T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

141987

HİPER VE HİPOTİROİDİLİ HASTALARDA HOMOSİSTEİN S-ADENOZİLMETİYONİN VE ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİ

H. Hakan ALP

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. F. Zuhal UMUDUM

Yüksek Lisans Tezi

Erzurum - 2005

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

HİPER VE HİPOTİROİDİLİ HASTALARDA HOMOSİSTEDİN, S-ADENOZİLMETİYONİN VE ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİ

H. HAKAN ALP

Tezin enstitüye Verildiği Tarih	: 13.09.2005
Tezin Sözlü Savunma Tarihi	: 26.09.2005
Tez Danışmanı	: Doç. Dr. F. Zuhal UMUDUM
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Ebubekir BAKAN
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Nuri BAKAN
Jüri Üyesi	: Doç. Dr. Mustafa GÜL
Jüri Üyesi	: Yrd. Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM
Enstitü Müdürü	: Doç. Dr. Adnan TEZEL

Eylül 2005
ERZURUM

İÇİNDEKİLER I

TEŞEKKÜRLER.....IV

ÖZET V

SUMMARY VI

1- GİRİŞ VE AMAÇ 1

2- GENEL BİLGİLER 4

2.1 AMİNO ASİTLER 4

2.2- S-adenozilmetiyonin 5

2.3- Homosistein..... 6

2.3.1- Homosistein Metabolizması 9

2.3.2- Hiperhomosisteinemi Nedenleri 12

2.3.2.1- Hiperhomosisteineminin Patofizyolojik Nedenleri 16

2.4- SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR 17

2.4.1- Serbest Oksijen Radikalleri Ve Reaktif Oksijen Türleri 19

2.4.1.1-Süperoksid Radikali ($0_2^{\cdot}$) 19

2.4.1.2- Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) 19

2.4.1.3- Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$) 20

2.4.1.4- Singlet Oksijen (O_2) 20

2.4.1.5- Hidrojen Peroksit (H_2O_2) 20

2.4.1.6- Diğer Radikaller 21

2.4.2- Serbest Radikallerin Kaynakları 21

2.4.2.1- Elektron Transport Zinciri 21

2.4.2.2- Enzimatik tepkimeler 21

2.4.2.3- Enzimatik olmayan tepkimeler 22

2.4.2.4- Dış etkenler 22

2.4.2.5- Endoplazmik retikulum (ER) ve Nükleer Membran (NM) Elektron Transport Sistemi 23
2.4.2.6- Plazma Membranı 24
2.4.3- Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri 24
2.4.4- Serbest Radikaller İle İlgili Durumlar ve Hastalıklar 27
2.4.5- Antioksidan Savunma Sistemleri 27
2.4.5.1- Doğal Antioksidanlar 28
2.5- Tiroid Hormonları 32
2.5.1- Tiroid Hormonlarının Biyosentezi 32
2.5.1- Tiroid Hormonlarının Taşınma Ve Metabolizması 34
2.5.2- Tiroid Hormonlarının Biyolojik Etkileri 35
2.5.3- Tiroid Hormon Bozuklukları 36
2.5.3.1- Hipotiroidizm 37
2.5.3.2- Hipertiroidizm 37
3- MATERYAL VE METOD. 39
3.1- Kan Örneklerinin Alınması 39
3.2- Kullanılan Kimyasal Maddeler..... 39
3.3- Kullanılan Araç Ve Cihazlar 40
3.4- Kullanılan Çözeltiler Ve Hazırlanması 41
3.5- Metod..... 43
3.5.1- Plazma Homosistein Analizi 43
3.5.2- Plazma S-Adenozilmetiyonin Analizi.....43
3.5.3 Kromotografik Koşullar..... 44
3.5.4- FT_3, FT_4, TSH Analizi 44
3.5.5- Glutatyon Peroksidaz (GSHPx) Analizi 44

3.5.6- Superoksid Dismutaz (SOD) Analizi 46
3.5.7- Malondialdehit (MDA) Analizi 47
3.5.8- Nitrik Oksit (NO) analizi 48
3.5.9- İstatistiksel Analiz..... 50
4- BULGULAR 51
5- TARTIŞMA 59
6- KAYNAKLAR 65

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince değerli bilgi, tecrübe ve deneyimlerinden yaralandığım, bana her konuda yol gösterip, manevi ve ilmi yardımlarını esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. F. Zuhal UMUDUM' a en içten duygularımla teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi, manevi ve ilmi desteklerini gördüğüm hocalarım başta sayın Prof. Dr. Ebubekir BAKAN ve Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans tezimi hazırlamamda bana yardımcı olan sayın Prof. Dr. Nuri BAKAN ve Prof. Dr. Fatih AKÇAYA'a eğitimim süresince kendilerinden her konuda bilgi aldığım Atatürk Üniversitesi Tıp fakültesi Anabilim Dalı değerli hocalarından Prof. Dr. Leyla YILDIZ'a, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Doç. Dr. M. Sait KELEŞ'e, Doç. Dr. Hülya AKSOYA ve Arş. Gör. Berna DEMİRCAN'a, Arş. Gör. Fatma ÖZABACIGİL'e, Arş. Gör. Hamdullah TURHAN'a, Arş. Gör. Asuman ÖZKAN'a ve Arş. Gör. Yasemin TÜRKANA'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bölümümüz sekreteri Keriman ERDEN'e Biyokimya Anabilim Dalı Hormon labratuvarı çalışnaları Selda GÜL, Ayla KARA ve Serpil KILICA gösterdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmamda bana her türlü anlayışı ve desteği gösteren aileme ve dostlarıma teşekkür ederim.

H. Hakan ALP

ÖZET

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yakutiye Araştırma Hastanesi Endokrinoloji Kliniğinde teşhis konulup henüz tedavi başlamamış gönüllü 22 hipotiroidili (12 erkek,10 kadın), 30 hipertiroidili (10 erkek, 20 kadın) hasta ve 15 sağlıklı (8 erkek, 7 kadın, hiçbir sistemik ve patolojik rahatsızlığı olmayan) kişi üzerinde gerçekleştirildi. Bu hasta ve kontrol gruplarında plazma homosistein (Hcy), S-adenozilmetiyonin (SAM) ve serum malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve nitrik oksit (NO), seviyeleri tespit edilerek aralarındaki ilişki incelendi. Hipertiroidili hasta grubunda ortalama plazma Hcy düzeyi, ($X \pm SD$; 8.4 ± 1.9 μmol/L) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (9.1 ± 2.8 μmol/L) daha düşük olduğu tespit edildi ama bu istatistiksel olarak anlamsızdı. Aynı hasta grubunda ölçülen ortalama SAM düzeylerinin (150.6 ± 29.6 nmol/L) kontrol grubuna kıyasla (187.1 ± 20.8 nmol/L) daha düşük olduğu gözlendi ($p<0.05$). Hipotiroidili grupta plazma Hcy (17.9 ± 4.9 μmol/L) ve SAM (237.4 ± 34.5 nmol/L) düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.01$ Hcy ve SAM için).

Kontrol grubu MDA (23.5 ± 7.4mmol/L) seviyeleri her iki hasta grubundan da (hipertiroidi için: 27.7 ± 7.8 mmol/L, $p<0.01$ ve hipotiroidi için: 26.5 ± 9.9 mmol/L, $p<0.05$) düşüktü. Ortalama NO değerleri açısından kontrol grubuyla (27.7 ± 8.4 U/mL) hipertiroidili grup (28.12 ± 7.6 U/mL) arasında önemli bir fark yok iken ($p>0.05$), hipotiroidili grup (17.2 ± 8.7 U/mL) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.01$). Hiper ve hipotiroidili hasta gruplarında ölçülen SOD (1.8 ± 0.1 U/mL, 2.37 ± 0.7 U/mL) aktiviteleri kontrol grubundan (3.4 ± 0.7 U/mL) düşüktü, (hipertiroidi için $p<0.01$, hipotiroidi için: $p<0.05$). GSHPx açısından kontrol (1927.3 ± 534.8 U/mL) grubu ile hasta grupları (hipertiroidi: 1967.1 ± 263.6 U/mL, hipotiroidi: 2026.2 ± 587.5 U/mL) arasında önemli bir fark yoktu.

Yapılan korelasyon analizlerinde, hipotiroidili hasta grubunda FT_4 ile SAM arasında negatif korelasyon ($r = -0.409$, $p<0.05$) FT_3 ile NO değerleri arasında pozitif korelasyon ($r = 0.431$, $p<0.05$) olduğu tespit edildi. Hipertiroidili hasta grubunda, TSH ile MDA düzeyleri arasında ($r = -0,482$, $p<0.05$) ve FT_3 ile GSHPx aktivitesi arasında negatif bir korelasyonlar
($r = -0.479$, $p<0.05$) olduğu belirlendi.

Sonuç olarak hipotiroidili hasta gruplarında artan homosistein ve SAM seviyeleri ile tiroid hormonları arasında arasında direkt bir ilişki saptanamadığı gibi bu grupta artan oksidatif stres ve antioksidan düzeylerindeki azalma ile de bir korelasyon bulunamadı. Hipertiroidili hasta grubunda Hcy ve SAM düzeyleri kontrol grubuna göre yine tiroid hormonlarından bağımsız olarak düşük bulundu. Oksidatif stresin daha yüksek olduğu bu grupta Hcy ve SAM ile antioksidanlar arasında korelasyon bulunamadı.

Anahtar kelimeler: Homosistein, S-adenozilmetiyonin, hipertiroidi, hipotiroidi, oksidatif stres

SUMMARY

LEVELS OF HOMOCYSTEIN, S-ADENOSYLMETHIONINE AND ANTIOXIDANTS IN PATIENTS WITH HYPER- AND HYPOTHYROIDISM

This study was carried out in 22 newly diagnosed hypothyroid (12 men, 10 women) and 30 newly diagnosed hyperthyroidism (10 men, 20 women) patients from the Endocrinology Department of Atatürk University Yakutiye Research Hospital. Fifteen similary age- and sex-matched healthy volunteers (8 men and 7 women) were taken as control group.

In these patient and control groups, plasma homocystein (Hcy), S-adenosylmethionine (SAM), serum malondialdehyde (MDA) and nitic oxide (NO) levels, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSHPx) activities were determined and the relations of these parameters were investigated. In the patients with hyperthroidism the mean plasma Hcy levels ($X \pm SD$; 8.4 ± 1.9 μmol/L) was lower than those of the control group (9.1±2.8 μmol/L), but this was statistically insignificant. It was observed that SAM levels of the same patient group (150.6 ± 29.6 nmol/L) were low in comparison to the control group (187.1 ± 20.8 nmol/L, $p<0.05$). It was also seen that plasma Hcy (17.9±4.9 μmol/L) and SAM (237.4±34.5 nmol/L) levels were higher in the hypothyroid group than in the control group ($p<0.01$ for Hcy and SAM).

MDA levels of the control group (23.5±7.4 mmol/L) were lower than those to both the patient groups (for hyperthyroid group: 27.7±7.8 mmol/L, $p<0.01$ and for hypothyroid group: 26.5±9.9 mmol/L, $p<0.05$). While there was not any significant difference between the control group (27.7±8.4 U/mL) and hyperthyroid group (28.12±7.6 U/mL) for the means of NO levels, the difference between the control group and hypothyroid group (17.2±8.7 U/mL) was statistically significant ($p<0.01$).

SOD activities of patients with hyper- and hypothyroidism (1.8±0.1 U/mL, 2.37±0.7 U/mL, respectively) were lower than those of the control group (3.4±0.7 U/mL) , ($p<0.01$ for hyperthyroid, $p<0.05$ for hypothyroid).

There was no significant difference in GSHPx activities between control group (1927±534.8 U/mL) and patient groups (hyperthyroid: 1967±263.6 U/mL, hypothyroid: 2026.2±587.5 U/mL).

In the correlation analysis, it was found that there were negative correlation between FT_4 and SAM levels ($r = -0.409$, $p<0.05$) and positive correlation between FT_3 and NO levels ($r = 0.431$, $p<0.05$) in hypothyroid group. There were negative correlation both between TSH and MDA levels ($r = -0,482$, $p<0.05$) and between FT_3 levels and GSHPx activities ($r = -0.479$, $p<0.05$) in hyperthyroid group.

In conclusion, it was not observed any direct correlation not only between increased Hcy and SAM levels and the levels of thyroid hormones, but also between increased oxidative stress and decreased antioxidant capacity in the patients with hypothyroidism. In the patients with hyperthyroidism, it was found that Hcy and SAM levels were low as compared with the control group independent of thyroid hormones. In these group in which oxidative stress was high, there was not any significant correlation between Hcy and SAM levels and antioxidants.

Key World: Homocystein, S-adenosylmethionine, hyperthyroidi, hypothyroidi And oxıdatıf stress

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Homosistein protein yapısına girmeyen ve kükürt ihtiva eden bir amino asittir. Vücutta, esansiyel bir amino asit olan metiyonin metabolizmasından türer.[1-4] Homosistein iki yolla metabolize olmaktadır. Bunlardan birincisi vitamin B_{12}-bağımlı bir enzim olan metiyonin sentaz tarafından katalizlenen remetilasyon yoludur. Bu reaksiyonda 5-metiltetrahidrofolat metil donörü olarak kullanılır, metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi remetilasyon yolunun regülatörüdür.[5,6] İkinci yol ise transsülfürasyon yoludur. Bu reaksiyonda homosistein serinle reaksiyona girerek sistatiyonini oluşturur. Bu reaksiyon sistatiyonin β sentaz tarafından katalizlenmektedir.[7,8]

Plazma total homosistein konsantrasyonunun 15 μmol/L den daha yüksek olması "hiperhomosisteinemi" olarak tanımlanmaktadır.[1,2] Plazma homosistein seviyesinin artışının kardio vasküler hastalıklar, venöz tromboz, mental retardasyon ve nöral tüp defekti için bir faktör olduğu, daha önce yapılan çalışmalarda bir çok kez vurgulanmıştır.[5,6,9] Hiperhomosisteinemiye sebep olan sistatiyonin β sentaz, metiyonin sentaz ya da metilentetrahidrofolat redüktaz defekti, vitaminlerin besinsel defekti (folat, vitamin B_{12} ya da B_6) ile aterosiklerotik ve aterotrombotik hastalıklar arasında da bir ilişki mevcuttur[10]. Homosistein ya da ilgili metabolitlerin bu hastalıklarla arasındaki ilişkinin mekanizması bilinmemesine rağmen şiddetli homosistein artışının vasküler sistem için toksik olduğunu ispatlayan güçlü kanıtlar mevcuttur.[1,2,8]

Ölçüm tekniklerinin gelişmesiyle birlikte daha önceki bilgilerin aksine, amino asit defekti olmayan bireylerde de, çeşitli nedenlerden dolayı hiperhomosisteineminin bulunabileceği gösterilmiştir.[12-14]

Metiyoninin homosisteine çevriminde iki ara ürün oluşmaktadır bunlardan birincisi S-adenozilmetiyonin (SAM) ikincisi ise S-adenozilhomosisteindir (SAH). SAM metabolizmada bir metildonörüdür. N^5-Metiltetrahidrofolat'ta bir metil taşıyıcısıdır

fakat SAM üzerinde bulundurduğu kararsız sülfonyum iyonundan dolayı güçlü bir alkilleyicidir. Metil grubu nükleofillerin saldırısına maruz kalır ve N^5-metiltetrahidrofolatın metil grubundan 1000 kat daha reaktiftir.[5]

Hiperhomosisteineminin serbest radikal oluşumunu artırabileceği düşüncesi indirekt kanıtlarla desteklenmeye çalışılmıştır. Homosistein ve lipit peroksidasyonu arasında pozitif bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir.[15] Hiperhomosisteinemili hastaların genelinde lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit düzeylerinin artmış olduğu ifade edilmiştir. Endotelyumda homosisteinin toksik etkisinin antioksidan enzimler tarafından bloke edilebileceği düşünülmüştür.[16] Ayrıca tiollerin otooksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. [15,16]

Hiperhomosisteineminin serbest radikal oluşumu ile olan ilişkisinin yanı sıra tiroid hormonlarıyla da bir ilişkisi olabileceğini gösteren çalışmalar vardır.[7,11] Tiroid hormonları tiroid bezinden salınan tetraiyodotreonin (T_4) ve triiyodotreonin (T_3) dir. Bu hormonlar genel metabolik aktivitenin düzenlenmesinden sorumludur.[17,18]

Tiroid hormonlarının salınımını tiroid stimule edici hormon (TSH) düzenler. Tiroid hormonları metabolizmada iki temel etkiye sahiptirler. Bunlardan birincisi tüm vücut dokularındaki protein sentezini artırmak diğeri ise Na^+-K^+ATPaz'a bağlı oksijen tüketimini artırmaktır. Tiroid hormonlarının normalden az salınması hipotroidiye, fazla salınımı ise hipertiroidiye yol açar.[19,20]

Biyokimyasal yolların çoğunda etkili olan tiroid hormonları homosistein metabolizmasında da sekonder bir etkiye sahip olabilir. Hipotiroidizmin hafif derecede hiperhomosisteinemiye sebep olduğu daha önceki çalışmalarda vurgulanmıştır. Bu ilişkinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir, ancak hipotiroidi ile birlikte homosisteindeki bu artışın folattan kaynaklandığı sanılmaktadır.[20,21,22] Tiroid

hormonlarının homosistein üzerindeki bu etkisinin yanı sıra serbest radikal oluşumu ve lipit peroksidasyonu üzerinde de etkisi olduğunu ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Hipertiroidili hastalarda serbest radikal ve lipit peroksidasyon oluşumunun arttığını, hipotiroidili hastalarda ise serbest radikal oluşumunun azaldığını vurgulayan çalışmalar yapılmıştır[11].

Bu çalışmanın amacı plazma total homosistein konsantrasyonu, SAM, oksidan ve antioksidanların hiper ve hipotroidli hastalardaki seviyelerinin tespit edilmesi ve tüm bu parametreler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesidir.

2- GENEL BİLGİLER

2.1 AMİNO ASİTLER

Amino asitler amino ve karboksil grubu taşıyan organik bileşiklerdir. Genel formülleri R-CH(NH_2)-COOH şeklindedir. Karboksil grubunun bağlı olduğu karbon atomuna (α-karbonu) bir amino grubu, bir hidrojen atomu ve amino asitten amino aside değişen bir R grubu bağlı bulunmaktadır.

R grubunun yapısı, büyüklüğü, elektrik yükü her amino asit için farklıdır. R gruplarının kimyasal yapısındaki farklılık ve çeşitlilik proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. Proteinlerin yapısında bulunan 20 amino aside standart veya primer amino asitler denilmektedir.

R grubu hidrojen olan glisin dışındaki tüm amino asitler asimetrik karbon atomuna sahiptirler. Yani α-karbon atomuna dört farklı grup bağlıdır. Bu dört farklı grubun uzaydaki farklı yönelişleri amino asidin D ve L steroizomerlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Proteinlerin yapısında bu iki izomerden sadece L formu yer alır.[25]

Amino asitler sulu çözeltilerde iyonize halde, ortamın pH değerine göre negatif yüklü (anyonik form), pozitif yüklü (katyonik form) veya nötral (dipolar iyon, zwitter form) yapılar olarak bulunmaktadır.

Amino asitler yapılarında bulundurdukları amino, karboksil ve R gruplarının özelliklerine göre kimyasal tepkimeye girerler. Amino asitler kendilerine özgü olan ninhidrin tepkimesine de girmektedirler.

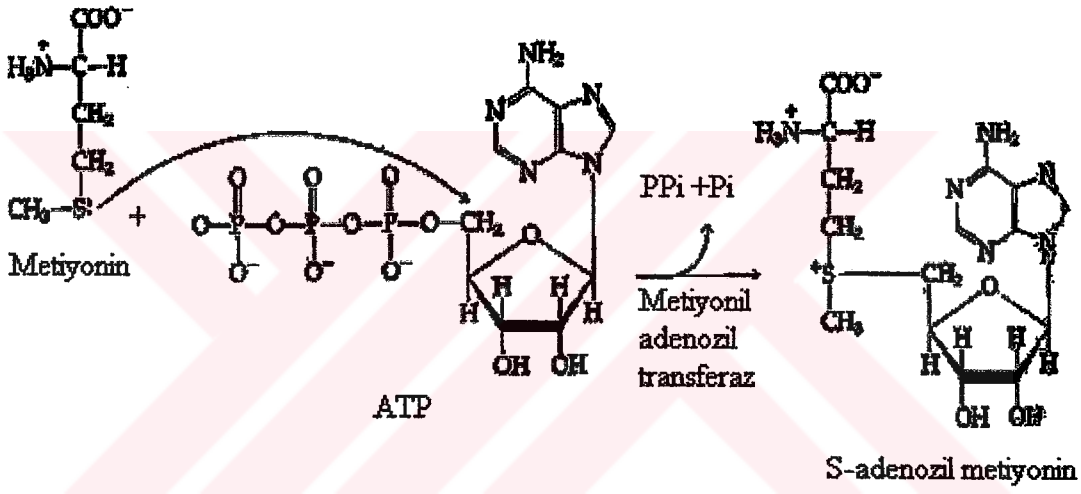
Standart amino asitler organizmada yapılıp yapılmadıklarına, metabolik sonlarına, izoelektrik noktalarına, R gruplarının çözünürlüğüne ve kimyasal yapılarına göre değişik şekilde sınıflandırılmaktadır. Yaygın olarak R gruplarına göre yapılan sınıflandırma kullanılmaktadır. Bu sınıflandırma, nonpolar alifatik R gruplu olanlar,

polar yüksüz R gruplar, aromatik R gruplar, pozitif yüklü R gruplar ve negatif yüklü R gruplar olarak yapılabilir. [5,6,19]

2.2- S-ADENOZİLMETİYONİN (SAM)

SAM vücutta bulunan en önemli metil vericisidir.

Esansiyel bir amino asit olan metiyoninin ATP ile metiyoninadenozil tranferaz enzimi katalizörlüğünde reaksiyona girmesi sonucu oluşur(Şekil 1). [27-29]



Şekil 1. S-Adenozilmetiyonin Oluşumu

SAM kararsız sülfonyum iyonundan dolayı güçlü bir alkilleyici ajandır. SAM bir metil vericisi olarak DNA, RNA, proteinler, nörotransmitterler ve kreatinin gibi bir çok biyomolekülün metillenmesinde görev alır.[30,31]

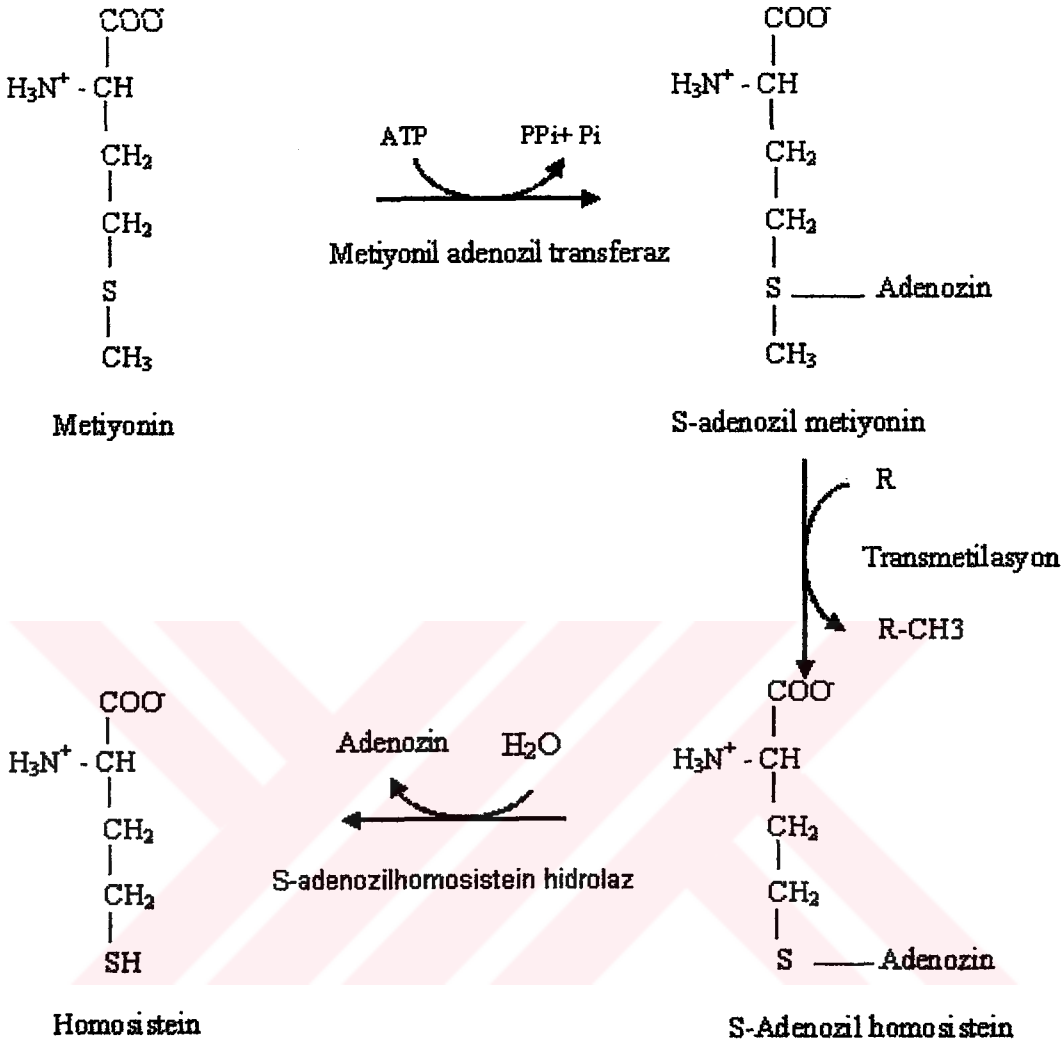
SAM yapısındaki metil grubunun uygun alıcılara transferinden sonra S-adenozilhomosistein oluşur. S-adenozilhomosistein, SAM'a bağımlı transmetilasyon reaksiyonlarında negatif bir feedback inhibitörü olarak fonksiyon görür. [26,27]

SAM adomet-dekarboksilaz enzimi ile poliaminlarin (spermidin, spermin) oluşumunda kullanılan üç karbonlu birimin öncülü olan S-adenozilmetiyopropilamine dekarboksile olmaktadır.[6]

SAM seviyesindeki artış homosisteinin remetilasyon yolunu inhibe eder. Sistatiyonin β sentaz enziminin aktivitesini ise stimule eder. Homosisteinin transsülfürasyon yolunda "dönüşümsüz" olarak kullanılmasını hızlandırır. SAM, antioaksidan sistemin önemli bir bileşeni olan glutatyon sentezini hızlandırarak oksidatif stres yükünü ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır.[31]

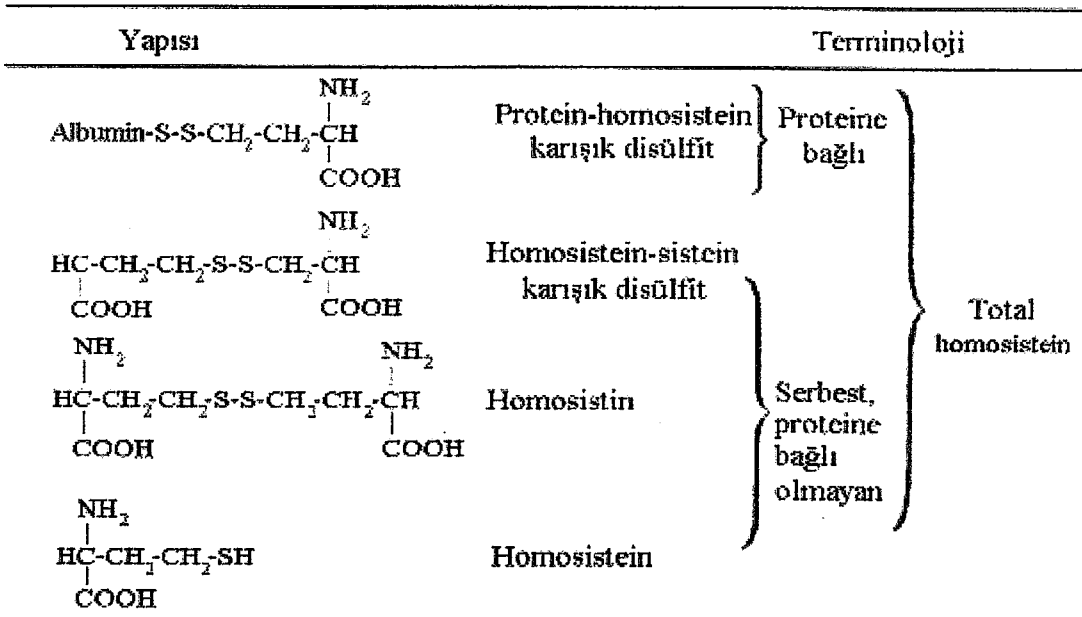
2.3- HOMOSİSTEİN

Homosistein serbest tiyol (sülfhidril) grubu taşıyan bir amino asittir. Fizyolojik pH' da değişik disülfütler oluşturacak şekilde kolayca okside olur. Bu durum, tiyol grubunun pKa değerinin 8-9 civarında oluşundan dolayıdır. Metiyonin vücuttaki homosisteinin tek kaynağıdır. Metiyonin esansiyel bir amino asittir ve bu esansiyel rolü proteinlerin ve SAM'in sentezinde kullanılmasından kaynaklanır. Homosistein protein yapısına katılmaz fakat önemli ara ürünlere kaynaklık edişi nedeniyle oldukca değerlidir.[32-34] İlk defa De Vigneaud tarafından 1932 yılında amino asit metabolizmasının bir ara ürünü olduğu keşfedilmiştir.[13] (Şekil 2)



Şekil 2. Homosisteinin Oluşumu

İnsan dolaşımında homosisteinin yalnızca %1-2 si serbest hal olan redükte formda bulunur. %5-10 u homosistein-sistein karışık disülfür şeklinde bulunur. %10-20 si dimerleşerek okside halde bulunur. %80 i başlıca albumine bağlıdır ve proteine bağlı homosistein olarak tanımlanır.[6,35-37] Bunların hepsi vücutta total homosistein olarak adlandırılır (Şekil 3).



Şekil 3. Homositein Çeşitleri.

1969 yılında Mc Cully, ilk olarak aterosiklerotik damar hastalığı ile artmış homosistein arasında bir ilişki olduğunu klinik olarak ortaya çıkarmıştır. Mc Cully, homosistinüri ve yüksek plazma homosistein konsantrasyonlu iki çocuğa yaptığı otopside geniş arteryal tromboz ve aterosklerosiz olduğunu rapor etmiştir. Bu gözlemlerle Mc Cully, artmış plazma homosisteinin aterosiklerotik vasküler hastalığın sebebi olabileceğini ileri sürmüştür.[24]

Homosistinürili çocuklar daha yakın takibe alınarak yapılan çalışmalarda, vakaların hemen hemen tamamında bulunan mental retardasyonun yanısıra, arteryal oklüzyon ve venöz tromboembolik olayların bu hastaların kliniğinde önemli bir yer tuttuğu gözlenmiştir. Vakaların %25 i, 20 yaşına kadar ilk tromboembolik atağını, %50 sinde tüm yaşamında en az bir kez tromboembolik atak geçirdiği rapor edilmiştir.[38] Bu gözlem, homosistinürili hastaların plazmalarında bulunan artmış homosistein düzeylerinin arteryel ve venöz patolojisinden sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonraki çalışmalar, sistatiyonin β sentaz ve metilentetrahidrofolat redüktaz enzim

defekti olan hastalarda, kroner arter hastalığı riskinin en az iki kat artmış olduğunu göstermiştir.[39,40]

Homosistein ve ilgili metabolitleri son yıllarda en çok araştırılan konular arasında yer almaktadır. Bu konuda 1966-1998 yılları arasında yapılan araştırmalar oldukca hızlı bir artış göstermiştir. 1998 de 500 araştırma[13] ve 1999-2004 yılları arasında 10000 den fazla araştırma yapılmıştır.

2.3.1- Homosistein Metabolizması

Homosistein, S-adenozilhomosisteinin S-adenozilhomosistein hidrolaz enzimi tarafından hidrolizi ile meydana gelir. Oluşan homosistein iki şekilde metabolize olur. Birincisi metiyonin metabolizmasını tamamlayacak şekilde homosisteinin metillenmesi diğeri ise homosisteinin transsülfürasyon yolu vasıtasıyla serin ile birleşerek sistatiyonini oluşturmasıdır.[6,34,39,41-43]

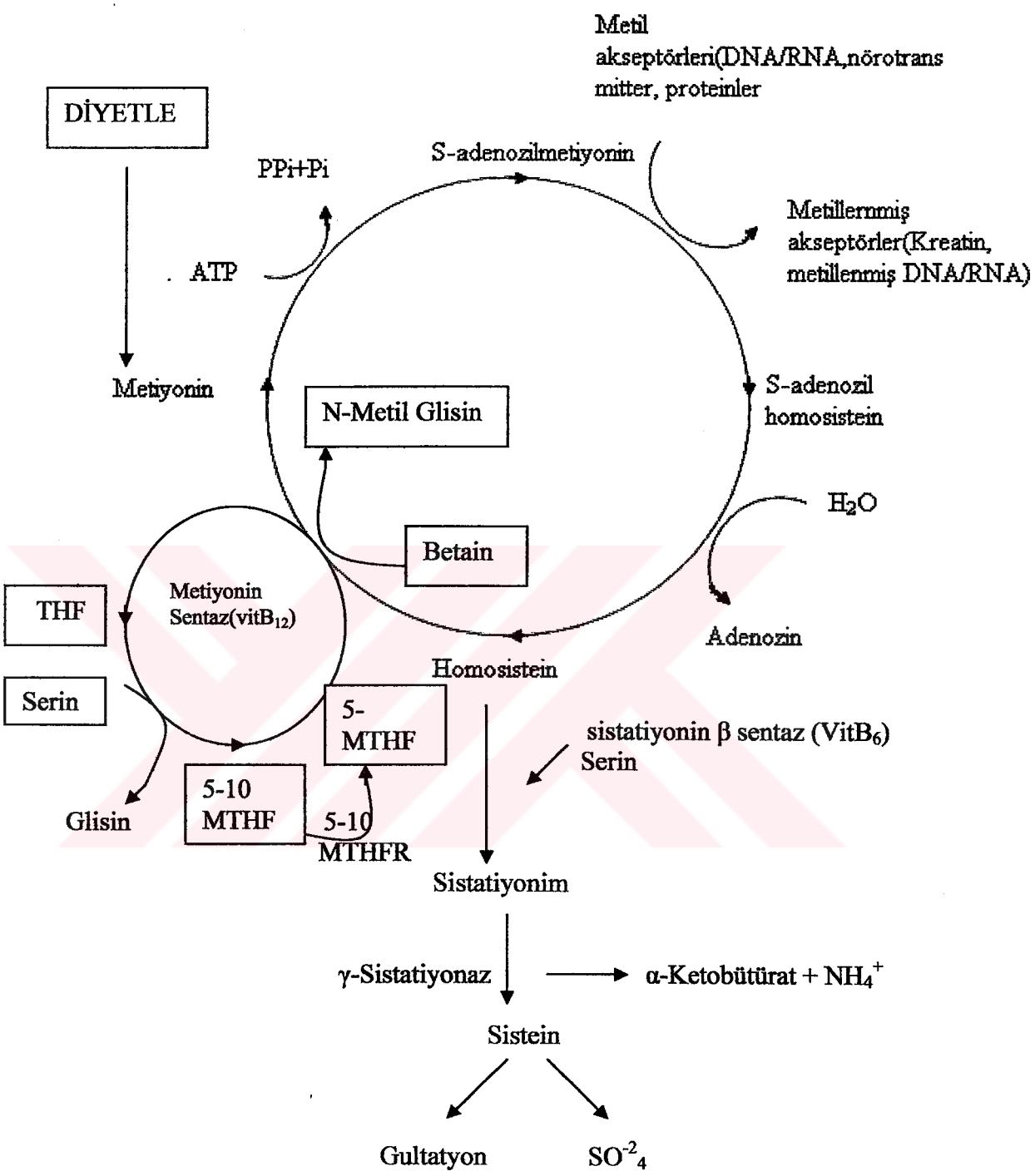
Karaciğerde, homosistein betain-homosistein metilentransferaz tarafından remetilasyona uğrar ve bu reaksiyonda metil donörü olarak betain kullanılır. Homosistein kofaktör olarak vitamin B_{12} nin kullanıldığı ve metilen transferaz enziminin katalizlediği reaksiyonla metiyonine çevrilir. Bu reaksiyonda metilentetrahidrofolat metil donörü olarak kullanılır.[19,44-46] Metiyonin eksikliğinde remetilasyon yolu tercih edilir.

Transsülfürasyon yolunda ise homosisteine serin eklenmesiyle sistatiyonin oluşur. Bu reaksiyonu sistatiyonin β sentaz enzimi katalizler ve kofaktör olarak vitamin B_6 ya gereksinimi vardır. Sistatiyonin, γ-sistatiyonaz enzimi katalizörlüğünde α-ketobütürat ve sisteine parçalanır (Şekil 4).[10,47-49]

Homosistein hücre içinde redükte formda bulunmaktadır. Yüksek intraselüler homosistein konsantrasyonu, SAM'ne bağlı transmetilasyon reaksiyonlarını inhibe eden S-adenozilhomosistein düzeyini artıracağı için, homosistein hücrede çok sıkı limitlerde

ayarlanmaktadır. Homosisteinin hücre dışına taşınması çok az çalışılan konulardan biridir.[50-52]

Aşırı homosistein konsatrasyonunda, homosistein proteinlere bağlanarak elimine edilmezse, redükte homosistein taşıyıcıları (R1) olarak adlandırılan taşıyıcılar vasıtasıyla endotelyumdan kana taşınır. Yüksek oksijen mevcudiyetinde ise homosistein okside formlarına dönüşür. Plazmada bulunan okside homosistein, redükte homosistein taşıyıcıları vasıtasıyla direkt olarak endotel ya da kan hücrelerine taşınamaz. Böylece aşırı homosisteinin hücreden uzaklaştırılması kolaylaştırılmış olup, hücre düşük homosistein seviyelerine sahip olmuş olur. Daha sonra, okside homosistein taşıyıcılarıyla (R2) karaciğer ve böbreğe taşınır. Karaciğer ve böbrekte ise redükte forma geçerek remetilasyon ya da transsülfürasyon yoluna geçer.[16]



Şekil 4. Homosistein Metabolizması

2.3.2- Hiperhomosisteinemi Nedenleri

Ölçüm tekniklerinin gelişmesi, hiperhomosisteinemi etyolojisinde günümüze kadar birçok değişik faktörün varlığını ortaya koymuştur. En önemli grubu, tam ya da kısmi enzim defekti ile oluşan genetik nedenler oluşturur. Homosistinüriler (görülme sıklığı 1:200000)[53] vücut dokularında homosisteinin artışıyla karakterize, bir grup bozukluktur. Homosistinürili hastalarla ilgili çalışmaların başladığı dönemlerde, karaciğer biyopsileri alınarak yapılan araştırmalarda eksikliği saptanarak, hastalığın tek nedeni olarak kabul edilen sistatiyonin β sentaz enzim defekti, genetik kökenli hiperhomosisteineminin en geniş alt grubunu oluşturur.[9,10,17,47,52] Bu enzim eksikliği homosisteinin sistatiyonine dönüşümünü engeller. Sonuçta homosistein ve öncülü birikir, vücut sıvılarında sistein ve sistin azalır.

Metilentetrahidrofolat redüktaz ve metiyonin sentaz enzimlerinin eksikliğinin ya da defektlerinin hiperhomosisteineminin nedeni olduğu araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır.[44,54,55] Genetik açıdan sağlıklı kişilerde, hiperhomosisteineminin en önemli nedeni beslenmeyle ilgili faktörleden kaynaklanır. Homosistein metabolizmasında koenzim olarak görev yapan vitamin B_6, B_{12} ve folatın besinlerle eksik alındığı ya da vücut tarafından alınan vitaminlerin kullanılamadığı durumlarda hiperhomosisteinemi görlebilir.[7,10,56]

Geniş kontrol grupları ile yapılan çalışmalar, plazma homosistein düzeyinin yaşlanma ile arttığını göstermiştir. Yaşlanmayla azalan kofaktörlerin veya renal fonksiyondaki bozukluğun, sistatiyonin β-sentaz aktivitesinin azalmasından kısmen sorumlu olabileceği belirtilmektedir.[39,55]

Araştırmalarda erkeklerin homosistein düzeylerinin kadınlardakinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu fark menapozdan önce daha belirgindir. Menapoz dönemiyle kapanmaya başlar daha sonra tamamen kalkar.[39,56] Ayrıca sigara kullananlar ve sık

kafein alımının piridoksal fosfat sentezini bozduğu belirtilmiştir. Sigara içenlerde, plazma homosistein seviyesi artmaktadır bu artış erkeklerde daha belirgindir.[12,39,56] Aşırı etanol tüketiminin plazma homosistein seviyesini yükselttiği belirtilirken az miktarda etanol alımının plazma homosistein seviyesini düşürdüğü ifade edilmiştir.

Renal yetmezlikli hastalarda plazma homosistein konsantrasyonu artmaktadır. Bu artış böbrek yetmezliğinin artışı ile doğrudan ilişkilidir ve serum "kreatin" i ile pozitif bir korelasyonu vardır.[57,58] Bazı solid tümörlerde , akut lenfoblastik lösemi, psöriasis, meme, over ve pankreas kanserli olgularda artmış plazma homosistein düzeyleri tespit edilmiştir.[59,60]

Bazı ilaçlar da, plazma homosistein düzeyini etkilemektedir. Metiyonin sentaz için bir yardımcı substrat olan metilentetrahidrofolatı azaltan metotreksat, genel anestezik olarak kullanılan metiyonin sentaz inhibitörü olan nitröz oksit, plazma homosistein düzeyinin artmasına yol açmaktadır. Antikonvülzan ilaçlar olan feniton, karbamazepin folat kullanımını, kolesterol düşürücü ajanlardan kolestipol ve niasin de muhtemelen folatın absorbsiyonunu engelleyerek, plazma homosistein konsatrasyonunu artırır. Vitamin B_6'nın antagonistleri olan azaribin, isoniazid, sikloserin, hidralazin, penisillamin, fenelzin ve prokarbazin gibi gibi ilaçlar homosistein seviyesinin artmasına neden olmuşlardır.[60-62] Hiperhomosisteineminin sınıflandırılması Tablo1 de nedenleri ise Tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 1. Hiperhomosisteineminin Sınıflandırılması.

Plazma homosistein	(µmol/L)	Etyolojisi
Şiddetli Form	> 100	Genetik enzim eksiklikleri
İlımlı Form	31-100	Enzim defektleri ya da bunlara eklenen beslenme faktörleri, diğer fizyolojik nedenler.
Hafif Form	15-30	Çoğu zaman genetik dışı nedenler, nadiren genetik nedenler

Tablo2. Hiperhomosisteinemi Nedenleri.

I. Genetik nedenler

A. Metiyonin sentaz enziminin eksik yada defekt olması
B. Metilentetrahidrofolat enziminin eksik ya da defekt olması
C. Sistatiyonin β sentaz ensiminin eksik ya da defektif olması
D. Vitamin B_{12} transport bozukluğu

II. Genetik olmayan nedenler

A. Fizyolojik nedenler

1. Cinsiyet
2. Yaş
3. Sigara içme
4. Beslenme alışkanlıkları

B. Patolojik nedenler

1. Hastalıklar
   - GİS cerrahisi
   - Hipogonadizm
   - Böbrek yetmezliği
   - Psöriazis
   - Akut lenfoblastik lösemi
   - Kronik atrofik gastrit
   - Malabsorbsiyon sendromu
   - Vitamin B_6, Vitamin B_{12}, folat eksikliği yapan diğer nedenler
2. İlaçlar
   - Metotrexate
   - Kolestipol
   - Niasin
   - Siklosporin
   - Nitröz oksit
   - Fenitoin
   - Nitrik oksit

2.3.2.1- *Hiperhomosisteineminin Patofizyolojik Mekanizmaları*

İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, homosistein indüklü aterosiklerozun, endotelin hasarlı bölgesinde mevcut trombosit birikimi ve trombositce zengin trombus oluşumu ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Lenz ve ark.[63] primat' larda yaptıkları diyet indüklü hiperhomosisteineminin in vivo bozulmuş vazomotor regulasyonu ve in vitro bozulmuş endotel antitrombik fonksiyona yol açtığını, yaptıkları bir çalışmada göstermişlerdir. Harker ve ark.[64,65] homosistein indüklü endotel hasarına, subendotelyal matriksin maruz kaldığı ve bu durumun ileride trombosit aktivasyonuna yol açtığını belirtmektedirler.

Endotel disfonksiyon mekanizması tam anlamıyla anlaşılamamasına rağmen, homosisteinin oksidatif stresi artırdığı yolundaki deliller kuvvetlidir.[12,29,66] Homosisteinin plazmada, homosistein tiolakton, karışık disülfür ve plazma homosistin oluşturmak üzere hızlı bir şekilde otooksidasyona uğrar.[11,67] Reaktif oksijen türleri homosisteinin otooksidasyonu esnasında üretilir ve hidroksil radikali ile birlikte hidrojen peroksitin, hiperhomosisteineminin vasküler toksisitesine karıştığına dair çalışmalar ifade edilmektedir. Süperokside bağlı hidroksil radikal oluşumunun, endotel plazma membranı seviyesinde ve lipoprotein partikülleri içinde oluşan bir etkiyle lipid peroksidasyonunu başlattığı belirtilmiştir.[12,68,69]

Endotel türevli nitrik oksit üretimi aynı zamanda homosistein tarafından zıt bir şekilde etkilenmektedir. Normal endotel hücrelerinin NO üreterek homosisteini detoksifiye ettikleri yapılan çalışmalarda gösterilmistir.[48] Burada NO, oksijen varlığında S-nitrozo- homosistein oluşturmak üzere homosistein ile reaksiyona girer.
Homosisteinin sülfidril gruplarının nitrizasyonu, sülflhidril-bağımlı hidrojen peroksit oluşumunu inhibe etmektedir[12,70]. S-nitrozo-homosistein aynı zamanda güçlü bir trombosit inhibitörü ve vazodilatördür.[71] Homosistein, ayrıca NO sentezini

bozarak, NO miktarını azaltabilir.[12,72,73] Homosistein, lipid peroksidasyonunu indükler. Lipid peroksidasyonu ise, endotel NO sentazın salınımını azaltır ve nitrik oksiti direkt olarak tüketir[74,75]. Upchurch ve ark.[74] homosisteinin endotel hücreleri vasıtasıyla sellüler GSHPx ekspresyonunu baskıladığını son zamanlarda yaptıkları bir çalışmada göstermişlerdir. Bu etki, homosisteinin oksidasyonu esnasında artan reaktif oksijen türleri aracılığıyla lipid peroksidasyonunu başlattığı belirtilmektedir.

Homosistein ayrıca vasküler hücrelerin biyokimyasal ve biyosentetik fonksiyonlarını etkileyerek vasküler matrikse de direkt olarak zarar verir. Homosistein oksidasyonunun oldukça reaktif anhidraz bir ürün olan homosistein tiolaktonun, intimal makrofajları tarafından alınan agregatları oluşturmak üzere düşük dansiteli lipoproteinle birleştiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir.[12,76]

2.4- SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir.[77] Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı stabil değillerdir ve oldukça reaktiftirler.[78]

Serbest radikaller (+) veya (-) yüklü veya elektriksel olarak nötral, organik veya inorganik moleküller seklinde olabilirler. Bir serbest radikal paylaşılmamış elektronunu radikal olmayan bir moleküle verebilir veya diğer bir molekülden elektron alabilir ya da radikal olmayan bir moleküle bağlanabilir. Bu reaksiyonlardan hangisi olursa olsun, radikal olmayan bir molekül sonuçta radikale dönüşür. Bir radikalin diğer moleküllerle etkileşmesi, antioksidan bir sistem araya girene kadar, zincirleme reaksiyon şeklinde devam eder.[64,78]

Normal koşullarda, aerobik hücre metabolizması sırasında % 1-2 oranında serbest radikaller oluşmaktadır.[79] Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok elektron transferi sonucu meydana gelir. Ultraviole ışık, radyasyon, enfeksiyon,

enflamasyon, ilaçlar ve daha bir çok etken ile oluşabilen serbest radikaller antioksidan savunma sistemi kapasitesini aştığı zaman ya da antioksidan savunma sisteminde bir bozulma meydana geldiğinde hücreyi ve organizmayı etkileyen patolojik bir süreç başlar. Çoğu serbest radikalin yarılanma ömürleri 10-60 saniye gibi çok kısa olmasına rağmen[80], amino asitler, proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi tüm hücre bileşenleri ile etkileşmesi sonucu, hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Homeostatik dengenin korunabilmesi, antioksidan kapasitede sürekli yenilenmeyi gerektirmektedir ve bu koşullar sağlanamadığında oksidatif hasar artarak önemli patolojik sonuçlar oluşmaktadır.[81]

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelir.[78,82]

1. Kovalent bağın homolitik yarılması: Bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik yarılması sonucu eşlenmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması ile serbest radikaller meydana gelmektedir.

$$X{:}Y \rightarrow X^{\cdot} + Y^{\cdot}$$

2. Bir molekülün elektron kaybetmesi: Molekülün yapısındaki atomlardan birisinden elektron uzaklaştırılması sonucu oluşmaktadır.

$$X \rightarrow X^{\cdot} + e^{-}$$

3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi: Bir molekül yapısına elektron eklenmesi sonucu reaktif özellik taşıyan yapılar oluşmaktadır. Metallerin varlığında ise aynı tepkime geçiş metalleri aracılığıyla (Fenton tepkimesi) gerçekleşmektedir.

2.4.1- Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller, oksijen merkezli ve oksijen merkezli olmayan serbest radikaller olarak sınıflandırılır. Oksijenin iki eşleşmemiş elektron bulundurması, onun serbest radikallerle, radikal olmayan diğer maddelere göre daha kolay reaksiyona girmesini sağlar. Bu nedenle biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Moleküler O_2 en son H_2O'ya indirgenir ve bu reaksiyonlar esnasında kısmi redüksiyonla çok sayıda reaktif ürünler oluşabilir.[82]

2.4.1.1-*Süperoksid Radikali ($0_2^{\cdot}$)*

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksid radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir. Süperoksid, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak fazla zararlı değildir. Asıl önemi, hidrojenperoksid kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

Süperoksid, düşük pH değerinde daha reaktif olup perhidroksil radikali (HO_2.) oluşturmak üzere protonlanır. Fizyolojik pH'daki protonlanmış formu %1'den azdır. Süperoksid anyonu, hem oksitleyici hem redükleyici özelliğe sahiptir. Redüktan olarak görev yaptığında, örneğin, ferrisitokrom c'nin ya da nitroblue tetrazalium'un redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Sitokrom c'yi indirgemesi SOD tarafından inhibe edilir. Bundan faydalanılarak SOD aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen $O_2^{\cdot-}$ tayini yapılır.[83-86]

2.4.1.2- *Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)*

$NO^{\cdot}$, vasküler endotelde, fagositlerde ve beyin dokusunda üretilen "relaxing factor" olarak bilinen, önemli fizyolojik fonksiyonları olan bir serbest radikaldir. Fakat $NO^{\cdot}$'in fazlası toksik etkiye sahiptir. $O_2^{\cdot-}$, $NO^{\cdot}$ ile birleşerek reaktif oksijen türevi olan peroksinitritler ($ONOO^-$) oluşturur. Bu durumda $NO^{\cdot}$'in normal fizyolojik etkisi inhibe olurken, $ONOO^-$ proteinler üzerine zararlı etkiler oluşturur ve

azot dioksit (NO_2), ·OH radikali ve nitronyum iyonu (NO^{2+})gibi başka toksik ürünlere dönüşür.[78,82]

2.4.1.3- *Hidroksil Radikali (OH·)*

OH·, yüksek reaktiviteye ve küçük miktarlarda bile aşırı hasar oluşturma özelliğine sahiptir.[82] OH·, demir iyonu katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile veya demir veya bakır iyonları katalizörlüğünde Haber-Weiss reaksiyonuyla oluşur. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda O-H kovalent bağının parçalanması ile de OH· radikali oluşur.[78]

OH·, tioller ve yağ asitleri gibi pek çok biyolojik molekülden H^+ atomlarını koparark çeşitli yeni radikallerin (sülfür radikalleri,RS) oluşmasına sebep olur. Oluşan RS, O_2 ile birleşerek RSO ve RSO_2 gibi oksisülfür radikallerini oluşturur. Sonuçta hücre membranında peroksidasyona ve protein hasarına neden olur.[77]

2.4.1.4- *Singlet Oksijen (O_2)*

Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesi ile oluşur. Singlet oksijen ortaklaşmamış elektron bulundurmadığından serbest radikal değildir fakat serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olduğu için önemlidir. Singlet oksijenin DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir.[86,88]

2.4.1.5- *Hidrojen Peroksit (H_2O_2)*

Moleküler oksijenin iki elektron alması veya $O_2^{\cdot-}$'in bir elektron alması sonucu peroksitler meydana gelir. Peroksit molekülünün iki H^+ atomu ile birleşmesi sonucu H_2O_2 oluşur. Ancak biyolojik sistemlerde H_2O_2'nin asıl üretimi $O_2^{\cdot-}$in dismutasyonuyla gerçekleşir. $O_2^{\cdot-}$'in dismutasyonu ya spontandır ya da SOD tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır. Nötral ya da alkali pH'da enzimatik dismutasyon daha belirgindir. H_2O_2, serbest radikal değildir fakat geçiş metal iyonları

varlığında (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarıyla) en reaktif ve toksik serbest oksijen radikali olan ·OH'in kaynağını oluşturması açısından önemlidir.[78]

2.4.1.6- *Diğer Radikaller*

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R), peroksit radikalleri (ROO), alkoksil radikalleri (RO), sülfür (thil) radikalleri (RS) gibi önemli serbest radikaller meydana gelir. Bunlardan özellikle poliansatüre yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Sülfür radikalleri oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil (RSO) veya sülfür (thil) peroksil (RSO_2·)gibi radikalleri meydana getirirler.[82]

2.4.2- Serbest Radikallerin Kaynakları

2.4.2.1- *Elektron transport zinciri*

Elektron transport zincirinde yer alan pek çok bileşik (NAD, FAD, KoenzimQ gibi) oksijen ile tepkimeye girerek 0_2· salınımına neden olmaktadır. Bu tek değerli oksijen kaçağı olarak tanımlanmaktadır. Bu kaçağa neden olan faktörler bilinmemektedir. Normal koşullarda bu kaçak, hücrenin savunma sistemleri ile yok edilebilmektedir. Ancak oksidatif stres durumunda savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve mitokondride hasar oluşmaktadır. Bu hasar sonucu hücrenin enerji sisteminin etkilenmesi ile ATP kullanımındaki artışa ve ATP sentezindeki azalmaya bağlı olarak hücrede ATP düzeyi hızla düşmektedir.[82]

2.4.2.2- *Enzimatik tepkimeler*

Elektronları oksijene aktaran oksidazlar oksijenin su veya hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini sağlamaktadır. Oksijenazlar oksijenin bir substratın yapısına katılmasını gerçekleştirmektedirler. Bu gruptaki enzimlerin katalizlediği tepkimelerde serbest radikaller oluşabilmektedir. Vücutta enzimatik tepkimelerde endojen olarak

oksijen metabolitleri meydana gelmektedir[107]. Reaktif oksijen kaynağı olan enzimatik kaynaklar Tablo 4 te sıralanmıştır.

2.4.2.3- *Enzimatik olmayan tepkimeler*

Otooksidasyon tepkimeleri sonucu enzimatik olmayan kaynaklardan reaktif oksijen metabolitleri oluşmaktadır [27].

2.4.2.4- *Dış etkenler*

Çeşitli dış etkenler ile reaktif oksijen metabolitleri oluşabilmektedir (Tablo3)

Tablo3. Oksijen Metabolitleri Oluşturabilen Dış Etkenler.

Radyasyon	
Toksik kimyasallar	CCI4, halojenlenmiş hidrokarbonlar (kloroform, brombenzen, halotan), difenoller ve kinoller
Hava kirliliği	Azot dioksit, ozon, sulfurdioksit
Sitostatikler	
Pestisitler	Bipiridil herbisin ajanlar
Metaller	Titanyum, aleminyum, kurşun, molibden, nikel, krom, civa, kadmiyum, arsenik
Antibiyotikler	Tetrasiklinler, kinon antibiyotikleri, arninoglukozidler
Sigara ve diğer yollarla toksik tütün alımı	
Alkol	

Tablo 4. Reaktif Oksijen Ürünlerin Enzimatik Kaynakları.

$Hipoksantin + O_2 \xrightarrow{Ksantin\ oksidaz} Ksantin + O_2^-$
$NADPH + O_2 \xrightarrow{NADPH\ oksidaz} NADP^+ + 2O_2^-$
$R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 + H_2O_2 + O_2 \xrightarrow{Amin\ oksidaz} R\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2$
$R\text{-}CHO + O_2 \xrightarrow{Aldehit\ oksidaz} RCOOH + O_2^-$
$Dihidroorotat + NAD^+ + O_2 \xrightarrow{Dihidroorotat\ dehidrogenaz} Orotik\ asit + NADH + O_2^-$
$H_2O_2 + X + H^+ \xrightarrow{Peroksidaz} HOX + H_2O$
$E\text{-}Fe^{+3} + ROOH \xrightarrow{NADH\ oksidaz} Bileşik\ I + ROH$
$Bileşik\ I + NADH \xrightarrow{NADH\ oksidaz} Bileşik\ II + NAD.$
$Bileşik\ II + NADH \xrightarrow{NADH\ oksidaz} NAD. + E_Fe^{+3}$
$2NAD. + 2O_2 \xrightarrow{NADH\ oksidaz} 2NAD^+ + O_2^-$
$CH_3NH_2 + H_2O \xrightarrow{Metilamin\ dehidrogenaz} HCHO + NH_3 + 2H^+ + 2e^-$
$R\text{-}CH_2OH + O_2 \xrightarrow{Galaktoz\ oksidaz} R\text{-}CHO + H_2O$
$NDP + 2e^- + 2H^+ \xrightarrow{Ribonükleotid\ redüktaz} dNDP + H_2O$
$Araşidonik\ asit + 2O_2 \xrightarrow{Prostaglandin\ H\ oksidaz} Prostaglandin\ G2$
$Prostaglandin\ G2 + 2e^- + 2H^+ \xrightarrow{Prostaglandin\ H\ oksidaz} Prostaglandin\ H2 + H_2O$
$Pirüvat + PFL \xrightarrow{Pirüvat\ format\ liyaz} Format + PFL\text{-}asetil$
$PFL\text{-}asetil + CoA \xrightarrow{Pirüvat\ format\ liyaz} PFL + Asetil\ CoA$

2.4.2.5- *Endoplazmik retikulum (ER) ve Nükleer Membran (NM) Elektron Transport Sistemi:*

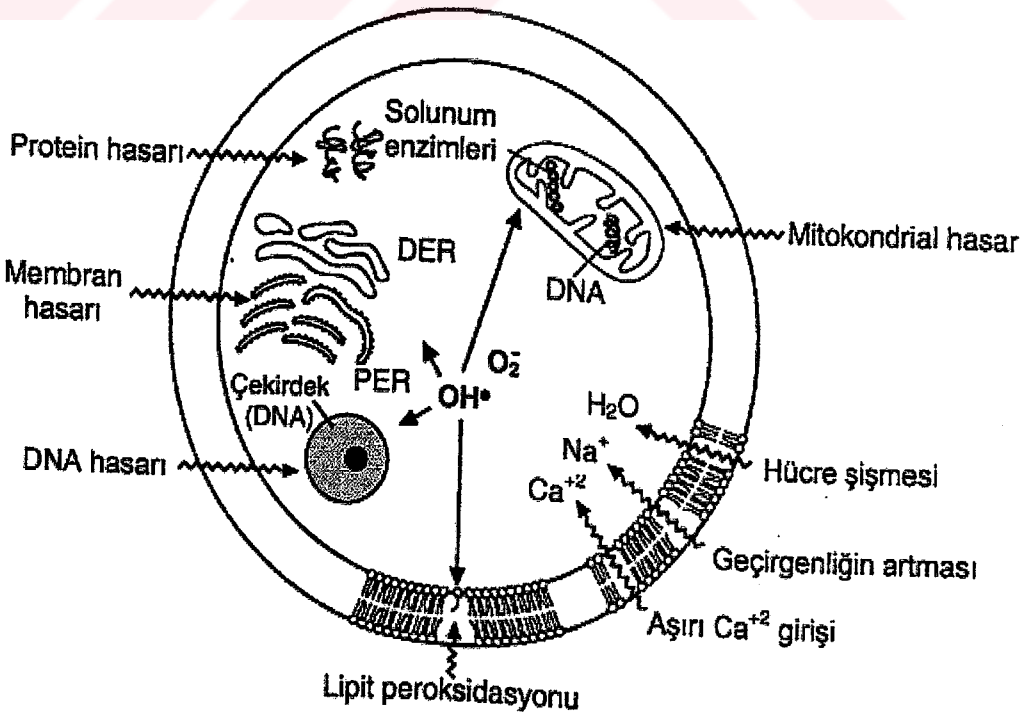
ER ve NM'da serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. ER ve nükleusun iç membranları sitokrom P-450 ve b5 yönünden zengindir. Bu bilesikler doymamış yağ asitlerinin, ksenobiyotiklerin, redükte dioksijenin ve diğer bazı substratların oksidasyonundan sorumludur.[89]

2.4.2.6- *Plazma Membranı*

Serbest radikaller plazma mebranını geçerken membrandaki toksik reaksiyonları başlatırlar. Biyolojik membran lipidlerinde doymamış yağ asitleri ve proteinlerinde ise okside olabilen amino asitler bulunmaktadır. Bu yüzden plazma membranı serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır. Membranda gerçeklesen lipid peroksidasyonu veya yapısal proteinlerin oksidasyonu membran permeabilitesini değiştirerek transmembran iyon gradiyentinin bozulmasına, sekretuar foksiyonların kaybına ve selüler metabolik olayların inhibisyonuna sebep olur.[78,84]

2.4.3- Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri

Serbest radikaller hücresel yapıları etkileyerek hücre hasarına yol açmaktadır (Şekil 5). Protein yapısında bulunan özellikle prolin, histidin, arginin, sistein ve metiyonin amino asitleri radikal hasarına açıktır. Bu amino asitlerin oksidasyonu proteinlerin parçalanmasına, çapraz bağ oluşumuna, agregasyona ve proteinlerin proteolitik parçalanmaya yatkın hale gelmesine neden olmaktadır.[82]



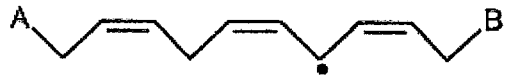
Şekil 5. Serbest Radikallerin Hücresel Hedefleri.

Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan büyük miktarda çoklu doymamış yağ asidi içermektedir. Bu yağ asitlerinin peroksidasyonu hücresel hasarın en önemli nedenlerinden biridir. Yağ asitleri peroksidasyonu zincir tepkimeleri şeklinde sürmektedir (Şekil 6). Yağ asidi ile birleşen radikal, bir dizi tepkimeyi başlatmaktadır. İlk olarak yağ asidi radikalinin oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksid radikali ($LOO^{\cdot}$) meydana gelmektedir. Bir diğer yağ asidi yan zinciri ile tepkimeye giren lipid peroksid radikalleri, hidroperoksitleri oluşturmaktadır. Metal iyonlarının katkısı ile bazı enzimatik tepkimelere katılan bu peroksid ürünlerinden etan, pentan, malondialdehid gibi yıkım ürünlerinin yanı sıra kemiluminesans ve fluoresans veren bileşikler elde edilmektedir.

Lipid peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu membran geçirgenliği ve kırılganlığının artması ile membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta ve hücreye Ca^{+2} girişi artmaktadır. Hücre içi serbest Ca^{+2} artısına bağlı olarak artan fosfolipaz aktivitesi fosfolipid kaybının artmasına, membran geçirgenliğinde değişiklik ve potansiyel kaybına bağlı toksik etkide artışa, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesine, katabolik enzimlerin aktivitesinde artışa ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmalarına yol açmaktadır. Herhangi bir nedenle oluşan serbest radikaller ve özellikle malondialdehid, hücre çekirdeğinde baslıca DNA ile tepkimeye girmektedir. Nükleik asit yapısındaki baz değişimleri veya DNA zincir kopması sonucu kromozomal yapıda değişiklikler oluşturarak sitotoksisiteye neden olmaktadır. Bugüne kadar oksidatif olarak değişmiş yaklaşık 20 tip DNA saptanmıştır. Sonuçta mutajenik ve karsinojenik etkiler gözlenmektedir. Serbest radikallerin hücredeki bu etkileri sonucu pek çok hastalığın oluşabildiği düşünülmektedir. Hastalıkların primer nedeni olabilen serbest radikal hasarı komplikasyonların artmasına neden olmakta veya diğer etkenlerle oluşan hücre hasarını artırmaktadır.[82,88]

Başlama

$LH \longrightarrow L^{\bullet}$

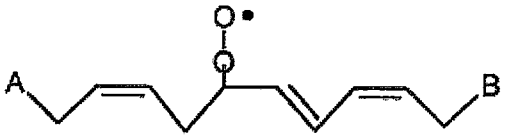


Çok doymamış yağ asidi radikali ($L^{\bullet}$)

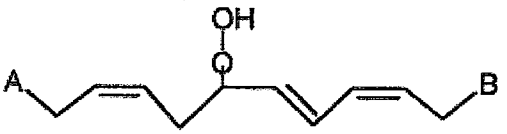
Zincir tepkimesinin ilerlemesi

$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$

$LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet}$



Lipit peroksid radikali ($LOO^{\bullet}$)

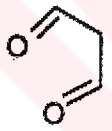


Lipit peroksit (LOOH)

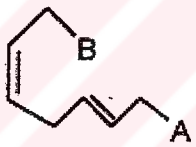
Zincir dallanması

$LOOH + Fe^{+2} \longrightarrow LO^{\bullet}$ (Lipit oksi radikali) $+ OH^{-} + Fe^{+3}$

Parçalanma



Malondialdehid



Parçalanmış lipid peroksit

Zincir tepkimelerinin sonlanması

$LO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOH + L^{\bullet}$

$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOOL + O_2$

$LOO^{\bullet} + InH$ (Antioksidan) $\longrightarrow In^{\bullet} + MP_1$

$In^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow MP_2$

$LOO^{\bullet} + Fe^{+2} \longrightarrow Fe^{+3} + MP_3$

$L^{\bullet} + Fe^{+2} \longrightarrow Fe^{+3} + MP_4$

MP_{1-4} = Daha sonraki tepkimelere katılmayan tanımlanamamış moleküller

Şekil 6. Lipit Peroksidasyonu.

2.4.4- Serbest Radikaller İle İlgili Durumlar Ve Hastalıklar

Tablo 5. Serbest Radikallerin Sebep Olduğu Hastalıklar

Toksik eksojen ajanların etkisi ile oluşan toksisite	İyonizan radyasyon, kemoteropatik ilaçlar, CCI4, prakuat, kimyasal karsinojenler (benzpiren, sigara, ozon, alloksan, NO_2)
Solunum sistemi	Akciğerde oksijen toksisitesi, amfizem, ARDS, kistik fibröz
İskemi/reperfüzyon sendromları	Miyokard enfarktüsü, kardiopulmoner bypass, organ transplantasyonu, mide mukozasında hasar (stres ülseri), nekrotizan enterekolit, şok sonrası karaciğer yetmezliği, beyin iskemisi, akut renal tubuler nekroz, serbest flep transferi, kokainle uyarılan fetal hasar
İnflamatuvar/immun hastalıkları	Ateroskleroz, artrit, inflamatuar kemik hastalıkları, bağ doku hastalıkları, otoimmun yetmezlik
Kalp ve kardio vasküler sistem	Keshan hastalığı, alkol kardiyomyopatisi
Üriner sistem	Otoimmun nefrotik sendrom, ağır metal nefrotoksisitesi, hemodializ
Beyin ve sinir sistemi	Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntingson koresi, amiyotrofik lateral skleroz, çoklu skleroz
Göz	Katarakt, retrolental fibroplazi, okuler hemoraji
Deri	Termal hasar, uv radyasyon, kontakt dermatit
Diğerleri	Yaşlanma, kanser, Diabetus mellitus, Down sendromu

2.4.5- Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan çeşitli antioksidan savunma mekanizmalar bulunmaktadır. Antioksidanlar etkilerini farklı şekilde göstermektediler. Enzimler oksidanları tutarak daha zayıf bir moleküle dönüştürmektedirler (toplayıcı etki). Vitaminler ve flavanoidler gibi bileşikler, oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirebilmektedirler (baskılayıcı etki). Oksidanlarin olusturdugu hasari onaran antioksidanlar bulunmaktadır (onarıcı etki). Ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engellemektedirle r(zincir kırıcı etki).

Antioksidan moleküller doğal antioksidanlar ve ilaçlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar.[86]

2.4.5.1- ***Doğal Antioksidanlar***

a) Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksijenin H_2O_2 dismutasyonunu superoksid dismutaz (SOD), hidrojen peroksidin dismutasyonunu ise katalaz enzimi katalizlemektedir. Glutatyon peroksidaz ise H_2O_2 ve lipid peroksidlerini indirgemektedir. Yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü sağlayan glutatyon redüktaz, indirekt yolla antioksidan etki göstermektedir. Enzimatik savunma sistemleri arasında NADH peroksidaz ve oksidaz ile sitokrom c oksidaz da yer almaktadır.

i. Superoksid Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1.)

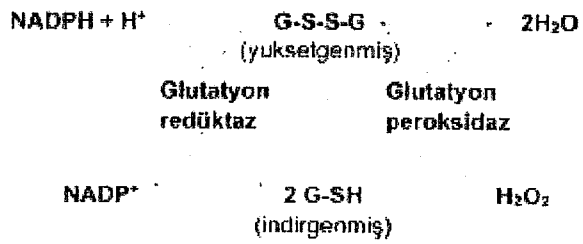
Ilk defa 1969'da McCord ve Fridovich tarafından sığır eritrositlerinden izole edilen ve aerobik hücrelerde yaygın şekilde bulunan bu enzim, fizyolojik pH'da $0_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 ve O_2 ye dönüşümünü spontan dismutasyondan 10.000 kez daha hızlı şekilde katalizler.[78,90] Enzimde bulunan çinkonun stabiliteyi sağladığı bakırın ise enzimatik aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. SOD'nin memeli dokusunda, farklı doku dağılımı ve spesifik subsellüler yerleşimli dört tipi bulunur. Bunlar; sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD), mitokondrial SOD (Mn-SOD), ekstraselüler SOD (EC-SOD) ve SOD (40kDa) dır.[80] Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksid serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır.[78]

Cu,Zn-SOD, tüm memeli hücre organelleri ve sitoplazmalarında en bol bulunan izoenzimidir[107]. Her biri bir Cu^{+2}ve bir Zn^{+2} atomu içeren iki alt birimden olusur. Ayrıca, Cu^{2+}ve Zn^{2+} içeren ancak yukarıda ifade edilen Cu,Zn-SOD'den farklı olarak 1982'de Markiund tarafından EC-SOD tanımlanmıştır.[91] EC-SOD, endotelyal hücreler ve fibroblast gibi sadece birkaç hücre tipinde sentezlenir ve hücre yüzeyinde, heparan

sülfatlara bağlı şekilde bulunur. Endotel kaynaklı relakse edici faktör (NO ya da ilişkili bileşikler) plazmada $O_2^{\cdot-}$ radikalleri tarafından nötralize edildiği için, ekstrasellüler ortamda tesbit edilebilen major SOD izoenzimi olan EC-SOD vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rol oynayabilir.

ii. Glutatyon Peroksidaz (GSHPx, E.C.1.11.1.9)

GSHPx, aktif bölgesinde selenosistein amino asiti ihtiva eden, H_2O_2, steroid ve lipid hidroperoksidler üzerine etkili bir antioksidan enzimdir. GSHPx, tetramerik 4 selenyum atomu ihtiva eder ve ciddi selenyum eksikliği durumlarında GSHPx eksikliği ortaya çıkabilir.[92] Fosfolipid Hidroperoksit Glutatyon Peroksidaz (PLGPx) da monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir ve membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersizliği durumlarında PLGSHPx membranı peroksidasyona karşı korur. Ayrı glutatyon peroksidazlar farklı genlerle kodlanırlar. GSHPx hemen hemen tüm dokulara yaygın bir şekilde dağılmış olmasına rağmen hücre içerisinde en yüksek konsantrasyonda karaciğerde bulunur. GSHPx, sitozol ve mitokondrial yerleşimli bir enzimdir. Eritrositlerde de GSHPx oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır.[78]



Şekil 7. Hidrojen Peroksidin Glutatyon Aracılığı İle İndirgenmesi.

iii. Katalaz (EC:1.11.1.16): Yapısal olarak bir hemoprotein olan katalazın molekül kütlesinin 248kDa olduğu ve kovalent olmayan bağ ile bağlı protoporfirin IX Fe (hem) grubu içerdiği ortaya konmuştur. Kan, kemik iliği, müköz membranlar, karaciğer ve böbrekde yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Düşük hızlarda H_2O_2

oluştuğu durumlarda veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğunda peroksidatif, hidrojen peroksid oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır .

$H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$

$H_2O + H_2O \rightarrow 2H_2O + O_2$

(H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak katalazın katalizlediği tepkimeler)

Enzimler arasında en yüksek katalitik dönüşüm hızına sahip olduğu bilinen katalazın aktivitesi için demir gerekmektedir. Aktif kısmı olan Fe^{+3}- protoporfirinin iki fonksiyonel döngüsü bulunmaktadır.[82]

$Katalaz\text{-}Fe^{+3} + H_2O_2$

$\downarrow$

$Katalaz\text{-}Fe^{+3}\text{-}HOOH$ (Aktif değildir)

$H_2O_2 \downarrow$

$Katalaz\text{-}Fe^{+3} + 2H_2O + O_2$ (Detoksifikasyon)

(Katalazın fonksiyonel döngüleri)

Ortamda H_2O_2 düzeyi çok düşük olduğunda aktif olmayan enzim bileşiği ile elektron alıcısı tepkimeye girmektedir .

$Katalaz\text{-}Fe^{+3}\text{-}HOOH + AH_2$

$\downarrow$

$Katalaz\text{-}Fe^{+3} + 2H_2O + A$

b) Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

i. Metal iyonlarının etkisizleştirilmesini sağlayan antioksidanlar: Bu grupta metal iyonlarını bağlayarak elektron transferini engelleyen bileşikler bulunmaktadır (Tablo 6).

Tablo 6. Metal İyonları Bağlayarak Elektron Transferini Engelleyen Bileşikleri.

Demir bağlayan bileşikler	Transferrin, laktoferrin, ferritin
Bakır bağlayan bileşikler	Seruloplazmin, albumin
Hem proteinleri	Hemoglobin, haptoglobulin, hemopeksin
Diğerleri	Metallotioneinler (5-7 adet Zn, Ag, Cu, Cd ve Hg)

ii. in vivo sentezlenebilen düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar (Tablo 7) .

Tablo 7. Düşük Molekül Ağırlıklı Antioksidanlar

Ürik asit	$O_2^{\cdot}$, OH. Ve peroksid radikali tutucusu
Ubikinon (koenzim Q)	Serbest radikal tutucusu
Bilirubin	Peroksil radikali ve singlet oksijen yok etmektedir.
A-Keto asit	Piruvat ve α-ketoglutarat H_2O_2 ile nonenzimatik tepkimeye girmektedir.
Cinsiyet hormonları	Dişi cinsiyet hormonları (östradiol, östrol ve östriol) lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir
Melatonin	Antioksidan enzim sentezini uyarmaktadır
Lipoik asit	
Melaninler	Melanin polimerleri yapılarındaki eşlenmemiş elektironlar ile UV radyasyonun absorbe edilmesini sağlamaktadır.
Histidin içeren dipepditler	Bakır iyonlarını şelatlayan karnozin, homokarnozin ve anserin, lipid peroksidasyonunu önlemektedir
Tiyol içerenler (Glutatyon, N-asetilsistein, metiyonin, kaptopril)	Serbest radikal ve HOCI tutucusu

iii. Diyetle Alınan Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar:

E vitamini ve analogları lipid peroksidasyon zincirini kırmaktadır. $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ tutucusu olan C vitamini, E vitaminini rejenere etmektedir. Hücre büyümesi, farklılaşması ve görme için esansiyel bir vitamin olan A vitamini peroksiller üzerine doğrudan etkili olmaktadır.

iv. Karotenoidler ve Fenolik Yapılar. Karotenoidler A vitamini öncülüdürler. Epikateşin (yeşil ve siyah çay), kateşin (kırmızı şarap), kamferol (brokoli, greyfurt ve siyah çay), kuarsetin (soğan, brokoli, çilek), antosiyaninler (renkli meyveler, kırmızı şarap, çilek, vişne), kafeik asit (zeytin ve kahve) gibi bazı bitkisel fenolik maddeler diyette bulunmaktadır. Fenollerin LDL oksidasyonunu önlediği de gösterilmiştir.[78,82]

v. İlaçlar

Tablo 8. Antioksidan Etkiye Sahip İlaçlar.

Rekombinan h-SOD
21-Aminosteroidler
Mannitol
Trimetazidim
Ebselen
Demir şelatörleri
Ksantinoksidaz inhibitörleri
Barbitüratlar
Indapamid
H_2 reseptör blokerleri

2.5- TİROİD HORMONLARI

Trekeanın her iki yanına yerleşmiş iki lob ve bağlayıcı bir kısımdan oluşan tiroid bezi 3,5,3'-triiyodotironin (T_3) ve 3,5,3',5'-tetraiyodotironin veya tiroksin (T_4)

hormonlarını sentezler ve salgılar. Bu iki hormon gen okunmasını, doku farklılaşmasını ve genel gelişmeyi düzenler.

2.5.1- Tiroid Hormonlarının Biyosentezi.

Tiroid hormonları tirozin amino asidinin halkalı yapısına iyot bağlanmasıyla oluşan yapılardır. Bu hormonların sentezi için tirozince zengin bir glikoprotein olan tiroglobuline ihtiyaç vardır. Tiroglobulin de tirozinlerin iyotlanması ile T_3 ve T_4 sentezlenir.

Tiroid hormonlarının sentezi için gerekli olan tiroglobulin folikül hücrelerinin granüler endoplazmik retikulm'da sentezlenip foliküler lümene verilir ve burada koloid şeklinde depolanır. Sentez için gerekli iyot ise besinlerle alındıktan sonra (I^- şeklinde) bağırsaktan kolaylıkla emilerek, plazma proteinleri ile tiroid bezine taşınmaktadır.[17,18]

İyot aktif taşıma ile hücreye pompalanır. Bu enerji gerektiren işlem foliküler hücrelerin bazal membranında bulunan Na^+-K^+ ATPaz tarafından sağlanmaktadır. I^- şeklinde hücreye giren iyot, tiroperoksidaz enzimi tarafından I^+ e oksitlenerek aktive edilmektedir. Oksidasyon için gerekli H_2O_2, NADPH-bağlı enzimle üretilir.[83]

Tiroperoksidaz enzimi TG yapısındaki tirozin halkalarında I^+ bağlanmasınıda kataliz etmektedir. Birinci iyot tirozin halkasının 3 nolu karbonuna bağlanarak (monoiyodotirozin) MIT oluşur, daha sonra ikinci iyot 5 nolu karbona bağlanır ve diiyodotirozin (DIT) oluşur.

Hormonal sentez, hedef endokrin bez hormonu olan tiroksinin kan düzeyini artırması sonucunda geri beslenmeli inhibisyon yolu ile düzenlenmektedir. Tiroksin düzeyinin artması, hipotalamus düzeyinde tirotropin salgılayıcı hormon düzeyini baskılamakta veya daha kısa bir yol kullanarak doğrudan hipofizin tirotropin salgılatıcı hormona olan duyarlılığını azaltmaktadır. İyot yetmezliğinde tiroksin sentezi baskılandığı için iyot, düzenleyici bir faktör olarak kabul edilmektedir. Bu durumda

bezin tirotropine duyarlılığının artması, tirotropin salınımına yol açmaktadır. Sonuçta bez büyüyerek guatra yol açmaktadır. İyot verilmesi tiroksin oluşumunu sağlayarak bu değişikliklerin normale dönmesine neden olabilmektedir.[83-86]

2.5.2- Tiroid Hormonlarının Taşınımı ve Metabolizması

Tiroid hormonları %99 kanda serum proteinlerine bağlanarak taşınır. Karaciğerde sentezlenen bu proteinlerin en önemlisi glikoprotein yapıdaki tiroksin bağlayıcı globulindir (TBG) ve bu protein %99 luk kısmın %70 ini kendine bağlar. Tiroksin bağlayıcı prealbumin olarak adlandırılan protein ise %20 lik kısmı bağlar, %10 luk bir kısmı ise plazma albuminine bağlıdır. Proteine gevşek bağlı olan ve hücrelere 20 kat daha hızlı olarak giren triiyodotironin, tiroksine oranla dolaşım düzeyi daha düşük, yarı ömrü ise daha kısa olan bir hormondur. Proteine bağlı olmayan, serbest olan fraksiyonları (FT_3, FT_4) aktif olan tiroid hormonlarından T_4'ün %0.03 kadarı, T_3'ün ise %0.3 kadarı serbest halde bulunmaktadır. T_4 kantitatif olarak en önemli tiroid hormonudur ve tamamı tiroid bezinden sentezlenir.[6,18,94,96] Temel aktif hormon olan T_3 ise T_4' ün 5' konumundaki iyotun deiyodinasyona uğraması ile oluşur. 5' pozisyonunun yerine 5 pozisyonundan bir iyodun uzaklaşması ile biyolojik inaktif form olan revers T_3 (rT_3) (3,3',5' triiyodotironin) oluşumuna sebep olur. T_4' ün deiyodinasyonunun denetlenmesi tiroid hormon biyoaktivitesini kontrol etmenin bir yoludur. Deiyodinasyon tiroid dokusunda da gerçekleşeceği gibi hedef dokuda veya periferde de olabilir.[18]

Temel metabolik sonları deiyodinasyon yolu ile karaciğer, böbrek, kas ve diğer dokularda biyolojik inaktif ürünlere dönüşmek olan tiroid hormonları, daha az oranla deamine ve dekarboksile edilmekte, glukuronik asit veya sulfatlarla konjuge edilerek atılmaktadır. Tiroksin metabolizmasının %75 kadarından sorumlu olan deiyodinasyon işleminde etkili iki çeşit diiyodotironin deiyodinaz bulunmaktadır. Periferik dokularda bulunan bu enzimler sırası ile fenolik (dış) veya tirozilm (iç) halkasına etki eder. T_3

veya revers T_3 oluşumuna yol açmaktadır. Tiroksinin %90 kadarının periferik deiyodinasyon ile dolaşımda bulunan T_3 oluşmaktadır. rT_3 ise biyolojik yönden tamamen inaktif bir üründür. Deiyodinazlar ile iyodotironin, tironin yapısı oluşuncaya kadar deiyodine edilmektedir. Tiroid hormonlarının alanin yan zincirlerinin karaciğerde deaminasyon ve dekarboksilasyon ile triiyodotiroasetikasit ve tetraiyodotiroasetik asit oluşmaktadır. Tamamen inaktif olmayan metabolitlerin metabolik aktiviteleri, orijinal hormonların yaklaşık olarak 1/4 kadarına eşdeğerdir.[95]

Salıverilen tiroksinin her gün %10 kadarının karaciğerde sülfat esterleri oluşturularak veya glukuronik asitle konjuge edilerek safraya atıldığı belirlenmiştir. İntestinal bakteriler tarafından hidrolitik yıkıma uğratılan sülfat veya glukuronat konjugelerinden açığa çıkan serbest hormon intestinal geri emilime uğrayabilmektedir.[18]

2.5.3- Tiroid Hormonlarının Biyolojik Etkileri

Tiroid hormonları hücre içi reseptörlere bağlanarak gen transkripsiyonu üzerinde etkili olmaktadır. Çekirdekteki reseptörlere stoplazmadaki reseptörlerden daha büyük bir afinite ile bağlanmaktadır. Nükleer bir mekanizma ile etkili olan tiroid hormonlarının etkileri geç başlamaktadır ama uzun sürmektedir. Bu hormonların en çarpıcı etkinliği, organ ve dokularda hücresel tepkimeleri hızlandırmalarıdır. Tiroid hormonlarının etkisi ile mutlak istirahat halinde bulunan bir olgudaki oksijen tüketim hızı olarak tanımlanan bazal metabolizma hızı artmaktadır. Hormonal etki ile büyümenin ve ATP oluşumu ile yıkımının artmasına bağlı olarak oksijen ve enerji tüketiminin arttığı gözlenmektedir. Tiroid hormonları ATP üretimine neden olan Na^+-K^+ ATPaz sentezini hızlandırarak termojenik bir etkinin oluşmasına neden olmaktadır. Böylece ATP üretimini hızlandırır ve genel metabolik hız etkiler.[98,99]

Tiroid hormonları glukozun bağırsaklardan emilimini artırır ve hepatik glikojenin glukoza dönüşümünü uyarır. Tiroid hormonları hormona duyarlı lipaz

aktivitesini uyararak yağ asitlerinin açığa çıkışını artırmaktadır. Yağ asitlerinin oksidasyonunu hızlandırmakta ve serum trigliserid düzeyini azaltmaktadır. Tiroid hormonları kolesterolün bağırsak absorbsiyonunu azaltarak, safra asidi sentezini artırır, LDL seviyesini korur ve hepatik lipaz aktivitesini yükselterek serum kolesterol düzeyini düşürmektedir.[101,109]

Tiroid hormonları, DNA ve RNA sentezi ile doku büyüme faktörlerinin sentezini hızlandırır. Hipofize doğrudan etki ederler büyüme hormonunun gen ifadelendirilmesini uyardıkları ve büyüme hormonunun sentezini hızlandırdıkları belirlenmiştir. Büyümenin hızlı olduğu prepubertal dönemde lineer kemik büyümesi ve iskeletin olgunlaşması için gerekli olan bu hormonlar, erken neonetal ve geç fetal dönemde sinir miyelinizasyonu ve beyin büyümesi için gereklidir. Total beyin büyümesinin yaklaşık %50'si bu dönemde olmaktadır.[98,102]

2.5.3- Tiroid Bozuklukları

Tiroid bozuklukları arasında; hipotiroidizm, hipertiroidizm, tiroid ile ilişkili olmayan hastalıklar ("nonthyroid ilness"), ötiroid hastalık sendromu ile ilaç kullanımına bağlı bozukluklar yer alır.[103]

2.5.3.1- *Hipotiroidizm*

Hipotiroidizm veya tiroid bezi aktivite azlığı, tiroid dokusunun hastalık veya tedavi sonucu hasar görmesi ile tiroid hormon biyosentezinin (primer hipotiroidizm) bozulmasına veya daha az sıklıkla hipofiz ile hipotalamusa ilişkin bozukluklara (sekonder hipotiroidizm) bağlı olarak görülür.[104,105] Gelişmiş ülkelerde otoimmün hasimoto tiroidi sıklıkla primer hipotiroidizm nedenleri arasında yer almaktadır, iyot eksikliği ise tiroid bezi yetmezliğinin en yaygın nedenlerindendir. Hipotirodizmde tiroid hormonları azalırken TSH artmaktadır.

Genelde hipotiroidili hastalarda soluk bir cilt, saç ve cilt kuruluğunun yanı sıra uykuya eğilimin artması soğuğa karşı dayanıksızlık ve kalp ritminin yavaşlaması görülmektedir. Çocuklarda ise fiziksel ve mental reterdasyona yol açar.

Hafif ve subklinik hipotirodizimde tiroid hormonları referans aralıkta kalırken TSH konsantrasyonu artar. Klinik olarak ötiroidinin sağlanması için serum TSH düzeyinin periyodik izlenmesi önemlidir.[106] Hipotiroidizm kadınlarda daha sık görülmektedir.[20] Hipotiroidizm nedenleri tabloda 9 verilmiştir.

Tablo 9. Hipotiroidizim Nedenleri.

Hipotirodizim nedenleri
Pirimer Hipotiroidizm (Guatr)
Kronik lenfosit
Subakut tiroid
Postpartum tiroid
Endemik iyot eksikliği
Hormon biyosentezi ve etkisindeki bozukluklar
İlaca bağlı bozukluklar (lityum, antitiroid, iyot)
Pirimer Hipotiroidizm (Guatr olmayan)
Spontan tiroid atrofisi
Radyoaktif iyot eksikliği
Cerrahi ablasyon
Eksternal radyasyon
Sporadik atireotik kretinizm
Sekonder hipotiroidizm
Hipofiz hastalıkları
Hipotalamus hastalıkları

2.5.3.2- *Hipertirodizm*

Aşırı miktarda serbest T_4 ve T_3 düzeyleri hipermetabolik bir bozukluk olan hipertiroidizme neden olur.[107,108] Bu yüksek değerler tiroidin hiper fonksiyonuna, hiper aktif olmayan bezden aşırı derecede sızıntıya veya tiroid dışı nedenlere bağlı olarak görülebilir. Hipertiroidizm de serbest T_4 ve T_3 artışı görülürken dolaşımda bulunan TSH miktarı ölçülemeyecek kadar düşüktür. Düşük TSH ve yüksek FT_4 düzeyleri hipertiroidizm tanısı için yeterlidir. Eğer TSH düşük, fakat serbest T_4 düzeyi normal ise Graves hastalığının erken dönemlerinde ve bazı Plummer's hastalığı bulunan olgularda görüldüğü gibi T_3 artışı, T_4 konsantrasyonundan daha fazla olduğu için total T_3 ölçümü yapılmalıdır. TSH konsantrasyonu, asemptomatik kişilerde subklinik hipertirodizm olarak tanımlanabilir (Tablo 10).

Tablo 10. Hipertiroidizim Nedenleri

Tiroid hiperfonksiyonu ile ilişkisi olanlar	**Tiroid hiperfonksiyonu ile ilişkisi olmayanlar.**
Diffüz toksik hiperplazi (Graves hastalığı)	Subakut tiroid
Toksik multinodüler guatr (Plummer hastalığı)	Sessiz lenfotik tiroidit
Soliter toksik adenom	Tirotoksikoz factitia
TSH salgılayan hipofiz tümörü	İlaca bağlı tirotoksikoz
CG salgılayan trofoblastik tümör	Struma ovarii
İyoda bağlı hipertitodizim	Hiperfonksiyonlu metastatik tiroid karsinomu
Hiperemez gravidarum	

3- MATERYAL VE METOD.

3.1- Kan Örneklerinin Alınması

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakütesi. Yakutiye Araştırma Hastanesi. Endokrinoloji Kliniğinde teşhis konulup henüz tedaviye başlamamış gönüllü 22 hipotiroidli (12 erkek, 10 kadın), 30 hipertiroidli hasta (10 erkek, 20 kadın) ve 15 sağlıklı (8 erkek, 7 kadın, hiçbir sistematik ve patolojik rahatsızlığı olmayan) kişi üzerinde yapıldı. Kan örnekleri EDTA'lı ve normal biyokimya tüplerine alındı. EDTA'lı tüplere alınan numuneler 3-5 dakika alt üst edildi, oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildikten sonra 3500 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek şekilli elemanlar çöktürüldü üstte kalan plazma kısmı ependorf tüplere alınarak -80 ^{0}C de analizin yapılacağı güne kadar saklandı. EDTA sız örnekler ise oda sıcaklığında 10-30 dakika bekletildikten sonra 3500 rpm de santrifüj edildi ve üstte kalan serum kısmı ependorf tüplere alınarak -80 ^{0}C de analiz gününe kadar saklandı.

3.2- Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddelerin analitik saflıkları olup karşılarında yazılı olan firmalardan temin edilmişlerdir.

Maddenin adı	**Temin Edildiği Firma**
S-adenozilmetiyonin iyot tuzu	Sigma
1-Heptansulfonik asit sodyum tuzu	Sigma
Glutatyon, redükte form	Sigma
Glutatyon, okside form	Sigma
Glutatyon redüktaz	Sigma
NADPH, tetrasodyum salt, redükte form	Sigma
Etilen diamintetraasetikasit, di sodtum tuzu	Sigma
Fosforik asit	Sigma

Bütillenmiş hidroksitoluen	Sigma
Nitroblue tetrazolium	Sigma
Bovin serum albumin	Sigma
Xantine	Sigma
Triklorasetik asit	Merck
Metanol	Merck
Sodyum fosfat monobazik	Merck
Sodyum fosfat monohidrat	Merck
Sodyumklorür	Merck
Tiyobarbitürik asit	Merck
Çinko sülfat	Merck
Sülfanil amid	Merck
Perklorik asit	Merck
Sodyum karbonat	Merck
Potasyum fosfat dibazik	Fisher
Potasyum fosfat monobazik	Fisher
FT_3,FT_4,TSH kiti	Roche

3.3- Kullanılan Araç ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıda belirtilen araç ve cihazlar kullanılmıştır.

pH metre	İnolab
Mikropipet	Fischer
Santrifüj	Heraeus İnsturment, Germany
Mikrosantrifüj	Sanyo, UK
Hassas terazi	Sartorius AG, Germany
Magnetik karıştırıcı	Labinco L32, Netherland

HPLC cihazı	Hawlet Packard
Homosistein kiti	Clin Reb
SAM ve SAH kolunu	250 mm x 4.6 mm i.d. Alltech Econospher C18, 5-µm Partical size. UK
Spektrofotometre	Beckman DU500, USA
Derin dondurucu	Sanyoultra low
Su banyosu	Elektro-mag M96 KPK
Karıştırıcı	Vortex-Genie, model K550, Germany
Otoanalizör	Roche modüler A170, Germany

3.4- Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

1. S-adeneozilmetiyonin stok çözeltisinin hazırlanması:

52.6 gr S-adenozilmetiyonin iyot tuzu tartılarak bir miktar distile suda çözülür ve daha sonra hacmi distile su ile 100 mL' ye tamamlanır.

2. S-adenozilmetiyonin standart çözeltisinin hazırlanması:

Stok çözeltiden 100 µL alınarak 0.4 M perklorik asit çözeltisi ile hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

3. S-adenozil metiyonin analizi için mobil fazın hazırlanması

50 mmol/L sodyumfosfat monobazik, monohidrat ve 10mmol/L heptanosülfonik asit 75mL metanolde çözüldükten sonra konsantre fosforik asitle pH:3.4 e ayarlandı.

4. %40 lık Trikloroasetik asit (TCA): 40 gr TCA bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 100 mL ye tamamlandı.

5. Fosfat tamponu(50mM,5nM EDTA lı pH=7):

A= $Na_2HPO_42H_2O$ 8,85gr/L B= KH_2PO_4 6,8 gr/L

A dan 600 ml ve B den 400 ml alındı ve bir kaba konuldu üzerine 2,8 gr EDTA çözeltiye eklendi ve çözülene kadar karıştırıldı.

6. GSH çözeltisi: 50 mg redükte glutatyon 1 mL fosfat tamponunda çözüldü.

7. GSH redüktaz çözeltisi: GSH redüktaz sıvı formda 10 µl alınıp direk deney ortamına katıldı.

8. Peroksit çözeltisi: % 30 luk H_2O_2 den 25 µl alınıp 5ml saf suda çözüldü ve bundan 15µl alınıp 5 ml tamponda çözülerek hazırlandı.

9. Fosfat tamponu ile tamponlanmış serum fizyolojik çözeltisi(pH=7.4):

8.9 gr NaCI, 2.885 gr $Na_2HPO_42H_2O$, 0.25 gr Na_2PO4 $2H_2O$ tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 1 L ye tamamlandı.

10. %30'luk Trikloroasetik asit çözeltisi: 30 gr TCA alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve daha sonra hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

11. 0.1 M'lık EDTA çözeltisi: 37.224 gr Etilen diamintetetraasetikasit, di sodyum tuzu (EDTA) bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 1 L ye tamamlandı.

12. 0.05 N NaOH çözeltisi: 0.2 gr NaOH bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 100 mL ye tamamlandı.

13. %0.12lik Tiyobarbitürik (TBA) asit çözeltisi: 1 gr TBA bir miktar 0.05 N NaOH çözeltisinde çözüldükten sonra hacmi 0.05 N NaOH çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı.

14. Çinko sülfat (ZnSO4) çözeltisi: 30 gr ZnSO4 bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 100 mL tamamlandı.

15. Griess reaktifi: 0,5 gr sülfanilamid +12,5 gr fosforik asid + 0,05 gr napthlethylendiamin 500 ml distile su içinde çözüldü.

16. NADPH çözeltisi (GSHPx analizi için): 50.4 mg NADPH 6mL, 50mM EDTA-Na tuzlu Fosfat tamponunda çözüldü.

17. NADPH+FAD çözeltisi: 0.004 NADPH+0.004 FAD 50 mL distile suda çözüldü.

18. Ksantin çözeltisi: 9.13 mg Ksantin 200 mL distile suda çözüldü.

19. Nitroblue tetrazoluim (NBT): 12.3 mg NBT 100 mL distile suda çözüldü.

20. Bovin serum albumin: 30 mg bovin serum 30 mL distile suda çözüldü.

21. Sodyum karbonat çözeltisi: 2.54 gr sodyum karbonat 60 mL distile su içinde çözüldü.

22. Potasyum nitrat stok çözeltisi: 0.72 gr potasyum nitrat bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 100 mL ye tamamlandı.

3.5- METOD

3.5.1- Plazma Homosistein Analizi

Plazma homosistein düzeyi HPLC yöntemiyle tayin edildi. Bunun için 2 mL lik ependorf tüplere 100 µl plazma, 25 µl internal standart ve 25 µl homosistein kitinin içinde mevcut olan A reaktifinden konuldu. 5 sn kadar hafifçe karıştırıldı ve daha sonra 100 µl reaktif B den konuldu. 30 sn vortekste şiddetli bir şekilde karıştırıldı ve 1000 g de 5 dakika santrifüj edildi. Her bir numunenin süpernatantından 50 µl alınarak viallere konuldu. Viallere 100 µl reagent C ve 50 µl reagent D eklendi ve kapakları sıkıca kapatıldı. Vialler 60 dk boyunca 60 ^{0}C de su banyosunda inkübe edildi. Vialler su banyosundan çıkarılarak oda sıcaklığına gelmeleri beklendi ve 20 µl numune alacak şekilde ayarlanmış HPLC cihazına verildi. Her bir numunenin analizi 5 dakikada tamamlandı. Sonuçlar µmol/L cinsinden verildi.

3.5.2- Plazma SAM Analizi

Plazma S-adenozilmetiyonin analizi Melnyk ve ark. tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı.[26] 200 µl plazma %40'lık trikloroasetik asitten 40 µl ilave edildi. Vortekslendikten sonra 30 dk oda sıkcaklığında inkübe edildi. 30 dk +4 ^{0}C de 10 000 g' de santrifüj edildi. HPLC cihazı otomatik olarak 20 µl numune alacak şekilde ayarlandı. Sonuçlar nmol/L cinsinden verildi.

3.5.3- Kromotografik koşullar

HPLC cihazı: Hawlett Packard 1100

Homosistein tayini için Clin Reb kiti kullanıldı.

Homosistein için ;

Basınç: 90 ± 10 bar

Kolon sıcaklığı: 30 ^{0}C

Pompa akış hızı: 1.0 mL/ dakika

Kolon: Clin Rep order no:

Dedektör: Florasan dedektör 385 nm eksitasyon ve 515 nm emisyon dalga boylarına ayarlandı.

S-adenozilmetiyonin için;

Basınç: 78 ± 10 bar

Kolon sıcaklığı: 25 ^{0}C

Pompa akış hızı: 1.0 mL/ dk

Kolon: 250 mm x 4.6 mm i.d. Alltech Econosphere C18, 5-µm particle size, UK

Dedektör: Elektrokimyasal dedektörün elektirodu 950 V a ayarlandı.

3.5.4- FT_3, FT_4, TSH Analizi

FT_3, FT_4 ve TSH tayini elektrokimyasal lüminesans immunassy prensibine göre çalışan Modular analitik E170 Roche otoanalizörlerinde yapıldı.

3.5.5- Glutatyon Peroksidaz (GSHPx) Analizi

GSHPx, H_2O_2 varlığında redükte glutatyon (GSH) okside glutatyona GSSG) yükselmesini katalizler. GSHPx reaksiyonu ile olusan GSSG, NADPH'ln indirgeyici substrat olarak kullanıldığı glutatyon redüktaz (GR) reaksiyonuyla tekrar GSH'a dönüsür. Bu reaksiyonlar esnasında NADPH'in NADP' ye yükseltgenmesi ile oluşan

absorbans azalışı 340 nm de spektrofotometrik olarak ölçülerek GSHPx aktivitesi hesaplanır.[112]

Kullanılan reaktifler: Fosfat tamponu (50mM, pH 7.5, EDTA'lı), redükte glutatyon, glutatyon redüktaz, %30' luk H_2O_2 çözeltisi.

Deneyin yapılışı: GSH-Px aktivitesi, Paglia ve Valentine' nin tarif ettiği metoda göre yapılmıştır. -80 ^{0}C den alınan numuneler (serumlar) önce -20 ^{0}C ye sonra + 4 ^{0}C ye alınarak yavaş yavaş çözülmesi sağlandı. Deneyin yapılışı tabloda verilmiştir.

	Kör tüp	Numune tüpü
Fosfat tamponu	2,650ml	2,650ml
GSH	100µl	100µl
NADPH	100µl	100µl
Numune	-	20µl
Distile su	20µl	-
Glutatyon redüktaz	10µl	10µl
	Karıştır 30dk 37 ^{0}C de inkübasyon.	
H_2O_2	100µl	100µl

Spektrofotometre, 37 ^{0}C de 340 nm dalga boyunda 3 dakikalık kinetik okutma programına ayarlandı. İnkübasyon sonrası her tüpe 0.100 mL H_2O_2 ilave edilerek reaksiyon başlatıldı ve 3 dakika süreyle numunelerdeki absorbans azalışı kayıt edildi.

Hesaplamalar:

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A/t \times 10^6}{\varepsilon} \times SK$$

$\Delta A/t$: Dakikadaki absorbans değişimi

ε : NADPH' ın 340 nm deki molar absorbtivite katsayısı (6.22×10^3)

SK : Seyreltme katsayısı

10^6 : Molü, mikromole çevirme katsayısı.

3.5.6- Superoksid Dismutaz (SOD) Analizi

Enzimatik reaksiyonlarla üretilen $O_2^{\cdot-}$ radikalinin reaksiyon ortamında nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesinin numunede bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesi prensibine dayanır.[110] NBT'nin indirgenmesi ile 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren mor renkli formazan oluşur. SOD aktivitesinin büyüklüğü oluşan formazanın absorbansıyla ters orantılıdır.

Kullanılan reaktifler: Deney reaktifi (Ksantin, 0.3mM; EDTA, 0.6mM; NBT, 150 µM; Na_2CO_3, 0.4 M; BSA, 1gr/L), ksantin oksidaz, $(NH_4)2SO_4$ 2M.

Deneyin yapılışı: -80 ^{0}C den alınan numuneler (serumlar) önce -20 ^{0}C ye sonra + 4 ^{0}C ye alınarak yavaş yavaş çözülmesi sağlandı. Sun ve arkadaşlarının metoduyla SOD tayini yapıldı127. Deneyin yapılışı tabloda verilmiştir.

	Kör tüpü	Numune tüpü
Assay reaktifi	2,450ml	2,450ml
Numune	-	0,5ml
Bidistile su	0,5ml	-
Xantine oxidaz	50µl	50µl

Deney tüpleri birer dakikaya arayla inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda renkli bileşiğin absorbansı 560 nm dalga boyunda tespit edildi.

Hesaplamalar:

İnkübasyon esnasında NBT'nin redüksiyon hızındaki %50'lik inhibisyon 1 SOD ünitesi olarak ifade edilir. Aktivite aşağıda verilen formüle göre hesaplanır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Abs(Kör)} - \text{Abs(Numune)}}{\text{Abs(Kör)}} \times 100$$

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{\text{50x Numune hacmi(mL)}}$$

3.5.7- Malondialdehit (MDA) Analizi

95^{0}C'de inkübasyon sonucu, tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin 520 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.[111]

Kullanılan Reaktifler: Fosfat tamponu (pH=7.4), butile hidroksitoluen (BHT), %30'luk TCA, EDTA (0.1M), Tiyobarbitürik asit (TBA), NaOH (0.05N)

Deneyin yapılışı: -80 ^{0}C den alınan numuneler (serumlar) önce -20 ^{0}C ye sonra + 4 ^{0}C ye alınarak yavaş yavaş çözülmesi sağlandı. Jain ve arkadaşlarının tarif ettiği metodla MDA tayini yapıldı[129].

	Numune tüpü	Kör tüpü
Fosfat tamponu	0.8 mL	0.8 mL
Numune	0.2 mL	-
BHT çözeltisi	0.025 mL	0.025 mL
TCA çözeltisi	0.5 mL	0.5 mL
Vorteksle karıştırışır, 4 ^{0}C'de 2 saat inkübasyon sonrası 2000g de 15 dk santrifüj edilir.		
Süpernatant	1 mL	1 mL
EDTA çözeltisi	0.075 mL	0.075 mL
TBA çözeltisi	0.25 mL	0.25 mL
	95 ^{0}C de 15dk inkübe edilir	

İnkübasyon sonrası tüpler musluk suyunun altında tutularak soğutulur. Absorbsiyon iki farklı dalga boyunda (532 ve 600) köre karşı okutuldu ve 600 nm dalga boyunda çıkan sonuçlar 532 nm de okutulan değerlerden çıkarılarak sonuçlar hesaplandı.

Hesaplama:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{Absorbans x } 10^6}{1.52 \text{ x } 10^5} \text{ x SK}$$

$1.52 \text{ x } 10^5$: Molar absorbtivite katsayısı

SK: Seyreltme katsayısı

10^6 : Molü, Mikromole çevirme katsayısı

3.5.7- Nitrik Oksit (NO) Analizi

Oldukca kısa ömürlü olan NO radikali hızla NO^{-2} ve NO^{-3}'a okside olmaktadır. Bu nedenle NO miktarı belirlenirken NO^{-2} ve NO^{-3} miktarları belirlenmektedir. Özellikle NO^{-2}'in Griess reaktifi ile etkileşmesi sonucu oluşan rengin absorbansının belirlenmesi oldukca yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mevcut NO^{-3} nitrat redüktazla NO^{-2}' e indirgendikten sonra ölçülmektedir.[109]

Kullanılan reaktifler: Çinko sülfat, Griess reaktifi, NADPH, FAD, nitrat redüktaz, laktad dehidrogenaz, sodyum pirüvat ve potasyum nitrat stok çözeltisi.

Deneyin yapılışı:

a) Nitrit Tayini: -80 ^{0}C den alınan serumlar önce -20 ^{0}C, daha sonrada 4 ^{0}C de bir süre bekletildikten sonra iyice çözülmesi sağlandı. Daha sonra Griess reaktifi kullanılarak aşağıdaki işlemler yapıldı.

	Numune tüpü
Numune	100µL
Distile su	400µL
Çinko sülfat	25µL
Vortekslenir, 1000g de 15 dk santrifüj edilir ve süpernatant kısmı alınır	
Süpernatant	100µL
Griess reaktifi	100µL

10 dk oda ısısında renk oluşumu için beklendi. 540 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

b) Nitrat Tayini

Nitrat, önce nitrat redüktaz ile enzimatik olarak nitrite dönüştürülür. Aşağıda verilen şekilde ölçüm yapılır.

	Numune tüpü
Numune	100 µL
Deiyonize su	400 µL
Çinko sülfat	25 µL
Vortekslenir, 1000 g de 15 dk santrifüj edilir ve süpernatant kısmı alınır	
Süpernatant	100 µL
NADPH	100 µL
FAD	100 µL
Nitrat redüktaz	20 µL
Vortekslenir, 37 ^{0}C de 20 dk İnkübe edilir	
Laktat dehidrogenaz	10 µL
Sodyum pirüvat	10 µL
Vortekslenir, 37 ^{0}C de 5 dk İnkübe edilir	
Griess reaktifi	100 µL

10 dk oda sıcaklığında bekletilir, 540 nm dalga boyunda absorbans okutulur.

Hesaplama:

$$\text{Toplam nitrik oksid : } \mu\text{mol/L} = \frac{\text{Abs} \times \text{DF}}{0{,}0395}$$

DF: Dilisyon faktörü

Abs : 540 nm dalga boyunda tespit edilen absorbans

3.5.8- İstatistiksel Analiz

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi. Bulguların ortalama değerleri (X) ve standart sapmaları (SD) bulundu. İsatatistiksel değerlendirmeler, bilgisayarda SPSS 11.0 paket programında, anlamlılık sınırı 0.05 alınarak yapıldı. Bulgularımız nonparemetrik olduğu için karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve karşılaştırılmalarda önemli bulunan gruplarda Mann-Whitney'U testi kullanıldı. Bulgularımız arasındaki korelasyon için Spearman korelasyon testi uygulandı.

4-BULGULAR

Bu çalışmada, hipertiroidili, hipotiroidili ve kontrol gruplarında homosistein, SAM, MDA, SOD, GSHPx ve NO düzeyleri tespit edildi. Ortalamalar ve standart sapmalar Tablo 11 de verilmiştir.

Tablo 11. Hipertiroidili, Hipotiroidili Ve Kontrol Grubunda Tespit Edilen Ortalama Değerleri.

Parametreler	Grup I Hipertiroidili Hasta (n=30), x ± SD	Grup II Hipotiroidili Hasta (n=22), x ± SD	Grup III Kontrol (n=15), x ± SD
FT_3 (pg/mL)	6.96 ± 4.3**	1.9 ± 0.7*	2.9 ± 1.0
FT_4 (ng/mL)	2.53 ± 1.2**	0.7 ± 0.2*	1.3 ± 0.3
TSH (μU/mL)	0.28 ± 1.2**	12.4 ± 7.7**	2.5 ± 1.6
Plazma homosistein (μmol/L)	8.4 ± 1.9	17.9 ± 4.9**	9.1 ± 2.8
Plazma SAM (nmol/L)	150.6 ± 29.6*	237.4 ± 34.5**	187.1 ± 20.8
SOD (U/mL)	1.8 ± 0.1**	2.37 ± 0.7*	3.4 ± 0.7
MDA (mmol/L)	27.7 ± 7.8**	26.5 ± 9.9*	23.5 ± 7.4
NO (U/mL)	28.12 ± 7.6	17,2 ± 8.7**	27.7 ± 8.4
GSHPx (U/mL)	1967.1 ± 263.6	2026.2 ± 587.5	1927.3 ± 534.8

*: Hasta gruplarının değerleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p<0.05$ seviyesinde anlamlı

**: Hasta gruplarının değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p<0.01$ seviyesinde anlamlı.

Tablo12. Hasta Gruplarda Tespit Edilen Ortalama Değerler.

Parametreler	Grup I Hipertiroidili Hasta (n=30), x ± SD	Grup II Hipotiroidili Hasta (n=22), x ± SD
FT_3 (pg/mL)	6.96 ± 4.3**	1.9 ± 0.7**
FT_4 (ng/mL)	2.53 ± 1.2**	0.7 ± 0.2**
TSH (μU/mL)	0.28 ± 1.2**	12.4 ± 7.7**
Plazma homosistein (μmol/L)	8.4 ± 1.9**	17.9 ± 4.9**
Plazma SAM (nmol/L)	150.6 ± 29.6**	237.4 ± 34.5**
SOD (U/mL)	1.8 ± 0.1*	2.37 ± 0.7*
MDA (mmol/L)	27.7 ± 7.8	26.5 ± 9.9
NO (U/mL)	28.12 ± 7.6**	17,2 ± 8.7**
GSHPx (U/mL)	1967.1 ± 263.6	2026.2 ± 587.5

*: Hasta gruplarının değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p<0.05$ seviyesinde anlamlı.

**: Hasta gruplarının değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p<0.01$ seviyesinde anlamlı.

4.1- FT_3, FT_4 , TSH: Hipertiroidili hasta grubunda FT_3, FT_4 değerleri kontrol grubuna göre yüksek, TSH ise düşüktü. Fark istatistiksel olarak ($p<0.01$) seviyesinde anlamlıydı. Hipotiroidili hast grubunda ise FT_3, FT_4 değerleri kontrol grubunda tespit edilen değerlere göre düşük, TSH ise yüksekti. FT_3 ve FT_4 için fark istatistiksel olarak ($p<0.05$), TSH için ($p<0.01$) seviyesinde anlamlıydı.

4.2- Plazma homosistein: Hipotiroidili grupta tayin edilen plazma homosistein değerleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu . Bu istatistiksel olarak ($p<0.01$) seviyesinde anlamlıydı. Hipertirodili grubun plazma homosistein seviyeleri kontrol grubundaki plazma homosistein değerleri ile kıyaslandığında az miktarda düşük olduğu tespit edildi fakat bu istatistiksel olarak bir anlam ifade etmiyordu.

4.3- SAM: Hipertiroidili hasta grubunda tayin edilen SAM değerleri kontrol grubunda tayin edilen değerlerle karşılaştırıldığında daha düşük olduğu tespit edildi ve bu istatistiksel olarak ($p<0.05$) seviyesinde anlamlıydı. Hipotirodili hasta grubunda ölçülen

SAM değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edildi ve istatistiksel olarak ($p<0.01$) seviyesinde anlamlıydı.

Hipotiroidili hastalarda tespit edilen FT_4 değerleri ile SAM arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edildi ($r = -0.409$, $p<0.05$) .

4.4- SOD: Hipertiroidili ve hipotiroidili hasta grublarında tayin edilen SOD aktivitelerinin kontrol grubundaki SOD aktivitesinden düşük olduğu tespit edildi ve istatistiksel olarak sırasıyla ($p<0.01$) ve ($p<0.05$) seviyesinde anlamlıydı.

4.5 MDA: Hipertirodili ve hipotiroidili hasta grublarında ölçülen MDA değerleri kontrol grubunda tayin edilen MDA değerleriyle karşılaştırıldığında yüksek olduğu tespit edildi bu istatistiksel olarak sırasıyla ($p<0.01$) ve ($p<0.05$) seviyesinde anlamlıydı.

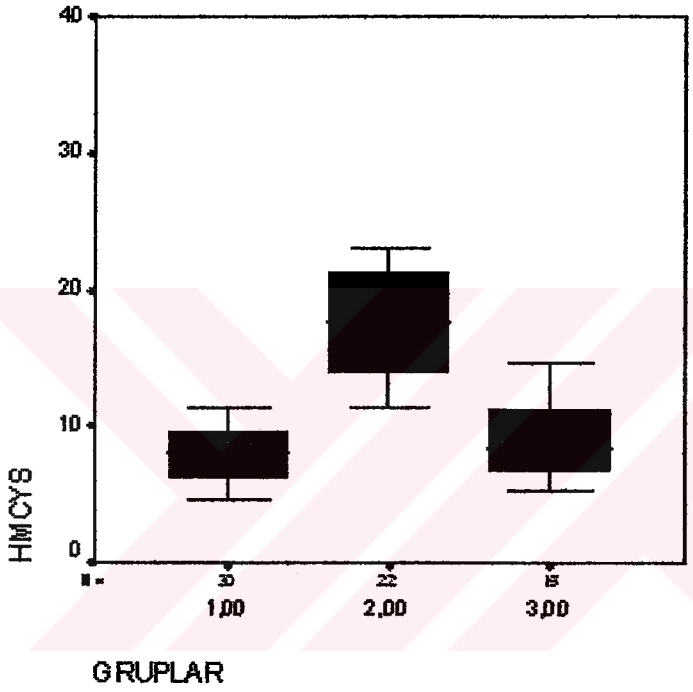
Hipertiroidili hastalarda tespit edilen TSH değeri ile MDA miktarı arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edildi, bu istatistiksel olarak ($r = -0,482$, $p<0.05$) seviyesinde anlamlıydı.

4.6- NO: Hipertiroidili hasta grubunda tayin edilen NO aktiviteleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan seviyede yüksek bulundu. Hipotirodili hasta grubundan alınan serum örneklerinde tayin edilen NO aktiviteleri kontrol grubunda tayin edilen NO aktivitelerine göre düşüktü ve istatistiksel olarak ($p<0.01$) seviyesinde anlamlıydı.

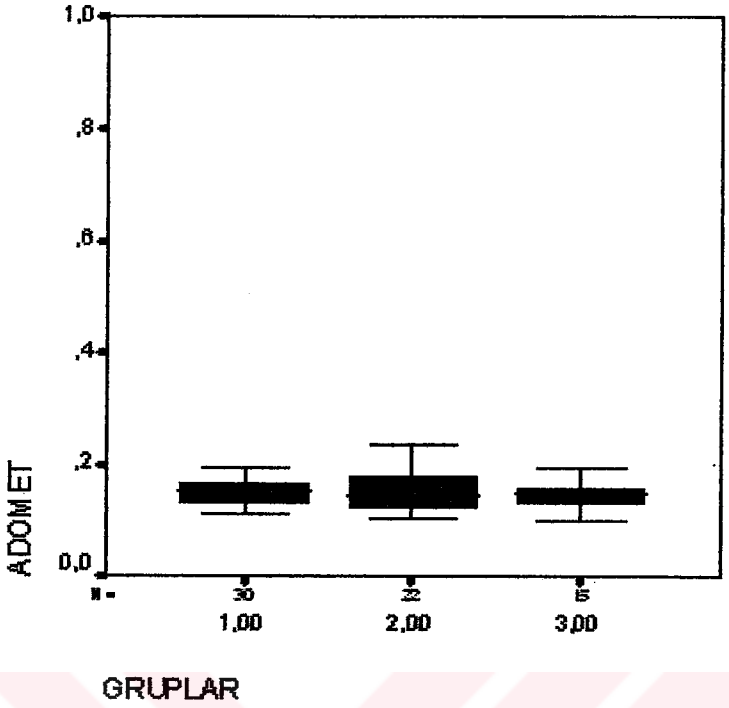
Hipotiroidili hasta grubunda tespit edilen FT_3 değerleri ile NO miktarı arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edildi ve bu istatistiksel anlamda ($r = 0.431$, $p<0.05$) seviyesinde anlamlıydı.

4.7- GSHPx: Hipertiroidili hastalardan alınan serum örneklerinde tayin edilen GSHPx aktiviteleri kontrol grubundan alınan örneklerde tayin edilen GSHPx aktiviteleriyle karşılaştırıldığında bir fark gözlenemedi. Hipotiroidili hastalardan alınan serum örneklerinde tayin edilen GSHPx aktivitesi kontrol grubundan alınan örneklerden elde

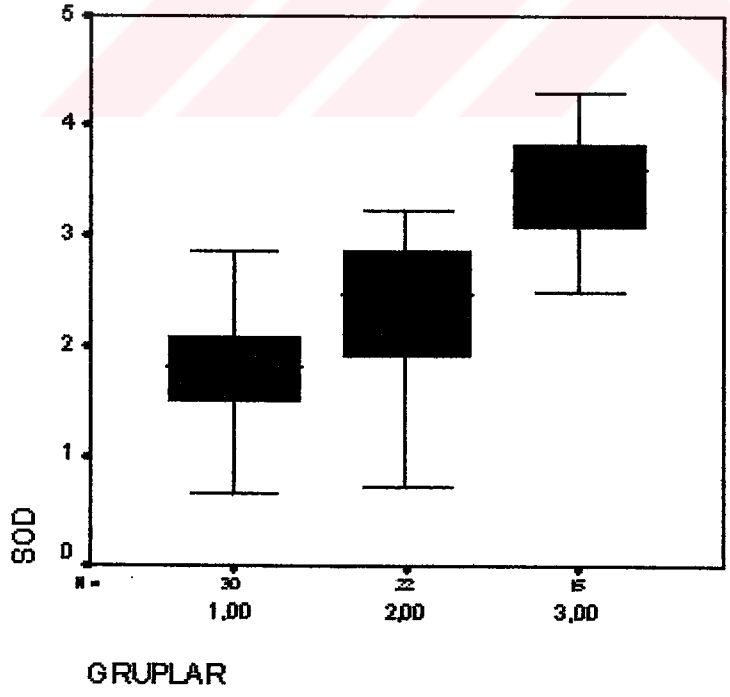
edilen GSHPx aktiviteleriyle karşılaştırıldığında hasta grubunun GSHPx aktivitesinin az miktarda yüksek olduğu tespit edildi ama bu istatistiksel olarak bir anlam ifade etmiyordu fakat hipertiridili hasta grubunda FT_3 değeri ile GSHPx aktivitesi arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edildi ($r = -0.479$, $p<0.05$).



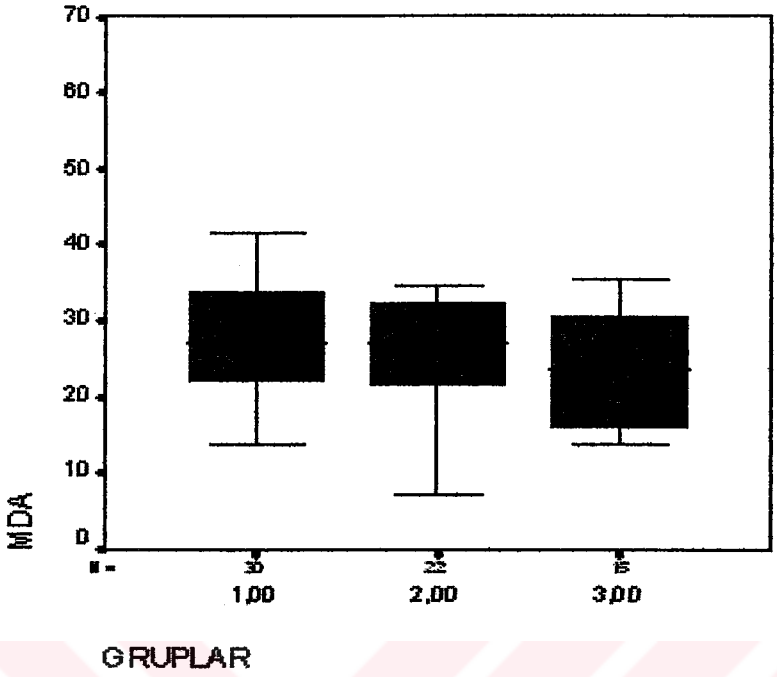
Şekil 8. Homosistein ve Gruplar Arasındaki Dağılım.



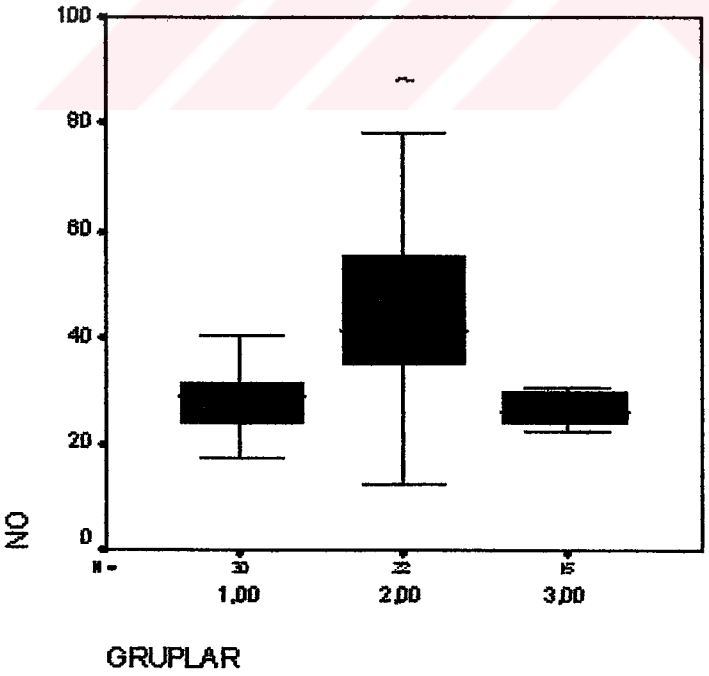
Şekil 9. S-Adenozilmetiyonin ve Gruplar Arasındaki Dağılım.



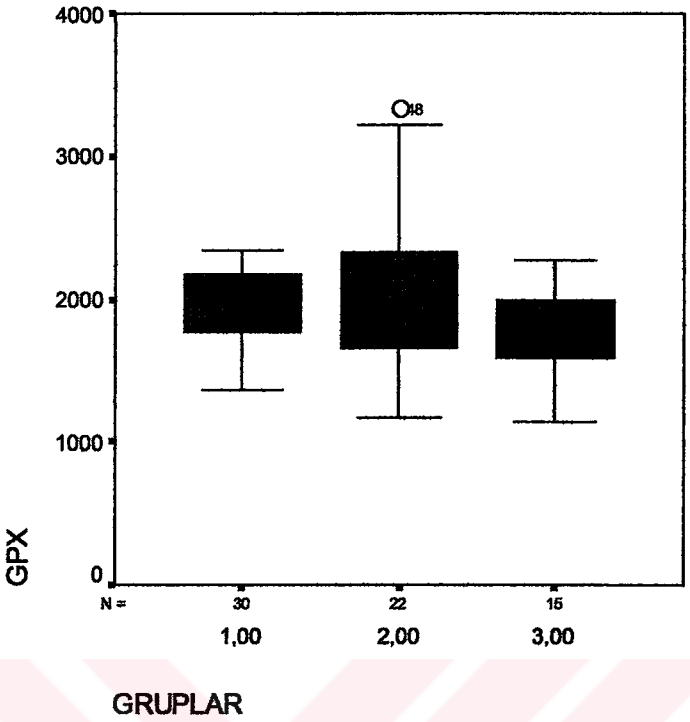
Şekil 10. SOD ve Gruplar Arasındaki Dağılım.



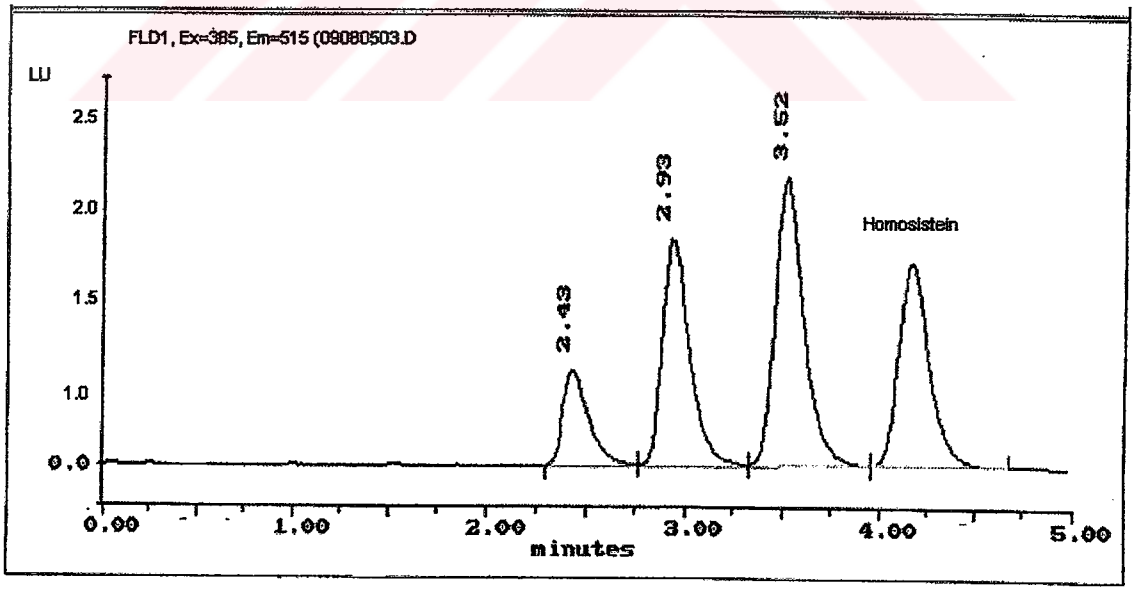
Şekil 11. MDA ve Gruplar Arasındaki Dağılım.



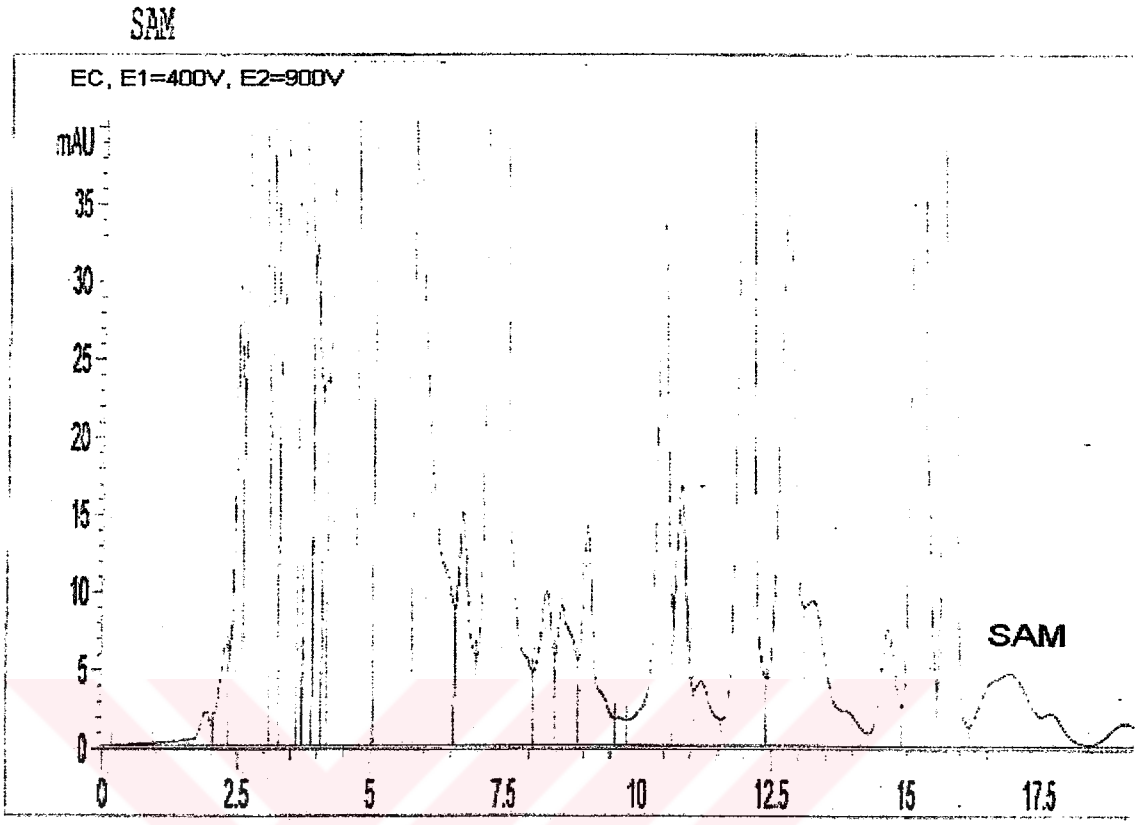
Şekil 12. NO ve Gruplar Arasındaki Dağılım.



Şekil 13. GSHPx ve Gruplar Arasındaki Dağılım.



Şekil 14. Hasta Grubuna Ait Plazma Homosistein Kromotogram Örneği.



Şekil 15. Hasta Grubuna Ait S-Adenozilmetiyonin Kromotogram Örneği.

5- TARTIŞMA

Tiroid hormonlarının metabolizmada primer ya da sekonder olarak rol aldığı bilinmektedir. Bu hormonların en önemli etkisi hücre ve organlarda hücresel tepkimeleri hızlandırmaktır. Tiroid hormonlarının kardiyovasküler sistem üzerine etkilerini inceleyen birçok çalışma vardır.[114,115] Bu çalışmalarda tiroid hormonlarının kardiak kasılmayı artırdığı ve kalp üzerinde pozitif bir kronotropik etki yarattığı öne sürülmüştür. Ayrıca serum kolesterol seviyesini düşürdüğü bu işlemi LDL seviyesini koruyarak gerçekleştirdiğini gösteren çalışmalarda mevcuttur.[116] Buna bağlı olarak tiroid hormonların kolesterol seviyesini düşürerek kardiyovasküler hastalıklar ve tromboz riskini azalttığı belirtilmiştir.[11,116,117] Tiroid hormonları kardiyovasküler hastalıklar ve tromboz riskini azaltırken, çalışmamızda yer alan homosistein ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir kısmı mekanizması tam olarak bilinmese de plazmada artan homosistein seviyesinin bir kardiyovasküler hastalık ve tromboz risk faktörü olduğunu ortaya koymuşlardır.[3,8,11,48] Artmış plazma homosistein seviyelerinin sadece kroner arter hastalığı için değil, karotid, serabral, periferik arterleri içine alan vasküler tıkayıcı hastalıkların gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olduğu yapılan çalışmalarda ileri sürülmüştür.[14,118,119] Homosisteinin yanı sıra çalışmamızda da bulunan ve homosisteinin öncülü olan SAM metabolizmanın en önemli metil vericisidir.[120] DNA, RNA, nörotransmitterler ve kreatin gibi biyolojik moleküllerin metilasyonunda görev alır. SAM'in kardiovasküler hastalarda homosisteinden daha sensitif bir belirteç olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.[121]

Plazma homosistein seviyesinin artış nedenlerinden en yaygını sistatiyonin β sentaz, metilentetrahidrofolat redüktaz ve metiyonin sentaz enzimlerinin eksikliği veya defektidir. [44,54,55] Bu enzimlerin eksikliği ya da defekti genetik kökenli ya da sonradan kazanılmış olabilir. Bu enzim eksikliklerinin yanı sıra metiyonin sentaz enziminin

kofaktörü vitamin B_{12}, sistatiyonin β sentaz enziminin kofaktörü vitamin B_6 ve folatın besinlerle yeterince alınmaması veya bu vitaminlerin v0ücut tarafından kullanılmaması da hiperhomosisteinemiye neden olur.[7,47,56,]

Homosistein ve SAM'in sadece kardiovasküler hastalıklar değil, mekanizması tam olarak açık olmasa da oksidatif stresi artırdığı yolundaki deliller kuvvetlidir.[12,29,122] Homosistein plazmada, karışık disülfür ve homosistein oluşturmak üzere hızlı bir şekilde okside olur.[11,123] Reaktif oksijen türleri bu otooksidasyon esnasında üretilir ve hidroksil radikali ile birlikte hidrojen peroksitin, hiperhomosisteineminin vasküler toksisitesine karıştığına dair deliller kuvvetlidir.[12,68,69]

Endotel türevli nitrik oksit üretiminin homosistein tarafından zıt bir şekilde etkilendiğini bildirilmiştir.[70]

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda hiper ve hipotirodili hastalarda homosistein, SAM ve antioksidan düzeylerini tespit ettik ve bu hasta gruplarındaki sonuçları kontrol grubunda tespit edilen değerlerle karşılaştırdık.

Çalışmamızda tespit ettiğimiz FT_3, FT_4 ve TSH seviyeleri gerek hasta grupları arasında gerekse kontrol grubuyla karşılaştırıldığında literetürlerle uyumluydu.[81]

Çalışmamızda hipotirodili hastalara homosistein seviyesinin kontrol grubuna oranla oldukça yüksek olduğunu tespit ettik. Hipertiroidili hastalarla kontrol grubu arasında önemli derecede fark yoktu. Diekman MJ ve ark.[7] homosistein seviyesinin hipotirodili hastalarda kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğunu ve hipertirodili hastalarda ise önemsenecek derecede farklı olmadığını belirtmektedir. Yalnız hipertirodili hastalar ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda hipertiroidili hasta grubunda tespit edilen homosistein seviyesinin kontrol grubunda tespit edilen seviyeden önemli derecede düşük olduğunu savunan çalışmalar bulunmaktadır[11]. Yapılan bazı çalışmalarda, tam kandan plazma ya da serum ayrılması geciktiği zaman

total homosistein konsantrasyonunun yükseldiği ve oda sıcaklığında tam kan bir saat bekletildiği zaman, plazma/serum homosistein konsantrasyonunun yaklaşık %10 arttığı literatürlerde ifade edilmiştir.[124,125] Çalışmamızda bekletmeden kaynaklanan homosistein artışına neden olmamak için alınan kan örnekleri hemen 3500 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra ependorf tüplere alınarak -80 ^{0}C de analizlere kadar saklandı.

Plazma homosistein ölçmek için bir çok metot kullanılmıştır. Bizim kullandığımız, sülfhidril gruplarına spesifik ajanlarla kolon öncesi işaretleme (derivatizasyon) yapılarak HPLC ile floresans dedektörde saptamak, yüksek spesivite ve sensitiviteye sahip olan metotdur.[126-128]

Çalışmamızda yer alan diğer bir parametre SAM, Melnyk S ve ark.[26] nın kullandığı yönteme uygun olarak HPLC sisteminde elektrokimyasal dedektör kullanılarak tespit edildi. Ölçüm için plazma örnekleri hazırlanırken derivatizasyon işlemi ve öncül kolon kullanılmadı bu yüzden bulduğumuz sonuçlar diğer çalışmalar oranla daha yüksekti. Bunun yanı sıra SAM'in tayini için kullandığımız metotda bir numunenin analizi için 40 dakika gerekmektedir bu bekleme süresinde SAM konsantrasyonunda %20 lik bir artışa neden olmuş olabilir.

Hipotirodili hastalarda tespit ettiğimiz SAM seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksek olduğu tespit edildi. Hipotirodili hastalarda homosistein seviyelerinin tiroid hormonlarından bağımsız olarak yüksek olması tiroid hormonlarının homosistein metabolizmasında bulunan bir çok enzimin gen ifadelendirilmesini etkilemesinden olabilir, SAM düzeylerinin FT4 ile ($r = -0.409$, $p<0.05$) seviyesinde anlamlı negatif korelasyon göstermesi. Özellikle metilasyon basamağındaki enzimlerin etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Hipotirodili hastalarda tiroid hormonlarının düşük olması bu enzimlerin transkripsiyonunu yavaşlatabilir ve buna bağlı olarak

homosistein ve öncülü SAM plazmada birikebilir. Bu konuda moleküler düzeyde genetik çalışmalar gereklidir. Hipertiroidili hasta grubunda SAM düzeyleri önemsiz seviyede düşük bulundu. Yapılan bazı çalışmalarda hiperhomosisteinemili hastalarda SAM seviyesinin değişmediği tespit edilmiştir.[26,30,31]

Canlı organizmada bulunan antioksidan savunma mekanizmaları tüm aerobik hücrelerde, normal metabolizma sonucu oluşan toksik oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden hücreleri korumaktadır. Vücutta oksidan ve antioksidan sistem bir denge içinde bulunmaktadır. Bu denge oksidanların lehine bozulması durumunda hücre ve dokularda artan serbest radikaller çeşitli tahribatlara neden olmaktadır. Bu radikallerin oluşumuna katkıda bulunan maddelerin aerobik hücrelerde artması ve detoksifikasyonu mekanizmalarının yetersiz kalması durumunda bu zararlı etkiler hızlanmaktadır.

Homosistein oksidasyonu sonucu oluşan süperoksit anyon radikali nitrik oksitle birleşerek bir çok hücre bileşenlerine zarar veren ve çok güçlü bir oksidan olan peroksinitrit radikalinin oluşumuna ve aynı zamanda, bir vazorelaksan olan nitrik oksidin sentezini bozarak, onun biyo yararlılığının azalmasına neden olduğunu savunan çalışmalar mevcuttur.[126,127] Çalışmamızda hipotiroidili hastalarda tespit ettiğimiz NO seviyesinin kontrol grubuna göre düşük, homosistein seviyesinin yüksek olması bu çalışmalarla uyum göstermektedir. Hipertirodili hastalarda NO seviyesi kontrol grubunda tespit edilen NO seviyesinden yüksekti fakat bu fark istatistiksel açıdan bir önem ifade etmiyordu. Hipertiroidili hasta grubunda homosistein düzeyleri de kontrol grubuna göre çok az düşük bulunmuştu. Ancak yapılan korelasyon analizlerinde her iki grupta da bu parametreler arasında bir korelasyon bulunmadı.

Çalışmamızda hiper ve hipotiroidili hastalarda MDA seviyesi kontrol grubunda tespit edilen MDA seviyelerinden yüksekti. Hipertiroidili hastalarda bu fark çok daha

belirgindi ve TSH ile MDA arasında negatif bir korelasyon ($r = -0,482$, $p<0.05$) olduğu tespit edildi.

Tiroid hormonlarının mitokondride metabolik hız değişikliğini oksidatif metbolizmayı regüle ederek denetlediği daha önceki çalışmalarda vurgulanmıştır. Buna bağlı olarak hipertiroidili hastalarda tiroid hormonlarının artışıyla metabolizmanın hızlanacağı, bu yüzden serbest radikal oluşumunun ve lipit peroksidasyon seviyesinin artacağı öne sürülmektedir.[82] Bizim çalışmamızda da lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA yüksek bulundu. Hipotiroidili hastalarda ise metabolizma hızı yavaşlayacağından lipit peroksidasyonu ve buna bağlı olarak MDA seviyesinin normalden düşük olabileceğini ortaya koyan çalışmalar olmakla birlikte hiperhomosisteineminin lipit peroksidasyonunu yükselttiği çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır[74,75].

Çalışmamızda hiper ve hipotiroidili hastalarda tespit edilen GSHPx aktiviteleri kontrol grubunda tespit edilen aktivitelerden yüksekti fakat bu istatistiksel olarak bir anlam ifade etmiyordu, fakat hipertiroidili hasta grubunda FT_3 değeri ile GSHPx aktivitesi arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edildi bu istatistiksel olarak ($r = -0.479$, $p<0.05$) seviyesinde anlamlıydı. Hipertiroidinin GSHPx seviyesini düşürdüğünü ileri süren. çalışmada[47]da tiroid hormonlarının GSHPx aktivitesine direk etkisi olduğu kanıtlanamamıştır çünkü yapılan bu çalışmada eutiroidili grupta da yaşlanmayla birlikte GSHPx aktivitesi azalmıştır.[16]

Hiper ve hipotiroidili hasta gruplarında tespit edilen SOD aktiviteleri kontrol grubunda tespit edilen SOD aktivitesinden düşük bulundu. Hipertirodili hastalardaki SOD aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.01$ seviyesinde anlamlıyken hipotirodili hastalarda bu $p<0.05$ seviyesinde anlamlıydı. Bu konuda yapılan değişik çalışmalar SOD aktivitesinin tiroid hormonlarıyla değişmediğini vurgulamışlardır. Bizde

yaptığımız istatistiksel korelasyonda tiroid hormonlarıyla SOD aktivitesi arasında bir bağlantı bulamadık. SOD aktivitesinin bu azalışının tiroid hormonlarıyle direkt değil dolaylı bir ilişkisi olabilir.

Sonuç olarak hipotiroidide homosistein ve SAM düzeylerindeki artış, hipertiroididekı azalış, TSH ve tiroid hormonlarından bağımsızdır. Her iki hasta grubunda da antioksidan düzeylerindeki değişme ile homosistein ve SAM arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

KAYNAKLAR

1- Ward M. Homocysteine, fo1ate, and cardiovascu1ar disease. Int J Vitam Nutr Res 2001; 71(3):173-178.

2- Nauck M, Bisse E, Nauck M and Wieland H. Pre-analytical conditions affectting the determination of the plasma homocysteine concentration. Elin Chem Lab Med 2001; 39(8):675-680.

3- Ueland PM, Refsum H. Plasma homosysteine, a risk factor for vascular disease; plasma levels in health, disease, and drug therapy. J Lab Elin Med 1989; 114:473-501.

4- Blom HJ. Genetic determinants of hyperhomocysteinaemia: the roles of cystathionine β-synthase and 5, 10-methylenetetrahydrofolate reduclase. Eur J Pediatr 2000; 159(suppl 3):S208-S212.

5- David L. Nelson-Michael M. Cox. Lehninger Principle of Biochemistry. USA: Worth Publıshers, 1993:525-527.

6- Baghavan NV. Medical biochemistry. USA: Acedemic Press, 2002: 354-357.

7- Diekman MJ. Van der put NM. Blom HJ. Tijssen JG. Wiersinga WM. Determinants of changes in plasma homocysteine in hyperthyroidism and hypothyroidism. Clinical Endocrinology 2001; 54(2): 197-204.

8- Prasan K. Homocysteine, a Risk Factor for Cardiovascular Disease. Int. J. Angiol.. 1999 Jan;8(1):76-86.

9- Welch GN. LOscalzo J. Mechanisms of disease: homocystein and atherothrombosis New england Journal of Medicine. 1998; 338, 1042.

10- Brattstrom L. Wilcken EL. Homocystein and cardiovascular disease : cause or effect?.Am J Clin Nurt.2000; 72:315-23.

11- Demirbaş B. Özkaya M. Çakal E. Çulha C. Gülçelik N. Koç G. Serter R.Aral Y.

Plasma homocysteine levels in hyperthyroid patients. Endocr J.2004 Feb;51(1):121-125.

12- Franklin HE, We1ch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothromosis. N Engl J Med 1998; 338:1042-1050.

13- Finkelstein JD. Homocysteine: A history in progress. Nutrition Rewiews 2000; 58(7): 193-204.

14- Jacobsen DW. Determinants of hyperhomocysteinemia: amatter of nature and nurture. Am J Clin Nutr 1996; 64:641-642.

15- Olszewski AJ, McCully KS. Homocysteine content of lipoproteins in hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 1991 May;88(1):61-8.

16- Blom HJ. Consequences of export and oxidation in the vascular system. Semin Thromb Hemost 2000; 26(3):227-232.

17- Baghavan NV. Medical biochemistry. USA: Acedemic Press, 2002: 769-779.

18- Ersöz B, Titoid hormonları. In Onat T, eds. İnsan Biyokimysı. Ankara: Palme yayıncılık, 2002: 464-467.

19- Smith C, Marks A, Lieberman M. Marks'Basic medical biochemistry USA. Lippincott Williams&Wilkins,2005: 719-721.

20- Robert K, Darly K, Peter A, Victor W. Harper's Biochemistry. USA: Appletob&Lange, 2000: 561-567.

21- Nedrebo BG, Ericsson UB, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Aakvaag A, Aandreud S, Lien EA. Plasma total homocystein levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. Metaboism 1998; 47, 89-93.

22- Nedrebo BG, Ericsson UB, Nygard O. Plasma level of atherogenic amino-acid homocystein in hyper-and hypothyroid patients. Metabolism 1998; 48,89-93.

23- R Shinohara, T Mano, A Nagasaka, at all. Lipid peroxidation levels in rat

cardiac muscle are affected by age and thyroid status. Journal of Endocrinology (2000) 164, 97–102.

24- McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. Am J Patho 1969; 56(1): 111-128.

25- Demircan B. Aminoasidürilerin kağıt kromatografisi ve HPLC ile karşılaştırmalı incelemesi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.Erzurum, 2000.

26- Melnyk S. Pognibna M. Pogrıbny IP. Yi P. James SJ. Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: alterations with plasma homocysteine and pyridoxal 5'-phosphate concentrations. Clin Chem. 2000 Feb;46(2):265-72. Erratum in: Clin Chem 2001 Mar;47(3):612.

27- Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, Wagner C. Plasma s-adenosylhomocysteine is a more sensitiye indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. Am J Elin Nutr 2001; 74(6):723-729.

28- She QB, Nagao I, Hayakawa T, Tsuge H. A simple HPLC method for the determinahali of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat tissues: the effect of vitamin B_6 deficiency on these concentrations in rat liver. Biochem Biophys Res Commun 1994; 205(3):1748-1754.

29- Herrmann W. The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: An overview. Clin Chem Lab Med 2001; 39(8):666-674.

30- Rita Castro, Isabel Rivera, Eduard A. Struys, Erwin E.W. Jansen, Paula Ravasco, Maria Ermelinda Camilo, Henk J. Blom, Cornelis Jakobs, and Isabel Tavares de Almeida. Increased Homocysteine and S-Adenosylhomocysteine Concentrations and DNA Hypomethylation in Vascular Disease. Clinical Chemistry(2003) 49:8

1292–1296.

31- Evans PJ, Whiteman M, Tredger JM, Halliwell B. Antioxidant properties of Sadenosyl- L-methionine: a proposed addition to organ starage fluids. Free Radic Biol Med 1997; 23(7):1002-1008.

32- Kang SS, Wong PW, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. Metabolism. 1987; 36(5):458-62.

33- Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. Int J Biochem Cell Biol 2000; 32(4):385- 389.

34- Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. Ann Elin Biochem 2000; 37 (Pt 5):627-648.

35- Ubbink JB, Vermaak Wl, van der Merwe A, Becker PJ. Vitamin B_{12}, Vitamin B_6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. Am J Clin Nutr 1993; 57:47-53.

36- Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. Eur J Elin Chem Clin Biochem 1992; 30(6):377-9.

37- Mansoor MA, Ueland PM, Aarsland A, Svardal A. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with homocystinuria. Metabolism 1993; 42(11):1481-1485.

38- Robinson K, Mayer E, Jacobsen DW. Homocysteine and coronary artery disease. Cleve Elin J Med 1994; 61(6):438-450.

39- Nevruz O. Plazma total homosistein düzeyi ile koroner arter hastalığı arasındaki ilişkinin incelemesi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi. Iç Hast. Bilim Dalı. Uzmanlık tezi. Ankara, 1998.

40- Van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Vasikaran SD, Taylor RR. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. Circulation 1997; 95(1):21-3.

41- Anwar W, Gueant JL, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Gerard P, Lemoel G, Erraess N, Moutabarrek A, Namour F. Methylenetetrahydrofolate-reductase and methionine synthase polymorphisms, in supplemented end-stage renal disease patienis undergoing hemodialysis. Elin Chem Lab Med 2001; 39(8):747-752.

42- Friedman AA, Bostom AG, Selhub J, Levey AS, Rosenberg IR. The kidney and homocysteine metaholism. J Am Sac Nephrol200l; 12:2181-2189.

43- Dalery K, Lussier-Cacan S, Selhub J, Davignon J, Latour Y, Genest J Jr. Homocysteine and coronary artery disease in French Canadian subjects: relation with vitamins B_{12}, B_6, pyridoxal phosphate, and folate. Am J Cardiol 1995; 75(16):1107-1111.

44- Fodinger M, Buchmayer H, Sunder-Plassmann G.. Molecular genetics of homocysteine metaholism. Miner Electrolyte Metab. 1999; 25(4-6):269-278.

45- Goulding CW, Postigo D, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine. Biochemistry 1997; 36(26):8082-8091.

46- Dixon MM, Huang S, Matthews RG, Ludwig M. The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductiye methylation of B_{12}. Structure 1996; 4(11):1263-1275.

47- Födinger M, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reduclase. J Nephrol2000; 13:20-33.

48- Boushey Cl, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of

plasma homosistein as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA 1995; 274:1049-1057.

49- Refsum H, Deland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 1998; 49:31-62.

50- Blom HJ. Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. Semin Thromb Hemost 2000; 26(3):227-232.

51- Van der Mo1en EF, Hiipakka MJ, van Lith-Zanders H, Boer.s GH, van den Heuve1 LP, Monnens LA, Blom HJ. Homocysteine metabohsm in endothelial cells of a patient homozygous for cystathionine beta-synthase (CS) deficiency. Thromb Haemost 1997; 78(2):827-833.

52- Refsum H, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, Ueland PM. Hyperhomocysteinemia in terms ofsteady-state kineties. Eur J Pediatr 1998; 157 Supp12:S45-S49.

53- Erol A. Homosisteinin koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe nitrik oksit salıverilmesi üzerine olan etkisi Ege üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji A.B.D. Uzmanlık tezi İzmir,1999.

54- Miner SES, Evrovski J, Co1eDEc. Clinical chemistry and molecular biological of homocysteine metabalism: An update. Elin Biochem 1997; 30(3):189-201.

104- Skovby F, Homocystinuria. Clinical, biochemical and genetic aspects of cystathionine beta-synthase and Its deficiency in man. Acta Paediatr Scand Suppl1985; 321:1-21.

55- Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. J Elin mvest 1988; 81(2):466-474.

56- Dierkes J, Kroesen M, Pietrzk K. Folie acid and vitamin B_6 supplementation and

plasma homoeysteine eoncentrations in health young women. Int J Vitam Nutr Res 1998; 68:98-103.

57- Mathez Ch, Trueb L, Darioli R, Waeber G. Homocystein and cardiovascular risk: is dosage useful. Schweiz Rundsch Med Prax. 2004 Dec 8;93(50):2093-7.

58- Harpel PC, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulthydryl compounds enhance the binding of lipoprotein (a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulthydryl compound metaholism. Proc Nat1 Acad Sci USA. 1992; 89(21):10193-10197.

59- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP. Total Homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. Elin Chem 1993; 39(9):1764-1779.

60- Ellen LM, Jacobsen DW, Robinson K. Homocystejne and coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 1996; 27:517-527.

61- Blankenhom DH, Mahnow MR, Mack Wl. Colestipol plusniacin therapy eleyates plasma homocyst(e)ine levels. Coronary ArteryDis 1991; 2:357-360.

62- Drell W, We1ch AD. Azaribine-homocysteinemia-thrombosis in histarical perspectives. Pharrnacol Ther 1989; 41:195-206.

63- Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Paraci.PM, Mahnow MR, Heistad DD. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. J Elin Invest 1996; 98(1):24-29.

64- Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how thay work. Crit Rev Food Sci Nutr 1995;35(1-2):7-20.

65- Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosc1erosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. J Elin Invest 1976; 58(3):731-741.

66- James TN. The spectrum of diseases of smal coronary arteries and their Physiologic consequences. J Arn Col1Cardiol 1990; 15(4):763-774.

67- Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Kooner JS. Acute hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction. Lancet 1998; 351(9095):36-7.

68- Rowley DA, Halliwell B. Superoxide-dependent formatian of hydroxyl radicals ftom NADH and NADPH in the presence ofiran salts. FEBS Lett 1982; 142(1):39-41.

69- Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing arnina acids in superoxide production and modification of law density lipoprotein by arterial smooth musc1ecells. J Biol Chem 1987; 262(21):10098-10103.

70- Stamler JS, Osbome JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mul1ins M, Singel D, Loscalzo 1. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothehum-derived relaxing factor and related oxides ofnitrogen. J Elin Invest 1993; 91(1):308-318.

71- Stamler JS, Simon DI, Osbome JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization ofbiologically active compounds. Proc Nat1Acad Sci U S A. 1992; 89(1):444-448.

72- Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia.J Elin Invest 1996; 98(1):5-7.

73- We1ch GN, Upchurch G Jr, Loscalzo J. Hyperhomocyst(e)inemia and atherothrombosis. Ann N Y Acad Sci. 1997; 811:48-58; discussion 58-59.

74- Upchurch GR Jr, We1chGN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. J Biol Chem. 1997; 272(27):17012-17017.

75- Blom HJ, Kleinveld HA, Boers GH, Demacker PN, Hak-Lemmers HL, Te Poele-

Pothoff MT, Trijbels JM. Lipid peroxidation and susceptibility of low-density lipoprotein to in vitro oxidation in hyperhomocysteinaemia. Eur J Elin Invest. 1995; 25(3):149-154.

76- Naruszewicz M, Mirkiewicz E, Olszewski AJ. Thiolation of low density lipoprotein by homocysteine thiolactione causes increased aggregation and altered interaction with cu1turedmacrophages. Nutr Metab Cardiovasc Dis 1994; 4:70-77.

77- Hulbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. Biol Rev Camb Philos Soc. 2000 Nov;75(4):519-631.

78- Akkus İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. baskı ed. Konya : Mimoza Yayınları; 1995.

79- Sara H. Kalsiyum kanal blokerlerinin oksidan ve antioksidan savunma sistemlerine etkileri. Uzmanlık tezi, İzmir: Ege Universitesi; 1992.

80- Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001;54(3):176-186.

81- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz basic prencipes in clical chemistry. Çev Ed. Alan D. Tietz kilinik kimyada temel ilkeler.Türkiye , Palme yayıncılık 2005: 839-853

82- Sözman EY. Yaşlanma biyokimyası. In Onat T, Emerk K, Sözmen YS. İnsan Biyokimyası. Palme yayıncılık, 2002:666-674.

83- Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. Lab Invest 1982; 47(1):5-18.

84- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediatesd by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am J Surg 1991; 161(4):488-503.

85- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemstry. Br Med

Bull 1993;49(3):48-493.

86- Yıldırım AK. İntakt ve adrenalektomili sıçanların eritrosit ve mide dokularından oksidan ve antioksidan parametrelerin araştırılması. Uzmanlık tezi, Erzurum Universtesi; 2003.

87- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free rdacals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol 1990;186:1-85.

88- Di Mascio P, Murphy Me, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. Am J Clin Nurt 1991;53(1 suppl):194-200.

89- Robinson K, Mayer E, Jacobsen DW. Homocysteine and coronary artery disease. Cleve Elin J Med 1994; 61(6):438-450.

90- Fridovich I. Biological effectes of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys 1986;247(1):1-11.

91- Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79(13):4793-4796.

92- Nakane T, Asayama K, Kodera K, Hayashibe H, Uchida N, Nakazawa S. Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. Free Radic Biol Med. 1998 Sep;25(4-5):504-11.

93- Lei J, Nowbar S, Mariash CN, Ingbar DH. Thyroid hormone stimulates Na-K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 285:762-772.

94- Edith C. H. Friesema, Jurgen Jansen, Carmelina Milici and Theo J. Visser. Thyroid hormone transporter. Vitam Horm. 2005;70:137-67.

95-Kohrele J. Thyroid hormone metabolism and action. Z Arztl Fortbild Qualitatssich.

2004 May;98 Suppl 5:17-24.

96- Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transporter. Biochem Soc Trans. 2005 Feb;33(Pt 1):228-32.

97- Ojamaa K, Balkman C, Klein IL. Acute effectes of triiyodothyronine on arterial smooth musvle cells. Ann Thoroc Surg 1993; 56:61-67.

98- Hulbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. Biol Rev Camb Philos Soc. 2000 Nov;75(4):519-631.

99- Gumieniak O, Perlstein TS, Hopkins PN, Brown NJ, Murphey LJ, Jeunemaitre X, Hollenberg NK, Williams GH. Thyroid function and blood pressure homeostasis in euthyroid subjects. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jul;89(7):3455-61.

100- Simon N. Young, PhD; Marjan Shalchi, MSc. The effect of methionine and *S*-adenosylmethionine on *S*-adenosylmethionine levels in the rat brain. J Psychiatry Neurosci 2005;30(1) :44-48.

101- Arruda AD, Da Silva WS, Carvalho DP, De Meis L. Hyperthyroidism increases the uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. Biochem J. 2003 Nov 1;375(Pt 3):753-60.

102- Ward CR, Achenbach SE, Holt D, Peterson ME, Meinkoth JL. Thyrotropin-stimulated DNA synthesis and thyroglobulin expression in normal and hyperthyroid feline thyrocytes in monolayer culture. Thyroid. 2005 Feb;15(2):114-20.

103- Brennan MD, Bahn RS. Thyroid hormone and illness. Endocr Pract. 1998 Nov-Dec;4(6):396-403.

104- Lindsat RS. Hypothyrodism. Lancet 1997;349:413-417.

105- Ridgway EC. Modern consept of primary thyroid gland failure. Clin Chem

1996;42:179-182.

106- LaFranchi SH. Hypothyroidism. Pediatr Clin North Am. 1979 Feb;26(1):33-51.

107- Kannan CR, Seshadri KG. Thyrotoxicosis. Dis Mon. 1997 Sep;43(9):601-77.

108- Lazarus JH. Hyperthyrodism. Lancet 1997;349:339-343.

109- Dong-Ju Shin and Timothy F. Osborne. Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through sterol regulatory element-binding protein-2. Tha journal biological chemistry 2003; 278(36), 34114-34118.

110- SunY, Oberley L, Li Y, A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988;34:497-500.

111- Jain S, McVie R, Duett J, Herbst J. Eryhrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobine in diabetes. Diabetes 1989;38:1539-1543.

112- Paglia D, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967;70:158-169.

113- Sych IuP, Kalatnikov VIu, Syrkin AL, Mel'nichenko GA. Impairment of cardiovascular function in subclinical hypothyroidism. Klin Med (Mosk). 2003;81(11):4-9.

114- Danzi S, Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. Minerva Endocrinol. 2004 Sep;29(3):139-50.

115- Ojamaa K, Kenessey A, Shenoy R, Klein I. Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000 Dec;279(6):E1319-24.

116- Oge A, Sozmen E, Karaoglu AO. Effect of thyroid function on LDL oxidation in hypothyroidism and hyperthyroidism. Endocr Res. 2004 Aug;30(3):481-9.

117- A. Berghout, J. van de Wetering, P. Klootwijk. Cardiac and metabolic effects in

patients who present with a multinodular goitre. The Journal of Medicine 2003; 61: 318-322.

118- Jones BG, RoseFA, Tudball N. Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity. Atherosc1erosis 1994; 105:165-170.

119- Baysal B, Meral I. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antı-oxidantnt enzyme actıvıtıy in rats experimentaly inducet hyperthyroidism. Clin.l and Exper. Phar and Phys 2005; 32: 541–544.

120- Tyasi S. Vitamin B_6 eksikliği oluşturulan sıçanlarda plazma homosistein ve piridoksal fosfat düzeyleri ile plazma ve karaciğer dokusunda s-adenozilmetiyonin ve s-adenozilhomosistein düzeyleri. Atatürk Ünv. Sağlık bilimler Enstitüsün biyokimnya A.B.D. Doktora tezi. Erzurum. 2004.

121- Davir MK. Koury MJ. Captevila A. Rana S. Wagner C. Plazma s-adenosylmethionine is a more sensitivite indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. Am J ClimNurt 2001; 74:7123-9.

122- James TN. The spectrum of diseases of smal coronary arteries and their Physiologic consequences. J Arn Col1Cardiol 1990; 15(4):763-774.

123- Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Kooner JS. Acute hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction. Lancet 1998; 351(9095):36-7.

124- Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J.Elevations of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatographymass spectrometry. J Clin Invest 1988, 81: 466-474.

125-Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia.J Clin Invest 1996;98:5-7.