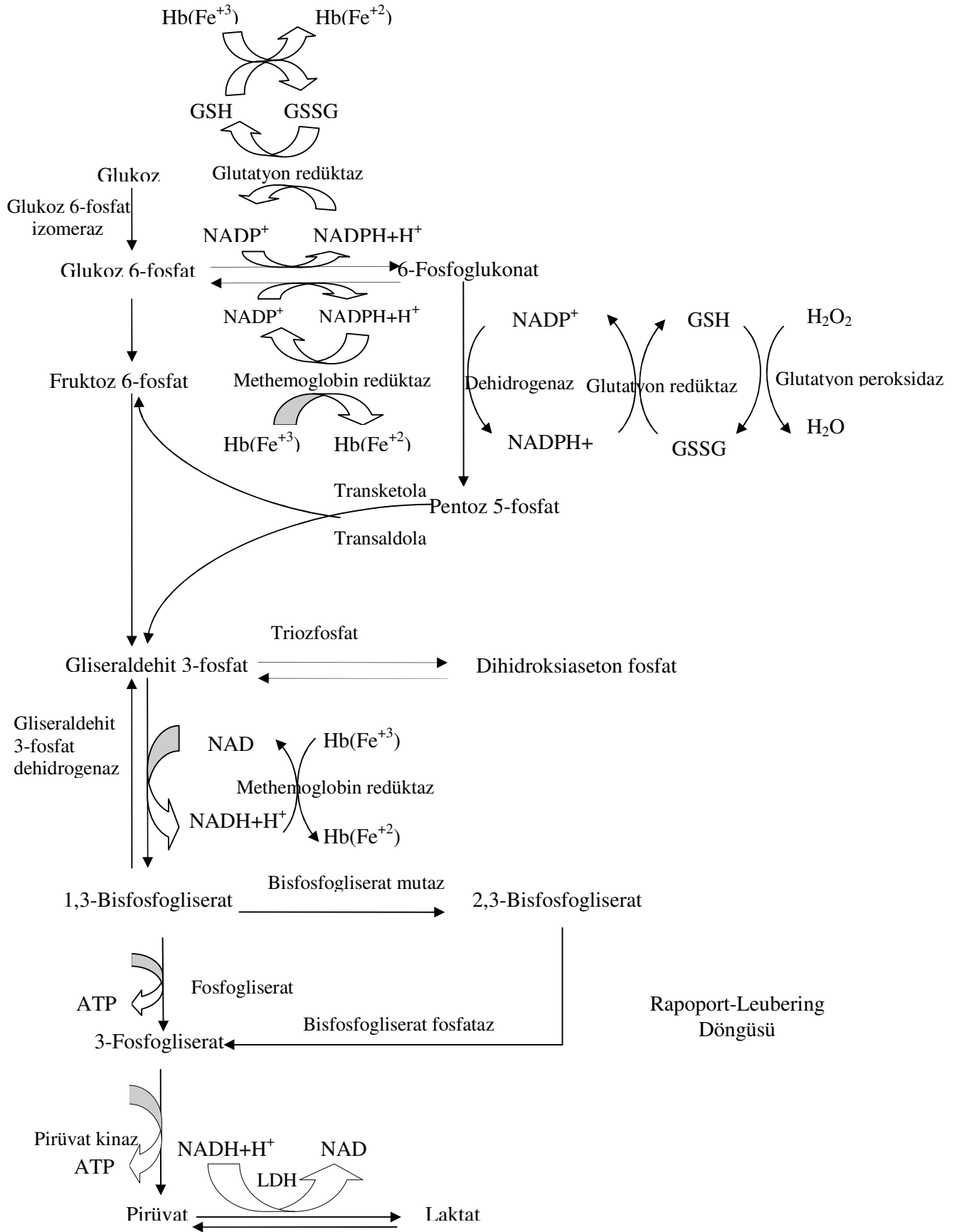
Olgun eritrositlerde mitokondri bulunmadığı için enerji üretimi çok sınırlıdır. Oksidatif fosforilasyon ve sitrat döngüsü aktivitesi olmadığı için enerji gereksinimi glikolitik yoldan sağlamaktadır. Oksidatif stres etkisinde olmayan eritrositte glukozun % 90 kadarı anaerobik glikoliz (Embden-Mayerhof yolu) ile pirüvat ve laktata parçalanmaktadır. Enerjisi tamamen glukozla bağlı hücrelerden olan eritrositlerde hücre laktik aside olmakta ve net 2 ATP enerji kazanılmaktadır. Eritrositlerin iyonik dengesinin sağlanması için Na^+, K^+ -ATPaz sisteminde, membran yapısının deformasyon yeteneğinin sürdürülmesinde ve eritrositlerin bikonkav şeklinin korunmasında ATP' ye gereksinim vardır. Pentoz fosfat yolu ile indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve pentoz fosfatlar sağlanmaktadır. NADPH eritrositlerde glutatyon

metabolizmasında rol oynamaktadır. Oksijen ve türevleri hemoglobini inaktif methemoglobine dönüştürmektedir. Ayrıca moleküler oksijen, membran lipidlerinden aktivitesi yüksek peroksitler oluşturmaktadır. Pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH, eritrositin oksidatif hasara karşı korunmasında kullanılmaktadır (Muray ve ark, 1996).

Eritrositlerde hemoglobinin oksijene afinitesini Rapoport-Luebering döngüsü düzenlemektedir. Glikolitik yolda 1mol ATP üretilen fosfogliserat kinaz tepkimesinin atlandığı bir yolda bisfosfogliserat mutaz tarafından katalizlenen tepkime ile eritrosite özgün olan 2,3-bisfosfogliserat (2,3-BPG) elde edilmektedir (Rapoport-Luebering döngüsü). Eritrositlerde 2,3-BPG üretimi, glikolitik yolda 1mol ATP eksik elde edilmesine yol açmaktadır. Allosterik etkileyici olarak etki gösteren 2,3-BPG, hemoglobinin oksijene afinitesini düzenlemektedir. Eritrositlerde Na^+, K^+ -ATPaz sistemi ile üç sodyumun hücre dışına çıkarılmasında ve iki potasyum ile bir klorürün hücre içine girmesinde 1 mol ATP harcanmakta ve elektiriksel nötralitenin sürdürülmesi sağlanmaktadır. Embden-Mayerhof yolu ile sıkı ilişkide bulunan diğer metabolik yollar (Rapoport-Luebering döngüsü), NAD^+ ile NADH ve ADP ile ATP miktarlarının oransal düzenlenmesinde etkili olmaktadır (Muray ve ark., 1996).

Hemoglobin yapısının korunması, membranın deformasyon özelliğinin ve sürekliliğinin sağlanması için eritrositlerde oksidatif hasarlardan korunma mekanizmaları bulunmaktadır. Normal koşullarda hücrede oluşan methemoglobinin çoğu, NAD^+ bağımlı methemoglobin redüktaz ile katalizlenen tepkime sonucunda hemoglobine indirgenmektedir. Az miktarda methemoglobin ise glutatyon (GSH) tarafından NADP^+ bağımlı glutatyon peroksidazın katalizlediği tepkimeye katılmaktadır. Diğer taraftan lipid peroksidasyonuna karşı selenyum içeren glutatyon peroksidaz, eritrositte oluşan peroksit gruplarını zararsız hidroksil gruplarına çevirmektedir. Bu tepkimede GSH indirgenmektedir. Tripeptit yapısındaki glutatyon methemoglobin ve peroksitlerin indirgenmesi sırasında disülfitle bağlı okside glutatyona (GSSH) yükseltgenmektedir. Tekrar kullanılabilmesi için GSSH, NADPH bağımlı glutatyon redüktaz ile indirgenmekte ve GSH oluşmaktadır (Onat, 2002).

Pentoz fosfat yolunda glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve 6-Fosfoglukonat dehidrogenazın kullanıldığı ilk iki tepkimede NADPH üretilmektedir. NADPH üretimi ile eşlenen glutatyonun indirgenmesi sonucu yaşamsal önemi olan enzimlerin ve hemoglobinin oksidasyonu önlenmektedir (Muray ve, 1996).



Şekil 1.3. Eritrosit metabolizması. Anaerobik glikoliz, Rapoport-Leubering döngüsü, pentoz fosfat yolu ve glutasyon metabolizması (Onat, 2002)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

L,D-Homosistein, L-Alanin, L-Glisin, L-Serin, L-Valin, L-Glutamin, L-Glutamik asit, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Arjinin, L-Lözin, L-Metiyonin, L-Histidin, 5,5'-dithiobis- (nitrobenzoate) (DTNB) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A). Deneylerde kullanılan kan, SSK Hastanesi kan bankasından, sağlıklı vericilerden 300 ml'lik üniteler şeklinde elde edilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler için Shimatzu 1200 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Eritrositlerin Hazırlanması:

Sağlıklı insanlardan alınan heparinize kan, 2000 g de 5 dk. santrifüj edilerek plazma ve eritrositler birbirinden ayrılmıştır. Plazma ve beyaz kan hücrelerini ihtiva eden tabaka ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen eritrosit yığını üç defa iki hacim 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat- tuz tamponuyla (PBS) (9 hacim 0.15 M NaCl ve 1 hacim 0,1 M potasyum fosfat buffer, pH 7,4) yıkanmış ve deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

DENEY 1: Eritrositlere L,D-Homosistein girişi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. % 0,9'luk NaCl (1 lt)
2. PBS (0.1 M, pH 7.4)
3. PBS-glukoz (9 hacim 0.15 M NaCl ve 1 hacim 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 8 mM glukoz pH 7.4)
4. Krebs ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM Glukoz, pH 7.4)
5. 10 ml hacimde 1 mM, 2 mM, 3 mM L,D-Homosistein içeren Krebs Ringer tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)

6. % 10'luk TCA (Trikloroasetik asit) 100 ml
7. Tris EDTA tamponu (pH 8.9)
8. 2.9 mg DTNB (2.5 ml metanolde çözünmüş)

DENEY 2: Eritrositlerden L,D-Homosistein çıkışı

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. % 0.9'luk NaCl (1 lt)
2. PBS (0.1 M, pH 7.4)
3. PBS-glukoz (9 hacim 0.15 M NaCl ve 1 hacim 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 8 mM glukoz pH 7.4)
4. Krebs ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 10 ml hacimde 1 mM, 2 mM, 3 mM L,D-Homosistein içeren krebs ringer tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
6. Tris EDTA tamponu (pH 8.2)
7. 2.9 mg DTNB (2.5 ml metanolde çözünmüş)

DENEY 3: Eritrositlere L,D-Homosistein girişinin sıcaklığa bağlılığı

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. % 0.9'luk NaCl (1 lt)
2. PBS (0.1 M, pH 7.4)
3. PBS-glukoz (9 hacim 0.15 M NaCl ve 1 hacim 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 8 mM glukoz pH 7.4)
4. Krebs ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 10 ml hacimde 1 mM, 3 mM L,D-Homosistein içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)

6. %10'luk TCA 100 ml
7. Tris EDTA tamponu (pH 8.9)
8. 2.9 mg DTNB (2.5 ml metanolde çözünmüş)

DENEY 4: Eritrositlere L,D-Homosistein girişi üzerine amino asitlerin etkileri

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. % 0.9'luk NaCl (1 lt)
2. PBS (0.1 M, pH 7.4)
3. PBS-glukoz (9 hacim 0.15 M NaCl ve 1 hacim 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 8 mM glukoz pH 7.4)
4. Krebs ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 10 ml hacimde 1 mM L,D-Homosistein içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
6. 10 ml hacimde 1 mM alanin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
7. 10 ml hacimde 1 mM glisin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
8. 10 ml hacimde 1mM serin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
9. 10 ml hacimde 1 mM valin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
10. 10 ml hacimde 1 mM glutamin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
11. 10 ml hacimde 1 mM glutamik asit içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)

12. 10 ml hacimde 1 mM aspartik asit içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
13. 10 ml hacimde 1mM prolin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
14. 10 ml hacimde 1 mM arjinin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
15. 10 ml hacimde 1 mM histidin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
16. 10 ml hacimde 1 mM lözin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
17. 10 ml hacimde 1 mM metiyonin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
18. %10'luk TCA 100 ml
19. Tris EDTA tamponu (pH 8.9)
20. 0.4 mg/ ml DTNB (2.5 ml metanolde çözünmüş)

DENEY 5: Eritrositlerden L,D-Homosistein çıkışı üzerine amino asitlerin etkileri

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. % 0.9'luk NaCl (1 lt)
2. PBS (0.1 M, pH 7.4)
3. PBS-glukoz (9 hacim 0.15 M NaCl ve 1 hacim 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 8 mM glukoz pH 7.4)
4. Krebs ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 10 ml hacimde 1mM L,D-Homosistein içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)

6. 10 ml hacimde 1mM alanin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
7. 10 ml hacimde 1 mM glisin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
8. 10 ml hacimde 1 mM serin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
9. 10 ml hacimde 1 mM valin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
10. 10 ml hacimde 1 mM glutamin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
11. 10 ml hacimde 1 mM glutamik asit içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
12. 10 ml hacimde 1mM aspartik asit içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
13. 10 ml hacimde 1mM prolin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
14. 10 ml hacimde 1 mM arjinin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
15. 10 ml hacimde 1 mM histidin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
16. 10 ml hacimde 1 mM lözin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
17. 10 ml hacimde 1 mM metiyonin içeren krebs ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
18. Tris EDTA tamponu (pH 8.2)

19. 2.9 mg DTNB (2.5 ml metanolde çözünmüş)

DENEY 6: Homosistinin homosisteine dönüşmesi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. % 0.9'luk NaCl (1 lt)
2. PBS (0.1 M, pH 7.4)
3. PBS-glukoz (9 hacim 0.15 M NaCl ve 1 hacim 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 8 mM glukoz pH 7.4)
4. Krebs ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 20 ml hacimde 0.5 ve 1 mM L-Homosistin içeren krebs ringer fosfat tamponu (135 mMNaCl , 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
6. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
7. 2.9 mg DTNB (2.5 ml metanolde çözünmüş)

DENEY 7: Sistinin sisteine dönüşmesi

1. % 0.9'luk NaCl (1 lt)
2. PBS (0.1 M, pH 7.4)
3. PBS-glukoz (9 hacim 0.15 M NaCl ve 1 hacim 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 8 mM glukoz pH 7.4)
4. Krebs ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 20 ml hacimde 0.5 ve 1 mM L-Sistin içeren Krebs ringer fosfat tamponu (135 mMNaCl , 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
6. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
7. 2.9 mg DTNB (2.5 ml metanolde çözünmüş)

DENEY 8: Homosistinin homosisteine dönüşmesinin sıcaklığa bağlılığı

1. % 0.9'luk NaCl (1 lt)
2. PBS (0.1 M, pH 7.4)
3. PBS-glukoz (9 hacim 0.15 M NaCl ve 1 hacim 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 8 mM glukoz pH 7.4)
4. Krebs ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 20 ml hacimde 0.5 ve 1 mM L-Homosistin içeren krebs ringer fosfat tamponu (135 mMNaCl , 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
6. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
7. 2.9 mg DTNB (2.5 ml metanolde çözünmüş)

3.2. YÖNTEM VE ÇALIŞMANIN AŞAMALARI

Çalışmamız sekiz aşamadan oluşmaktadır;

1. Aşamada, eritrositlere homosistein girişi gözlenmiştir.
2. Aşamada, eritrositlerden homosistein çıkışı gözlenmiştir.
3. Aşamada, eritrositlere homosistein girişinin sıcaklığa bağlılığı incelenmiştir.
4. Aşamada, eritrositlere homosistein girişi üzerine amino asidlerin etkileri incelenmiştir.
5. Aşamada, eritrositlerden homosistein çıkışı üzerine amino asidlerin etkileri incelenmiştir.
6. Aşamada, eritrositlerde homosistinin homosisteine dönüşmesi gözlenmiştir.
7. Aşamada, eritrositlerde sistinin sisteine dönüşmesi gözlenmiştir.
8. Aşamada, eritrositlerde homosistinin homosisteine dönüşmesinin sıcaklığa bağlılığı incelenmiştir.

DENEY 1: Eritrositlere homosistein girişi

Deneylerde sağlıklı vericilerden elde edilen heparinize insan kanı kullanılmıştır. Kan, PBS-glukoz ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. Bu işlemten sonra içinde 1 mM, 2 mM, 3 mM L-Homosistein içeren krebs ringer fosfat tamponundan 500 µl, hazırlanmış eritrosit süspansiyonundan 250 µl alınarak endorff tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 500 µl Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl eritrosit içeren endorff tüpler kullanılmıştır. Eendorff tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C’ de 60 ve 120 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g’ de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır. 1000 µl PBS-glukoz eklenip endorfflar hafifçe altüst edilip 5 dakika 2000 g’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılır. Eendorfflara 250 µl TCA eklenip, eritrositler parçalanır. Daha sonra 5 dk 10000 g’de santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 100 µl alınarak 1850 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.9) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçölmüştür. Serbest-SH konsantrasyonları 13.1 mM ekstinksiyon katsayısı (bir maddenin 1 molar konsantrasyonunun verilen dalga boyunda yaptığı absorbans değeri) kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 2: Eritrositlerden homosistein çıkışı

İçinde 1 mM, 2 mM, 3 mM L-Homosistein içeren krebs ringer fosfat tamponundan 500 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak endorff tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 500 µl Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl eritrosit içeren endorff tüpler kullanılmıştır. Eendorff tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C’ de 60dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g’de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır. 1000 µl PBS eklenip endorfflar hafifçe altüst edilip 5 dakika 2000 g’de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılır. Eendorfflara 500 µl krebs ringer fosfat tamponu ilave edilip 60 ve 120 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g’de santrifüj edilmiştir ve süpernatanttan 200 µl alınarak 1750 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra

spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest-SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 3: Eritrositlere homosistein girişinin sıcaklığa bağlılığı

İçinde 1 mM ve 3 mM L,D-Homosistein içeren krebs ringer fosfat tamponundan 500 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 500 µl Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl eritrosit içeren ependorf tüpler kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 4, 20, 37 °C' de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g' de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır. 1000 µl PBS eklenip ependorf hafifçe altüst edilip 5 dakika 2000 g' de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılır. Ependorflara 250 µl TCA eklenip eritrositler parçalanır. Daha sonra 5 dk 10000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 100 µl alınarak 1850 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.9) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest –SH konsantrasyonları 13,1 mM ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 4: Eritrositlere homosistein girişi üzerine amino asitlerin etkileri

1 mM L,D-Homosistein içeren krebs ringer fosfat, 1 mM alanin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM glisin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM serin içeren krebs ringer fosfat, 1mM valin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM glutamin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM glutamik asit içeren krebs ringer fosfat, 1 mM aspartik asit içeren krebs ringer fosfat, 1 mM prolin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM arjinin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM histidin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM lözin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM metiyonin içeren krebs ringer fosfat tamponlarından 500 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 500 µl krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl eritrosit içeren ependorf tüpler kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g'de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır. 1000 µl PBS eklenip ependorflar hafifçe altüst edilip

5 dakika 2000 g'de santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ependorflara 250 µl, TCA eklenip, eritrositler parçalamıştır. Daha sonra 5 dk 10000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 100 µl alınarak 1850 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.9) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 5: Eritrositlerden homosistein çıkışı üzerine amino asitlerin etkileri

1 mM L,D-Homosistein içeren krebs ringer fosfat tamponundan 500 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol-I grubu olarak 500 µl krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl eritrosit içeren ependorf tüpler kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C' de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g' de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır. 1000 µl PBS eklenip ependorflar hafifçe altüst edilip 5 dakika 2000 g' de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kontrol-I ve Kontrol-II gruplarına 500 µl krebs ringer fosfat, diğer ependorflara 1 mM alanin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM glisin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM serin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM valin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM glutamin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM glutamik asit içeren krebs ringer fosfat, 1 mM aspartik asit içeren krebs ringer fosfat, 1 mM prolin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM arjinin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM histidin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM lözin içeren krebs ringer fosfat, 1 mM metiyonin içeren krebs ringer fosfat tamponlarından 500 µl ilave edilip 60 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g'de santrifüj edilip, süpernatanttan 200 µl alınarak 1750 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 mM ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 6: Homosistinin homosisteine dönüşmesi

0,5 mM ve 1 mM L-Homosistin içeren krebs ringer fosfat tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl eritrosit içeren ependorf tüpler kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C’ de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g’ de santrifüj edilip, süpernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest –SH konsantrasyonları 13.1 mM ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 7: Sistinin sisteine dönüşmesi

0,5 mM ve 1 mM L-Sistin içeren krebs ringer fosfat tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl eritrosit içeren ependorf tüpler kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C’de 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g’ de santrifüj edilip, süpernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest –SH konsantrasyonları 13.1 mM ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 8: Homosistinin homosisteine dönüşmesinin sıcaklığa bağlılığı

0,5 mM ve 1 mM L-Homosistin içeren krebs ringer fosfat tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl eritrosit içeren ependorf tüpler kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 4 °C, 20 °C ve 37 °C’ de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2000 g’ de santrifüj edilip, süpernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA

tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest –SH konsantrasyonları 13.1 mM ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.1.İstatistiksel Analizler

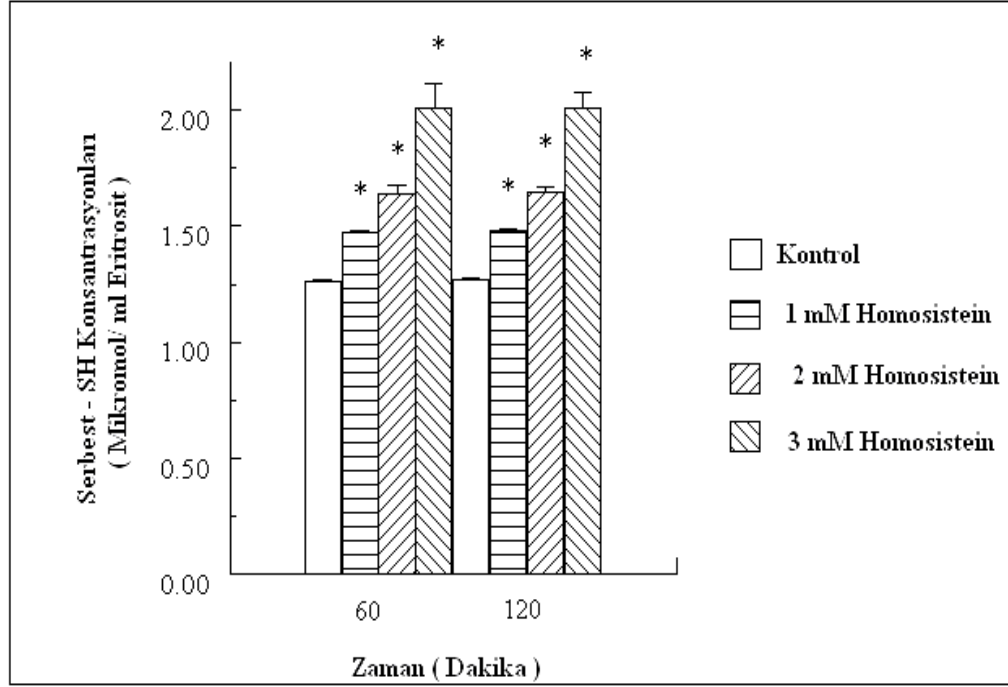
Çalışmada Student-Newman-Keuls Multiple Comparasion ve tek yönlü değişim analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Tüm testler üçlü örneklerle uygulanmıştır. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir ve $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmamızdaki ana hedeflerden biri plazmadaki homosistein konsantrasyonunun düzenlenmesinde eritrositlerin bir rol oynayıp oynamadığını tayin etmektir. Şekil 4.1’ de de görüldüğü gibi eritrositlere homosistein girişi zamana ve konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ortamdaki homosistein konsantrasyonu arttığı zaman eritrositlere homosistein girişide artmaktadır. Bir saatlik zaman periyodunda giriş doyum seviyesine ulaşmış olarak görülmektedir. Bu zaman sürecinden daha uzun süre eritrositler inkübasyona bırakıldığında homosistein girişinde büyük bir artış olmamaktadır.

Şekil 4.2’de eritrositlerden dış ortama homosistein çıkışı çalışmasının sonuçları gösterilmektedir. Sonuçlarımızdan dış çevrede homosistein bulunmadığında eritrositlerdeki homosisteinin tekrar sitoplazmadan dış ortama taşınabildiği görülmektedir. Homosistein hücrelerden çıkışı zamana ve hücre içi homosistein düzeyine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ayrıca sonuçlardan eritrositlerden çıkan homosistein miktarının eritrositlerdeki homosistein seviyesiyle ilişkili olduğu görülmektedir. Eritrositlerden çıkan homosistein miktarı 60 dakikalık inkübasyon süresince artmış olarak görülmektedir. Eritrositler daha uzun süre inkübe edildiklerinde çıkış sürmekte fakat ortamda buna bağlı büyük bir artış olmamaktadır.

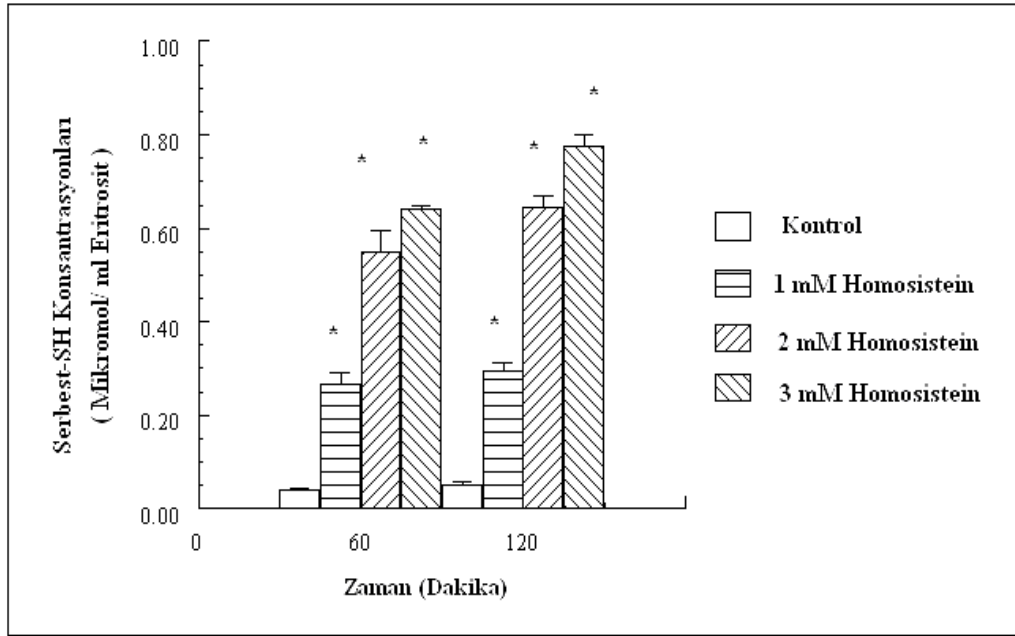
Şekil 4.3’te sıcaklığın homosistein girişi üzerine etkisi gösterilmektedir. Eritrositler 4 °C’de inkübe edildiğinde eritrositlere homosistein girişi oldukça düşük seviyelerde gerçekleşmektedir. Sıcaklık arttığında ise eritrositlere homosistein girişide buna bağlı olarak artmaktadır.



Şekil 4.1. Eritrositlere homosistein girişi. Yıkanan eritrositler krebs ringer tamponu içerisinde 1mM, 2mM ve 3mM homosistein varlığında 37°C’de 60 ve 120 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler izole edildi, yıkandı ve eritrositlerin içindeki serbest -SH konsantrasyonları ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrolten önemli derecede farklı değer.

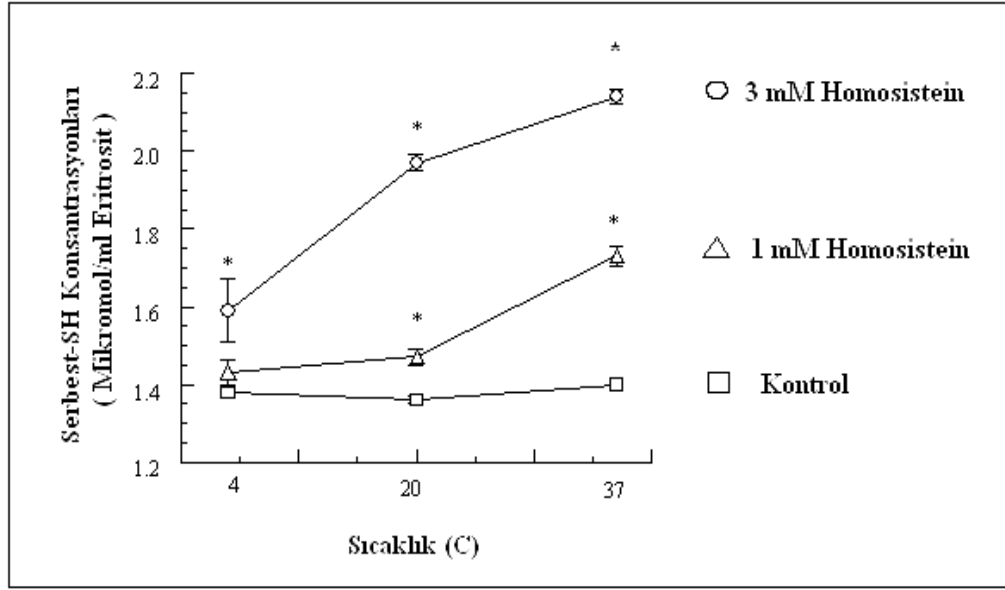


Şekil 4.2. Eritrositlerden homosistein çıkışı. Muamele öncesinde yıkanan eritrositler belirli homosistein konsantrasyonlarında 60 dk inkübe edildi. Eritrositler yıkandı ve santrifüj edilerek izole edildi. Yıkanan eritrositler daha sonra içinde homosistein bulunmayan yeni tampona aktarıldı. Daha sonra eritrositler 60 ve 120 dk 37°C' de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj edildi ve süpernatanttaki serbest -SH konsantrasyonları ölçüldü.

Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrolten önemli derecede farklı değer.

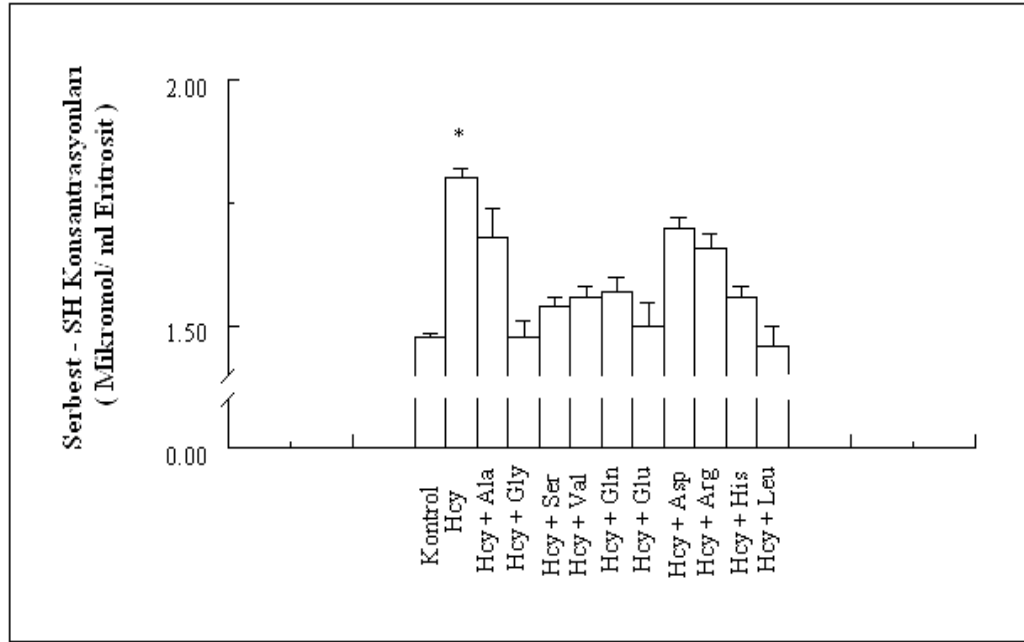


Şekil 4.3. Eritrositlere homosistein girişinin sıcaklığa bağlılığı. Yıkanan eritrositler 1 mM ve 3 mM homosistein varlığında ve yokluğunda 60 dk belli sıcaklıklarda (4, 20 ve 37°C) inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler yıkayıp izole edildi ve eritrositlerdeki serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

*Kontrolnden anlamlı derecede farklı değer.

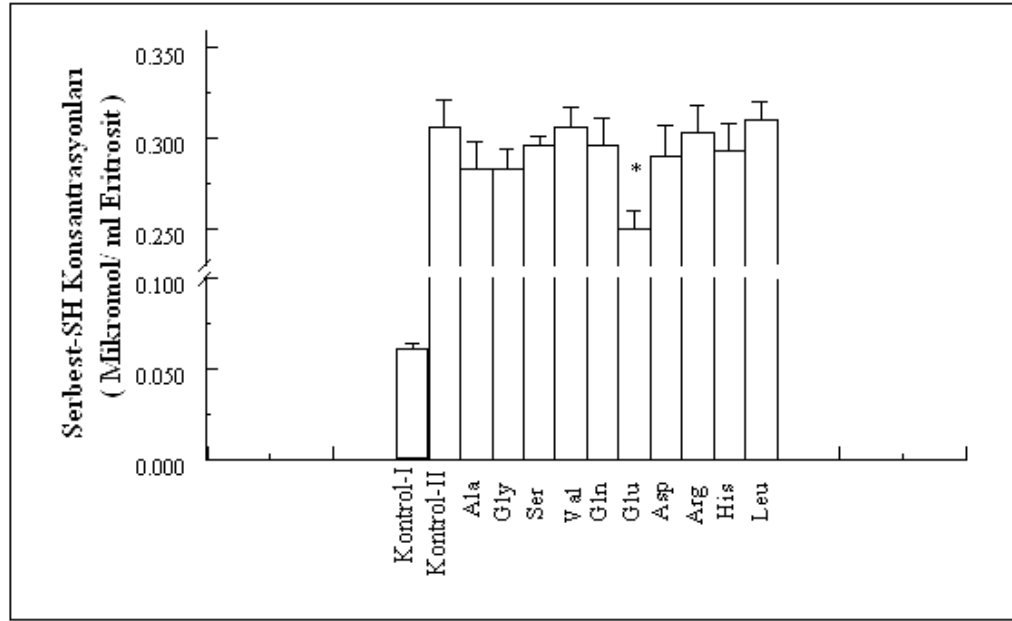
Deneyimizin bir sonraki aşamasında, belirli amino asitlerin homosisteinin membrandan taşınımına etki edip etmediğini değerlendirdik. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te bu çalışma ile ilgili sonuçlar gösterilmektedir. Şekil 4.4'te belirli amino asitlerin homosistein giriş miktarını anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmektedir. İncelenen bütün amino asitlerin eritrositlere homosistein girişi üzerine inhibitör etki gösterdikleri görülmektedir. Buna rağmen aynı amino asitlerin homosistein çıkışında çok fazla etkili olmadığı görülmüştür. Amino asitlerden sadece glutamat eritrositlerden homosistein çıkışını anlamlı bir şekilde inhibe etmektedir.



Şekil 4.4. Eritrositlere homosistein girişi üzerine amino asitlerin etkisi. Yıkanan eritrositler yalnız homosistein ve homosistein artı diğer amino asitlerin varlığında 37 °C de 60dk inkübe edildi. Kontrol hücrelerine hiçbir muamele yapılmadı. İnkübasyondan sonra eritrositler yıkandı ve izole edildi. Eritrositlerdeki serbest -SH konsantrasyonu ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Diğer tüm gruplardan önemli derecede farklı değer.

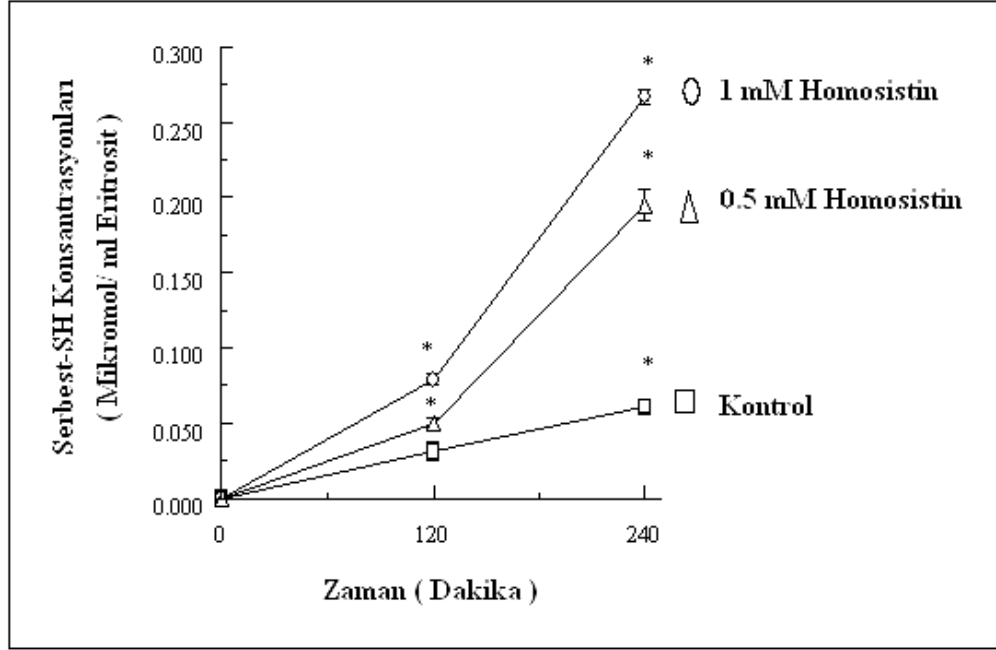


Şekil 4.5. Eritrositlerden homosistein çıkışı üzerine amino asitlerin etkisi. Kontrol grubunun dışında tüm gruplar 1mM homosistein varlığında 37°C de 60dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler yıkandı ve izole edildi. Yıkanan eritrositler her bir amino asitten 1 mM bulunan yeni tampona aktarıldı ve 60 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj edildi ve süpernatanttaki serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol-II gruptan önemli derecede farklı değer (Başlangıçta homosistein ile muamele edilip daha sonra amino asitlerle muamele edilmeyen grup).

Deneyimizin bir sonraki aşamasında eritrositlerde ekstraselüler homosistinin homosisteine dönüştürülüp dönüştüğünü araştırdık. Şekil 4.6'daki sonuçlarımızda da görüldüğü gibi eritrositler homosistini homosisteine dönüştürebilmektedir.



Şekil 4.6. Homosistinin homosisteine dönüşmesi. Yıkanan eritrositler 0.5 mM ve 1 mM homosistin varlığında belirli zaman aralıklarında 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj ve izole edildi. Daha sonra süpernatanttaki serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrolten önemli derecede farklı değer.

Homosistinin homosisteine dönüşümünün metabolik olarak aktif olup olmadığını görmek için farklı sıcaklıklarda deneyi tekrarladık. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi düşük sıcaklıkta homosistini homosisteine dönüştüren yol inhibe olmaktadır.

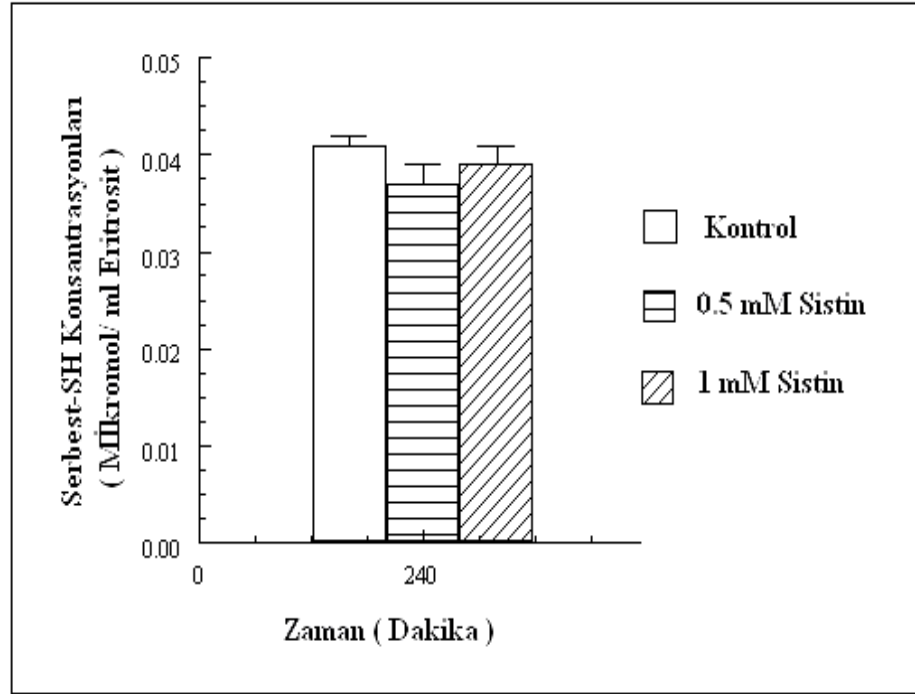
	Serbest -SH Konsantrasyonları(Mikromol/ml Eritrosit)					
	120 Dakika			240 Dakika		
	4 °C	20 °C	37 °C	4 °C	20 °C	37 °C
Kontrol	0.00	0.016 ± 0.00	0.020 ± 0.002	0.00	0.026 ± 0.002	0.034 ± 0.008
0.5 mM Homosistin	0.00	0.029* ±0.001	0.046* ±0.001	0.00	0.79* ± 0.004	0.184* ±0.004
1 mM Homosistin	0.00	0.043 *±0.002	0.086* ±0.002	0.00	0.119* ±0.003	0.249* ±0.006

Çizelge 4.1. Homosistinin homosisteine dönüşmesinin sıcaklığa bağlılığı. Eritrositler farklı konsantrasyonlarda homosistin içeren krebs ringer tamponunda farklı sıcaklıklarda belirli zaman periyodlarında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler izole edildi ve süpernatanttaki serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

Kontrolden önemli derecede farklı değer.

Çalışmamızın son aşamasında eritrositlerin sistini sisteine dönüştürmediğini aynı deney sistemini kullanarak araştırdık. Şekil 4.7’de de gösterildiği gibi eritrositler homosistinin aksine ekstraselüler sistini sisteine dönüştürememektedirler.



Şekil 4.7. Sistinin sisteine dönüşmesi. Yıkanan eritrositler 0.5 mM ve 1 mM sistin varlığında 37 °C’de 240 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj ve izole edildi. Daha sonra süpernatanttaki serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

Sonuçlarda istatistiksel fark yoktur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmanın amacı eritrositlerin plazma homosistein konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynayıp oynamadığını belirlemek. Sonuçlara göre, eritrositler plazmadaki homosistein konsantrasyonu değişimlerine cevap verebilecek şekilde homosisteinin membrandan taşınımını çift yönlü olarak gerçekleştirebilmekte ve böylece plazmadaki homosistein konsantrasyonunu geçici olarak regüle edebilmektedir. Sonuçlardan ayrıca eritrositlerin ekstraselüler homosistinin homosisteine dönüşümünü sağlayabildiği görülmektedir. Eritrositlerin bu fonksiyonu plazmada homosistin birikmesiyle meydana gelebilecek mekanik endotelial hasarların engellenmesi açısından önemli olabilir.

Eritrositler kan hücreleri içerisinde en büyük sayıdaki hücre grubunu oluşturmaktadırlar. Eritrositler ayrıca plazma ile doğrudan doğruya ilişkili hücrelerdir ve dolayısıyla plazma şartlarındaki değişikliklere birinci derecede maruz kalırlar. Bu açıdan eritrositler plazmada bazı metabolitlerin konsantrasyonlarının düzenlenmesinde bir fonksiyonları olabilir. Örneğin belirli bir metabolit plazmada arttığında bu eritrositler içersine alınarak plazmadaki seviyesi daha düşük tutulabilir. Aynı metabolitin plazmada konsantrasyonu azaldığında ise eritrositler bu metaboliti tekrar plazmaya bırakabilirler. Eritrositlerin böyle bir fonksiyonu homosistein varlığında gerçekleştirip gerçekleştirmediğini görmek amacıyla eritrositlerde homosisteinin dışardan hücre içine girişini ve hücreden dışarıya çıkışını iki yönlü olarak araştırıldı. Sonuçlar eritrositlerin dış ortamda homosistein konsantrasyonu arttığında bunu hücre içine transport ettiklerini dış ortamdaki konsantrasyon azalınca aldıkları homosisteini tekrar dış ortama bıraktıklarını göstermiştir. Eritrositlerin bu gözlenen özelliği en az iki farklı fonksiyonu yerine getirebilir. Birincisi plazmada homosistein artışlarına karşı geçici bir depo olarak görev görmek. Böyle bir fonksiyon plazmada homosistein artışı sonucu homosistein oksidasyonu ile oluşacak serbest radikal miktarını azaltarak kalp damar hasarlarını hafifletebilir. Diğer bir fonksiyonda eritrositlerin homosisteini yoğun olarak ürettikleri bölgeden alarak böbrekler gibi homosisteinin metabolizmasının ve eliminasyonun daha aktif olduğu bölgelere taşınması olabilir. Eritrositlerde homosisteinin membranda taşınmasını sağlayan sistemler detaylı olarak çalışmamıştır. Bununla birlikte diğer hücre sistemlerinde homosisteinin sistein taşıyan ASC, A, L, ve

X(AG) gibi sistemler tarafından taşınabildiğini ortaya koymuştur (Jiang ve ark., 2007). Eritrositlerde sistem X(AG)' nin varlığını gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla homosisteinin eritrositlere taşınmasında sistein taşınmasında görev alan diğer sistemler rol oynayabilirler. Deney sistemimizde homosistein alımının belirli amino asitler tarafından inhibe edilmeside bunu desteklemektedir. Ayrıca sonuçlarımızda görülen homosistein alımının bir çok amino asit tarafından inhibe edilebiliyor olmasıda diğer amino asitlerin plazmadaki artışlarının homosistein alımını yavaşlatarak plazmada homosistein konsantrasyonunun yükselmesine sebep olabileceklerini göstermektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada yüksek protein ihtiva eden diyetin plazma homosistein konsantrasyonunu yükselttiği gösterilmiştir (Verhoef ve ark., 2005). Ancak bunun sebebinin diyetteki metiyonin olduğuna yaygın olarak inanılmaktadır. Buna ilave olarak yüksek protein diyetinden kaynaklanacak olan plazmadaki amino asit konsantrasyonlarındaki artışında aynı zamanda homosistein alımını inhibe ederek plazmadaki homosistein konsantrasyonunu arttırdığıda sonuçlara bağlı olarak ileri sürülebilir.

Daha önce yapılan bir çalışmada hiperhomosisteinemide görülen endotelial hasarların konsantrasyonu yükselen homosistinde mekanik olarak kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Ragone, 2002). Hiperhomosisteinemide homosistin konsantrasyonu hemen hemen homosistin plazmada presipite olabileceği bir sınıra yaklaşmaktadır. Bu hastaların plazmalarındaki ani homosistin konsantrasyonu artışları homosistin presipitasyonu ile sonuçlanabilir. Dolayısıyla bu çalışmada eritrositlerin homosistini homosisteine çevirip çeviremedikleride araştırılmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada homosistin eritrosit membranından geçemediği gösterilmiştir (Eldjarn ve ark.,1962). Ancak yapılan çalışmada homosistinle muamele edilen eritrositlerin süpernatantında zamana bağlı olarak serbest -SH artışı olduğu gösterilmiştir. Bu eritrositlerin dışardan uygulanan homosistini homosisteine dönüştürebildiklerini göstermektedir. Bu sonucun açıklanması için muhtemel iki yol vardır. Birincisi homosistin eritrositler tarafından dışardan alınır ve daha sonra hücre içinde redüklendikten sonra tekrar homosistein şeklinde hücre dışına atılır. İkinci olasılık ise homosistin hücre içine alınmaz ancak GSH in redükleme gücü membran proteinleri tarafından hücre dışına iletilerek homosistin hücre dışı ortamda redüklenerek homosisteine dönüşür. Bahsedilen ikinci olasılığı destekleyen direk çalışmalar

literatürde bulunmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada eritrosit membranından geçemeyen bir disulfid olan DTNB nin eritrositlerde hücre içi GSH seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (Reglinski ve ark., 1988). Bu çalışmaya bağlı olarak GSH in redükte gücünün tiyol ihtiva eden ve membranı baştan başa geçen membran proteinleri tarafından dış ortama iletilebileceği ileri sürülmüştür. Yine benzer diğer bir çalışmadada ekstraselüler olarak uygulanan GSH in eritrositlerde hücre içi GSH seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Ciriolo ve ark., 1993). Bu çalışmada yine GSH in kendisi transport edilmeden GSH in redükte gücünün membranın iki tarafına iletilebileceğini göstermektedir. Bu açıdan deney sistemimizde eritrositlere ekstraselüler olarak uyguladığımız homosistin aynı mekanizmayla homosisteine dönüştürülmüş olabilir.

Çalışmada benzer deneyler homosistin yerine sistin kullanılarak tekrarlandığında sistinin eritrositler tarafından sisteine dönüştürülemediği gösterilmiştir. Homosistin ve sistin ile alınan bu farklı sonuçların temeli bunların yapısal stabiliteelerindeki ve tiyol değiştirme reaksiyonlarına yatkınlıklarındaki farklılık olabilir. Sonuç olarak hangi mekanizmayla olursa olsun eritrositlerin dış ortamda bulunan homosistini homosisteine dönüştürebildikleri görülmektedir. Bu şekilde eritrositler plazmada homosistin artışını engelleyerek homosistin presipitasyonunu dolayısıyla bu sebeple oluşabilecek mekanik endotelyal hasarlarıda engelleyebilir.

KAYNAKLAR

- Aksoy, Ş., N, Geyikli, İ., Saygılı, İ., 2006. Sağlıklı kişilerde plazma homosistein düzeyinin belirleyicileri. **Türk Biyokimya Dergisi**, 31 (4) ; 175–181.
- Aydoğdu, M., Erkan, T., Uzun, H., Aydın, S., Doğan, Y., Çokuğraş, F., Ç., Kutlu, T., 2007. Portal hipertansiyonda serum leptin ve homosistein düzeylerinin anlamı ve antropometrik değişkenler ile ilişkisi. **Türk Ped Arş** , 42: 17–23.
- Arnadottir, M., Berg, A., Hegbrant, J., Hultberg, B., 1999. Influence of haemodialysis on plasma total homocysteine concentration. **Nephrol Dial Transplant**, 14:142-146.
- Bailey, B.ve Gregory, J., 1999. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: Metabolic significance, risks and impact on folate requirement. **The Journal of Nutrition**, 129: 919–922.
- Bakkaloğlu, S., 2002. Homosistein ve kronik böbrek yetmezliği. **Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi**, 11(2):68–73.
- Bree, A., Verschuren, M., Kromhout, D., Kluijtmans, L., Blom, J., 2002. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Pharmacol Rev**, 54:599–618.
- Bridges, C. ve Zalups, R., 2004. Homocysteine, system b⁰,₋ and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic. **Mercury American Journal of Pathology**, Vol. 165, No. 4.
- Bulucu, F., Vural, A., Yeşilova, Z., Öktenli, Ç., Yaman, H., Erbil, M., Kocabalkan, F., 1998. Hemodiyaliz hastalarında plazma total homosistein düzeyi. **Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi**, 3:132–136.
- Canoruç, N., , Canoruç, F., Aslan, Ç., Yılmaz, Ş., Turgut, C., Dursun M., Akkuş, Z., Kale, E., 2006. Karaciğer hastalıklarında (siroz veya hepatit) homosistein ve selenyum düzeyleri. **Akademik gastroenteroloji dergisi**, 5 (1): 26–30.
- Cavalca, V., Cighetti, G., Bamonti, F., Loaldi, A., Bortone, L., Novembrino, C., Franceschi, M., Guazzi, D., 2001. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. **Clinical Chemistry**, 47:5,887–892.
- Çıkım, G., Ozan, G., Gülcü, F., Baykan, D., Gürsu, M., 2004. Toksik multinodüler guatrı olgularda homosistein düzeyi ve lipid peroksidasyonu. **Fırat Tıp Dergisi**, 9(4): 116–119.
- Ciriolo M.R., Paci M., Sette M., De Martino A., Bozzi A., Rotilio G., 1993. Transduction of reducing power across the plasma membrane by reduced glutathione. A 1H-NMR spin-echo study of intact human erythrocytes. **Eur J Biochemistry**, 215(3), 711-8.
- Closs, E. I., 1996. CATs, A Family of Three Distinct Mammalian Cationic Amino Acid Transporters. **Amino Acids**, 1: 193-208.
- Demirci, C., Özbakkaloğlu, M., Yıldırım, A., Çakmak, T., Yavuzgil, C., 2003. Akut koroner sendromlu hastalarda plazma homosistein düzeyleri. **SSK Tepecik Hastanesi Dergisi**, 13(2):91–96.
- Demirkıran, K., 2003 Homosistein ve serebral vasküler hastalıklar. **Kocatepe Tıp Dergisi**, 1, 08–13.

- Deves, R., Chavez, P., Boyd, C.A.R., 1992. Identification of a New Transport System in Human Erythrocytes That Recognizes Cysine and Leucine with High Affinity. **Journal of Physiology**, 454: 492-501.
- Dikmen, M., 2004. Homosistein metabolizması ve hastalıklarla ilişkisi. **Türkiye Klinikleri J Med Sci**, 24:645-652
- Dikmen, M., Gülel, B., Güneş, H., Gücüyener, D., Değirmenci, İ., Özdemir, G., Başaran A., 2004. Akut inme hastalarında risk faktörü olan homosistein düzeyine MTHFR gen polimorfizmlerinin etkisi. **Kocatepe tıp dergisi**, 5: 55–61.
- Eavenson, E., Christensen, H.N., 1967. Transport Systems for Neutral Amino Acids in the Pigeon Erythrocyte. **Journal Biology Chemtiry**, 242: 5386-5396.
- Eikelboom, W., Lonn, E., Genest, J., Hankey, G. and Yusuf, S., 1999. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease. **Annals of Internal Medicine** , Volume 131.
- Eldjarn L., Bremer J., Borresen C., 1962. The reduction of disulfides by human erythrocytes. **Biochemtiry Journal**, 82, 192-197.
- Eleno, N., Deves, R., Boyd, C.A., 1994. Membrane Potential Dependence of the Kinetics of cationic Amino Acid Transport System in Human Placenta. **Journal Physiology**, 479: 291-300.
- Elias, F., Sullivan, M., D'Agostino, B., Elias, K., Jacques, F., Selhub, J., Seshadri, S., Wolf, A., 2005. Homocysteine and cognitive performance in the framingham offspring study: Age is important. **American Journal of Epidemiology**, 162:644–653.
- El-Khairi, L., Vollset, E., Refsum, H., and Ueland, M., 2003. Predictors of change in plasma total cysteine: Longitudinal findings from the hordaland homocysteine study .**Clinical Chemistry**, 49:1 113–120.
- Erol, A. Homosisteinin koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe nitrik oksit salıverilmesi üzerine olan etkisi. **XIII. Ulusal Farmakoloji Kongresi**, 4-8 Kasım 1996, Tekirova-ANTALYA
- Faraci, F., Lentz, S., 2004. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. **Stroke**, 35:345-347.
- Fe1, Y. J., Prasad, P.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., 1995. The Amino Acid Transport System y^+L Induced in *Xenopus Laevis* Oocytes by Human Choriocarcinoma Cell mRNA is Functionally Related to the Heavy Chain of the 4F2 Cell Surface Antigen. **Biochemistry**, 34: 8744-8751.
- Finkelstein, J., 2000. Homosisteine: A history in proress. **Nutrition Reviews**, 59:5193-5204.
- Friedman, A., Bostom, G., Selhub, J., Levey, A. and Rosenberg, I., 2001. The Kidney and Homocysteine Metabolism. **Journal of The American Society Nephrology**, 12: 2181–2189.
- Guidotti, G. G., Gazzola, G. C., 1992. Amino Acid Transporters: Systematics Approach and Principles of Control.(M.S.Kilberg ve D.Haussinger, Editör). **In: Mammalian Amino Acid Transport Mechanisms and Control**. New York, 3–30 .
- Hanson, N., Eckfeldt, J., Schwichtenberg, K., Aras, Ö. And Tsai, Y., 2002. Interlaboratory variation of plasma total homocysteine measurements: Results of three successive homocysteine proficiency testing surveys. **Clinical Chemistry**, 48:9 1539–1545.

- Heuberger, R., Fisher, A., Jacques, P., Klein, R., Klein, B., Palta, M. and Perlman, J., 2002. Relation of blood homocysteine and its nutritional determinants to age-related maculopathy in the third. **American Journal Clinical Nutrition**, 76:897–902.
- Hundal, H. S., Rennie, M. J., Watt, P. W., 1987. Characteristics of L-glutamine Transport in Perfused Rat Skeletal Muscle. **Journal Physiology**, 393: 283–305.
- Jacobsen, D., 2000. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress time for a reality check?. **Arterioscler Thromb Vascular Biology**, 20:1182–1184.
- Jacobsen, D., 1998. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. **Clinical Chemistry**, 44:8(B) 1833–1843.
- Jiang X., Yang F., Brailoiu E., Jakubowski H., Dun N.J., Schafer A.I., Yang X., Durante W., Wang H., 2007. Differential regulation of homocysteine transport in vascular endothelial and smooth muscle cells arteriosclerosis. **Trombosis, and Vascular Biology**, 27, 1976–1982
- Karaman, Y., 2006. Alzheimer hastalığı, vasküler demans ve hafif kognitif etkilenmede plazma homosistein, vitamin B₁₂ ve folat seviyeleri. **Journal of Neurological Sciences [Turkish]**, 23:(3) 8; 175–184.
- Kılıççı, Ç., 2004. Erken gebelik kayıplarında homosistein düzeyinin rolü. **Uzmanlık tezi**.
- Kim, J., Lee, H. and Chang, N., 2002. Hyperhomocysteinemia due to short-term folate deprivation is related to electron microscopic changes in the rat brain. **Journal Nutrition**, 132: 3418–3421.
- Knott, L., Hartridge, T., Brown, N., Mansell, J., 2003. Homocysteine oxidation and apoptosis: A Potential cause of cleft palaten. **Biology Animal**, 9:98–105.
- Kocabalkan, F., Baykal, Y., Bozoğlu, E., 2000. Yaşlılarda kardiyovasküler risk faktörü olarak homosistein. **Turkish Journal of Geriatrics**, 3(2): 69–73.
- Lehninger, A. L., Nelson, D.L., Cox, M. M., 2005. Principles of Biochemistry. **Worth Publishers**, Chapter–11; Biological Membranes and Transport, 370–378s, New York.
- Lim, U. and Cassano, P., 2002. Homocysteine and blood pressure in the third national health and nutrition examination survey, 1988–1994. **American Journal of Epidemiology**, 156:1105–1113
- Lynch, A. M., McGivan, J.D., 1987. Evidence for A Single Common Na⁺ dependent Transport System for Alanine, Glutamine, Leucine and Phenylalanine in Brush-Border Membrane Vesicles from Bovine Kidney, **Biochemistry Biophysics Acta**, 899: 176–184.
- Malinow, M., Bostom, A., Krauss, R., 1999. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases a statement for healthcare professionals from the nutrition committee. **American Heart Association Circulation**, 99:178–182.
- McKinley, M., Strain, J., McPartlin, J., Scott, J., and McNulty, H., 2001. Plasma homocysteine is not subject to seasonal variation. **Clinical Chemistry**, 47:8, 1430–1436
- Medina, M., Urdiales, J. And Sanchez, M., 2001. Roles of homocysteine in cell metabolism. Old and new functions. **European Journal Biochemistry**, 268, 3871±3882.

- Milton, H., Saier, J., 2000. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64(2): 354-411.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., 1996. Harper'in Biyokimyası. (R;K,MURAY, editör). **Barış Kitapevi**, Bölüm-6, Zenobiyotiklerin Metabolizması, 807-832s,İstanbul.
- Noyan, A., 2000. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, **Meteksan**, Bölüm-1, 6; Hücre, Vücut Sıvılarının Ayarlanması; 1-29s; 606-656, Ankara.
- O'Callaghan, M., Meleady, R., Fitzgerald, T., Graham, I., 2002. Smoking and plasma homocysteine. **European Heart Journal**, 23, 1580-1586.
- Onat, T., Emerk, K., Sözman, E. T., 2002. İnsan Biyokimyası. **Palme yayıncılık**, 975-8624-20-02, Ankara.
- Onat, T., Emerk, K., Sözman, E. Y., 2002. İnsan Biyokimyası. **Palme yayıncılık**, Bölüm-1-4; Hücre Amino Asitlerin Metabolizması, 1-18s,80-104s, Ankara.
- Özlem,S., Samancı, N., Karayalçın, B., Bilgilişoy, M., Gürbüz, Ü.,Gülsüm, Ö., Gültekin,İ.,2006. Postmenapozal osteoporoz ve osteopenide plazma homosistein düzeyleri ile biyokimyasal kemik döngüsü belirteçleri arasındaki ilişki. **Osteoporoz Dünyasından**, 12 (2): 22-26.
- Pamuk, F., 2000. Biyokimya. Gazi Kitapevi, Bölüm-12; Hücre zarında taşınım, 154-166, Ankara.
- Ragone, R., 2002. Homocystine solubility and vascular disease. **Faseb Journal**, 16, 401-404.
- Reglinski J., Hoey S., Smith W.E., Sturrock R.D.,1988. Cellular response to oxidative stress at sulfhydryl group receptor sites on the erythrocyte membrane. **Journal Biology Chemistry**. 263(25), 12360-12366
- Thambyrajah, J. and Townend, J., 2000. Homocysteine and atherothrombosis - mechanisms for injury. **European Heart Journal**, 21, 967-974.
- Temel, İ., Özerol, E., 2002. Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. **İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, 9(2) 149-157.
- Uz, E., Dankı, D., Dilbaz, N., 2006. Alkol kullanımı ve homosistein. **Klinik Psikofarmakoloji Bülteni**, 16:1-8.
- Usluer, H., Türker, G., Gökalp, A., 2005. Yenidoğan bebeklerde homosistein düzeyleri ve etkilendiği perinatal olaylar. **BABP – Proje No: 2005/004**.
- Weissa, N., Kellera, C., Hoffmanna, U.and Loscalzob, J., 2002. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. **Vascular Medicine**, 7: 227-239.
- Verhoef P., van Vliet T., Olthof M.R., Katan M.B., 2005. A high-protein diet increases postprandial but not fasting plasma total homocysteine concentrations: a dietary controlled, crossover trial in healthy volunteers. **American Journal Clinical Nutrition**. 82(3), 553-8.
- Yüce, A., Aksakal, M., 2006. Ratlarda homosisteinin oksidan ve antioksidan sistem ile kronik damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine E vitamininin etkisi. **F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi**, 20(3), 189-197.
- Yüksel, A., Yüksel, C., Canbakan, B., Atalay, H., Ayılı, M., 2002. Son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda homosistein düzeyleri ve rHuEPO kullanımının plazma homosistein düzeyleri ile ilişkisi. **Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi**, 11(2):12S-128.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan, yol gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Deniz YILDIZ'a (M.K.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Bölüm Başkanımız sayın Prof. Dr. Hayrettin OCAKVERDİ' ye (M.K.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), çalışmalarımın düzenli ilerlemesinde bana yardımcı olan Yeliz ÇAKIR, Mustafa ARIK, Hüseyin DOĞRU, Ar. Gör. Hasan YILDIZ' a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında destek ve sabırlarını benden esirgemeyen sevgili aileme gönül dolusu teşekkürler.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Hatay'ın Antakya ilçesinde doğdum. İlköğretim ve lise öğrenimimi Antakya'da tamamladım. 2006 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldum. 2006 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.

