

AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HOMOSİSTEİNİN İNDÜKLEDİĞİ OKSİDATİF STRES
ÜZERİNDE QUERCETİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Bio. Naime KOCABAŞ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN

Tez No : 2008-029

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HOMOSİSTEİNİN İNDÜKLEDİĞİ OKSİDATİF STRES
ÜZERİNDE QUERCETİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Bio. Naime KOCABAŞ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN

**Bu Tez Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından
07.TIP.09 Proje Numarası İle Desteklenmiştir.**

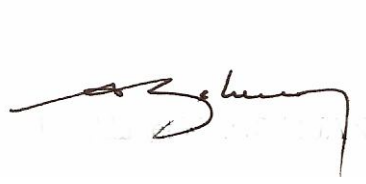
Tez No : 2008-029

2008 – AFYONKARAHİSAR

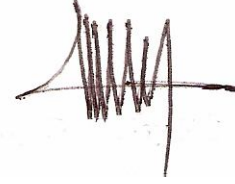
KABUL ve ONAY

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


Tez Savunma Tarihi: 12.06.2008



Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN
ÜYE




Doç. Dr. Tülay KÖKEN
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Nuray ÖZTAŞAN
ÜYE

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Naime KOCABAŞ'ın "Homosisteinin İndüklediği Oksidatif Stres Üzerinde Quercetinin Koruyucu Etkisi" başlıklı tezi 16/06/2008 günü saat 16.00' da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Yavuz DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

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

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

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini sınırsız sundukları için sevgili aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın sürdüğü 30 gün boyunca ratların bakım aşamasında ve biyokimyasal analizlerin çalışılmasında her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Kim. Elif KAĞA'ya, ratların kesim aşamasında, bilgi ve emeklerini esirgemeyen Arş. Gör. Murat KUŞ, Arş. Gör. Ayhan VURMAZ ve Arş. Gör. Zafer SÖYLEMEZ'e sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

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

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

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Homosistein	4
2.1.1. Homosistein Metabolizması	6
2.1.2. Hiperhomosisteinemi	9
2.1.3. Hiperhomosisteinemi ve Kardiyovasküler Hasar	10
2.1.4. Homosistinüri	11
2.2. Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres	14
2.2.1. Süperoksit Anyon Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	17
2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	19
2.2.3. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)	19
2.2.4. Singlet Oksijen (1O_2)	20
2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	21
2.3.1. Membran Lipitleri Üzerine Etkileri	21
2.3.2. Proteinler Üzerine Etkileri	25
2.3.3. Karbohidratlar Üzerine Etkileri	25
2.3.4. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	26
2. 4. Antioksidanlar	27
2.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	28
2.4.2. Katalaz (CAT)	30

2.4.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	31
2.4.4. Glutasyon S-Transferazlar (GST)	31
2.4.5. Glutasyon Redüktaz	32
2.4.6. Redükte Glutasyon (GSH)	32
2.4.7. Vitamin E (α -tokoferol)	34
2.4.8. Vitamin C (Askorbik asit)	35
2.4.9. Flavonoidler	36
2.4.9.1 Quercetin	38
3. MATERYAL VE METOD	41
3.1. Hayvanlar	41
3.2. Biyokimyasal Analiz	42
3.2.1. Hemoglobin Tayini	42
3.2.2. Plazma MDA Düzeylerinin tayini	43
3.2.3. Plazma Protein Karbonil Grupları Tayini	44
3.2.4. Eritrosit GSH Tayini	45
3.2.5. Plazma -SH Grupları Tayini	46
3.2.6. Eritrosit SOD Aktivite Tayini	47
3.2.7. Eritrosit Katalaz Aktivite Tayini	48
3.3. İstatistiksel Analizler	50
4. BULGULAR	51
4.1. Plazma MDA Düzeyleri	51
4.2. Plazma Karbonil Grupları	52
4.3. Eritrosit Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyleri	53
4.4. Plazma Sülfhidril (-SH) Grupları	54
4.5. Eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) Aktiviteleri	55
4.6. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktiviteleri	56
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ	66
7. KAYNAKLAR	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
ATP	: Adenozin trifosfat
β	: Beta
BHMT	: Betain-homosistein metil transferaz
C	: Karbon
CAT	: Katalaz
CBS	: Sistatyonin β -sentaz
CH ₃ THF	: 5-metiltetrahidro folat
Cl	: Klor
Cu	: Bakır
CYS	: γ -sistatyonaz
DMSO	: Dimethylsulpokside
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DTNB	: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoikasit
e ⁻	: Elektron
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
Fe	: Demir
gr	: Gram
GSH-P _x	: Glutatyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
GSSGR	: Glutatyon redüktaz
GST	: Glutatyon-S-transferaz
Hb	: Hemoglobin
Hcy	: Homosistein
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO ₂ [·]	: Perhidroksil radikali
K	: Potasyum
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği

KVH	: Kardiovasküler hastalıklar
L	: Litre
L \cdot	: Lipid radikali
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LO \cdot	: Alkoksil radikali
LOO \cdot	: Peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksit
LPO	: Lipid peroksidasyonu
μ	: Mikro
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
Mn	: Manganez
MS	: Metiyonin sentaz
MTHF	: Metilentetrahidrofolat
MTHFR	: Metilentetrahidrofolatredüktaz
Na	: Sodyum
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NO	: Nitrik oksit
NO ₂	: Nitrit
¹ O ₂	: Singlet oksijen
O ₂	: Moleküler oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyon radikalleri
\cdot OH	: Hidroksil radikali
PCO	: Protein karbonil oksidasyonu
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
R \cdot	: Aril radikali
RNA	: Ribonükleikasit
ROO \cdot	: Peroksi radikali
ROS	: Reaktif oksijen türleri
S \cdot	: Tiil radikali

SAH	: S-adenozil homosistein
SAM	: S-adenozilmetiyonin
SH	: Sülfidril grupları
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyo barbitürük asit
TCA	: Trikarboksilik asit
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Homosistein'in oksidlenmesi sonucu homosistin oluşması.	4
Şekil 2.2. Homosistein metabolizması.	7
Şekil 2.3. Reaktif oksijenden moleküler ara ürün.	15
Şekil 2.4. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu	24
Şekil 2.5. Glutasyon yapısı	33
Şekil 2.6. Glutasyon biyosentezi	33
Şekil 2.7. Çeşitli flavonoidler	36
Şekil 2.8. Quercetin yapısı	39
Şekil 4.1. Plazma MDA düzeyleri	51
Şekil 4.2. Plazma karbonil grupları düzeyleri	52
Şekil 4.3. Eritrosit GSH düzeyleri	53
Şekil 4.4. Plazma -SH düzeyleri	54
Şekil 4.5. Eritrosit SOD aktiviteleri	55
Şekil 4.6. Eritrosit CAT aktiviteleri	56

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Total plazma homosistein bileşenleri ve yüzdeleri.	5
Tablo 2.2. Total plazma homosistein dağılımı.	5
Tablo 2.3. Reaktif oksijen türleri.	16
Tablo 2.4. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi	28
Tablo 4.1. Plazma MDA düzeyleri	51
Tablo 4.2. Plazma karbonil düzeyleri	52
Tablo 4.3. Eritrosit GSH düzeyleri	53
Tablo 4.4. Plazma -SH düzeyleri	54
Tablo 4.5. Eritrosit SOD aktiviteleri	55
Tablo 4.6. Eritrosit CAT aktiviteleri	56

ÖZET

Homosisteinin İndüklediği Oksidatif Stres Üzerinde Quercetin Koruyucu Etkisi

Metiyonin metabolizmasından meydana gelen bir ara ürün olan homosisteinin çeşitli nedenlerden dolayı plazma düzeylerinin yükselmesiyle hiperhomosisteinemi meydana gelir. Hiperhomosisteineminin indüklediği oksidatif stres sonucu lipid peroksidasyonu ve membran hasarının gelişmesine yol açan reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelir. İnsan vücudunda ROS'un toksik etkilerini azaltan antioksidan savunma mekanizması ve bu hasarı onaran antioksidanlar mevcuttur. Çeşitli bitkiler tarafından üretilen flavonoidler biyolojik membranları serbest radikallerin indüklediği oksidatif hasara karşı korurlar.

Bu çalışmanın amacı ratlarda hiperhomosisteineminin indüklediği oksidatif hasara karşı quercetin tedavisinin koruyucu bir rolünün olup olmadığını değerlendirmektir.

Bu amaçla, 32 adet Sprague-Dawley yetişkin erkek rat 4 gruba ayrıldı. 1. Kontrol grubu (K); İntraperitoneal olarak serum fizyolojik (SF) verildi (1,5 ml/gün). 2. Quercetin grubu (Q); Quercetin (50 mg/kg/gün) ve SF (0,25 ml/gün) verildi. 3. Homosistein grubu (Hcy); İntraperitoneal olarak %1 (v/v)'lik homosistein (1 mg/kg/gün) ve SF (1,25 ml/gün) verildi. 4. Quercetin+Homosistein grubu (Q+Hcy); Homosistein (1 mg/kg) verilmeden 1 saat önce quercetin (50 mg/kg) verildi. Quercetin % 1 gr olarak SF ile hazırlandı.

Çalışmada, oksidatif stresin göstergesi olan plazma malondialdehit (MDA), plazma karbonil ve antioksidan kapasitenin göstergesi olarak eritrosit glutatyon (GSH), plazma sülfhidril (SH) gruplarının düzeyleri ve eritrosit katalaz (CAT) ile eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri tayini yapıldı. Çalışma sonucunda, quercetin grubunda eritrosit CAT düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı

derecede artmış olduğu tespit edildi. Homosistein grubunda ise plazma MDA ve karbonil düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve eritrosit GSH, eritrosit SOD ve plazma -SH düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Quercetin + Homosistein grubunda ise Homosistein grubu ile karşılaştırıldığında eritrosit GSH ile eritrosit CAT düzeylerinin anlamlı derecede yükseldiği ve plazma MDA düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi.

Sonuç olarak, quercetin eritrosit GSH düzeylerini ve eritrosit CAT aktivitesini artırıp plazma MDA düzeylerini azaltarak homosisteinin indüklediği oksidatif stres üzerine olumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Homosistein, oksidatif stres, antioksidan, flavonoidler, quercetin.

SUMMARY

Protective Effect Of Quercetin On Homocysteine-Induced Oxidative Stress

Hyperhomocysteinemia takes place, due to increase in plasma level of homocysteine derived from the metabolism of methionine. Due to hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress, reactive oxygen species which initiate lipid peroxidation and membrane demolitions occur. In human body, there are antioxidant defence system which might potentiate the toxic effects of reactive oxygen species and antioxidants repairing injures. Flavonoids which are produced by various plants can protect biological membranes against free radical-induced oxidative damage.

The aim of present study is to evaluate whether the quercetin treatment could have a protective effect against oxidative stress-induced by hyperhomocysteinemia in rats or not.

For this purpose, thirty two male Sprague-Dawley rats(adult) were divided four groups: 1. Control group (C); received saline, as intraperitoneal (1,5 ml/day). 2. Quercetin group (Q); received quercetin (50 mg/kg/day) as intraperitoneal and saline (0,25 ml/day). 3. Homocysteine group (Hcy); received homocysteine (1 mg/kg/day) and saline (1,25 ml/day). 4. Quercetin + Homocysteine group (Q+Hcy); Quercetin (50 mg/kg/day) was introduced 1 h before Hcy administration (1 mg/kg). Quercetin (1 g) was suspended in 100 ml of saline.

Plasma malondialdehyde (MDA), plasma carbonyl, erythrocyte glutathione (GSH), plasma sulfhydryl (SH), erythrocyte catalase and erythrocyte superoxide dismutase (SOD) activities were determined. Results revealed that in quercetin group erythrocyte CAT levels was found as significantly higher than control group. However, plasma MDA level significantly decreased. In homocysteine group, plasma MDA and carbonyl levels significantly increased and erythrocyte GSH and erythrocyte SOD levels significantly decreased than control group.

In quercetin +homocysteine group, if compared to homocysteine group, erythrocyte GSH and erythrocyte CAT levels significantly increased and plasma MDA levels significantly decreased.

Results as signed that by decreasing MDA level, increasing GSH level and erythrocyte CAT activity quercetin makes positive effects on oxidative stress induced by homocysteine.

Key Words: Homocysteine, oxidative stress, antioxidant, flavonoids, quercetin.

1. GİRİŞ

Homosistein (Hcy), sülfür içeren esansiyel aminoasitlerden olan metiyonin metabolizmasından meydana gelen bir ara üründür. Metiyonin bakteriler ve bitkilerde aspartattan sentezlenebildiği halde, insanlarda yeterli miktarda homosistein ve metil grupları sağlanamadığı sürece esansiyeldir (1) . Hem homosistein hem de metiyonin birbirlerinin prekürsörleridir, birinin yıkılması diğerinin sentez aşamasını oluşturmaktadır (2). Normal hücre içi homosisteinin yaklaşık %50'si iki remetilasyon yoluyla tekrar metil grubu alarak metiyonine çevrilir ki bu yollar; Vit. B₁₂ bağımlı metiyonin sentetazın katalizlediği bir reaksiyonda bir metil grubunun 5-metiltetrahidrofolattan homosisteine transferi ve betain veya trimetilglisinindeki bir metil grubunun geri dönüşümsüz olarak homosisteine transfer edilmesidir. Homosistein Vit. B₆ bağımlı sistasyon β sentetaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla sistasyona transsüfüllenebilir. Sistasyon, glutasyon gibi hücre içi tiol içeren bir çok major bileşiğin sentezinde gerekli olan sistinin kaynağıdır. En sonunda sistasyon ve diğer sülfür içeren aminoasitler su ve sülfata metabolize edilerek idrarla atılırlar (3).

Plazma veya serumda yüksek homosistein düzeylerinin klinik aterosklerotik vasküler hastalıklarla bir risk faktörü olarak ilişkili olduğu giderek daha iyi gösterilmektedir. Homosistein ile ilişkili aterojenik olaylar endotel hasarı, bunu takip eden trombosit aktivasyonu ve trombüs formasyonu ile ilişkili gibi görülmektedir (4). Ayrıca artmış homosistein seviyeleri nöral tüp defektleri ve diğer doğum defektleri için önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir (5). Genel olarak yükselmiş plazma total homosistein konsantrasyonunun en sık edinsel sebepleri folat, B vitaminlerinin tam veya relatif eksikliği ve böbrek yetmezliğidir (6). Sağlıksız beslenme, sigara, aşırı alkol tüketimi, aşırı kahve tüketimi, fiziksel egzersiz yapmama gibi stres yaratabilecek sağlıksız yaşam faktörleri de hiperhomosisteinemi nedenleri arasındadır (5).

Oksidatif stres, prooksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Homosistein serbest radikal etkileri nedeniyle, son yıllarda oksidatif sisteme dahil edilmiştir. Serbest radikaller gibi etki göstermesi vücutta birçok zararlı etkilere yol açar (5,7).

Hcy, otooksidasyonunun bir sonucu olarak kolayca oksidize olur ve sülfidril gruplarının oksidasyonu sırasında lipid peroksidasyonunu artıran, oksijenden türeyen serbest radikaller oluşur (8, 9). Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir (10, 11). Pek çok hastalık sürecinde önemli rol oynarlar (12, 13). Normal şartlar altında serbest radikallerin oluşturacağı zararlı etkiler hücrel koruma sistemi ile kontrol edilir. Bu koruyucu sistemler melatonin, Vitamin E, Vitamin C ve glutatyon etkinliği, enzimatik olan veya enzimatik olmayan mekanizmalar olabilir (14). Süperoksit radikallerinin enzimatik dismutasyonla temizlenmesinin yanında antioksidan olarak bilinen fakat enzim olmayan bileşikler de vardır ve bu bileşikler, organizmada oksijen radikallerinin temizlenmesini sağlayan vitaminler ve flavonoidler gibi bileşiklerdir (15).

Flavonoidler insan dietinin sık rastlanan komponentleridir ve biyolojik ve farmakolojik etkileriyle eşleştirilmiş multiple mekanizmaları vardır (16, 17). Flavonoidlerin major etkileri radikallerin toplanmasıdır. Flavonoidlerin etki gösterdiği bir diğer mekanizma çeşitli enzim türleriyle etkileşimdir. Flavonoidlerin her ne kadar tümör hücrelerinin apoptozisine ve genotoksitesine katkıda bulunan pro-oxidant özelliğe sahip olduğunu bildiren yayınlar olsa da, hücreleri oksidatif strese karşı koruyan antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (18, 19).

Quercetin, meyve ve sebzelerde en bol bulunan flavonol tip flavonoiddir. Quercetin'in vazodilatasyon ve antitrombotik etkileri gibi çok fazla biyolojik aktiviteleri vardır (20, 21). Quercetin'in *invivo* ve *invitro* antioksidan etkileri iyi bilinmektedir (17, 22). Quercetin ve diğer flavonoidlerin hepatik dokularda kolesterol biyosentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (23). Ayrıca *invivo* ve *invitro*

çalışmalarda quercetin'in yağ asit sentezi üzerindeki inhibitör etkisi gösterilmiştir (24).

Bu çalışmanın amacı, yüksek homosistein seviyesinin indüklediği oksidatif hasara karşı quercetin'in koruyucu etkisi olup olmadığının araştırılmasıdır.

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

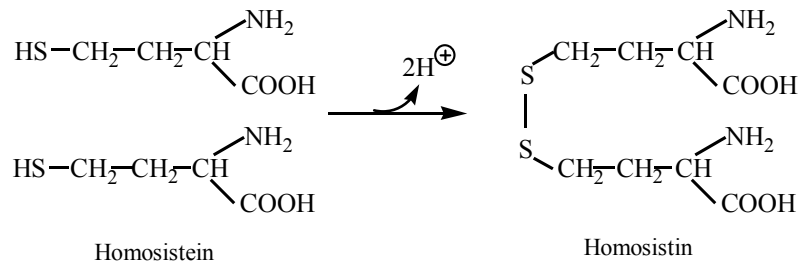
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Homosistein

Homosistein (Hcy), sülfür içeren esansiyel aminoasitlerden olan metiyonin metabolizmasından meydana gelen bir ara üründür. Ayrıca metiyoninin sistine dönüşümü sırasında meydana gelen tiol içeren bir aminoasittir (1). Homosistein, kofaktör olarak vitamin B₁₂ kullanıldığında remetilasyonla tekrar metiyonine yada vitamin B₆ kullanıldığında transsülfürasyonla sistine metabolize olur (25).

Total plazma homosisteinin yaklaşık %80'i disülfid köprüleriyle albümine bağlıdır. Bağlı olmayan homosistein türleri ise başlıca 'homosistein-sistin' ve 'homosistein-homosistein' disülfidleri şeklinde bulunur. Dolaşımdaki tüm homosisteinin yalnızca %1'i serbest homosistein şeklinde bulunur (26).

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



Şekil 2.1. Homosistein'in oksidlenmesi sonucu homosistin oluşması (27).

Tablo 2.1. Total plazma homosistein bileşenleri ve yüzdeleri (27).

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

Yapılan çalışmalar sonucu homosisteinle ilgili kimyasal tanımlamalar yapılmıştır. Bu kimyasal tanımlamalar, sülfidriлли veya redükte formdaki homosistein ve disülfidli veya okside formdaki homosistein olarak adlandırılmıştır. Disülfidli formlar, reaktif sistein kalıntıları içeren proteinlerle ve sisteinle meydana gelir. Homosisteinin okside formları aynı zamanda mikst disülfidler olarak adlandırılır. Plazmadaki homosisteinin multipl formlarının isimlendirilmesinde “total homosistein, indirgenmiş homosistein, proteine bağlı homosistein, serbest homosistein ve homosistein-sistein kompleksi” gibi kavramlar genel olarak kullanılmaktadır (27). Total homosistein bütün bu serbest ve bağlı biyokimyasal homosistein türlerinin toplamını tanımlar (26).

Tablo 2.2. Total plazma homosistein dağılımı (27).

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

Normal olgularda ortalama plazma Hcy değeri 10 $\mu\text{mol/L}$ olup 95 persentil ile 16 $\mu\text{mol/L}$ civarındadır (Tablo 2.2.). Değerler kadınlarla karşılaştırıldığında erkeklerde % 10 kadar daha yüksektir ve konsantrasyonlar her iki cinste yaşla birlikte giderek artar. Homosistein ölçümleri hasta aç durumdayken yapılmalıdır.

Günümüzde homosistein seviyeleri için terapötik hedefler saptanmıştır. Son verilere göre kardiyovasküler hastalıklar için yüksek risk altındaki hastalarda hedef düzey 10 $\mu\text{mol/L}$ 'den az olmasıdır (28).

Normal sağlıklı kişilerde günlük homosistein üretimi 20.000 μmol kadardır. Total homosisteinin 1200 $\mu\text{mol/gün}$ kadarlık kısmı plazmada sürekli bir döngü durumundadır. Homosisteinin yaklaşık 3-10 $\mu\text{mol/24}$ saat kadarlık miktarı idrarla atılır. Bu miktar total homosistein'in yaklaşık %0,1 kadarını oluşturur (25, 27).

2.1.1. Homosistein Metabolizması

Homosistein iki major yolla metabolize olur; transsülfürasyon ve metilasyon. Homosisteinin % 50'lik kısmı transsülfürasyon yoluyla sisteine dönüşür. Diğer % 50'lik kısmı ise yeniden metillenerek metiyonini oluşturur (5). Homosistein metabolizması komplike bir feed-back sistemle düzenlenir (Şekil 2.2).

a) Remetilasyon yolu: Homosistein esansiyel bir aminoasit olan metiyoninin demetilasyonu ile metilasyon döngüsünde meydana gelir. Besinlerle alınan metiyoninin ATP yapısındaki adenzil kalıntısı ile oluşturduğu S-adenozil metiyonin (SAM), metillendirme tepkimelerinde en önemli metil vericisi olarak kullanılmaktadır. SAM yapısındaki metil grubunun özel metiltransferazlar ile uygun alıcılara taşınmasından sonra oluşan S-adenozilhomosistein (SAH), adenzin ve homosisteine hidroliz olmaktadır (1).

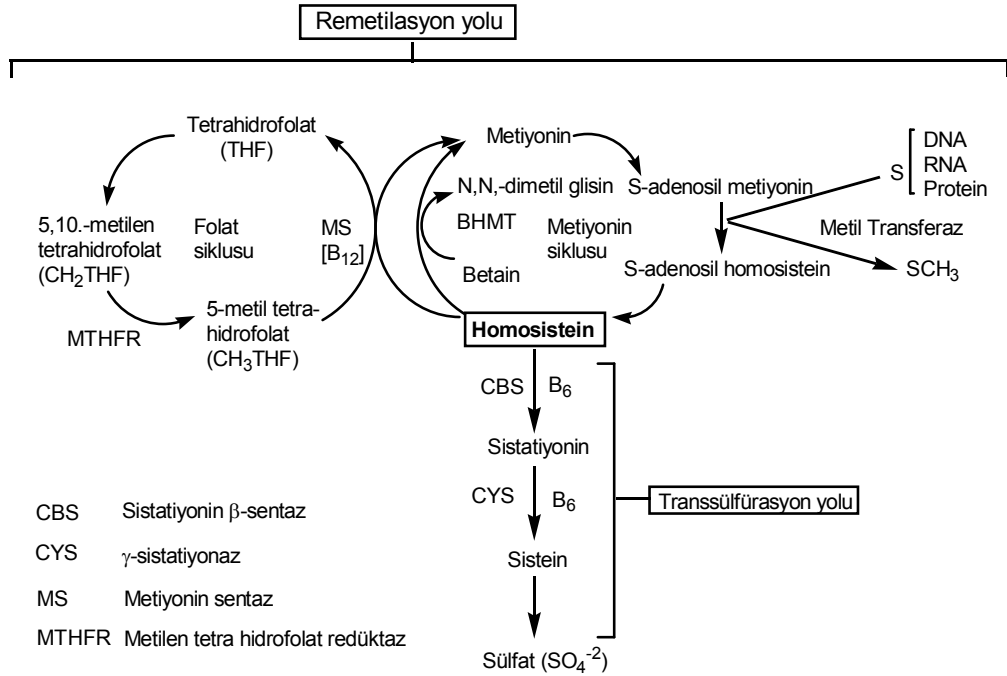
Eğer metiyonin dengesi negatif ve SAM konsantrasyonu düşükse homosistein doğrudan metiyonin sentazın (MS) katalizlediği reaksiyonla metiyonin oluşturmak için remetilasyon yoluna girer. Bu reaksiyonda Vit. B₁₂ kofaktör, metiltetrahidrofolat (MTHF) substrattır (5).

MTHF metilentetrahidrofolat redüktazın (MTHFR) katalizlediği bir reaksiyonla meydana gelir. Bu reaksiyon folat metabolizmasında MTHF'in formasyonu için hız

kısıtlayıcı basamaktır ve homosisteinden metiyonin jenerasyonu için önemlidir. MTHF 'ın homosistein remetilasyonunda indirekt etkisi vardır.

Çoğu dokuda homosistein Vit. B₁₂ bağımlı enzim metiyonin sentaz ile metiyonine remete olur. Bazı dokularda ise çoğunlukla karaciğer ve böbreklerde betain homosistein metiltransferaz enzimi homosisteinin metiyonine remetilasyonu için alternatif bir yoldur (5). Bu yolda homosistein, kolinin oksidasyonu ile oluşan betainden metil grubu alarak yeniden metiyonine dönüşür (1).

Homosisteinin SAM ve metiyonine dönüşümü MS veya MTHFR enzimindeki genetik bir defektle bloke olabilir. Bu şekildeki yeni doğanlarda total homosistein seviyesi yüksek, metiyonin seviyesi düşüktür. Nörolojik semptomlar ve zihinsel problemler mevcuttur (29).



Şekil 2.2. Homosistein metabolizması (27,30).

Hem homosistein hem de metiyonin birbirlerinin prekürsörleridir, birinin yıkılması diğersinin sentez aşamasını oluşturmaktadır. Bu ilişkinin temelini metiyonin metabolizması oluşturmaktadır (2).

b) Transsülfürasyon yolu: SAM konsantrasyonu yüksek olduğunda, transsulfürasyon yolu kullanılır ve homosistein geri dönüşsüz olarak sistasyon ve sistein oluşturmak için ilk basamağını sistasyon β -sentazın (CBS) katalizlediği iki Vit. B₆ bağımlı reaksiyona girer. Sistein major hücrel redoks tampon ve glutatyon için bir prekürsördür. Tahminen karaciğerdaki hücre içi glutatyon havuzunun yarısı homosisteinden türemektedir (5).

CBS enzimi bu yol için en önemli enzimdir. Bu enzime ait homozigot defektler nedeniyle homosistein düzeyleri (>100 $\mu\text{mol/L}$) artarak homosistinüriye neden olur. Heterozigot defektlerde ise parsiyel CBS eksikliği meydana gelir ve orta düzeyde hiperhomosisteinemi saptanabilir. Metiyonin yükleme testinden sonra hiperhomosisteineminin belirgin bir şekilde ortaya çıkması ile tanısı konulabilir. Kofaktör B₆'nın eksikliklerinde ise parsiyel CBS eksikliğinde meydana gelenlere benzer homosistein yükseklikleri görülebilir (25, 27).

Transsülfürasyon yolu öncelikle karaciğer, böbrek ve pankreasta meydana gelir. Bu dokular ayrıca glutatyon döngüsünün en hızlı olduğu dokulardır.

Hayvanlarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki Vit. B₆ eksikliğinden kaynaklanan transmetilasyon yolunun inhibisyonu SAH seviyelerinde artış ve SAM seviyelerinde azalmayla sonuçlanır (5).

2.1.2. Hiperhomosisteinemi

Enzim defektleri, homosistein metabolizmasındaki vitaminlerin eksikliği veya dağılımındaki bozukluk, yaşam şekli, hastalıklar ve ilaçlar metilasyon ve folat döngüsünü bozarak total homosistein seviyesini artırabilir (31).

Genel olarak yükselmiş plazma total homosistein (tHcy) konsantrasyonunun en sık edinsel sebepleri folat, B vitaminlerinin tam veya relatif eksikliği ve böbrek yetmezliğidir. Bu durum özellikle yaşlı kimseler için daha doğrudur (6). Renal fonksiyon total homosistein seviyesi için güçlü bir göstergedir. Bu, renal metabolizmayla ilgilidir (27). Genetik bozukluklara bağlı olarak görülen eksiklikler genel popülasyonda veya vasküler hastalıklı kişilerde görülen yüksek seviyelerin muhtemelen sadece bir kısmının sebebi olarak düşünülmektedir. Homosisteinüriye en sık sebep olan genetik durum, yüksek tHcy seviyeleri ve prematüre kardiyovasküler hastalıklarla karakterize sistasyon β sentetaz eksikliğidir. Yeni doğanlarda, tHcy metabolizması defektleri homosisteinüri ile seyreden ağır hiperhomosisteinemi sebebidir. Artmış tHcy'nin diğer genetik sebepleri; metiyonin sentaz ve MTHFR yokluğu ve bozukluğudur (32).

Yüksek tHcy seviyesi; ilerlemiş yaş, hipotiroidi, SLE, nikotinic asit, teofilin ve L-dopa gibi ilaçların kullanımı sırasında da görülebilir (31). Diyetle alınan Vit. B₆ , Vit. B₁₂ ve folat düzeyleri ve total homosistein seviyeleri ters orantılıdır. Aşırı sigara, alkol ve kafein alan kişilerde total homosistein seviyesi yükselir. Kadınlarda bu şekilde hayat tarzı erkeklere göre total homosistein seviyesini daha fazla etkiler. Kronik alkol tüketiminde etanolün vitamin durumunu etkilemesi sonucu total homosistein seviyesi artar (27).

Yüksek tHcy seviyelerine sebep olan diğer klinik durumlar; malignensiler (meme ve over ca.) ve psöriazis' dir. Hipotiroidi ve birçok farmakolojik ajan da yükselmiş tHcy konsantrasyonundan sorumlu olabilir (32).

2.1.3. Hiperhomosisteinemi ve Vasküler Hasar

In vitro çalışmalar Hcy'in indüklediği muhtemel vasküler etkileri göstermiştir. Bu etkilerden endotelyum üzerinde olanlar;

- a. Endotelial hücre hasarı ve endotelial hücre yıkımında doz bağımlı hızlanma.
- b. Azalan DNA metilasyonu ve gen ekspresyonundaki spesifik değişiklikler ile ilişkili olarak vasküler endotelial hücre gelişiminin inhibisyonu.
- c. Yumuşak kas hücre proliferasyonunda artış.
- d. Muhtemelen metalloproteinaz-1 'in indüksiyonunun neden olduğu kollajen akümülasyonu.
- e. Arterlerin adrenerjik vazokonstrüksiyonunda azalma.
- f. Lipoprotein(a)-fibrin bağlanmasına katkı.

Koagülasyon üzerindeki etkileri;

- a. Düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonuna katkı.
- b. Tromboksan aracılığıyla artan platelet agregasyonu ve trombin aktivasyonunda artış.
- c. Selüler doku faktör prokoagulan aktivitesinde artış.
- d. Hücre yüzey trombomodulin ekspresyonunun inhibisyonu ve protein C aktivasyonu.
- e. Antikoagulan heparin sülfat ekspresyonunun azalan antitrombin III bağlanma aktivitesiyle bastırılması.
- f. Faktör V aktivitesinde artış.
- g. Doku plazminojen inaktivatör için hücresel bağlanma bölgelerinin redüksiyonu ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 gen ekspresyonu ve sekresyonuna katkı (5).

İlk kez 33 yıl önce Mc Cully plazma Hcy düzeyi ile aterosklerotik vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiye dikkat çekerek hiperhomosisteineminin (Hpr-Hcy) aterosklerotik hastalıklarla sonuçlandığını bildirmiştir. Şiddetli Hpr-Hcy'li hastalarda

myokard infarktüsü, inme ve pulmoner embolizm gibi vasküler patolojiler sonucu yüksek sıklıkta erken ölümler saptanmıştır.

Genç hastalarda orta homosisteinemi ile birlikte serebrovasküler hastalık gözlenmesinin genetik olma olasılığı fazlayken, yaşlı hastalarda homosisteinemi genellikle edinseldir. Artmış plazma Hcy düzeylerinin özellikle yüksek serum kolesterol düzeyleri, yüksek kan basıncı ve sigara içimi gibi diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığında ateroskleroz için bağımsız risk faktörü olduğu bildirilmektedir. Homosisteinemili hastalardaki beyin infarktılarında büyük intrakranial damarlarda ateromatöz oklüzyon gözlenmektedir. Bu damarlarda tipik aterosklerotik değişiklikler; fibröz plaklar, medial fibrosiz ve internal elastik laminada kesintiler gözlenmiştir (33).

Koroner arter hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve periferik vasküler hastalıkların eşlik ettiği hafif hiperhomosisteinemide, klasik homosistinüriye göre homosisteinin oynadığı rol daha azdır. Ancak, önceden miyokard infarktüsü geçiren serebrovasküler trombozlu yaşlı erkeklerde total homosisteinin 10 $\mu\text{mol/L}$ 'den yüksek olduğu tespit edilmiştir. Akut koroner sendromlu hastalarda pıhtılaşma faktörleri ile homosistein arasında ilişki bulunmuş ve koroner yetmezlikli hastalara folik asit ve antioksidan vitaminler verilerek total homosistein konsantrasyonu azaltılmıştır. Bu nedenlerden dolayı total homosistein konsantrasyonunun düşürülmesiyle KVH'nın mortalite ve morbiditesinin azaltılabileceği düşünülmektedir (27).

2.1.4. Homosistinüri

Homosistinüri klinik ve biyokimyasal olarak farklı 3 ayrı antiteden oluşan genetik bir hastalıktır (34). Sistasyon β -sentaz (CBS), metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ve metiyonin sentaz (MS) eksikliği ile ortaya çıkmakta ve otozomal resesif bir mekanizmayla kalıtsal olarak geçmektedir (27). CBS eksikliği, kan ve idrarda artmış metiyonin ve Hcy düzeylerinin saptandığı, otozomal resesif kalıtılan en sık

rastlanan formudur. Bu enzimin geni 21 q üzerinde lokalize edilmiştir. Homozigotlarda enzim aktivitesi %1-5 arasındayken heterozigotlar genellikle klinik olarak korunmuştur ve enzim aktivitesi %40-60 arasındadır (33). Homozigot CBS eksikliği olan bireylerde transsülfürasyon yoluyla sıvılarında metiyonin, homosistein ve prekürsörleri birikmesiyle beraber sistein ve sistin miktarı azalır. Metiyonin miktarı normalde 0.45 mg/dL iken hiperhomosistinüri de 30 mg/dL'ye çıkmaktadır.

İdrarda homosistin, ve homosistein yanında metiyonin, metiyonin sulfoksit ve mikst disulfidli sistein gibi diğer sülfürlü aminoasitler de artar. Hastalığın dağılımında coğrafik farklılıklar vardır. Genel olarak popülasyonun %1'inden daha azında heterozigot CBS eksikliği görülür. Bu kişiler genellikle aç iken normal total homosisteine sahip olmalarına rağmen metiyonin yüklemesinden sonra total homosistein seviyesi yükselir. Yapılan son genetik çalışmalara göre vasküler hastalığı olan kişilerde CBS eksikliği için heterozigotluk seyrek olarak ortaya çıkar ve bu hafif genetik defektli hastalarda genellikle hiperhomosisteinemiye neden olmaz (27).

Klasik homosistinüri fenotipli çocuklarda oküler, vasküler, iskelet ve sinir sistemi anomalileri gözlenir. Vasküler endotelin zedelenmesi sonucunda ateroskleroza hızlandırarak arteriyal tromboz, myokard infarktüsü ve inme gelişimine neden olur. Etkilenen bireylerde marfanoid görünüm, lens dislokasyonu ve kognitif etkilenme saptanabilir. Malar rash ve livedo retikularis bazı hastalarda gözlenmektedir. Bu hastalıklar gözlenebilmekle birlikte hastalık için karakteristik değildir (33).

Homosistinürinin seyrek rastlanan formları; şiddetli MTHFR defekti, homosistein remetilasyonunda bozulma ve kobalamin metabolizmasındaki yeni doğan hataları sonucunda ortaya çıkar. Homosisteinin metillenerek metiyonin oluşturması, folata bağımlı bir sistem tarafından gerçekleşmektedir (Şekil 2.2). Bu siklusta substrat olarak folat kullanılırken N₅-metil tetrahidrofolat transferaz (MTHFT)'ı aktive etmek için kofaktör olarak vitamin B₁₂ kullanılır. Genetik olarak, folat siklusunda kullanılan redüktaz ve transferaz enzimleri defekti olan, folat veya

vitamin B₁₂'yi biyokimyasal olarak aktif formlarına dönüştüremeyen veya diyetle alınan folat ve vitamin B₁₂ düzeyi yetersiz olan kişilerde homosistein birikerek homosistinüriye neden olur (27). Metiyonin sentetaz enzim aktivitesi Tip II homosistinüriye hastalarda düşük saptanmıştır. Bu formda mental reterdasyon ve şizofreni siktir. Lens ektopisi saptanmaz.

Tip III homosistinüride metiltetrahidrofolat redüktaz enzimi eksiktir (33). MTHFR geninde sık görülen C677T mutasyonu, enzim aktivitesinde azalmaya, termolabiliteye ve folat metabolizma bozukluklarına neden olmasının yanında, orta veya daha yüksek hiperhomosisteinemiye neden olur. Bu bireyler, idrarları ile büyük miktarda homosistein atarlar ve plazma total homosistein konsantrasyonları sağlıklı popülasyona göre 10-15 kat yükselmiştir.

Bu bireylerde görülen arterioskleroz ve aterosklerozun hızlı başlaması, total plazma homosisteini ile KVH'nın başlangıcı ve ilerlemesi arasında bir doz-zaman ilişkisinin olabileceğini akla getirir. Bu nedenle, genel popülasyonda plazma homosisteininde hafif veya orta derecede yükselmenin ateroskleroza zemin hazırlayacağı hipotezi geliştirilmiştir (27).

2.2. Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres

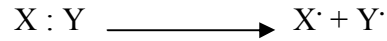
Serbest radikaller hücre metabolizması sırasında meydana gelen biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir (34).

Serbest

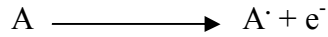
radikaller kovalent bağlı bir molekülün her atomunda ortak e⁻ 'lardan birinin kalarak, kovalent bağın homolitik bölünmesiyle ya da radikal olmayan bir moleküle tek bir e⁻ 'un eklenmesiyle oluşurlar. Bu nedenle serbest radikallerde yarım bağ olduğu düşünülebilir. Bu tür maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler (35).

Bir serbest radikal üç yolla ortaya çıkabilir:

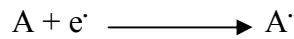
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



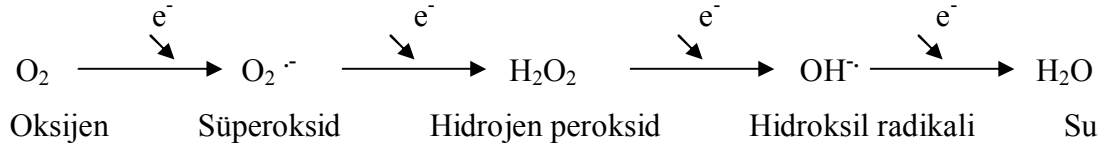
2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ile oluşur.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar (36).



Biyolojik sistemler için serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir (O₂). 1924'de O₂ 'in eşleşmemiş e⁻ 'lar içeren türleri saptanmıştır. O₂ 'nin dört e⁻ 'u basamaklar halinde redükte olarak su şekline dönüşür (35)(Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Reaktif oksijenden moleküler ara ürün (37).

O_2 bir e^- alınca süperoksid oluşur. Eğer iki e^- transfer edilirse oluşan ürün hidrojen peroksittir. H_2O_2 bir radikal değildir, fakat kuvvetli oksidan bir maddedir. İki den fazla e^- alabilir ve oldukça sitotoksik olan ürünlere dönüşür. Ferro demir (Fe^{+2}) H_2O_2 'e üçüncü e^- 'unu transfer ederse O-O bağı kırılır, su ve $\cdot\text{OH}$ oluşur (35).

Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümleriyle sonuçlanmaktadır .

Serbest radikaller hücrenin lipit, DNA, karbohidrat, protein gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyonu, hidroksil radikali, nitrik oksit, peroksil radikali ve radikal olmayan hidrojen peroksit gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar (36) (Tablo 2.3).

Miyokardiyal enfarktüs, diyabet, kanser, katarakt, romatoid artrit, infertilite, solunum, sinir ve üriner sistem hastalıkları ile stres ve yaşlanma sürecinde antioksidan enzim aktivitelerinde önemli değişiklikler ve lipit peroksidasyonunda artış, bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (34).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içindedir ve bu oksidan-antioksidan denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma yada ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (36).

Homosistein, son yıllarda oksidatif sisteme dahil olduğu kabul edilmiş protein yapısına girmeyen bir amino asittir. Serbest radikaller gibi etki gösterir. Enzimlerde konjenital eksiklik ve metabolizma sırasında reaksiyonlarda işlev gören folik asit, Vit. B₁₂ ve B₆'nın yetersizliğine bağlı olarak plazma homosistein düzeyleri yükselir. Buna bağlı olarak hiperhomosisteinemi görülür ve serbest radikaller gibi davranıp endotel hasarı oluşturur (5).

Homosistein, otooksidasyonu sırasında meydana gelen süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri endotel plazma membranında ve lipoprotein partiküllerinde lipid peroksidasyonu başlatır. Yine homosisteinin otooksidasyonu düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu süperoksit anyon radikalleri aracılığıyla destekler (38). Süperoksit radikalleri kuvvetli bir oksidan olan peroksinitriti meydana getirmek için nitrikoksit ile reaksiyona girerler (39).

Tablo 2.3. Reaktif oksijen türleri (15).

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit anyon radikali (O ₂ ⁻)		Hidrojen peroksit	(H ₂ O ₂)
Hidroksil radikali (HO [·])		Lipit hidroperoksit	(LOOH)
Peroksil radikali (ROO [·])		Hipohalöz asid	(HOX)
Alkoksil radikali (RO [·])		N-Halojenli aminler	(R-NH-X)
Semikinon radikali (HQ [·])		Singlet oksijen	(¹ O ₂) ₂
Organik radikaller (R [·])		Ozon	(O ₃)
Organik peroksit radikali (RCOO [·])		Azot dioksit	(NO ₂)
Nitrik oksid radikali (NO [·])		Hipokloröz asid	(HOCl)
Hemoproteine bağlı radikaller		Peroksinitrit	(ONOO ⁻)

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

Moleküler oksijenin dış orbitallerinde paylaşılmamış iki adet elektron vardır. Bu elektronlar paylaşılmadığı zaman, spinleri aynı yönde olduğu zaman ve ayrı ayrı orbitallerde bulduklarında en düşük enerji seviyesindedirler. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha alabilir. Bu orbitallerin tek elektron almasıyla süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), iki elektron almasıyla ise peroksi anyonu (O_2^{2-}) meydana gelir (40, 41).

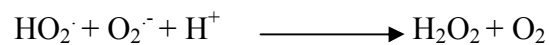
Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali diğer moleküllerden elektron çekip enerji ihtiyaçlarını karşılayabildikleri için oksitleyici ajanlar olarak bilinirler. Ayrıca süperoksit anyon radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcısına vererek tekrar oksitlenebildiği için bir indirgeyici olarak davranabilir (42).

Hücre membranındaki siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri, sitoplazmadaki ksantin oksidaz ve triptofan dehidrogenaz enzimleri ve lökosit membranındaki NADH oksidaz enzimi aracılığıyla süperoksit anyon radikali oluşabilir (40, 43).

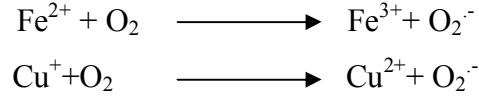
Süperoksit anyon radikali en çok hücrel organellerde elektron transport zincirinde bazı komponentlerden O_2 'e elektron sızması ile meydana gelir (44).

Mitokondriyal e^- transport zincirinde e^- iki yerden sızır. Birincisi, NADH-Dehidrojenaz basamağı, ikincisi ise koenzim Q ya da ubikinon basamağıdır. e^- 'ların O_2 'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi O_2 'nin %98'ini harcayarak suya indirger. O_2 'nin % 2'si ise transport zincirinden sızan e^- 'larla $O_2^{\cdot-}$ oluşturur (45).

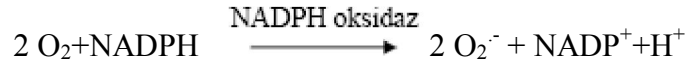
$O_2^{\cdot-}$ ile HO_2^{\cdot} reaksiyona girince, biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu reaksiyonda O_2 ve H_2O_2 meydana gelir (14).



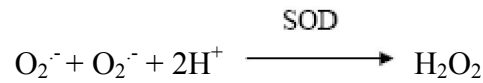
Geçiş metallerinin otooksidasyonu da O_2^- meydana getirebilir. Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü olduklarından geçiş metalleri iyonlarının O_2 ile reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir (14).



Fagositik hücreler (nötrofiller, monositler, makrofajlar), çeşitli biyolojik hedeflerin parçalanmasına neden olan ve enfeksiyona karşı hücre sel cevabı başlatan hücrelerdir. Solunumsal patlama sırasında fagositik hücrelerde diğer reaktif oksijen ürünleriyle birlikte süperoksit anyon radikali de meydana gelir. Nötrofillerde süperoksit anyon radikali plazma membranının dış yüzeyinde yerleşmiş olan NADPH oksidaz aracılığıyla meydana gelir. Uygun bir uyarı ile fagositik hücre uyarıldıktan sonra NADPH oksidaz aktive olur. NADPH'dan iki elektron iki molekül oksijene aktarılır. Böylece iki molekül O_2^- meydana gelir (14, 46).



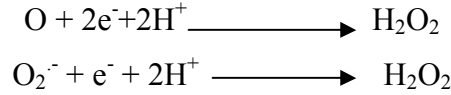
Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'e çevrilmesi SOD tarafından katalizlenmektedir .



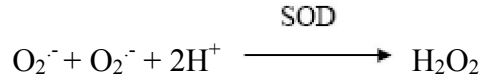
Bu tepkime 'dismutasyon tepkimesi' olarak tanımlanır (14).

2.2.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin 2 e⁻ alması veya süperoksidin bir e⁻ almasıyla peroksit meydana gelir. Oluşan peroksit molekülü 2 hidrojen atomuyla birleşerek H₂O₂ meydana getirir.



Fakat biyolojik sistemlerde H₂O₂ esas olarak süperoksidin dismutasyonu ile meydana gelir. Dismutasyon ya spontan olarak ya da süperoksid dismutaz (SOD) katalizi ile gerçekleşir (14, 47).

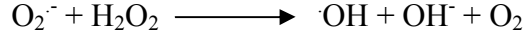


Bu reaksiyon sonucu iki süperoksit molekülü iki proton alarak H₂O₂ ile moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler oluşması nedeniyle bu reaksiyon bir dismutasyon reaksiyonudur. Hidrojen peroksitin pK'sı 10.6 olduğundan, nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz ve biyolojik zarları kolayca geçer. Hidrojen peroksit yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden dolayı radikal değildir (48).

2.2.3. Hidroksil Radikali (·OH)

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi (Fenton reaksiyonu) ile oluşan son derece reaktif bir radikaldir. Ayrıca hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu (Haber-Weiss reaksiyonu) sonucunda da meydana gelir (14, 49, 50).

O_2^- Cu^{2+} gibi geçiş metalleri ve radikal türleri ile kolayca reaksiyona girer ve H_2O_2 ile Haber-Weiss reaksiyonu vererek oldukça toksik hidroksil radikalini oluşturur.



Fe^{2+} iyonları katalizörlüğünde ‘Fenton reaksiyonu’ gerçekleşir ve reaksiyon ortalama 4000 kat hızlanır(51).



Biyolojik sistemlerdeki en reaktif tür olan $\cdot OH$, ortamda rastladığı her biyomolekülle çok hızlı bir şekilde tepkimeye girer. Bu nedenle ömrü 10^{-9} saniyeden daha kısadır. Hidroksil radikalinin başlıca tepkimeleri elektron transfer tepkimeleri, hidrojen çıkarma tepkimeleri ve bunu takiben katılma tepkimeleridir. $\cdot OH$ ’nin seçtiği başlıca hedef noktalar elektronca zengin bileşiklerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikal yapıdaki tepkimelerde binlerce farklı ara ürün oluşabilir (14, 48).

Hidroksil radikali kimyada en aktif radikal olarak bilinir. Bu nedenle in vivo oluşan bir $\cdot OH$ Radikali hemen her moleküle saldırır ve oluştuğu yerde de büyük hasara sebep olur (49, 51) .

2.2.4. Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin yüksek enerjili ve mutajenik formudur(42).

Spin kısıtlaması olmadığı için reaktivitesi çok yüksektir. Vücutta, pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorplaması sonucu, hidroperoksitlerin metal varlığındaki

yıkım tepkimelerinde ya da kendiliğinde dismutasyon tepkimeleri sırasında meydana gelebilir.

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Doymamış yağ asitleriyle tepkimeye girerek peroksi radikalini meydana getirir. Bunun sonucunda hidroksil radikali kadar etkin şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (14, 48).

Singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır (14).

2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir (52).

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Bu etkiler aşağıdaki başlıklar halinde açıklanabilir.

2.3.1. Membran Lipitleri Üzerine Etkileri

Lipitler serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller, yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna neden olurlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif hasarı kendi kendini devam ettiren zincirleme bir reaksiyon olup geri dönüşümsüz

membran hasarına neden olur. Hücre yüzeyindeki hormon akseptörleri, DNA, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ve Na^+K^+ -ATP az gibi enzimler lipit peroksidasyonu sırasında inaktive olur. Böylece lipit peroksidasyonu hücrelerde dejeneratif, mutajenik ve karsinojenik bozukluklara neden olur (53).

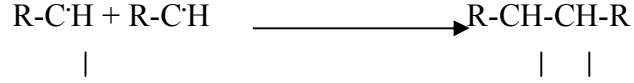
Lipit peroksidasyonu bir metilen grubundan hidrojen atomu kopartabilecek reaktiviteye sahip herhangi bir ROS'un lipit molekülüne saldırısıyla başlar. Çift bağ içermeyen yada bir çift bağı olan yağ asitleri oksidatif hasara çok doymamış yağ asitlerinden daha dirençlidirler. Bir çok membran ve lipoproteinlerde ise bu çok doymamış yağ asitleri bulunur.

Hidroksil radikalleri eğer hidrokarbon yan zincirlere ulaşabilmişlerse peroksidasyonu başlatabilirler. Hücre dışında oluşmuş $\cdot\text{OH}$ ekstrinsik proteinlere ve fosfolipitlerin baş gruplarına saldırabilirler. Akışkan solusyonların radyolizi $\cdot\text{OH}$ üretir. Bu $\cdot\text{OH}$ de ortamdaki tüm lipitlerin peroksidasyonunu stimüle eder. Bu olay sadece biyolojik membran ve yağ asitlerinde gösterilmekle kalmamış ayrıca yiyecek lipitlerinde de gösterilmiştir. Tersine, O_2^- Lipitlerden hidrojen koparacak kadar reaktif değildir ve yükü zaten membrandan geçmesini engelleyecektir. Bu nedenle O_2^- membrandan geçemez ancak tek istisna eritrosit membranıdır. Burada O_2^- , Cl^- ve bikarbonatın geçişini sağlayan bir iyon kanalı vasıtasıyla içeri girebilir. O_2^- 'nin protonlanmış formu olan HO_2^- daha reaktiftir ve izole yağ asitlerinden, örneğin; linolenik, linoleik ve araşidonik asitten H^\cdot koparabilirler (54).

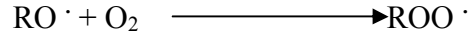
Araşidonik asit metabolizması sonucu oluşan serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonuna 'enzimatik lipit peroksidasyonu', diğer radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonuna ise 'non enzimatik lipit peroksidasyonu' denir (51).

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisiyle membran yapısında bulunan konjuge olmayan çok doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından, bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlamaktadır (54).

Hidrojen atomu yalnızca bir elektrona sahip olduğundan metilen grubundan hidrojen radikali koparılması arkasında karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron bırakır. Karbon radikalleri çeşitli reaksiyonlara uğrayabilir. Örnek olarak iki tanesi membran içinde karşılaşırlarsa yağ asidi yağ zincirleri ile çapraz bağlar yapabilirler.



Bununla birlikte oldukça muhtemeldir ki aerobik şartlar altında karbon radikalinin bağı özellikle membranın içine doğru konsantrasyon olan hidrofobik molekül O_2 ile birleşir. O_2 ile reaksiyon bir peroksil radikali verir.



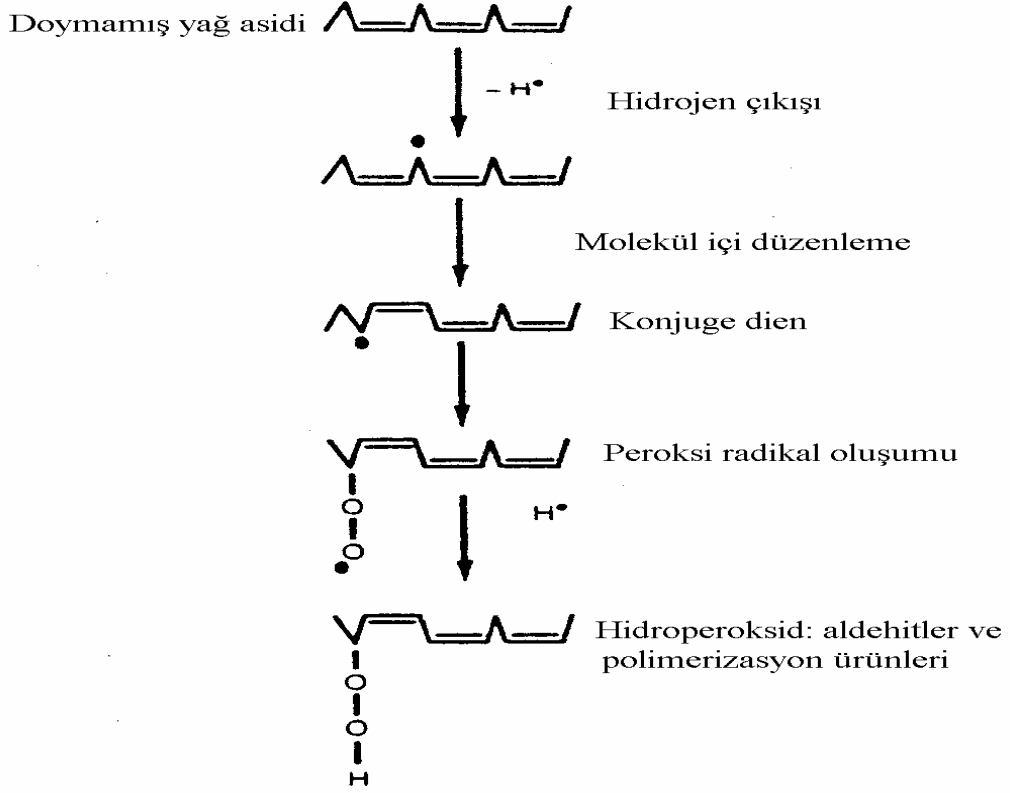
Lipit radikalının moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu lipit peroksit radikali ($\text{LOO}\cdot$) meydana gelmektedir (54, 55).

Bu radikaller de membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan H_2 atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşmektedir (Şekil 2. 4).

Lipit hidroperoksitlerden, fenton tipi bir reaksiyonla aldehit ve ketonlar oluşur. Üretilen hidroperoksitler daha fazla radikali yıkarak, lipit peroksit, etan ve pentan gibi uçucu gazlar oluşur. Aldehitler en toksik ürünlerdir. Plazma MDA konsantrasyonu non-enzimatik lipit peroksit oluşumunun bir sonucudur (54).

Oluşan aldehitler içinde en çok dikkati MDA çekmektedir. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonunun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. L'nin hidrofobik yapıda olması dolayısıyla reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelmektedir. $\text{LOO}\cdot$ ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana

bağlı enzimleri inaktive ederek membran proteinlerinde de hasara neden olurlar. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinlerde oksidasyona uğrayabilirler. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler (51).



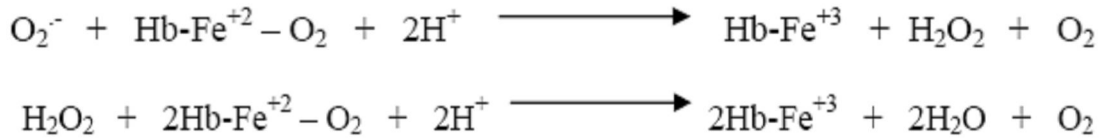
Şekil 2.4. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu (56).

2.3.2. Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren aminoasitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenir. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin ölçülmesi ile proteinlerin oksidatif hasarı ölçülebilir (14).

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (14, 57).

Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobin O_2^- veya H_2O_2 ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşur (14, 50).



2.3.3. Karbohidratlar Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonunun, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agrega olmalarına sebep olduğu gibi bazal membran kalınlaşmasına ve sonuçta katarakt, mikroanjiopati gelişimine de sebep oldukları ileri sürülmektedir (42).

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu meydana gelen okszaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. PUFA ve karbohidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glyoxal'ın hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (14).

2.3.4. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Stabil bir molekül olan DNA da lipitler, karbohidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür.

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (58).

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolaylıkla reaksiyona girerek değişikliklere neden olur. Hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse pürin ve primidin bazlarında mutasyonlara neden olur. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş C atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girebilir. Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır (42-47). Singlet oksijene maruz kalan hücrelerde en sık rastlanan mutasyon G-T transversiyonudur (58). Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan , guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer.

Hidrojen peroksit membrandan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine gelerek DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hücre ölümüne yol açabilir (42). Hidrojen peroksit ile indüklenmiş mutasyonların delesyon ve baz substitüsyonları olduğu saptanmıştır (58).

2.4. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar ‘antioksidan savunma sistemleri’ olarak bilinmektedirler (Tablo 2.4).

Antioksidanlar moleküler endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan antioksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler (36).

Etkilerini; lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip LPO’nun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak gösteren antioksidanlar; intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki grupta incelenirler. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (42-47).

Tablo 2.4. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi(42-50).

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albümin
Katalaz (CAT)	α -Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbat (vit C)	Transferrin
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon	β -Karoten	Ferritin
Peroksidaz (PLGSH-Px)	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Ürat	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Bilirubin	Sistein

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler;

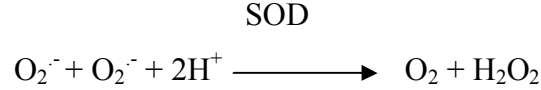
1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tüm tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tür etki gösterirler.
2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
3. Serbest oksidan radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir (59).

2.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir (60). Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. SOD'un 3 çeşidi vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde

lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksid radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dır.

Metalloprotein olan SOD bir süperoksid molekülünü O₂ molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksid molekülünü H₂O₂'e indirger.



Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalinin anyon ve kation formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4, 8'de kendiliğinden de cereyan eder. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH'nın 7, 35- 7, 45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş olacaktır (61).

Memeli hücrelerinde SOD'nın üç tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilki sitozolde ve mitokondrial membranın iç bölümünde bulunan dimerik yapıdaki sitozolik Cu-Zn SOD enzimidir (35).

Cu-Zn SOD; ilk kez 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Cu-Zn SOD molekül ağırlığı yaklaşık 32000 Dalton'dur. Birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşur. Her subünitede bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetilenmiş terminal amino grubu bulunduğu tespit edilmiştir (62-63).

İkinci izomer ise mitokondrial matrikste ve kısmen sitoplazmada fonksiyon gösteren mitokondrial Mn-SOD'dur (35).

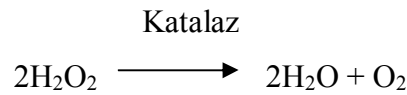
Mn- SOD; prokaryotik hücreler molekül ağırlığı 40000 olan, birbirinin aynı iki alt birimden meydana gelir. Enzim alt birimi başına birer atom Mn bağlı olan bir dismutaz içerirler. Mitokondri dismutazı da diğer prokaryotik hücrelerdeki dismutaza benzer, fakat 80000 molekül ağırlığında tetramer yapıdadır. Mitokondri ve diğer prokaryotların dismutazlarının pek çok ortak özelliği gibi primer yapıları da birbirine

çok benzer. Mitokondri dismutazın bu özelliği, mitokondrinin prokaryotik orijinli olup, ökaryotik hücre içine girerek simbiyotik bir yaşam oluşturduğuna kanıt olarak kabul edilir. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur (42-47).

Ayrıca 1982 yılında glikoprotein yapısında olan ekstraselüler SOD (EC-SOD) tanımlanmıştır. Molekül ağırlığı 135.000 Da'dır. Dört eşit subüniti vardır. 4 Cu ve muhtemelen 4 Zn atomu taşımaktadır. EC-SOD ve Cu-Zn SOD'ın prostetik metalleri benzemesine rağmen aminoasit dizilişi, antijenik özellikleri ve kromozal yerleşimleri farklıdır (35).

2.4.2. Katalaz (CAT)

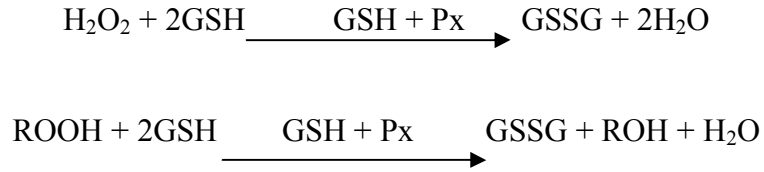
Sumer ve Dounce tarafından 1937'de kristalize halde saflaştırılmıştır. Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe^3 bulduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir (61). Ferri demir taşıyan hem grupları her bir alt birimin aktif bölgesine kovalent olmayan bağlar ile bağlanmıştır. Polar olmayan kapalı yapılar içine gömülü olan hem gruplarının protein yüzeyi ile iletişimleri dar kanallarla sağlanmakta ve böylece H_2O_2 molekülünden büyük bileşiklerin protein yapısına girmesi önlenmektedir. Ayrıca her alt birimde bir NADPH bulunmaktadır. Eritrositlerde hemoglobinin otooksidasyonu sonucu ortama salınan O_2^- radikalinin dismutasyonu ile oluşan H_2O_2 , katalaz ile doğrudan oksijene yıkılmaktadır.



Başta karaciğer olmak üzere tüm organlarda bulunan katalaz özellikle peroksizomlarda yer alan antioksidan bir enzimdir. Mitokondri (kalp dışında) ve endoplazmik retikulum çok az katalaz içerir. Bu nedenle organellerde üretilen H_2O_2 peroksizomlara difüze olmadığı sürece katalaz tarafından parçalanamaz (15).

2.4.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

H₂O₂ ve lipid peroksidlerin glutatyon tarafından indirgenmesini katalizleyen glutatyon peroksidaz, ilk olarak 1957 yılında hayvan dokularında bulunmuştur (15). Her birinde selenosistein içeren dört alt birimden oluşmuştur. Redükte glutatyonu yükseltirken H₂O₂ 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (61).



Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. %25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (63). E vitamini yetersiz olursa membranı peroksidasyona karşı korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır. Düşük konsantrasyonlarda H₂O₂ 'i glutatyon peroksidaz parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz aktivite kazanır (61).

2.4.4. Glutatyon –S Transferaz (GST)

Glutatyon –S Transferaz insanda, bir çok dokuda geniş dağılıma sahip çok işlevli ve geniş spektrumlu substrat özgülüğü olan bir enzimdir. Bu özelliği ile GST, potansiyel toksik kimyasallara maruz kalan canlı organizmalarda savunma görevini üstlenmiştir (64).

GST glutatyonun tiyol (-SH) grupları ile alkilasyon ajanlarının reaksiyonunu kataliz ederek onların elektrofilik alanlarını yok eder. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroksiperoksitleri olmak üzere lipid hidroksiperoksitlere (ROOH) karşı GST, Se- bağımsız glutatyon aktivitesi gösterirler (65).



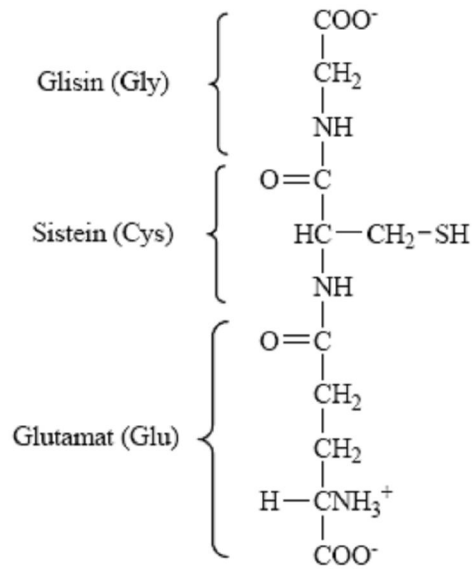
2.4.5. Glutasyon Redüktaz

Yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş hale çeviren 2 subünitten oluşmuş bir dimerdir. Her bir subünit NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve ara yüz alan olmak üzere 3 yapısal alan içerir. Okside glutasyonun bir subününün FAD alanı ve diğer subününün ara yüz alanından oluşan bir bağlanma bölgesi vardır. Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektron NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra subünitlerdeki iki sistein arasında bulunan iki disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatona aktarılmış olur (61).



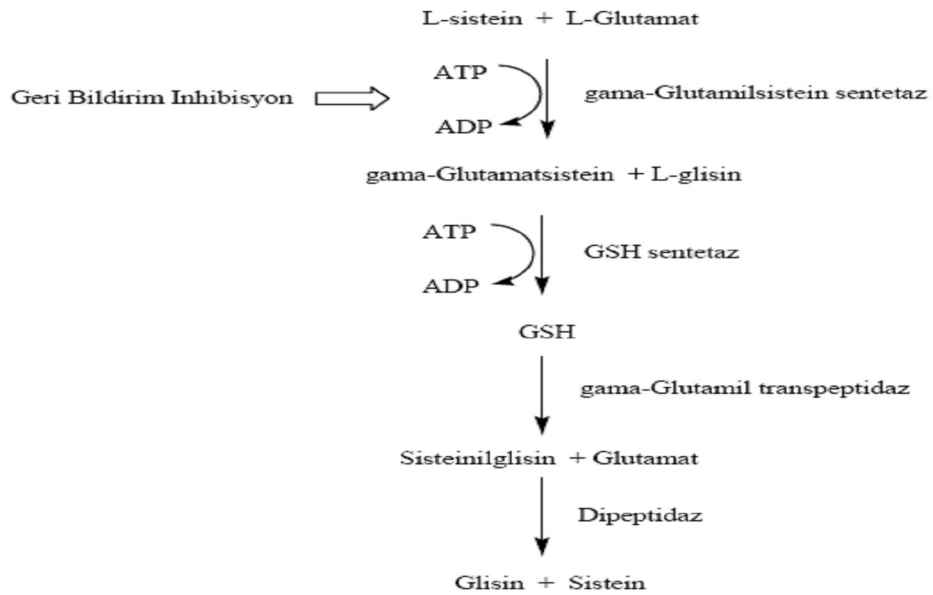
2.4.6. Redükte Glutasyon (GSH)

Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan redükte glutasyon (GSH) hemen hemen bütün hücrelerde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunur (66). Glutasyon disülfid (GSSG), GSH'daki sisteinin tiol grubunun oksidasyonu ile oluşmaktadır. Hücrede bulunan glutasyonun üçte bire yakını disülfid şeklinde ve tiol grubu içeren sistein, koenzim A gibi bileşikler ile beraber bulunmaktadır (Şekil 2.5)(67).



Şekil 2.5. Glutatyonun yapısı (67).

GSH sentezi L-glutamat ve L-sisteinin γ -glutamil sistein sentetaz enzimi ile katalizlenmesi ile başlar. Oluşan γ -glutamil sistein ve L-glisin ürünü GSH sentetaz enziminin katalizörlüğünde GSH'a dönüştürülür. Bu reaksiyon sırasında 2 ATP harcanır(Şekil2.6)(67).



Şekil 2.6. Glutatyonun biyosentezi (65).

Glutasyon intraselüler indirgenme reaksiyonlarında, kataliz olaylarında, metabolizmada ve aminoasitlerin transportunda önemli rol oynar. Hücreleri, serbest radikallere, reaktif oksijen türlerine, endojen ve eksojen orijinli toksik bileşiklere karşı korur (66, 68).

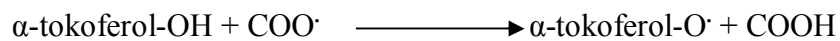
Redükte glutasyon, serbest bir sülfidril grubu içeren bir tripeptiddir. İndirgenmiş durumda hemoglobin ve eritrosit hücre proteinlerinin sistein artıklarını muhafaza eden bir sülfidril tamponu olarak görev yapar. GSH, H₂O₂ ve organik peroksitlerin neden olduğu detoksifikasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynar (68, 69).

Glutasyonun, eritrositlerin normal hücre yapısının korunması ve hemoglobindeki demirin ferro durumunda tutulması için de gerekli olduğu düşünülmektedir. Daha düşük düzeyde GSH içeren hücreler, hemolize daha hassastır (69).

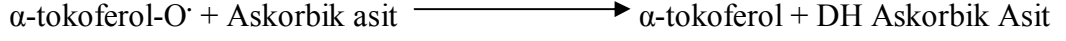
2.4.7. Vitamin E (α -tokoferol)

Selüler ve subselüler membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturduğu ve bu nedenle bu bölgede yoğunlaştığı düşünülmektedir (42).

Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. En aktif formu α -tokoferoldür. Zincir kırıcı antioksidan olarak fonksiyon gösterir. Hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen –OH grubu bağlıdır. Bu yüzden lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine α -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur.



Böylece α -tokoferol yeni bir radikal olan α -tokoferol-O[•] 'e dönüştürülmüş olur. Bu radikalın ise başka bir yağ asidiyle birleşebilme aktivitesi düşüktür. Sonuçta zincir reaksiyonunu durdurur. Oluşan bu tokoferoksil radikali membran yüzeyinde askorbik asitle (C vitamini) reaksiyona girerek tekrar tokoferole dönüşmektedir (61).



Glutasyon peroksidaz ile Vitamin E serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim, teşekkül etmiş olan peroksitleri ortadan kaldırırken Vitamin E peroksitlerin sentezini engeller (42, 54, 63).

2.4.8. Vitamin C (Askorbik Asit)

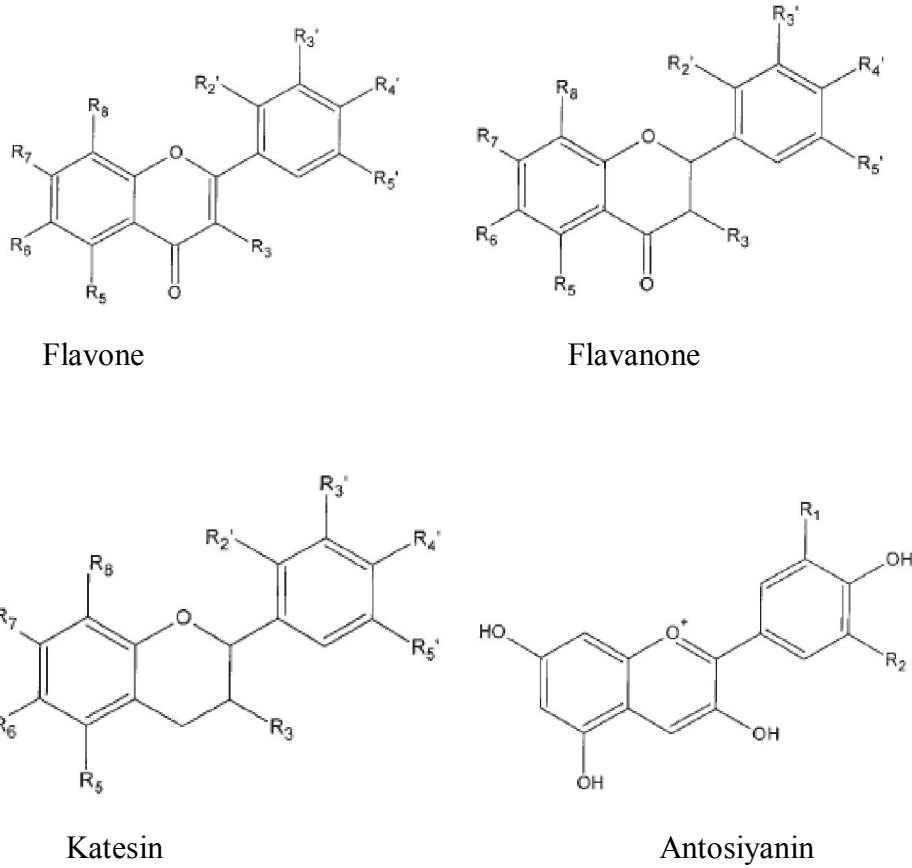
Askorbik asit; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde olan suda eriyen bir vitamindir. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan defansı oluşturur (61).

L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit gibi iki aktif formu vardır. Redükleyici bir ajan ve radikal süpürücü olarak askorbik asit, reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu etki sağlar. Bununla birlikte serbest radikal kaynağı gibi hareket edebilen çeşitli işlevli bir bileşimdir.

Süperoksid ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalının tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar (42).

2.4.9. Flavonoidler

Flavonoidler meyve, sebze, çiçek, çay ve şarapta bulunan değişken fenolik yapıda doğal maddelerdir (70). Bu doğal ürünler sağlık açısından taşıdıkları yararlarla bilinirler. Bir çoğu çiçek, meyve ve yapraklara rengini veren 4000'den fazla flavonoid tespit edilmiştir. Flavonoidler moleküler yapılarına göre çeşitli gruplara ayrılırlar. Bunlardan temel olan 4 grup flavonlar, flavanonlar, katesinler, antosiyaninlerdir (Şekil2.7) (71).



Şekil 2.7. Çeşitli flavonoidler (72).

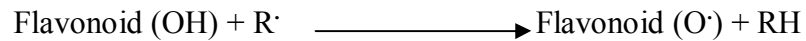
Flavonoid iskeleti çoğunlukla heterosiklik bir halka oluşturacak şekilde oksijen ile kapalı halde bulunan üç karbonlu bir zincirle bağlanmış iki fenolik halkadan (AveB) oluşur. Bazı durumlarda üç karbonlu zincir açık halde bulunabilir. Flavonoid gruplarının karakteristik özelliklerini heterosiklik halka belirler ve flavonoidler bu özelliklerine göre sınıflandırılabilirler (73).

Flavonlar sentral aromatik halkada çift bağ ile karakterizedir. Flavonoidlerin en iyi tanımlanmış üyelerinden biri olan quercetin bu grupta yer almaktadır. En fazla soğan, elma, brokoli ve çilekte bulunurlar. İkinci grup olan flavanonlar narenciyede bol miktarda bulunur. Bu grubun en iyi örneği narigindir. Flavonoidler siyah ve yeşil çayda ve şarapta bol bulunan katesinleri içerir (71). Antosiyaninler ise en fazla çilek, üzüm, çay ve şarapta bulunur.

Flavonoidlerin önemli bir etkisi serbest oksijen radikallerinin süpürülmesidir. In vitro deneysel sistemler ayrıca flavonoidlerin antiinflamatuvar, antiallerjenik, antiviral ve antikarsinojenik özelliklerini ortaya koymuştur (70).

Flavonoidlerin neredeyse tüm gruplarında en iyi tanımlanan özellikleri antioksidan gibi davranma kapasiteleridir. Flavonlar ve katesinler vücudu reaktif oksijen türlerine karşı savunmada en güçlü flavonoidler gibi görünmektedir. Eksojen hasar veya normal oksijen metabolizmasıyla üretilen reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin sebep olduğu hasarla vücut hücreleri ve dokular devamlı zarar görür (74-75). Flavonoidler endojen savunma bileşiklerine ek bir etki gösterirler. Flavonoidler değişik serbest radikal savunma sistemine sahiptirler ve aynı zamanda endojen antioksidanların fonksiyonlarını artırırılar.

Flavonoidlerin serbest radikal hasarını önlemelerinin bir yolu serbest oksijen radikallerinin direk süpürülmesidir. Flavonoidlerin serbest radikallerle oksitlenmesi daha stabil ve daha az reaktif radikal oluşumuyla sonuçlanır. Diğer taraftan flavonoidler radikalın reaktif bileşeniyle reaksiyona girerek reaktif oksijen türünü stabilize eder. Flavonoidlerin hidroksil grubunun yüksek reaktivitesi sonucu radikaller inaktive olur (76).



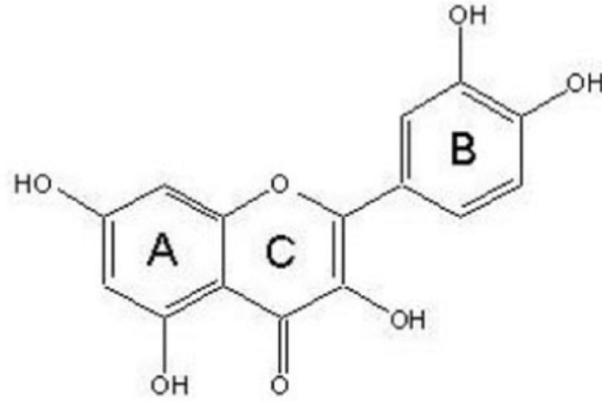
Burada R \cdot bir serbest radikal ve O \cdot bir serbest oksijen radikalidir (77). Radikallerin süpürülmesiyle flavonoidler LDL oksidasyonunu inhibe edebilir. Bu aktivite LDL

partiküllerini korur ve teorik olarak flavonoidlerin ateroskleroza karşı koruyucu aktivitesi olduğunu gösterir (78).

2.4.9.1. Quercetin

Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksilflavon) polifenolik flavonoid bileşiklerinin geniş bir sınıfına aittir. Quercetin sıklıkla R-4 hidroksil grubunun hidrojenin bir dissarid ile yer değiştirdiği glikozidler şeklinde bulunur (Şekil2.8). Genellikle aglikon olarak tanımlanır (79). Yarı ömrü α fazı için 8. 8 dk. , β fazı için 2. 4 saattir. % 98 oranında proteinlere bağlı olarak taşınır. Plazma seviyesi 20-40 dakikada çok azalır, 54 dakikada tespit edilemeyecek seviyeye düşer (80). Quercetin insan diyetinde major bioflavonoiddir. Hesaplanan günlük alımı 25 mg'dır (79). Yiyeceklerin quercetin içeriğiyle ilgili bilgiler sınırlıdır. Fakat elde bulunan veriler quercetin meyvelerde oranının 2-250 mg/kg, sebzelerde 0-100 mg/kg olduğunu ve özellikle soğanda 200-600 mg/kg gibi yüksek değerlerde olduğunu göstermektedir.

Quercetin başlangıçta β -glikozid dizisinin kolonik mikrofloralar tarafından parçalanmasını takiben ince bağırsaktan absorblandığı düşünülmüştür. Hollman ve arkadaşları insan vücudunun quercetini absorblayabileceği fakat absorpsiyonun glukozla konjugasyonla geliştirildiği sonucuna varmışlardır (81).



Şekil 2.8. Quercetin yapısı (82).

Quercetin gibi flavonoidler Vit. C ve Vit. E 'den daha etkili antioksidanlardır. Quercetin; hücre proliferasyonunun bastırılması, LDL oksidasyonunun korunması, platelet agregasyonunun engellenmesi, apoptosisin indüklenmesi gibi çeşitli aktiviteleri vardır (83).

Quercetin aktivitesinin major moleküler mekanizmaları arasında mutant P53 proteininde düşük regülasyon, tirozin kinaz inhibisyonu ve ras proteinleri ekspresyonunun inhibisyonu vardır (79).

Quercetin Na^+ K^+ ATPaz inhibisyonu, Protein kinaz C, sarkoplazmik retikulumda Ca^{2+} - ATPaz ve pp60 kinaz inhibisyonu aktivitesi gösterir. Quercetin muhtemelen belirlenen ilk tirozin kinaz inhibitörüdür ve ayrıca gastrik kanser hücreleri ve insan lökemik T hücrelerinde hücre siklusunun durmasına neden olduğu bildirilmiştir. Quercetin ayrıca fosfotidil-3 kinaz ve 1-fosfotidilinositol-4 kinaz inhibitörüdür.

Quercetin invitro over, göğüs ve mide kanser hücre duvarında proliferasyon aktivitesine sahiptir (84).

Quercetin'in serbest radikallerle ilgili etki mekanizmaları çeşitlidir. Quercetin hidroksil radikali, peroksil ve süperoksit anyona karşı diğer flavonoidlere kıyasla en yüksek seviyede antiradikal özellik sergiler (82). Quercetin, ksantin oksidaz

aracılığıyla süperoksit anyon üretimini inhibe eder(85), singlet oksijen ve hidroksil radikallerini temizler (86). Peroksil radikalini ve alkoksil radikalini yakalar ve lipid peroksil zincirini kırar (71), siklooksigenaz ve lipoksigenaz enzim aktivitelerini inhibe eder (86), demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlar (87), laktat transportunu engeller (88), Vit. C absorpsiyonunu artırır (89).

Quercetin'in bu özellikleri yapısındaki 3 aktif kimyasal grubun varlığından kaynaklanır. Bu gruplar B halkasındaki o-hidroksil (katekol) yapısı, 4-oxo fonksiyonu ile konjugasyondaki 2, 3 çift bağ ve her iki 3- ve 5- hidroksil gruplarıdır (82).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hayvanlar

Çalışmada Sprague-Dawley cinsi ortalama ağırlıkları 200-300 gr olan erkek ratlar kullanıldı. Ratlar ortama uyum sağlamaları bakımından Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne geldikten bir hafta sonra çalışmaya başlandı. Uygun sıcaklıkta, rat bakımı için tasarlanmış özel kafeslerde 12 saatlik ideal aydınlık ortamında barındırıldı. Ratlar, standart yem ve musluk suyu ile beslendi. Çalışmanın sürdüğü 30 gün boyunca ratların, standart yemleri ve suları her gün saat 17:00 de verildi. Quercetin ve homosistein verilmesini içeren işlemler yemler verilmeden önce uygulandı. Çalışmada her biri 8 rattan oluşmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu.

Çalışma grupları aşağıdaki gibi belirlendi:

1. Kontrol grubu (K) (n=8): Bu gruba 30 gün süre ile intra peritoneal olarak 1,5 ml serum fizyolojik (SF) uygulandı. Yiyebildikleri kadar yem ve içebildikleri kadar su içmelerine izin verildi.

2. Quercetin grubu (Q) (n=8): Bu gruba her gün 50 mg/kg dozda quercetin serum fizyolojikte hazırlanarak (%1) ve 0,25 ml SF intra peritoneal olarak verildi.

3. Homosistein Grubu (Hcy) (n=8): Bu gruba her gün 1 mg/kg homosistein ve 1,25 ml SF intra peritoneal olarak verildi.

4. Quercetin + Homosistein Grubu (Q + Hcy) (n=8): Bu gruba günlük 1 mg/kg homosistein intra peritoneal olarak ve 50 mg/kg quercetin intra peritoneal olarak verildi.

K grubu, Q grubu, Hcy grubu ve Q+Hcy grubu ratlarına son yüklemeden 24 saat sonra 0,4 ml Ketamin + 0,6 ml xylasine olacak şekilde anestezi çözelti hazırlandı ve 1,6 ml/kg miktarında i.p. olarak verildi. Derin anestezi altında toraks açılıp ekarte edilerek açık kalpten alınan kan örnekleri heparinli tüplere konuldu.

Kan örnekleri 2500 rpm'de 10 dk. santrifüj edilip plazma ve eritrositler ayrıldı. Hücreler serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı. Çalışma için örnekler analiz edilinceye kadar -20°C 'de saklandı. Eritrositler birkaç defa dondurulup çözülerek parçalandıktan sonra 1/1 oranında soğuk distile suyla dilüe edilerek dilüsyonlu stok hazırlandı.

Quercetin, homosistein, ketamin, xylasine ve diğer kimyasallar SIGMA chemical Co.(St. Louis, USA)'dan temin edildi.

Tüm spektrofotometrik ölçümlerde, Shimadzu UV-1601 spektrofotometresi kullanıldı. Kimyasallar analitik saflıkta idi.

3.2. Biyokimyasal Analizler

3.2.1. Hemogloblin Tayini

Reaktifler:

Drapkin solüsyonu

- 0,2 g/dl $\text{K}_3\text{F}(\text{CN})_6$
- 0,05 g/dl KCN
- 1,0 g/dl NaHCO_3

Prosedür:

Dilüsyonlu stoktan 20 μl alındı ve üzerine 6 ml dropkin solüyonu eklendi ve Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 540 nm dalga boyunda reaktif körüne

karşı okundu. Hb değerleri standart ve numune absorbanları kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve g/dl olarak ifade edildi.

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

C_N : Numunenin Konsantrasyonu

C_S : Standardın Konsantrasyonu

A_N : Numunenin Absorbansı

A_S : Standardın Absorbansı

3.2.2. Plazma MDA Düzeylerinin Tayini

Plazma MDA düzeyleri Ohkawa ve ark. yöntemine göre ölçüldü (90).

Prensip:

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

Reaktifler:

- Potasyum fosfat tamponu 0,1 M pH 7,4
- Asetik asit % 20, pH 3,5
- Tiyobarbitürik asit (TBA) % 0,8
- Bütanol

Prosedür:

500 µl plazma alınarak her birinin üzerine 0,2 ml %8,1 Sodyum dodesil sülfat, 5 ml %20 asetik asit (pH: 3,5) ve 1,5 ml %0,8 TBA solüsyonu eklenerek 95 °C'de 60 dakika kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 5 ml bütanol eklendi ve karıştırılıp 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakadaki rengin absorbanı reaktif körüne karşı 532 nm dalga boyunda okundu. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan'ın

4,173 µmol/ml'lik çözeltisi kullanıldı. MDA düzeyleri plazmada nmol/L olarak ifade edildi. Aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

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

C_N : Numunenin Konsantrasyonu

C_S : Standardın Konsantrasyonu

A_N : Numunenin Absorbansı

A_S : Standardın Absorbansı

3.2.3. Plazma Protein Karbonil Grupları Tayini

Plazma protein karbonil grupları Levine ve ark. modifiye spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (91).

Prensip:

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

Reaktifler:

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

Prosedür:

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

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

3.2.4. Eritrosit GSH Tayini

Eritrosit GSH düzeyleri spektrofotometrik olarak Beutler yöntemi ile belirlendi (92).

Prensip:

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

Reaktifler:**Çöktürücü solüsyon (Proteinsizleştirme çözeltisi)**

Metafosforik asit	1,67 g/dl,
EDTA	0,2 g/dl
NaCl	30 g/dl
- Na ₂ HPO ₄ çözeltisi	(0,3 M): 10.65 gr. Na ₂ HPO ₄ 250 ml. distile suda çözülür.

- DTNB (5,5'-2-dithiobis nitrobenzoik asit) solüsyonu (2 mM): 1 gr. sodyum sitrat ve 40 mg. DTNB 100 ml. distile suda çözülür.

Prosedür:

Dilüsyonlu stoktan 0,2 ml örnek alınarak üzerine 10,8 ml distile su ve 3 ml çöktürücü solüsyon eklenerek karıştırıldı. 5 dakika oda ısısında bekledikten ve renk kıvamına geldikten sonra süzgeç kağıdından süzülerek filtrat elde edildi. 0,4 ml filtrat üzerine 1,6 ml 0,3 M Na₂HPO₄ çözeltisi ve 0,2 ml DTNB ile muamele edilerek oluşan rengin absorbansı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 412 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı okundu. GSH standartı (50 µmol/L) hazırlandı. Numunelere uygulanan işlem, GSH standardına da uygulandı. GSH düzeyleri, standart ve numune absorbansları kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve µM/gHb olarak ifade edildi.

$$C_N = ((A_N/A_S) \times C_s)/H_b$$

C_N: Numunenin Konsantrasyonu

C_s: Standardın Konsantrasyonu

A_N: Numunenin Absorbansı

A_S: Standardın Absorbansı

H_b: Hb miktarı (g/dl)

3.2.5. Plazma -SH Grupları Tayini

Plazma -SH grupları Koster ve ark. spektrofotometrik metoduna göre belirlendi (93).

Prensip:

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

Reaktifler:

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

Prosedür:

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

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

3.2.6. Eritrosit SOD Aktivite Tayini

Eritrosit SOD aktiviteleri Winterbourn ve ark. spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (94).

Prensip:

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

Reaktifler:

- EDTA+NaCN 0,1 M (0,1 M 100 ml EDTA içine 1,5 g NaCN eklenir)
- Nitro Blue Tetrazoliumchloride (NBT) 1,5 mM
- Sodyum fosfat tamponu 1/15 M pH 7,8
- Riboflavin (0,12 mM): 4,5 mg/100 ml.

Prosedür:

Dilüsyonlu stoktan 0,5 ml örnek alındı ve üzerine 3,5 ml soğuk distile su eklendikten sonra 2500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Sonra süpernatanttan 50 µl alınıp üzerine 200 µl EDTA+NaCN eklendi. Ardından 100 µl NBT, 2,6 ml fosfat tamponu ve 50 µl riboflavin eklendikten sonra 15 dakika kutu içinde florasan ışığına maruz bırakıldı. Oluşan rengin absorbansı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 560 nm dalga boyunda hemolizat hariç diğer reaktiflerle hazırlanan köre karşı okundu. Aynı işlem SOD standartları ile tekrarlandı. Aşağıdaki formüle göre U/Hb olarak hesaplandı.

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

C_N : Numunenin Konsantrasyonu

C_S : Standardın Konsantrasyonu

A_N : Numunenin Absorbansı

A_S : Standardın Absorbansı

Hb: Hb miktarı (g/dl)

3.2.7. Eritrosit Katalaz Aktivite Tayini

Eritrosit CAT aktiviteleri Beutler'in spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (95).

Prensip:

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

Reaktifler:

- Tris-HCl-EDTA	pH: 8,0
- Tris-HCl	1 mM
- EDTA	5 mM
- H ₂ O ₂	10 mM

Prosedür:

Dilüsyonlu stoktan 0,2 ml alındı ve üzerine 0,8 ml soğuk distile su eklenerek karıştırıldı ve 2500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatanttan 1 ml alınarak 1/200 dilüsyon hazırlandı ve bu dilüsyondan 1 ml alınarak 100 ml ye distile su ile tamamlandı ve toplam dilüsyon 1/2000 oldu. 100 µl Tris-HCl-EDTA (pH:8,0) üzerine 1800 µl 10 mM H₂O₂ ve 60 µl distile su eklenip 10 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon, dilüe hemolizattan (1/2000)'tan 40 µl eklenmesi ile başlatıldı. H₂O₂ 'nin H₂O 'ya dönüşümünü, 4 dakika boyunca reaktif körüne karşı (H₂O₂ hariç diğer bütün reaktifleri içeren kör) absorbans değişimi izlenip kaydedildi (5 ölçüm yapıldı). Bir dakikada oluşan ABS değişimi (ΔABS) bulundu. Enzim ünitesi, absorbans değişimi H₂O₂ 'ye ait ekstinksiyon kat sayısına bölünerek aşağıdaki formüle göre hesaplandı. CAT aktiviteleri U/g Hb olarak ifade edildi.

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

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

N: İndikatörün molekül sayısı (H₂O₂ için 2)

V_H: Homojenatın volümü

ΔABS: Dakikada değişen absorbans

Hb: Hb miktarı (g/dl)

3.3 İstatistiksel Analizler

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

4. BULGULAR

4.1. Plazma MDA Düzeyleri

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

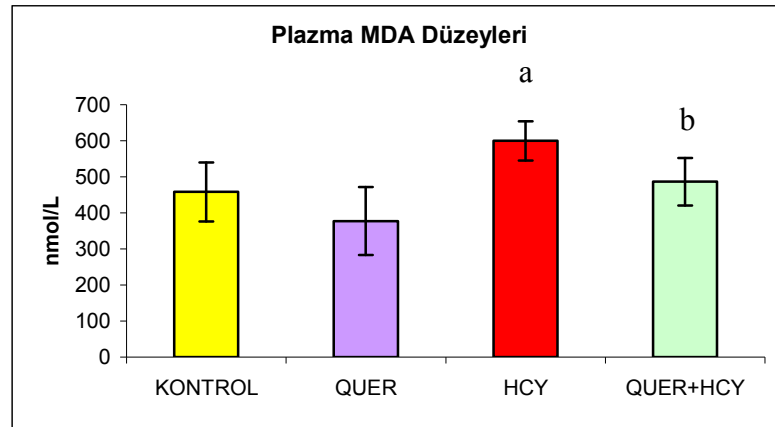
Quercetin+homosistein grubunda MDA değerleri homosistein grubuna göre düşük, quercetin grubuna göre yüksek ($p<0.05$) bulundu.

Tablo 4.1. Plazma MDA düzeyleri.

GRUPLAR	nmol/L
Kontrol	458,27± 81,83
Quercetin	377,38 ± 93,90
Homosistein	599,71 ± 54,49 ^a
Quercetin + Homosistein	486,40 ± 66,02 ^b

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

(b) Homosistein grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$



Şekil 4.1. Plazma MDA düzeyleri

4.2. Plazma Karbonil Grupları

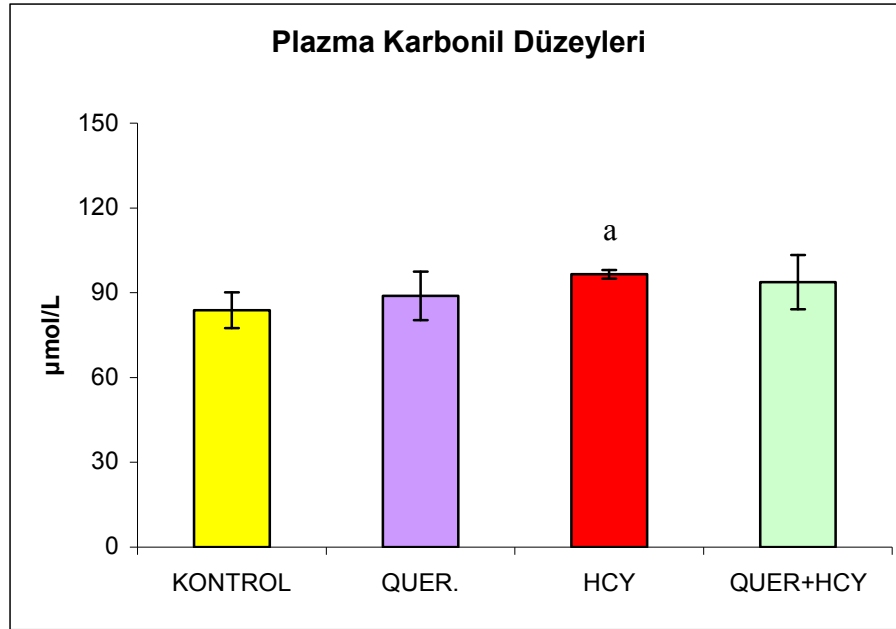
Plazma karbonil düzeyleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre plazma karbonil düzeyleri homosistein grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p<0.05$) bulundu.

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

Tablo 4.2. Plazma karbonil düzeyleri.

GRUPLAR	$\mu\text{mol/L}$
Kontrol	$83,86 \pm 6,33$
Quercetin	$88,90 \pm 3,75$
Homosistein	$96,53 \pm 1,52^a$
Quercetin + Homosistein	$93,75 \pm 9,63$

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



Şekil 4.2. Plazma karbonil grupları düzeyleri.

4.3. Eritrosit Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyleri

Eritrosit GSH düzeyleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Bu bulgulara göre eritrosit GSH düzeyleri homosistein grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük ($p<0.05$) bulundu. Quercetin+homosistein grubunda GSH homosistein grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p<0.05$) bulundu.

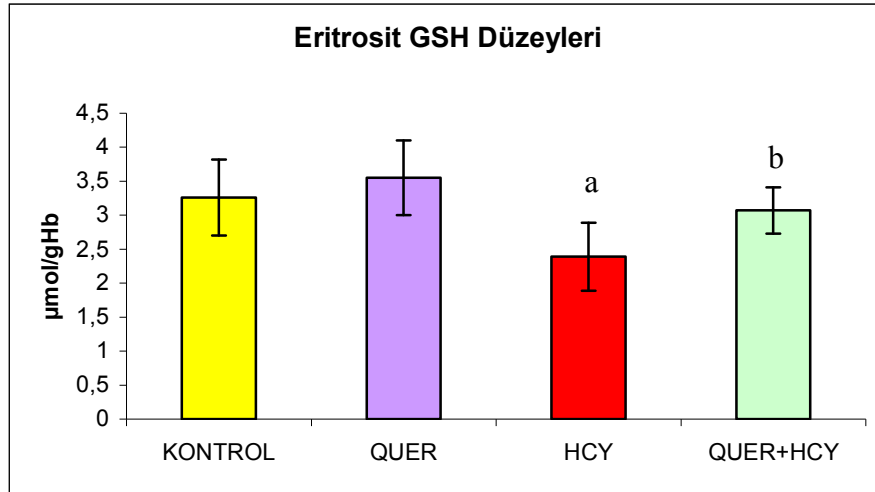
Kontrol grubuyla quercetin grubu arasında ve quercetin ile quer+Hcy grupları arasında yapılan karşılaştırma sonucu eritrosit GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4.3. Eritrosit GSH düzeyleri.

GRUPLAR	$\mu\text{mol/gHb}$
Kontrol	$3,26 \pm 0,56$
Quercetin	$3,55 \pm 0,55$
Homosistein	$2,39 \pm 0,50^a$
Quercetin+ Homosistein	$3,07 \pm 0,34^b$

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

(b) Homosistein grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$



Şekil 4.3. Eritrosit GSH düzeyleri.

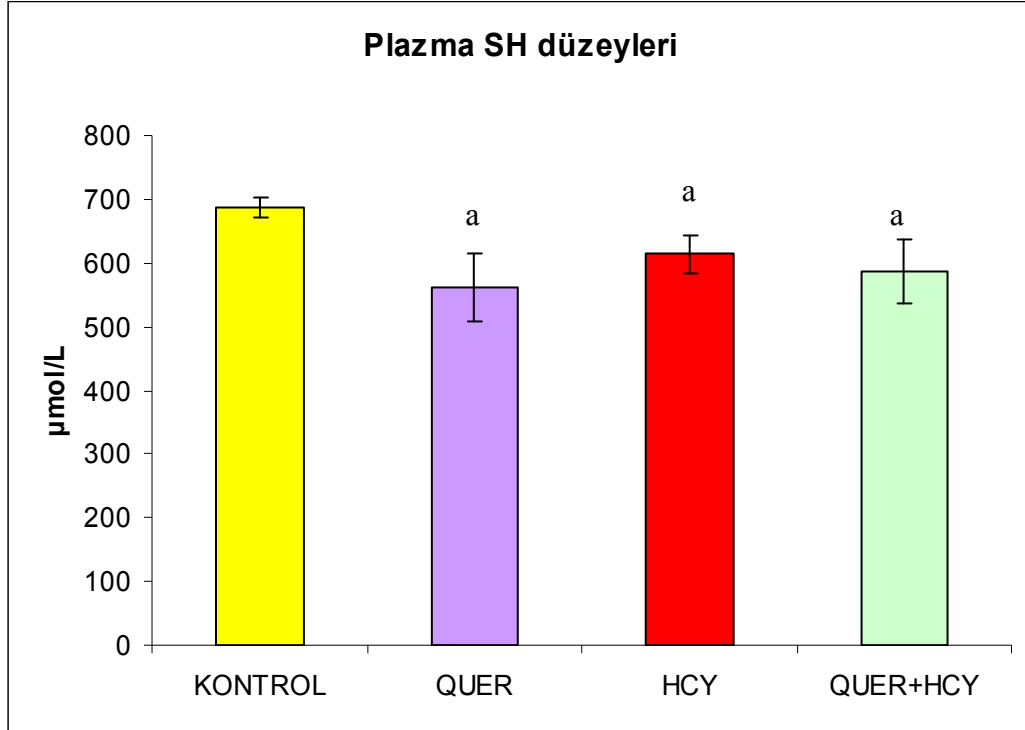
4.4. Plazma Sülfhidril (-SH) Grupları

Plazma -SH düzeyleri Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre plazma -SH düzeyleri tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ($p<0.05$) bulundu.

Tablo 4.4. Plazma -SH düzeyleri.

GRUPLAR	$\mu\text{mol/L}$
Kontrol	$687,78 \pm 15,82$
Quercetin	$562,48 \pm 53,61^a$
Homosistein	$614,01 \pm 30,69^a$
Quercetin + Homosistein	$587,08 \pm 49,31^a$

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



Şekil 4.4. Plazma -SH düzeyleri.

4.5. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktiviteleri

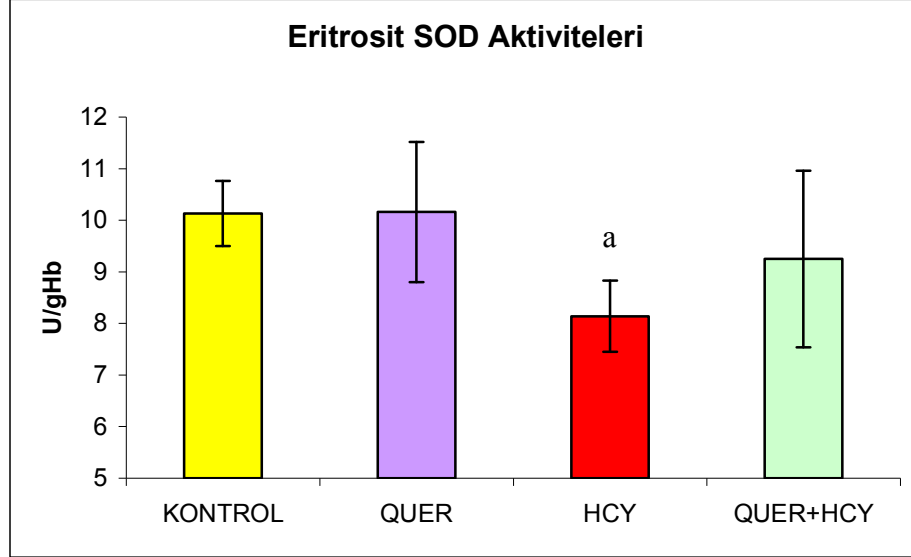
Eritrosit SOD aktiviteleri Tablo 4.5 ve Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre eritrosit SOD aktiviteleri homosistein grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ($p<0.05$) bulundu.

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

Tablo 4.5. Eritrosit SOD aktiviteleri.

GRUPLAR	U/gHb
Kontrol	10,13 ± 0,38
Quercetin	10,16 ± 1,26
Homosistein	8,143 ± 0,36 ^a
Quercetin + Homosistein	9,25 ± 1,00

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



Şekil 4.5. Eritrosit SOD aktiviteleri.

4.6. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktiviteleri

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

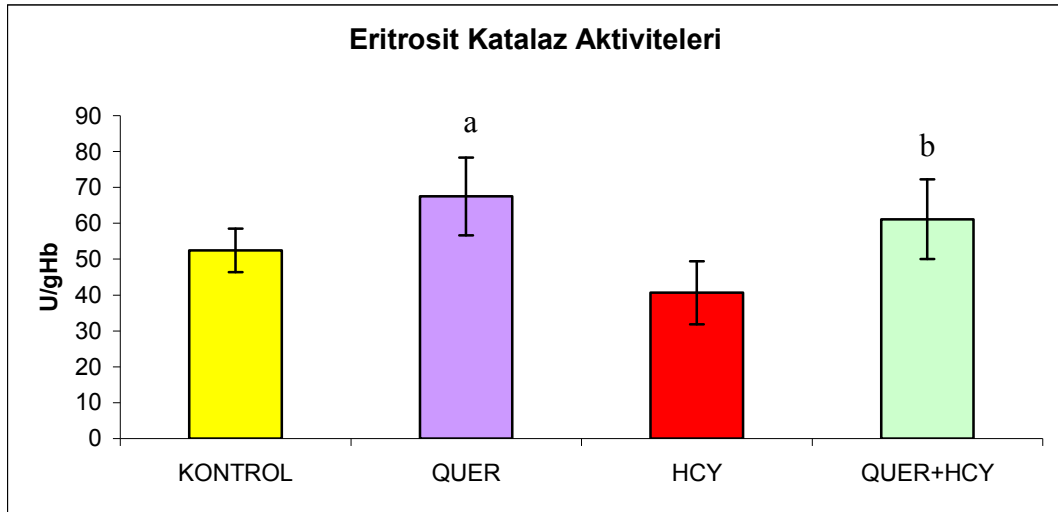
Kontrol grubuyla, homosistein ve quercetin+homosistein grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu eritrosit CAT aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4.6. Eritrosit CAT aktiviteleri

GRUPLAR	U/gHb
Kontrol	52,45 ± 6,03
Quercetin	67,49 ± 10,85 ^a
Homosistein	40,64 ± 8,77
Quercetin+ Homosistein	61,14 ± 11,08 ^b

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

(b) Homosistein grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$



Şekil 4.6. Eritrosit CAT aktiviteleri.

5. TARTIŞMA

Homosistein insan vücudunda üretilen ve pek çok maddenin yapımında kullanılan sülfür içeren bir aminoasittir. Beslenme ile alınan metioninin metabolizması sırasında ara ürün olarak oluşmaktadır. Hücresel homosistein metabolizması metioninin kullanılabilirliğine, homosisteinin metionine remetilasyonu ve sisteine transsülfürasyonuna bağlıdır. Bir çok vitamin homosistein ve metionin metabolizmasında kofaktör ve substrat fonksiyonu görmektedir. Folik asit ve siyanokobalamin, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ve metionin sentetaz enzimleri tarafından katalize edilen metabolik yollarda düzenleyici olarak görev alırlar (33).

Homosisteinin sentez ve metabolizmasının büyük kısmı karaciğerde gerçekleşmektedir. Metioninin büyük kısmı karaciğerde metabolize olur. Betain-homosistein metil transferaz (BHMT) ve sitatyonin beta sentaz (CBS) enzimlerinin sentezi karaciğerde gerçekleşir. Bu sebeple karaciğer hasarı gerçekleştiğinde homosistein metabolizmasında değişiklikler meydana gelir (29).

Yüksek homosistein düzeylerinin klinik aterosklerotik vasküler hastalıklarla bir risk faktörü olarak ilişkili olduğu giderek daha iyi gösterilmektedir (33). Kalp-damar hastalıklarının gelişiminde plazma homosistein düzeylerinin yükselmesinin etkili olduğu genel bir anlayış olarak benimsenmektedir (96).

Serbest radikallerin oluşumu organizmada oksijen kullanımı sırasında ortaya çıkar. Eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller hücrenin zarar gördüğü reaksiyonlar dizisini başlatır. Reaktif oksijen türleri (ROS) düşük dozlarda çeşitli stres tepkimelerinde arabolucu gibi rol oynarken, yüksek dozlarda (oksidatif stres gibi) hücresel zararlara yol açarlar (97)

Oksidan ve mutajen özellikte olan bu metabolizma yan ürünleri DNA, protein ve diğer makromoleküllerde tahribata hatta hücrenin ölümüne neden olarak kronik hastalıkları başlatır (98).

Yüksek homosistein konsantrasyonlarının serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir (99).

Homosistein otooksidasyonu sonucu kolayca okside olur ve sülfidril gruplarının oksidasyonu sırasında lipid peroksidasyonunu başlatan serbest oksijen radikalleri meydana gelir (100).

Tan ve ark. (101) Asyalı yetişkinlerde hiper homosisteinin iskemik inme için bağımsız risk faktörü olduğu ve büyük arter inmelerinde hiper homosisteininin proaterojenik etkisi nedeniyle inme riskini artırdığı sonucuna vardılar.

Baydas ve ark. (100) yaptıkları çalışmaya göre ratlarda kronik metiyonin uygulaması plazma homosistein seviyesini artırmış ve homosistein verilen gruplarda lipid peroksidasyonu uyarılmıştır.

Boushey ve ark. homosisteinde 5 $\mu\text{mol/L}$ artışın koroner arter hastalık riskini 1.7 kat, serebrovasküler hastalık riskini 1.5 kat ve periferik arter hastalığı riskini 6.8 kat artırdığını göstermişlerdir (102).

Quercetin çeşitli mekanizmalarla oksidan hasarı ve hücre ölümünü engeller (103). Quercetin en iyi bilinen etkileri arasında vazodilatasyon ve antitrombotik etki vardır (104).

Bazı araştırmacılar quercetin, etanolla muamelesinde etanolün indüklediği hepatik steatozis ve lipid peroksidasyonunu azalttığını kanıtlamışlardır. Bunu quercetin antiperoksidatif, antioksidan ve antihistaminik etkilerinden kaynaklanan gastroprotektif etkilerine bağlamışlardır.

Quercetin'in antiaterojenik aktivitesi; antioksidan özelliği, anti-inflamatuar aktivitesi, antiplatelet etkileri ve antiproliferatif etkilerine bağlıdır (103).

Juzwiak ve ark. (105) iki hayvan grubunda quercetin'in hipolipemik ve antiaterojenik etkilerini incelemişlerdir. 12 hafta sonunda quercetin'in yüksek yağ diyetiyle artan serum gliseridler ve kolesterol seviyeleri üzerinde azaltıcı bir etkisi olduğunu belirlemişlerdir. Ve böylece quercetin'in hipolipemik etkisinin tüketilmeye başlandığı andan itibaren ortaya çıktığını söylemişlerdir. Bu çalışmada ayrıca quercetin'in antiaterosklerotik mekanizmasını ortaya koymuş ve yüksek yağla flavonoidlerin birlikte tüketiminde MDA formasyonunun azaldığını belirtmişlerdir.

Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri MDA'dır. Üç yada daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonundan MDA meydana gelir. Oluşan MDA hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (52).

Yüce ve ark. (34) homosistein verilen ratların plazma ve doku MDA değerleri incelendiğinde yalnız homosistein verilen ratlarda kontrol grubuna göre MDA değerlerinde anlamlı artış belirlemişlerdir. Bu sonucun artan homosistein miktarının, lipit proksidasyon oluşumunu engelleyen ve antioksidan enzimlerden biri olan olan GSH-Px'in aktivitesini azaltarak oluştuğunu belirtmişlerdir.

Cavalca ve ark. koroner arter hastalıklı insanlarda yaptıkları çalışmada kardiyovasküler hastalığı olanların plazma homosistein konsantrasyonlarını kontrollere oranla belirgin şekilde yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada kardiyovasküler hastalardaki serbest radikal üretiminin parametresi olarak MDA kullanmışlar ve homosisteinin muhtemel rolünü değerlendirmişlerdir. Ve bu hastalarda total plazma MDA'nın kontrollere göre iki kat fazla olduğunu belirlemişlerdir. Total ve serbest MDA'nın tüm hastalarda yüksek

konsantrasyonlarının, artmış membran lipid peroksidasyonuna ve oksidatif stresin potansiyel ilerlemesine işaret ettiğini belirtmişlerdir (104).

Bizim çalışmamızda homosistein verilen ratlarda, plazma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Quercetin verilen ratların, plazma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Ratlara homosistein verilmeden önce quercetin verilmesi MDA değerlerini homosistein grubu değerlerine göre düşürmüştür. Homosistein grubunda yüksek MDA değerleri, homosisteinin oksidatif stresi indüklediğini düşündürürken quercetin grubunda düşük MDA değerleri quercetin oksidatif strese karşı koruyucu etkisine bağlanabilir.

Duarte ve ark. (107) 5 hafta quercetin muamelesinden sonra kendinden hipertensif ratlarda kan basıncının düştüğünü, glutatyon peroksidaz aktivitesinin arttığını ve plazma ve hepatic MDA seviyelerinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Hipertansiyonun bu genetik modelinde quercetin antihipertensif ve antioksidan özellikler göstermiştir.

Periton içi homosistein uygulamaları karotid arterlerde intimal hiperplaziye ve hücre proliferasyonuna sebep olmaktadır. Plazma toplam homosistein miktarları ile karotid arterlerin duvar kalınlığı arasında pozitif bir ilişkinin var olduğu bilinmektedir (34).

Serafinowicz ve ark. (108) yaptıkları çalışmada hiperhomosisteinematik ratlarda lipid peroksidasyon ürünlerinin ve karotid intimal media kalınlığının artmış olduğunu belirtmişlerdir.

Hollman ve ark. (109) yaptıkları çalışmada quercetinle beslenme lipid peroksidasyonunun inhibisyonuyla sonuçlanmıştır. % 0.2 quercetin içeren diyetle beslenen ratlarda kontrol grubuna göre antioksidan kapasite belirgin şekilde yüksek bulunmuştur.

Protein karbonil türevlerinin oluşumuna primer modifikasyon reaksiyonları neden olur. Bu reaksiyonlar aminoasitlerin α -karbon atomlarının veya yan zincirlerinin oksidatif modifikasyona uğramalarından ve bu modifikasyonları takiben, reaktif oksijen-aracılı peptit ayrılması reaksiyonundan oluşur. Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit veya proteinlerin peptit omurgasında oluşan oksidatif hasardan dolayı protein karbonil ürünleri meydana gelir. Protein karbonil düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede hassas ve genel olarak uygulanan bir yöntemdir (35).

ROS protein, karbonhidrat ve lipid moleküllerinde oksidatif hasara neden olmaktadır. ROS etkisiyle oluşan lipid peroksidasyonu ve karbonhidrat oksidasyon ürünleri de proteinlerin aminoasit içeriğinde modifikasyonlar oluşturmakta ve plazma protein karbonil içeriğinde artışa neden olmaktadır (110).

Horakova ve ark. (111), standartize flavonoid (EGb 761, Pycnogenol) ekstraktı ve troloks ve stobadin'in antioksidan etkisini araştırmış ve tavşan iskelet kaslarında bulunan sarkoplazmik retikulum üzerine $Fe^{+3}/H_2O_2/AA$ ve $HOCl$ oksidan sistemler tarafından oksidatif hasar gerçekleştirmiş, bunun sonucunda oksidan + antioksidan gruplarının protein karbonil düzeyleri, oksidan gruplarının protein karbonil düzeylerine göre anlamlı şekilde düşük bulmuşlardır.

Yaptığımız çalışmada, plazma karbonil düzeyleri (PCO) açısından yukarıda belirtilen çalışmaya paralel sonuçlar elde ettik. Homosistein verilen ratların plazma karbonil düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0,05$). Fakat benzer çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda quercetin grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Molina ve ark. (103) kronik alkol verilerek oksidatif stres oluşturulan ratlarda plazma protein karbonil düzeylerinin kontrol grubuna anlamlı artış gösterdiğini, hem quercetin hem de etanol verilen ratlarda ise protein karbonil düzeylerinde düşüş olduğunu bulmuşlardır.

Sisteinin –SH grubu oksidatif hasara oldukça hassastır ve –SH gruplarından farklı mekanizmalarla oluşan tiil radikali (-S[·]) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna yardım eder. –SH gruplarının disüfitle ve oksiasitler gibi oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikallerden kaynaklanan protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir. Tiyol gruplarının diğer bir oksidasyon şekli ise 4-hidroksinonenal'in, proteinlerdeki –SH gruplarına Michael Reaksiyonu sonucunda tioeter bağıyla bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Michael Reaksiyonu geri dönüşümlü bir reaksiyondur (112).

Bizim yaptığımız çalışmada homosistein verilerek oksidatif strese maruz bırakılan homosistein grubunun plazma -SH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p < 0,05$). Quercetin+homosistein grubunun plazma –SH düzeylerinde ise homosistein verilen grubun plazma –SH düzeylerine göre artış olmasına rağmen anlamlı değildi.

Köken ve ark. (113) nin yaptığı çalışmada kronik böbrek yetmezliği (KBY) bulunan hastalarda oksidatif stres sonucu plazma protein karbonil içeriğinin sağlıklı kişiler ile kıyaslandığında artmış olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada plazma protein –SH gruplarının oksidatif hasara karşı hassas olduğundan, oksidatif hasarın olduğu hastalıklarda plazma protein –SH düzeylerinin düştüğü belirtilmiş ve yapılan çalışma sonucu kronik böbrek yetmezliği bulunan hastaların sağlıklı bireylere göre plazma protein –SH düzeylerinin düştüğü belirlenmiştir.

GSH vücutta enzimatik olmayan en önemli antioksidandır. Reaktif oksijen ürünleri ile reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca, proteinlerdeki –SH gruplarını redükte halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece, proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna engel olur (35). Homosistein, glutatyon antioksidan savunma sisteminin intraselüler inaktivasyonunu indükler ve muhtemelen GSH sentezini azaltır (114).

Yüce ve ark. (34) homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda meydana getirdiği değişiklikler üzerine yaptıkları çalışmada erkek

ratların kendi aralarında karşılaştırılması sonucu homosistein grubu ratların plazma GSH düzeylerinin kontrol grubu ratlarına oranla düşük olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ayrıca kontrol grubu erkek ile karşılaştırıldığında homosistein grubu erkek ratların kalp damarları endotel hücrelerin dökülmesiyle karakterize erken dönem aterosklerozis şekillendiği bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada homosistein uygulanan ratlarda, quercetin uygulanan ratlarda ve homosistein+quercetin uygulanan ratlarda eritrosit GSH düzeyleri incelendiğinde yukarıdaki çalışmayla paralel sonuçlar bulunmuştur. Homosistein grubunun eritrosit GSH değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Homosistein+quercetin ve quercetin grubunun eritrosit GSH değerleri homosistein grubunun eritrosit GSH değerlerinden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Morrison ve ark. (115) koroner arter hastalıklı bireylerde kontrollere oranla plazma tHcy seviyelerinin yüksekliğiyle birlikte GSH seviyelerinin düşük olduğunu belirtmişlerdir. Hultberg ve ark. (116) 250 mmol/L Hcy'e maruz kalan insan hücre duvarında belirgin şekilde azalmış GSH konsantrasyonları tespit etmişlerdir. Upchurch ve ark. (117) yaptıkları çalışmada 50-200 $\mu\text{mol/L}$ homosisteine maruz kalan bovin aortik endotel hücrelerde GSH aktivitesinin belirgin şekilde azaldığını tespit etmişlerdir.

Zhang ve ark. (118) tavuk spermatogonial hücre kültüründe A1254 verilmesiyle meydana gelen oksidatif stres sonucu MDA seviyelerinin belirgin şekilde arttığını, GSH ve SOD aktivitelerinin ise düştüğünü belirlemişlerdir. Quercetinle muamelenin MDA değerlerini düşürdüğü, GSH ve SOD aktivitelerini ise artırdığını tespit etmişlerdir.

Fiorani ve ark. (119) yaptıkları çalışmada quercetin dehidroaskorbik asit tarafından indüklenen glutatyon tüketimine karşı glutatyonu koruduğunu bildirmişlerdir.

Homosistein, SOD'ın endotel hücre yüzeyine bağlanmasını sağlayan endotel heparan sülfat proteoglikanını bozarak arteriyal endotel hücre yüzeyine SOD'ın bağlanmasını engellemektedir. Yüksek miktarda homosistein fibroblastlarca ortama verilen SOD miktarını azaltmaktadır. Böylece homosistein endotel hücrelerin özellikle süperoksit radikali olmak üzere serbest radikallere karşı savunma yeteneğini azaltmaktadır (34).

Yüce ve ark. (34) homosistein verilerek oksidatif stres oluşturdukları ratlarda homosistein grubu ratların plazma SOD ve CAT aktivitelerini kontrol grubu ratları değerlerine göre düşük bulmuşlardır.

SOD aktivitesinin inhibisyonu homosisteinin indüklediği oksidatif stres hasarı mekanizmalarından biridir. SOD'ın üç izoenzimi vardır. Chang ve ark. (120) rat vasküler yumuşak kas hücrelerinde homosisteinin indüklediği oksidatif stres çalışmasında homosisteinin mitokondriyal Mn-SOD aktivitesini doza bağımlı olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda homosistein grubunda eritrosit SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre homosistein grubunda anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında SOD aktivitelerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada 685 Avustralyalı kardiyovasküler hastalarda total homosistein ve ekstraselüler SOD aktiviteleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (121).

Kahraman ve ark. (110) yaptıkları çalışmada ethanolün indüklediği gastrik lezyonlara quercetin antioksidatif, antihistaminik etkisini araştırmışlar ve SOD aktivitelerinde ethanol verilmesiyle önemli düşüş gözlenirken, quercetin verilmesiyle önemli artış olduğunu tespit etmişlerdir.

SOD enziminin canlılardaki dağılımı CAT ile birlikte incelenmelidir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürün, oksijenin toksik türlerinden

biridir ve CAT tarafından birikimi önlenmektedir. CAT, genel hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Daha çok peroksidomlarda mevcuttur. CAT'ın hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük molekülleri indirgeyici aktivitesi vardır ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ile böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır. (92).

Yaptığımız çalışmada, quercetin grubunun eritrosit CAT aktivitesi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Homosistein grubunun CAT aktivitesi ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Homosistein+quercetin eritrosit CAT aktiviteleri ile homosistein grubunun eritrosit CAT aktiviteleri karşılaştırıldığında, homosistein+quercetin CAT aktivite değerlerinin anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Bunun nedeni, quercetin'in homosisteinin neden olduğu serbest radikallere karşı antioksidan etki göstermesi olabilir.

Molina ve ark. (103) yaptıkları çalışmada kronik etanole maruz bırakılarak oksidatif stres oluşturulan ratlarda kontrol grubuna kıyasla eritrosit katalaz enzim aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlemlemişlerdir. Bunun yanında kronik etanolle beraber quercetin verilen ratlarda etanol grubuna göre katalaz enzim aktivitesinde anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak homosisteinin lipit peroksidasyonunda ve protein oksidasyonunda artışa neden olması ROS aracılığıyla oksidatif stres meydana getirdiğini göstermiştir.

Quercetin+Homosistein grubunda Homosistein grubuna göre plazma MDA düzeylerinin düşük ve buna karşın eritrosit GSH, eritrosit SOD ve CAT aktivitelerinin yüksek olması bize, güçlü bir antioksidan olan quercetin, yüksek homosistein düzeylerinin indüklediği oksidatif hasara karşı hücreleri korumada yararlı olabileceğini ve kısmen de olsa oksidatif hasarı azaltabileceğini düşündürmektedir.

Ratlarla yapılan bu çalışmanın insan çalışmaları ile desteklenmesi gerektiğine inanıyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. James D.F., John J.M. (2000) Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 385-389.
2. Brattström L., Lindgren A., Israelsson B., et al. (1994) Homocystein and cystein: Determinants of plasma levels in middle- aged and elderly subjects. *J Intern Med* **263**, 633-41.
3. Koehler K.M., Romero L.J., Stauber P.M., et al. (1996) Vitamin supplementation and other variables affecting serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in elderly men and women. *J Am Coll Nutr* **15**, 364-76.
4. Malinow R., Andrew G. (1999) Homocysteine, Diet and Cardiovascular Disease. *Circulation* **99**, 178-182.
5. Bolander C. (2002) *Focus On Homocysteine And The Vitamins Involved In Its Metabolism* (ed). Second enlarged et revised edition, Springer Verlag France, Sweden.
6. Todesco L., Angst C., Litynski P., et al. (1999) MTHFR polymorphism, plasma homocysteine and age. *Eur J Clin Invest* **29(12)**, 1003-9.
7. Sies H. (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* **82**, 291-295.
8. Jara-Prado A., Ortega-Vazquez A., Martinez-Ruano L., Rios C., Santamaria A. (2003) Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. *Neurotox Res* **5(4)**, 237- 243.

9. Dayal S., Arning E., Bottiglieri T., et al. (2004) Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke* **35(8)**, 1957-1962.
10. Yamamoto M., Hara H., Adachi T. (2000) Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* **486(2)**,159-162.
11. Freeman B.A., Crapo I.D. (1982) Biology of disease-free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**, 412.
12. Lunec J., Blake D.R. (1985) Copper, iron, free radicals and arthritis. *Br J Rheumatol* **24(2)**, 123-5.
13. Ak H., Dingiloğlu T., Habif N., et al. (1994) Plasma lipid peroxidation, Vit. E, superoxide dismutase and glutathione peroxidase alterations in coronary atherosclerosis. *Tr J Med Sci* **26**, 11-15.
14. Akkuş İ. (1995) *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri* (ed). Mimoza Yayınları, Konya.
15. Onat T., Emerk, K., Sözmen, E.Y. (2002) *İnsan Biyokimyası* (eds). Palme Yayıncılık, Ankara.
16. Morand C., Crespy V., Manach C., et al. (1998) Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol* **275**, 212–219.
17. Manach C., Morand C., Crespy V., et al. (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* **426**, 331–336.

18. Gebhardt R. (2003) Variable influence of kaempferol and myricetin on in vitro hepatocellular cholesterol biosynthesis. *Planta Med* **69**, 1071–1074.
19. Li B.H., Tian W.X. (2004) Inhibitory effects of flavonoids on animal fatty acid synthase. *J Biochem* **135**, 85–91.
20. Knekt P., Jarvinen R., Reunanen A., Maatela J. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* **312**, 478–481.
21. Kuo S.M. (1997) Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Crit Rev Oncog* **8**, 47–69.
22. Hollman P.C.H., Gaag M.V.D., Mengelers M.J.B., van Trijp J.M.P., de Vries J.H.M., Katan M.B. (1996) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* **21**, 703–707.
23. Duarte J., Pe´rez-Vizcaino F., Zarzuelo A., Jimenez J., Tamargo J. (1993) Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **239**, 1–7.
24. Gryglewski R. J., Korbut R., Robak J., Swies J. (1987) On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* **36**, 317–322.
25. Boztepe Derici Ü., Altok Reis K. (2002) Hiperhomosisteinemi ve kronik böbrek yetmezliği. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* **1(3)**, 129-134.
26. Nygard O., Vollset S.E., Refsum H., et al. (1995) Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* **274**, 1526-33.

27. Temel İ., Özerol E. (2002) Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* **9(2)**, 149-157.
28. Andersson A., Brattström L., Israelsson B., et al. (1992) Plazma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender and menopausal status. *Eur J Clin Invest* **22**, 79-87.
29. McCully K.S. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia. *Am J Pathol* **56**, 111-128.
30. Vychytil A., Födinger M., Wolf G., et al. (1998) Major determinants of hyperhomocysteinemia in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* **53**, 1775-1782.
31. Selhub J. (1999) Homocysteine metabolism. *Annu Rev* **19**, 217-46.
32. Brönstrup A., Pietrzik K. (1998) Low dose B vitamin intervention in elderly individuals: Extent of homocysteine plazma reduction and association with vitamin and genotype status tor thermolabile methylene tetrahydrotblate reductase (MTHFR). *Neth J Med* **2**, 19.
33. Demirkıran M. K. (2003) Homosistein Ve Serebral Vasküler Hastalıklar. *Kocatepe Tıp Dergisi* **1**, 08-13
34. Yüce A., Aksakal M. (2006) Ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisi *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* **20(1)**, 51-59.
35. Çakar H. (2005) Etanolün oluşturduğu karaciğer hasarı üzerine quercetinin etkisi (ed). Afyon Kocatepe Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar, 107s (yayınlanmış).

36. Altan N., Dinçel S.A., Koca C. (2006) Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* **31(2)**, 51-56.
37. Champe P. C. , Harvey R. A. , (1997) Biyokimya (eds) Nobel Tıp Kitabevleri , İstanbul.
38. Yapıcı Ö. (2004) Tip II Diabetes Mellituslu hastalarda açlık plazma homosistein seviyesi ile diabetin kronik komplikasyonları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi 1. Dahiliye Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 88s (yayınlanmamış).
39. Wilcken D., Wang X.L., Adachi T. (2000) Relationship Between Homocysteine and Superoxide Dismutase in Homocystinuria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1199-1202.
40. Çakır M. (1997) Aspirin ve vitamin E (α -Tokoferol) 'nin farelerde (Mus musculus) karaciğer total süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 50s (yayınlanmamış).
41. Fridovich I. (1995) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **44**, 147-59.
42. Yanbeyi S. (1999) Aspirin ve antioksidan buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s (yayınlanmamış).
43. Weisiger R.A., Salzman A.T. (1986) Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology* **90(2)**, 494-496.
44. Ünal D. (1999) Serbest radikaller. *Sendrom Mart*, 68-80.

45. McCord J.M. (1992) Human disease, free radicals and oxidant balance. *Clin Biochem* **26**, 351-357.
46. Winrow V.R., Winyard P.G., Morris C.J., Blake D.R. (1993) Free radicals in inflammation. *British Medical Bulletin* **49(3)**, 506-522.
47. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990) Role of free radical and catalytic metal ion in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* **186**, 1-85.
48. Kılınç K., Kılınç A. (2002) Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* **33(2)**, 110-118.
49. Cheeseman K.H., Slater T.F. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* **49(3)**, 481-93.
50. Dikici İ. (1999) Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 73s (yayınlanmamış).
51. Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* **91**, 11- 12.
52. Mercan U. (2004) Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi* **15(1-2)**, 91-96.
53. Aydılek N., Aksakal M. (2003) Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi* **14(2)**, 22-25.
54. Halliwell B., Chirico S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* **57(5 Suppl)**, 715-725.

55. Porter N.A. (1984) Chemistry of lipid peroxidation. *Methods in Enzymol* **150**, 273-282.
56. Özekin A., Değer O. (2001) LDL oksidasyonu ve etkileri. *İbni Sina Tıp Dergisi* **6**, 125-132.
57. Mathers J., Fraser J.A., McMahan M., Saunders R.D., Hayes J.D. (2004) Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem Soc. Symp* **71**, 157-76.
58. Burçak G., Andican G. (2004) Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med* **35**, 159-169.
59. İnternet kaynağı (2007) <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-05.doc>
60. Çavdar C., Sifil A., Çamsar T. (1997) Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Oksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* **3-4**, 92-95.
61. Memişoğulları R. (2005) Diabette Serbest Radikallerin Rolü Ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* **3**, 30-39.
62. Freeman B.A., Crapo J.D. (1982) Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**, 412-425.
63. Fırat S. (1997) Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sisteinin bu system üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A. B. Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 95s (yayınlanmamış).
64. Siliğ Y., Çelik K.V., Atalay A. (2000) Daminozid Uygulamasından Sonra Elde Edilen Cıvcivlerde Karaciğer Sitoplazmik Glutatyon-S-Transferaz ve

Mikrozomal Nitrozodimetilamin Demetilaz Aktivitelerindeki Değişiklikler. *Türk J Biol* **24**, 119-126.

65. Cervello I., Lafuente A., Giralt M., Mallol J. (1992) Enhanced glutathione S-transferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)pyrene. *Placenta* **13(3)**, 273-280.
66. Rose W.C. (1984) New aspects of glutathione biochemistry and transport-selective alteration of glutathione metabolism. *Nutrition Reviews* (**42**)**12**, 397-410.
67. Zhao L. (2001) Glutathione, a ubiquitous thiol. Iowa University. Free radical and radiation biology graduate program, Iowa, 10s (yayınlanmamış).
68. Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W. (1993) *Harper'in Biyokimyası* (eds). Barış Kitabevi, İstanbul.
69. Stryer L. (1981) Biochemistry. Stanford University. W. H. Freeman and Company New York, Second Edition.
70. Middleton E.J. (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* **439**, 175-82 .
71. Groot H., Rauen U. (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* **12**, 249-55.
72. Nijveldt J.R., Nood V. E., Hoorn D., et al. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *N J Clin Nutr* **74**, 418-25.
73. Margalit I.Y. (2004) *Concepts in Wine Technology*. The Wine Appreciation Guild, 263, San Francisco.

74. Groot H. (1994) Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology* **41**, 328-32.
75. Grace P. A. (1994) Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* **81**, 637-47.
76. Korkina L.G., Afanas ev I.B. (1997) Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol* **38**, 151-63.
77. Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S. (1994) The correlation between active oxigens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* **16**, 845-50.
78. Shoskes D.A. (1998) Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation* **66**, 147-52.
79. Lamson D.W., Brignall M.S. (2000) Antioxidants and Cancer III: Quercetin. *Altern Med Rev* **5(3)**, 196-208
80. Gugler R., Leschik M., Dengler H.J. (1975) Disposition of Quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* **9**, 229-234.
81. Prior R.L. (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* **78**, 570-8.
82. Casagrande R., Georgetti S.R., Jabar J.R., Santas A.C., Fonseca M.J.V. (2006) Evaluation of Functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical formulations by its Antilipoperoxidative Activity. *AAPS Pharm Sci Tech* **7(1)**, Article 10.
83. Chow J., Shen S., Huan S.K., Lin H., Chen Y. (2005) Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂ – induced apoptosis via anti-oksident

- activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochemical Pharmacology* **69**, 1839-1851.
84. Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J., et al. (1996) Phase I Clinical Trial of the Flavonoid Quercetin: Pharmacokinetics and Evidence for *invivo* Tyrosine Kinase Inhibition. *Clinical Cancer Research* **2**, 659-668.
85. Moskaug J.Q., Carlsen H., Myhrstad M., Blomhoff R. (2004) Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mechanisms of ageing and development* **125**, 315-324.
86. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. (1990) Flavonoid as antioxidant: determination of radical scavenging efficiencies. *Method in Enzymology* **186**, 343-355.
87. Formica J.V., Regelson V. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd Chem Toxic* **33**, 1061-1080.
88. Booth A.N., Murray C.W., Cones F.T., Dees F. (1956) The Metabolik fate of rutin and quercetin in the animal body. *Federation Proc* **18**, 251-257.
89. Kandaswami C., Middleton E. (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In: Armstrong A. (ed) *Free Radical in Diagnostics Medicine*. Plenum Press, New York.
90. Okhawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979) Assay for Lipid Peroxidase in Animal Tissues By Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-358.
91. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. (1990) Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Method Enzymol* **186**, 464-478.

92. Beutler E., Robson M. J., Buttenvieser E. (1957) The Glutathione Instability of Drug Sensitivity Red Cells. *J Lab Med* **49**, 84.
93. Koster J.F., Biemond P., Swaak J.G. (1986) Intracellular and Extracellular Sulphydryl Levels in Romatoid Arthritis. *Annals of The Rheumatic Disease* **45**, 44-46.
94. Wintenbourn C.C., Hawkin R.E., Brian M., Corell R.W. (1975) The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* **85**, 337-341.
95. Beutler E. (1973) Red Cell Metabolism, A Manuel Of Biochemical Methods. Grune & Stratton, Inc. , New York.
96. De la Vega M. J., Santolaria F., Gonzalez-Reimers E., et al. (2001) High prevalence of hyperhomocysteinemia in chronic alcolism: the importance of the thermolabile form of the enzyme methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR). *Alchol* **25(2)**, 59-67.
97. Martin K.R., Barret J.C. (2002) Reactive oksijen species as double-edged swards in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum Exp Toxicol* **21**, 71-75.
98. Kazanç M.B. (1997) Antioksidan Vitaminler. *Sendrom Temmuz*, 14-22.
99. Kocabalkan F., Baykal Y., Bozoğlu E. (2000) Yaşlılarda kardiyovasküler risk faktörü olarak homosistein. *Geriatrici* **3(2)**, 69-73.
100. Baydas G., Özer M., Yaşar A., Koz S.T., Tuzcu M. (2006) Melatonin Prevents Oxidative Stress and Inhibits Reactive Gliosis Induced by Hyperhomocysteinemia in Rats. *Biochemistry* **71**, 91-95.

101. Tan N.C., Venketasubramanian N. (2002) Hyperhomocysteinemia and risk of ischemic stroke among Asian adults. *Stroke* **33**, 1956-1962.
102. Boushey C.J., Beresford S.A., Omenn G.S., et al. (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* **274**, 1049-57.
103. Molina M.F., Reus I., Iglesias I., Benedi J. (2003) Quercetin, a Flavonoid Antioxidant, Prevents and Protects against Ethanol-Induced Oxidative Stress in Mouse Liver. *Biol Pharm Bull* **26(10)**, 1398-1402.
104. Yamamoto Y., Oue E. (2006) Antihypertensive Effect of Quercetin in Rats Fed with a High-Fat High-Sucrose Diet. *Biosci Biotechnol Biochem* **70(4)**, 933-939.
105. Juzwiak S., Wojcicki J., Mokrzycki K., et al. (2005) Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacological Reports* **57**, 604-609.
106. Cavalca V., Cighetti G., Bamonti F., et al. (2001) Oxidative Stress and Homocysteine in Coronary Artery Disease. *Clinical Chemistry* **47(5)**, 887-892.
107. Duarte J., Perez-Palencia R., Vargas F., et al. (2001) Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **133**, 117-24.
108. Serafinowice A., Kukula K., Cieciora T., et al. (2000) Homocysteine and lipid peroxidation products: Important atherosclerosis risk factors in renal allograft recipients. *Transplant Proc* **32**, 1367-1368.

109. Hollman P.C.H., de Vries J.H.M., van Leeuwen S.D., Mengelers M.J.B., Katan M.B. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* **62**, 1276-82.
110. Kahraman A., Çakar H., Vurmaz A., Gürsoy F., Koçak S., Serteser M. (2003) Ağır egzersizin oksidatif stres üzerindeki etkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi* **2**, 33-38.
111. Horakova L., Strosova M., Skuciova M. (2005) Protective effects of some antioxidant on oxidatively modified sarcoplazmic reticulum from rabbit skeletal muscle *Biologia, Bratislava* **17**, 131-134.
112. Kayalı R., Çakatay U. (2004) Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med* **35**, 83-89.
113. Köken T., Kahraman A., Serteser M., Çetinkaya G. (2001) Hemodiyalizin protein karbonil içeriği ve sülfidril grubları düzeyi üzerine etkisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* **10(2)**, 83-85.
114. Mosharow E., Cranford M.R., Banerjee R. (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulphuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* **39(42)**, 13005-11.
115. Morrison J.A., Jacobsen D.W., Sprecher D.L., Robinson K., Khoury P., Daniels S.R. (1999) Serum glutathione in adolescent males predicts parenteral coronary heart disease. *Circulation* **100(22)**, 2244-7.
116. Hultberg B., Andersson A., Isaksson A. (2000) Hypomethylation as a cause of homocysteine-induced cell damage in human cell lines. *Toxicology* **147**, 69-75.

117. Upchurch G.R., Welch G.N., Fabian A.J., et al. (1997) Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathion peroxidase. *J Biol Chem* **272**, 17012-7.
118. Zhang Y.M. (2005) Protective effect of quercetin on aroclor 1254-induced oxidative damage in cultured chicken spermatogonial cells. *Toxicol Sci* **88(2)**, 545-50.
119. Fiorani M., De Sanctis R., Menghinello P., Cucchiarini L., Cellini B., Dacha M. (2001) Quercetin prevents glutathione depletion induced by dehydroascorbic acid in rabbit red blood cells. *Free Radic Res* **34**, 639-648.
120. Chang L., Xu J., Zhao J., Pang Y., Tang C., QI Y. (2004) Taurine antagonized oxidative stres injury induced by homocysteine in rat vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* **25(3)**, 341-346.
121. Wang X.L., Duarte N., Cai H., et al. (1999) Relationship between total plasma homocysteine, polimorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factore and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Atherosklerosis* **146**, 133-40.