

T.C.
AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KORONER ARTER HASTALARINDA LİPİD VE PROTEİN
OKSİDASYONU İLE SELENYUM İÇEREN
ANTIOKSİDANLARIN DÜZEYİ

Biyokimyager Halit Buğra KOCA

BIYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Tülay KÖKEN

Tez No: 2007-019

2007-AFYONKARAHİSAR

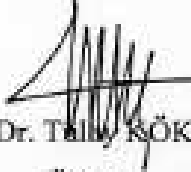
KABUL VE ONAY


Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08 / 06 / 2007



Doç. Dr. Talat KÖKEN
ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Afanet KAHRAMAN
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Temir Ali DEMİR

ÜYE


Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Halit Buğra KOCA'nın "Koronar arter hastalarında lipid ve protein oksidasyonu ile selenyum içeren antioksidanların düzeyi" başlıklı tezi 08.06.2007 günü saat 14:00.....'da lisansüstü eğitim ve öğretim sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Yavuz DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Engin bilgi ve deneyimleriyle çalışmalarına yön veren, tez danışmanım, çok değerli hocam Sayın Doç.Dr. Tülay Köken'e, eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyen, yetişmemde değerli katkıları olan, kıymetli hocalarım Sayın Yrd.Doç.Dr. Ahmet Kahraman ve Sayın Doç.Dr. Mustafa Serteser'e teşekkürlerimi sunarım.

Klinik bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen A.K.Ü. Tıp Fakültesi Kardiyoloji A.D. öğretim üyelerinden Sayın Yrd.Doç.Dr. Hayrettin Sağlam'a ve Dr. Nuran Karagünay'a, numunelerin toplanmasında ve hasta takiplerinde yardımcı olan Kardiyoloji servisi hemşirelerine, tezin deney aşaması ile biyokimyasal analizlerin yapılması sırasında yanımda olan değerli arkadaşlarım Bio. Ayhan Vurmaz, Dr. Sema Akgün ve Dr. Alper Yaman'a ve Rektörlük Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan doyamadığım rahmetli babama, sevgisini ve şefkatini daima yanımda hissettiğim güzel anneme ve sevgili kardeşlerime, özellikle de, yüksek lisansa başlarken tanıştığım ve bu yolda beraber yürüdüğüm, yüksek lisans eğitimimin ve tezimin her aşamasında yardımları ve desteğiyle hep yanımda olan sevgili nişanlım Bio. Tülay Akan'a her şey için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XI
ÖZET	XII
SUMMARY	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ateroskleroz	4
2.1.1. Normal Arter Duvarı	5
2.1.2. Aterogeneizde Rol Alan Hücreler	6
2.1.3. Aterogeneizde Temel Basamaklar	8
2.1.3.1. Endotel Disfonksiyonu	8
2.1.3.2. LDL'nin Oksidasyonu	10
2.1.3.3. Köpük Hücre Oluşumu	11
2.1.3.4. Lipid Çekirdeği (Lipid Core)'nin Oluşumu	12
2.1.3.5. Fibröz Başlık (Fibrous Cap) Oluşumu	13
2.1.3.6. İmmün Mekanizmalar	13
2.1.3.7. Plak Vaskülarizasyonu	14
2.1.4. Ateroskleroz Hipotezini Açıklamaya Yönelik Hipotezler	14
2.1.5. Aterosklerozun Lezyonları	16
2.1.6. Ateroskleroz Lezyonlarının Evreleri	16
2.1.7. Ateroskleroz Lezyonlarının Tipleri	18
2.1.8. Semptomları Ortaya Çıkaran Olaylar	22
2.1.9. Aterosklerozda Lipid Profili ve Değerlendirilmesi	22
2.2. Serbest Radikaller	24
2.3. Oksidatif Stres	27
2.3.1. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	28

2.3.2. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkileri	29
2.3.3. Malondialdehit	31
2.4. Antioksidanlar	31
2.4.1. Selenyum	35
2.4.1.1. Selenyum Biyokimyası ve Metabolizması	35
2.4.1.2. Selenyumun Klinik Önemi	37
2.4.1.3. Selenyum ve Kardiyovasküler Hastalıklar	38
2.4.2. Glutatyon Peroksidaz	38
2.4.3. Glutatyon	39
3. MATERYAL VE METOD	42
3.1. Denekler	42
3.2. Biyokimyasal Analiz	42
3.2.1. Plazma MDA Düzeylerinin Ölçümü	42
3.2.2. Plazma Protein Karbonil Grupları Tayini	43
3.2.3. Plazma Total Protein –SH Grupları Tayini	44
3.2.4. Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması	45
3.2.5. Hemolizat Hemoglobin Tayini	45
3.2.6. Eritrosit Redükte Glutatyon Düzeylerinin Ölçülmesi	46
3.2.7. Eritrosit GPx Düzeylerinin Ölçülmesi	47
3.2.8. Eritrosit GSSG-R Düzeylerinin Ölçülmesi	48
3.2.9. Serum Lipid Paneli Düzeylerinin Ölçülmesi	49
3.3. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	50
4.1. Plazma MDA Düzeyleri	50
4.2. Plazma Karbonil Düzeyleri	51
4.3. Plazma –SH Düzeyleri	51
4.4. Eritrosit GSSG-R Aktiviteleri	52
4.5. Eritrosit GPx Aktiviteleri	52
4.6. Eritrosit GSH Düzeyleri	53
4.7. Serum Total Kolesterol Düzeyleri	54
4.8. Serum Trigliserid Düzeyleri	54
4.9. Serum HDL-Kolesterol Düzeyleri	55
4.10. Serum LDL-Kolesterol Düzeyleri	55

4.11. Serum VLDL Düzeyleri	56
5.TARTIŞMA	57
6. SONUÇ	66
KAYNAKLAR	67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

4-HNE	: 4-Hidroksinonenal
AOPP	: İleri Protein Oksidasyon Ürünleri
ATP	: Adenozintrifosfat
CAT	: Katalaz
Cu	: Bakır
Cu-Zn SOD	: Bakır-çinko süperoksit dismutaz
diTyr	: Ditirosin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNP	: 2,4-dinitrofenilhidrazin
DTNB	: 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
EC-SOD	: Ekstraselüler süperoksit dismutaz
Fe ²⁺	: Ferro demir
Fe ³⁺	: Ferik demir
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GPx1	: Mitokondriyal glutasyon peroksidaz
GPx2	: Gastrointestinal glutasyon peroksidaz
GPx3	: Ekstraselüler glutasyon peroksidaz
GPx4	: Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz
GPx5	: Selenyum içermeyen glutasyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSHH	: Yüksek düzeydeki glutasyon
GSHh	: Düşük düzeydeki glutasyon
GS-SeH	: Glutasyon selenopersülfit
GS-Se-SG	: Selenoglutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GSSG-R	: Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H ₂ Se	: Hidrojen selenid

VIII

H ₂ SePO ₃	: Selenofosfat
Hb	: Hemoglobin
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HO ₂ [·]	: Hidroperoksil
ICAM-1	: İnterselüler adezyon molekül-1
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LOO [·]	: Peroksil radikali
LPO	: Lipid peroksit
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1
MCSF-1	: Makrofaj koloni stimulan kemotaktik faktör-1
MDA	: Malondialdehit
MI	: Miyokardiyal infarktüs
mmLDL	: Çok az değiştirilmiş LDL
Mn	: Manganez
Mn-SOD	: Mangan süperoksit dismutaz
Mo	: Molibden
mRNA	: Haberci RNA
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid (yükseltgenmiş)
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (yükseltgenmiş)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)
NO	: Nitrik oksit
NT	: Nitrotirozin
O ₂	: Moleküler oksijen
O ₂ ^{·-}	: Süperoksit radikal anyonu
OH [·]	: Hidroksil
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PCO	: Protein karbonil
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PECAM-1	: Platelet endotelial hücre adezyon molekül-1
PGI ₂	: Prostaglandin I-2
PHGPx	: Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz
PUFA	: Poliansatüre yağ asitleri

ROO·	: Peroksil radikali
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
-S·	: Tiil radikali
Se	: Selenyum
Sec	: Selenosistein
SelW	: Selenoprotein W
SeO ₃ ²⁻	: Selenit
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbütirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TNF- β	: Tümör nekroz faktör-β
TNF- α	: Tümör nekroz faktör-α
Txn	: Tiyoredoksin
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekül-1
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.3.1. Aterogenezin hasara-cevap teorisi	9
Şekil 2.1.3.2. Temel Ateroskleroz Süreci	14
Şekil 2.1.6.1. Amerikan Kalp Derneği'ne göre plak evreleri	18
Şekil 2.1.7.1. Tip I aterosklerotik lezyonun progresyonu	19
Şekil 2.1.7.2. Tip II aterosklerotik lezyonlarının progresyonu	19
Şekil 2.1.7.3. Tip IV aterosklerotik lezyonların progresyonu	20
Şekil 2.1.7.4. Tip VI aterosklerotik lezyonların progresyonu	21
Şekil 2.2.1. Reaktif oksijen ürünlerinin kaynakları ve meydana gelen reaksiyonlar	26
Şekil 2.4.1.1. Selenyum Metabolizması	36
Şekil 4.1.1. Plazma MDA düzeylerinin karşılaştırması	50
Şekil 4.5.1. Eritrosit GPx karşılaştırması	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.2.1. Reaktif oksijen ürünleri	27
Tablo 2.4.1. Enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar	32
Tablo 4.1.1. Plazma MDA Düzeyleri	50
Tablo 4.2.1. Plazma Karbonil Düzeyleri	51
Tablo 4.3.1. Plazma -SH Düzeyleri	51
Tablo 4.4.1. Eritrosit GSSG-R Aktiviteleri	52
Tablo 4.5.1. Eritrosit GPx Aktiviteleri	52
Tablo 4.6.1. Eritrosit GSH Düzeyleri	53
Tablo 4.7.1. Serum Total Kolesterol Düzeyleri	54
Tablo 4.8.1. Serum Trigliserid Düzeyleri	54
Tablo 4.9.1. Serum HDL-Kolesterol Düzeyleri	55
Tablo 4.10.1. Serum LDL-Kolesterol Düzeyleri	55
Tablo 4.11.1. Serum VLDL Düzeyleri	56

ÖZET**Koroner arter hastalarında lipid ve protein oksidasyonu ile selenyum içeren antioksidanların düzeyi**

Ateroskleroz, arterlerde kalınlaşma ve elastikiyet kaybı ile kendini gösteren ve özellikle aorta, koroner ve serebral arterleri tutan bir damar hastalığıdır. Ateroskleroz patojenezi ile ilgili çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Bu hipotezler arasında en geçerli olanı oksidatif stres hipotezidir.

Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun antioksidan savunması ile serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir. Reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı enzimatik korumayı sağlayan, protein oksidasyonu ve DNA' daki hasarı önleyen Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GSSG-R) gibi çeşitli enzim sistemleri vardır. Klinik çalışmalar, aterosklerotik hastalarda antioksidan aktivenin azaldığını göstermektedir. Bununla beraber ateroskleroz ile antioksidan markerlarının seviyeleri arasındaki ilişki tam bilinmemektedir.

Koroner kalp hastalığında serum lipid profillerinin değiştiği belirtilmektedir. Ateroskleroz gelişmesine en ciddi katkısı olan lipid fraksiyonu düşük dansiteli lipoprotein (LDL)-kolesteroldür. Plazmada LDL-kolesterolün artması ile subendotelyal bölgede depolanma ve inflamatuvar hücre yanıtının başladığı kabul edilir. Epidemiyolojik çalışmalar, toplumların total ve LDL-kolesterol düzeyleri yükseldikçe koroner arter hastalığı riskinin arttığını göstermiştir.

Bu çalışmada, koroner anjiyografi yapılan 59 hasta (21 kadın, 38 erkek) tıkalı damar sayılarına göre 3 gruba ayrıldı. I. grup bir damarı tıkalı olanlardan (n= 21), II. grup iki damarı tıkalı olanlardan (n= 18) ve III. grup üç damarı tıkalı olanlardan (n= 20) oluşturuldu. Kontrol grubunu, koroner anjiyografi sonucu normal olan 12'si kadın ve 7'si erkek 19 kişi oluşturdu. Alınan kan örneklerinden serumda lipid panellerine, plazmadan malondialdehit (MDA), protein karbonil içeriği (PCO) ve plazma sülfhidril (-SH) grupları, eritrosit redükte glutatyon (GSH) düzeyleri, GPx ve GSSG-R aktiviteleri ölçüldü.

Yapılan alışmalar sonucunda koroner kalp hastalarında kontrol grubuna göre plazma MDA düzeyinin arttığı, eritrosit GPx aktivitesinin azaldığı gözlemlendi. Plazma karbonil ve –SH düzeylerinde, serum total kolesterol, trigliserid, LDL, VLDL ve HDL kolesterol düzeylerinde, eritrosit GSH düzeyleri ve GSSG-R aktivitelelerinde çalışma grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Bu çalışmada aterosklerotik hastalarda lipid peroksidasyonunun arttığını ve antioksidan bir enzim olan GPx seviyesinin azaldığını bulduk. Damar tıkanıklığı ile lipid paneli arasında bir korelasyonun bulunmaması, lipid panelinin aterosklerozun her zaman erken göstergesi olamayacağını ortaya koymuştur. Aterosklerozda MDA düzeyinin artması ve GPx aktivitesinin azalması nedeniyle, klinikte bu parametrelerin lipid paneli ile birlikte bakılması aterosklerozun erken tanısında yararlı olabilir. Bu dşuncenin geçerliliği için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

Anahtar kelimeler: Ateroskleroz, Oksidatif stres, Antioksidanlar, LDL

SUMMARY**Lipid and protein oxidation and levels of selenium containing antioxidants in coronary artery patients**

Atherosclerosis is a vessel disease that it shows is self with becoming thick and losing flexibility of arteries, and catches especially aorta, coronary and cerebral arteries. There is a variety of hypothesis about the pathogenesis of atherosclerosis which is suggested. The most common valid hypothesis among them is the hypothesis of oxidative stress.

The oxidative stress can be basically defined as a unbalance between the antioxidant defence and free radicals production of body. Enzymatic protection against ROS and the breakdown products of peroxidized lipids and oxidized protein and DNA is provided by many enzyme systems such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GSSG-R). Clinical studies shows that on atherosclerotic patients the activity of antioxidant becomes less. However the relation between atherosclerosis and levels of antioxidant markers is not known entirely.

It has been noted that in the coronary heart disease the profiles of serum lipid is changing. In the development of atherosclerosis the most serious contribution that of lipid fraction is low density lipoprotein (LDL)-cholesterol. It is accepted that by the increase in LDL-cholesterol, the store in subendothelial area and response of inflammatory cell starts. Epidemiological studies has shown that by the increase in LDL- cholesterol levels of societies, the risk of coronary arteries disease is also increasing.

In this study, 59 patients (21 women, 38 men) who undergoing coronary angiography that divided in 3 groups according to their number of obstructed coronaries; one vessel (n=21), two vessels (n=18) and three vessels (n=20). The subjects with normal coronary angiograms (n=19, 12 women, 7 men) were evaluated as controls. Serum lipid panels, plasma malondialdehyde (MDA), protein carbonyls (PCO), total sulfhydryl (-SH) levels, erythrocyte glutathione (GSH) levels, GPx and

GSSG-R activities measured from the blood samples taken from patients and controls.

As the result of study, on coronary heart patients were observed that the plasma MDA levels were increased, the erythrocyte GPx activities were decreased with regard to control group. No statistical significant relation has been found on PCO and -SH levels, serum total cholesterol, trygliseride, LDL, very low density lipoprotein (VLDL) and high density lipoprotein (HDL) collestrol levels, erythrocyte GSH levels and GSSG-R activities between patients and control groups.

In this study, we found that increase of lipid peroxidation and decrease of GPx level which is an antioxidant enzyme on the atherosclerotic patients. The lacking of correlation between vessel obstruction and lipid panel has revealed that lipid panel wouldn't be the early indicator of atheosclerosis in all instances. Since the increase of MDA level and GPx activity in atherosclerosis, it would be beneficial to checking these parameters in clinic with lipid panel in order to make early diagnosis of atherosclerosis. For validity of these ideas, there is a necessary to more advanced studies.

Keywords: Atherosclerosis, Oxidative stres, Antioxidants, LDL

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında, mortalite ve morbiditenin majör nedeni olma yolunda gittikçe artan bir rol üstlenmektedir. Çalışmalar, tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranının 1990 ve 2020 yılları arasında, % 28.9'dan % 36.3'e yükseleceğini göstermektedir (1).

Tek başına ateroskleroz batı dünyasındaki ölümlerin yarısından fazlasında rol almaktadır. Koroner ateroskleroz, iskemik kalp hastalığına yol açabilir ve arteriyal lezyonlara trombus eklendiğinde, iskemik kalp hastalığının en ağır formu olan myokard infarktüsü gelişir ki, bu durum tek başına ABD'deki ölümlerin % 20-25'inden sorumludur (2).

Türk Kardiyoloji Derneği'nin öncülüğünde 1990 yılından beri yürütülen Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışmasının 12 yıllık izlem verilerine göre, Türkiye'de 2.0 milyon koroner kalp hastasının bulunduğu ve yılda 160 bin yurttaşımızın koroner kalp hastalığından öldüğü tahmin edilmektedir (3).

Serumda yüksek lipid miktarı ile koroner kalp hastalıkları ve ateroskleroz arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (4). Yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) ile koroner hastalıklar arasında ters bir orantı görülür iken düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterol ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) kolesterol konsantrasyonlarında artış gözlenmektedir (5). Kolesterolün depo edilmesi ya da parçalanacak olmasındaki en belirleyici ilişkinin LDL/HDL kolesterol oranı olduğu kabul edilmektedir (6).

Oksidatif stres; oluşan reaktif oksijen ürünlerinin, sistemin bunları nötralize ve elimine etme yeteneğinin üzerinde olması sonucu ortaya çıkan durum olarak tanımlanmıştır (7-9).

Süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH^\cdot) gibi reaktif oksijen ürünleri (ROS), hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de çevresel faktörlerin etkisi ile oluşabilmektedir (7). Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle başta lipidler, proteinler, karbohidratlar ve DNA

olmak üzere oksitlenebilen tüm hücre elemanları ile etkileşmektedirler. Bu nedenle, oksidatif stres, kardiyovasküler ve nörodejenaratif hastalıklar, kanser gibi hastalıkların ve yaşlanma prosesinin ilerlemesinde ilişkili olduğu belirtilmektedir (10).

Antioksidanlar, ROS' un kontrolsüz oluşumunu engelleyen veya biyolojik yapıları ile reaksiyonlarını inhibe eden doğal veya sentetik moleküllerdir. Antioksidan savunma enzimatik veya non-enzimatik çeşitli stratejileri kapsar. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), tioredoksin reduktazlar ve glutatyon peroksidaz, (GPx)/glutatyon redüktaz (GSSG-R) gibi enzimler tarafından enzimatik defans sistemi sağlanmış olur. Non-enzimatik antioksidanlar tokoferoller, karotenler, askorbat, glutatyon (GSH), ubikinoller ve flavonoidler gibi yapılardan oluşur. Bunlara ilave olarak çeşitli koruyucu enzimlerin önemli integral bileşenleri olan selenyum ve çinko, özel aminoasitler (selenosistein, selenometiyonin) gibi mikronutrient elementler de dikkat çekmektedir (11).

Lipidler, proteinler ve DNA' ya serbest radikallerin biyolojik oksidatif etkileri antioksidanlar ile kontrol edilir. Antioksidanlar aterogenezi inhibe eder ve vasküler fonksiyonları çeşitli mekanizmalarla geliştirir (12).

GPx, H₂O₂'nin destrüksiyonunda hidrojen vericisi olarak GSH'ı kullanır. GSH'ın rejenerasyonu GSSG-R ile katalizlenir. GPx ayrıca büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden de sorumludur.

GSH, önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiş bir tripeptittir. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur.

Protein sülfhidril (-SH) grupları oksidasyon zincirini kırma özelliğine sahip önemli antioksidanlardandır. Plazma protein -SH grupları oksidatif hasara karşı hassas olup koroner arter hastalığı (13), romatoid artrit (5), diabetes mellitus (14) gibi oksidatif hasarın olduğu hastalıklarda düştüğü gösterilmiştir.

Protein oksidasyonunun, protein karbonil (PCO) gibi markerlarının *in vivo* protein oksidasyonunun derecesini gösterecek bir araç olarak kullanılması uzun bir geçmişe dayanmaktadır (15, 16).

Serbest radikallerin lipid peroksidasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda 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 (17).

Bu çalışmada, koroner arter hastalarının lipid profili, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve antioksidan sistemi arasındaki ilişkiyi, tıkalı damar sayılarına bağlı olarak ölçmeyi amaçladık. Bu amaca göre hastalar tıkalı damar sayısına göre gruplara ayrıldı ve antioksidan parametreler olarak GPx, GSH ve GSSG-R, total SH grupları, oksidatif hasarın göstergesi olarak protein oksidasyonu sonucu oluşan protein karbonil içeriğini ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak da MDA düzeylerine ayrıca lipid profillerine bakılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Tüm dünyada epidemik hale gelen kardiyovasküler hastalıkların en sık nedeni aterogenez ve buna eklenen trombozdur. Ülkemiz de, ateroskleroz ve neden olduğu hastalıklar bakımından, öbür ülkelerden farklı değildir. Öbür damar yatakları konusunda elimizde ayrıntılı bilgiler olmamakla birlikte, TEKHARF çalışması koroner arter hastalığının Türkiye'deki durumu hakkında bilgiler vermektedir (18). Buna göre, erişkin nüfusta koroner arter hastalığı prevalansı %3.8'dir. Ancak, hastalığın klinik bulgularını vermeye başladığı yaş gruplarına bakıldığında, örneğin 60-69 yaş grubunda, prevalansın %14'ü aştığı gözlenmektedir. Hastalığın ülkemizdeki önemini vurgulayan bir başka veri, Türk Kardiyoloji Derneğinin 2000 yılında yayınladığı rapordan gelmektedir (19). Bu raporda, aterosklerozun neden olduğu koroner arter hastalıkları ve inmeden kaynaklanan ölümlerin, tüm ölüm nedenlerinin %43'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir.

Ateroskleroz arter intimasında plazmadan kaynaklanan aterojenik lipoprotein birikmesine karşı gelişen karmaşık bir inflamatuvar-fibroproliferatif yanıttır (20). Aortadan epikardiyal koroner arterlere dek değişen büyüklükte sistemik arterleri etkileyebilir. İleri evrelerde çeşitli lezyonlar birarada görülebilirse de intimal plaklar karakteristik lezyonudur. Plaklar daha çok lümen yüzeyi ile LDL gibi kandaki partiküller arasında etkileşim süresinin artmış olduğu dallanma bölgelerine yakın kısımda yerleşir. Bu durum, lipoproteinlerin transendotelyal difüzyonunda artışla ve hiperlipidemi varlığında subendotelyal matrikste lipid birikiminde artışla ilişkilidir. Homosisteinin yüksek düzeyleri de endotel tabakasında hasara yol açarak vasküler permeabiliteyi artırır. Son zamanlarda aterosklerotik plakların %50-75'inde saptanan Klamidya Pnömoniya varlığı mikroorganizmaların da aterosklerozdaki rolüne dikkatleri çekmiştir (21). Ekstrasellüler lipid, köpüksü stoplazmalı hücrelerdeki lipid ve düz kas hücrelerinin ürettiği kollajen gibi bağ dokusu elemanlarından oluşan plak içeriği plaklar arasında farklılık gösterebilir. Köpük hücreleri büyük oranda arter lümeninden plak içine giren monositlerden köken alan makrofajlardan oluşur (22).

2.1.1. Normal Arter Duvarı

Aterosklerotik sürecin daha kolay anlaşılması için normal damar yapısının bilinmesinde yarar vardır. Normal arter duvarı üç tabakadan oluşur. En iç, bir başka deyiş ile lümeni çevreleyen tabaka **intima**'dır. Tek sıra biçiminde dizilmiş endotel hücreleri, bunları destekleyen subendotelyal matriks ve bazal membran intimayı oluşturur. Öbür memelilerden farklı olarak, insan intimasında az sayıda düz kas hücresi de bulunmaktadır. İntima tabakası, medya tabakasından internal elastik membran ile ayrılır. Bu tabakayı oluşturan ve yukarıda sıralanan temel öğeler arter yatağının her kesiminde aynı olsa da, intima kalınlığı yerel farklılıklar gösterir (23). Farklılığın düzeyini, kan akımının damar duvarında oluşturduğu mekanik güçler belirler. Farklılaşmadaki amaç, kan akımını yatağın her bölümünde en iyi düzeyde tutmaktır. İntima kalınlığının en fazla olduğu bölgeler, yukarıda söylenen nedenden de anlaşılacağı gibi, arterlerin çatallarına (bifurkasyon) yerleri ve yan dalların ağız kesimleridir. Ancak dikkat çekici özellik, aterosklerozun daha çok bu bölgelere yerleşiyor olmasıdır. Fakat arter yatağının birçok yerinde var olan intima kalınlaşmalarının hepsinin aterosklerotik lezyonlara dönüşmemesi nedeniyle, bunları, aterosklerozun ön değişiklikleri olarak kabul etmek yerine, ateroskleroza yatkın bölgeler olarak tanımlamak daha doğru olur. Bu yaklaşım ile bakıldığında arter yatağı, yatkınlık derecesine göre üçe ayrılabilir (24):

1. Aterojenik lipoprotein düzeyleri çok yüksek olmadıkça lipid birikmesinin görülmediği kesimler: Kan akımının mekanik özellikleri nedeniyle intima kalınlaşmasının bulunmadığı arterler. Göğüs aortunun inen kesiminin ön yüzü bu duruma iyi bir örnektir.

2. Orta derecede yatkın kesimler: Bu bölgeler köpük hücreleri içerse bile bunların aterosklerotik lezyonlara ilerlemesi çok yavaştır. İnterkostal arterlerin ağızları örnek olarak gösterilebilir.

3. Yüksek derecede yatkın kesimler: Bu kesimler çocukluk yaşından başlayarak akıma uyum için intima kalınlaşmasının en belirgin olduğu bölgelerdir.

Buralardaki köpük hücre sayısı, damarın geri kalan kesimlerine göre çok daha fazladır. Sol koroner arterin, karotis arterinin ve karın aortunun distal kesimlerindeki çatallarına yerleri en tipik örnekleri oluşturur.

Orta tabakaya **medya** adı verilir. Kollajen, elastik lifler ve glikozaminoglikanlardan oluşan bir matriks içinde konsantrik olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşur. Adventisyadan eksternal elastik membran ile ayrılır.

En dış tabaka ise **adventisyadır**. Gevşek bir bağ dokusu yapısındaki bu tabaka, boyuna dizilmiş kollajen liflerden, vaza vazorumlardan ve sinir uçlarından oluşur (25).

2.1.2. Aterogeneizde Rol Alan Hücreler

Endotel, arter duvarı ile kan elemanları arasında düzgün ve kesintisiz bir sınır oluşturan tek sıra biçiminde dizilmiş hücrelerden oluşan bir tabakadır. Normal endotel oldukça seçici geçirgen bir engel (26), trombüs oluşumuna dirençli bir yüzey, pek çok vazoaaktif madde ile bağ dokusu yapılarının üretiminden sorumlu metabolik olarak etkin bir dokudur. Endotel hücreleri arasındaki bağlar, normalde albuminden daha büyük moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar sıkıdır. Lipoproteinler, endotel engelini ancak transsitoz -yani plasmalemma vesikülleri aracılığıyla- geçebilirler. Bu mekanizma lipoprotein reseptörlerinden bağımsızdır ve kandaki lipoprotein düzeyiyle ilişkilidir. Endotel zedelendiğinde, bu engel özelliğinin bozulduğu ve lipoproteinlerin subendotelyuma geçişinin hızlandığı öne sürülmüştür. Ancak, aterosklerozun gelişimini hızlandıran esas basamağın serbest lipoprotein girişi değil, bundan sonra gelişen olaylar (oksidasyon vs.) olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (27). İntimaya yerleşen lipoprotein moleküllerinin ilk oksidasyonu da yine endotel hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Okside LDL'nin oluşması aterogeneizde bir dizi zincirleme olayı tetikleyen ilk temel basamaktır. Ayrıca endotel hücreleri, aterogeneizde rol oynayan çok sayıda maddenin ve bağ dokusu elemanlarının sentezinden sorumludur. Bunlar arasında prostoglandin I₂ (PGI₂) ve nitrik oksit (NO), endotelin, anjiyotensin dönüştürücü enzim gibi vazoaaktif aminler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleri ve tümör nekrozant faktör- α (TNF- α) ve interlökin-1 (IL-1) gibi endotel proliferasyonunu inhibe eden maddeler de vardır. NO, endotelin koruyucu işlevinde çok önemli bir rol üstlenmektedir. Güçlü antiagregan etkisi nedeniyle, trombositlerin endotel yüzeyinde kümeleşmesini engeller. Anti-inflamatuvar özelliği ise aterosklerozu, her evrede, engelleyici bir etki göstermesini sağlar. NO, bu etkisi

ile adezyon moleküllerinin endotel yüzeyinde belirmesini, lipidlerin endoteli geçişini ve düz kas hücrelerinin proliferasyonunu önler (28-30).

Normal arter duvarının medya tabakasında yer alan düz kas hücrelerinin esas görevi arter tonusunu sağlamaktır. Aterosklerotik plağın oluşumu sırasında medyadan intimaya geçen bu hücreler, lezyonun fibroproliferatif sürecinde görev alırlar. Bu yüzden düz kas hücrelerinin intimada birikmesi, ilerlemiş lezyonun göstergesi kabul edilir. Düz kas hücreleri ayrıca, makrofajlar gibi lipoproteinleri fagosite edip kolesterol esterleri şeklinde depolayarak "köpük hücreleri"ni (foam cells) oluştururlar.

Makrofajlar, bebeklik çağından başlayarak endotel altı dokularda görülmeye başlarlar. Ancak bu dönemde tek tek bulunurlar ve kümeler oluşturmazlar. En yoğun olarak buldukları yerler ise, yukarıda arter duvarı ve endotel hücreleri bölümlerinde de vurgulandığı gibi, kan akımına uyum için kalınlaşmış intima tabakasının olduğu kesimlerdir (24). Makrofajlar bir kez lezyona yerleştikten sonra kendileri de pek çok biyolojik madde salgılayarak, yeni makrofajların gelmesini, düz kas hücreleri, fibroblastların çoğalmasını ve bağ dokusu sentezini uyarırlar.

Köpük hücre oluşturan asıl hücreler makrofajlardır. Daha önce endotel tarafından başlatılan LDL partiküllerinin oksidasyonunu makrofajlar tamamlar. Makrofajlar, "scavenger" (çöpçü) reseptörler aracılığı ile okside LDL'yi fagosite edip parçalarlar. Açığa çıkan kolesterol, kolesterol esterleri şeklinde depolanır. Ancak hücrenin kolesterol yüklenmesiyle, "scavenger" reseptörlerde bir "down" regülasyon olmadığından, depolanma işi hücrenin ölümüne dek sürer. Böylelikle lipid damlacıkları ile dolan makrofajlar "köpük hücrelerine dönüşür.

Trombositler, aterogenezin hemen her aşamasında lezyon üzerinde trombosit kümeleri veya mural trombüsler olarak görülebilir. Çekirdeksiz hücreler olduklarından protein üretememelerine karşın, trombositler içerdikleri granüllerde (α granülleri) çok sayıda değişik mitojenler, sitokinler ve vazoaktif maddeler taşırlar. Endotel hasarında olduğu gibi herhangi bir biçimde tetiklenen trombosit aktivasyon ve agregasyonu, sonuçta degranülasyona ve bu maddelerin salgılanmasına neden olur.

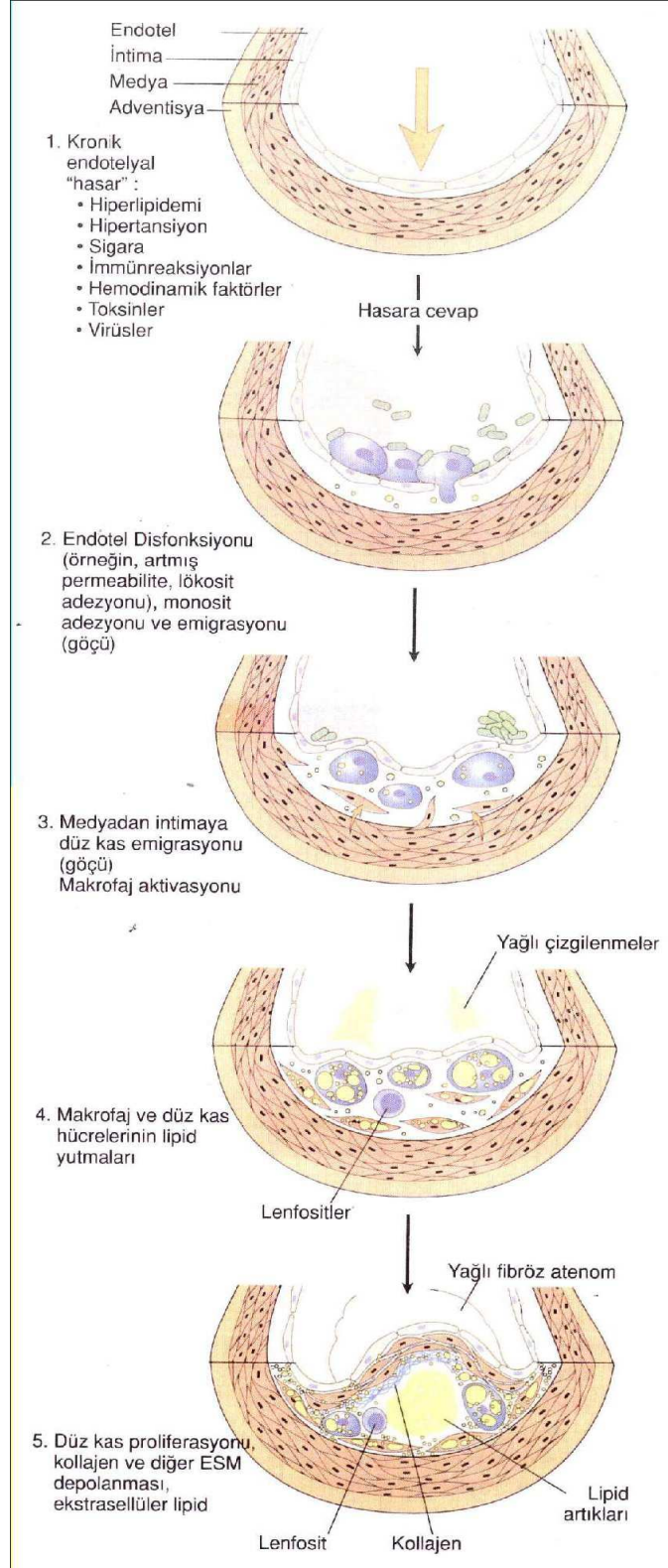
Aterosklerotik lezyonlarda hem CD4+ hem de CD8+ hücrelerin bulunması, aterosklerozun patogenezinde bağışıklık sistemine, hatta belki de otoimmüniteye

ilişkin bileşenlerin de rol oynayabileceği fikrini doğurmaktadır. Makrofajların bağışıklık sisteminde T-lenfositlere antijen sunan birincil hücreler olduklarının bilinmesi ve aterosklerotik plakta T-lenfositlerle yoğun etkileşimlerinin gösterilmiş olması da bu kanıyı desteklemektedir.

2.1.3. Aterogeneze Temel Basamaklar

2.1.3.1. Endotel Disfonksiyonu

Kronik ya da tekrarlayan endotel hasarı, hasara cevap hipotezinin köşe noktasıdır (2). Ross tarafından ortaya atılan bu hipotezde olayları endotel disfonksiyonu başlatmaktadır. Metabolik, mekanik, toksik, immünolojik olaylar ile enfeksiyonlar endotel disfonksiyonuna neden olurlar. Bilinen risk faktörlerinin hemen hepsi (sigara, hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi, okside LDL kolesterol) endotelde işlevsel bozukluğa yol açabilir. Endotel disfonksiyonu, tek hücre sırasından oluşan bu tabakanın, kan ile damar duvarı arasında bariyer olma özelliğini, seçici geçirgenliğini ve antitrombotik yapısını bozar. Bunun sonucunda gelişen inflamatuvar ve proliferatif olaylar dizisi aterosklerotik plağın oluşmasına neden olur (31). Endotel hasarı endotelin dökülmesini gerektirmez. Kaybolan endotel hücrelerinin hızla replase olması endotel hasarının en basit göstergesi olabilir. Endotel permeabilitesinde değişiklikler, endotele lökosit adezyonunun artması, vazoaktif madde ve growth faktörlerin salınması endotel disfonksiyonunu gösterir. Endotel hasarı endotel fonksiyonunu değiştirirken, önemli hücresel etkileşimlere neden olmakta ve aterosklerotik lezyon gelişimine yol açmaktadır (32). Şekil 2.1.3.1.'de aterogenezin hasara cevap hipotezi şema halinde görülmektedir (2).



Şekil 2.1.3.1. Aterogenezin hasara-cevap teorisi

Endotel disfonksiyonu, inflamasyonun varlığında ya da yüksek düzeydeki okside LDL partiküllerinin varlığında oluşur (33). Fonksiyonu bozulmuş endotel hücresi, koruyucu fenotipini yitirir ve proinflamatuvar, vazokonstriktif ve büyümeyi uyarıcı maddeler üretmeye başlar.

Normal endotelin fonksiyonlarındaki bozulma kendini başlıca şu şekilde gösterir:

- Endotele bağımlı vazodilatasyon bozulur (34).
- NO yapım ve salgılanması azalır (35), sonucunda trombosit agregasyonu kolaylaşır (36).
- Endotelin düzeyi artar, vazokonstriksiyon gelişir (37).
- Endotel hücrelerinde, yıkımının azalması (38) nedeniyle, asimetrik dimetilarginin düzeyi artar (39) ve bu da NO sentezini inhibe eder,
- Yüksek kolesterol düzeyi, endotelden serbest oksijen radikallerinin salgılanmasına neden olur ki bunlar da NO'e bağlanarak aktivitesini bozarlar (40).
- Hücre yüzeyinde vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1), interselüler adezyon molekül-1 (ICAM-1) ve platelet endotelyal hücre adezyon molekül-1 (PECAM-1) gibi adezyon moleküllerinin düzeyi artar ve endotel disfonksiyonunun olduğu bölgelere lökositlerin tutunması kolaylaşır (41,42).
- PGI₂ üretiminin azalması, endotel hücresine bağlı protein C etkinleşmesinde düşüş, tromboplastin üretiminin ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) salgılanmasının artması sonucunda trombus oluşumuna eğilimli bir durum oluşur.

2.1.3.2. LDL'nin oksidasyonu

Kronik hiperlipidemide dolaşımdaki LDL'ler endotel hücreleri tarafından oluşturulan engeli geçerek, endotel altında birikmeye başlar. Buradaki matrikste bulunan proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar, LDL ile etkileşerek birikimini sağlarlar. LDL'nin intimada kalış süresinin uzaması, oksidasyonuna olanak sağlar. Makrofajlardaki LDL reseptör sayısı az olduğundan okside olmamış LDL'nin fagosite edilme hızı düşüktür. İntimada, matrikse bağlı olarak tutulmakta olan LDL, endotel ve düz kas hücreleri ile makrofajlar tarafından okside edilirler. İlk aşamada LDL yapısındaki apo B-100 değişmez. Bu lipoprotein partiküllerine 'minimally modified' (çok az değiştirilmiş) LDL (mmLDL) adı verilir. Bunlar da LDL reseptörleri tarafından tutuldukları için köpük hücre oluşumuna katılmazlar ancak,

monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) yapımını uyararak bölgeye daha çok monosit göçünü sağlarlar. Oksidasyonu tamamlanmış bir başka deyiş ile okside LDL'de apo B-100 de değişmiştir. Bu lipoprotein de monosit ve lenfositler için kemotaktik maddelerin yapımını uyarır. Apo B-100'ün yapısı değiştii için de immünolojik olayların başlamasını tetikler. Okside LDL'nin makrofajlar tarafından fagosite edilmesi "scavenger" (çöpçü) reseptörler aracılığı ile olur. Bu şekilde alınan LDL, makrofaj içinde kolesterol esterlerine dönüşerek birikir ve köpük hücrelerini oluşturur (43,44). Okside LDL'nin aterogenezdaki etkileri şu şekilde sıralanabilir .

- "Scavenger" (çöpçü) reseptörlerce tanınarak makrofajlar ve düz kas hücrelerince fagosite edilir (45,46).
- Endotel hücreleri ve düz kas hücrelerine sitotoksik etki gösterir (32).
- Dolaşımdaki monositler için kemotaktiktir.
- Endotel adhezyon moleküllerinin (ICAM-1, VCAM-1) üretimini uyararak monosit ve T-lenfositlerinin damar duvarına yapışmasını kolaylaştırır.
- Plak içindeki makrofajların motilitesini inhibe ederek, lezyondaki makrofaj sayısının artmasına yardımcı olur.
- Bazı büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanmasını uyarır.
- İmmünojeniktir, antikor oluşumunu tetikler.

2.1.3.3. Köpük hücre oluşumu

LDL molekülünün ilk modifikasyonu endotel hücresinde olur. Oluşan mmLDL'nin aterosklerozun patogenezdaki rolünden daha önce bahsedilmiştir. mmLDL daha sonra makrofajlardan salgılanan lipooksijenaz, reaktif oksijen türevleri ve MDA'nın etkisiyle tekrar okside edilir (47). MDA, apoB proteininin lizin halkasını değiştirerek lipoprotein molekülünü, makrofajlar üzerindeki çöpçü reseptörlerce daha kolay tanınabilecek yönde şekillendirir (45,46). Böylelikle makrofajlar, okside LDL partiküllerini fagosite edip parçalarlar ve kolesterol esterleri biçiminde depo ederler. Hücrenin kolesterol yüklenmesi, çöpçü reseptör sayısında bir "down" regülasyona neden olmadığından, bu depolanma devam eder. Sonuçta köpük hücreleri (foam cells) oluşur. Makrofaj köpük hücreleri, TNF- α ve metalloproteinazlar gibi inflammatuar sitokinler ve prokoagulan faktörler salgırlar (48).

Düz kas hücrelerinin üzerinde de çöpçü reseptörler vardır. Bu hücreler de okside LDL'yi fagosite ederek köpük hücreleri oluştururlar.

Erken evredeki lezyonlarda lipid çoğunlukla hücre içindedir. Ancak hücre dışı aralıkta da elektron mikroskopuyla görülebilecek kadar az miktarda lipid damlacıkları bulunur.

2.1.3.4. Lipid çekirdeği (Lipid Core)'nin oluşumu

Lezyon ilerledikçe hücre dışında da lipid birikmeye başlar. Ekstraselüler lipidin olası iki kaynağı vardır: Dolaşımdaki LDL'nin doğrudan doğruya intima tabakasındaki proteoglikanlara bağlanması ya da, köpük hücrelerinin ölmesi sonucu depolanmış olan kolesterol esterlerinin açığa çıkması. Hücre dışı lipidin çoğunluğunun bu ikinci yoldan kaynaklandığı kabul edilmektedir.

Köpük hücre oluşumunda rol alan iki hücre tipinin, yani makrofaj ve düz kas hücresinin yaşam süresi bilinmemektedir. Ancak ileri lezyonlarda düz kas hücre proliferasyonunun oldukça sınırlı olduğu gösterilmiştir ki, bu da bu hücrelerin uzun ömürlü olduklarını düşündürmektedir.

Buna karşılık makrofajların aterosklerotik plaklarda çoğaldıkları ve dolaşımdaki monositlerin de sürekli olarak plak içine girdikleri bilinmektedir. Bu yüzden plaktaki makrofaj sayısının kontrolsüz olarak artmasını engelleyen faktörün hücre ölümü olduğu fikri mantıklı görünmektedir. Nitekim ilerlemiş aterosklerozda hücre ölümünün yaygın bir özellik olduğu gösterilmiştir (49).

Makrofajların ölümünde, LDL oksidasyonu sonucunda oluşan peroksitlerin de etkisi olmakla beraber asıl mekanizma 'apoptoz'dur.(49). Apoptozda, Makrofaj Koloni Stimulan Kemotaktik Faktör-1 (MCSF-1) gibi büyüme faktörlerindeki azalmanın yanı sıra TNF- α 'nın rolü vardır. Aktif plakta lipid çekirdek çevresinde metalloproteinaz üreten makrofaj kümeleri vardır, Metalloproteinazlar bağ dokusunun yıkımından sorumludur. Sonuçta oluşan lipid çekirdek, intima tabakasının bağ dokusu yapısı içinde kolesterol ve hücre yıkım ürünleri ile dolu boşluklardır. Bu aşamada lipid çekirdeğin üzerinde henüz fibrotik bir tabaka yoktur.

2.1.3.5. Fibröz başlık (Fibrous Cap) oluşumu

Olgunlaşmış aterom plağında lipid çekirdeğinin üstü fibröz bir başlıkla örtülüdür. Fibröz başlık yoğunlukla düz kas hücreleri ve onların ürettiği bağ dokusundan oluşur.

Lezyonun yaşı ilerledikçe düz kas hücrelerinin sayısı da artar. Düz kas hücrelerinin medyadan göçü ve proliferasyonu, PDGF ve FGF gibi büyüme faktörlerinin uyarısı ile gerçekleşir. Bu faktörler aterogenezde rol alan hemen her hücre tarafından üretilir (50). Aynı faktörler, bu hücrelerin bağ dokusu proteinlerini üretmesini de uyarırlar. Tümör nekroz faktör- β 'da (TNF- β) güçlü bir bağ dokusu yapımı uyarıcısı olmasına karşın, bu güne dek bulunan en güçlü düz kas hücresi proliferasyonu inhibitörüdür. TNF- β , etkinleşmiş makrofaj ve trombositlerden salgılanır. Uyarıcı ve baskılayıcı bu maddeler arasındaki etkileşim, düz kas hücrelerinin proliferatif cevabını belirler.

Bugün artık fibröz başlığın dinamik bir yapı olduğu bilinmektedir. Bir yandan düz kas hücreleri tarafından kollajen yapımı sürerken, diğer yandan proteazlar tarafından sürekli bağ dokusu yıkımı olmaktadır. Bu yapım ve yıkım işlemleri arasında çok sayıda sitokin tarafından kontrol edilen bir denge vardır (47).

Lipid çekirdek ve etrafındaki fibröz başlıktan oluşan ilerlemiş lezyona "fibroaterom" adı verilir. Lipid çekirdek ve fibröz tabakanın lezyondaki miktarı, plağın vulnerabilitesini (zedelenebilirliğini), bir başka deyişle, komplikasyon gelişimine ne kadar açık olduğunu belirleyen esas etkidir (51). Şöyle ki, fibröz başlık ne kadar kalınsa plak o kadar stabil, fibröz başlık ne kadar inceyse, yırtılmaya o kadar yatkın ve dolayısıyla plak da komplikasyona o kadar açıktır (52,53).

Fibröz başlığın yapımında düz kas hücrelerinin rolü düşünüldüğünde, plağın stabilizasyonunda da önemli görev üstlendikleri anlaşılır (51).

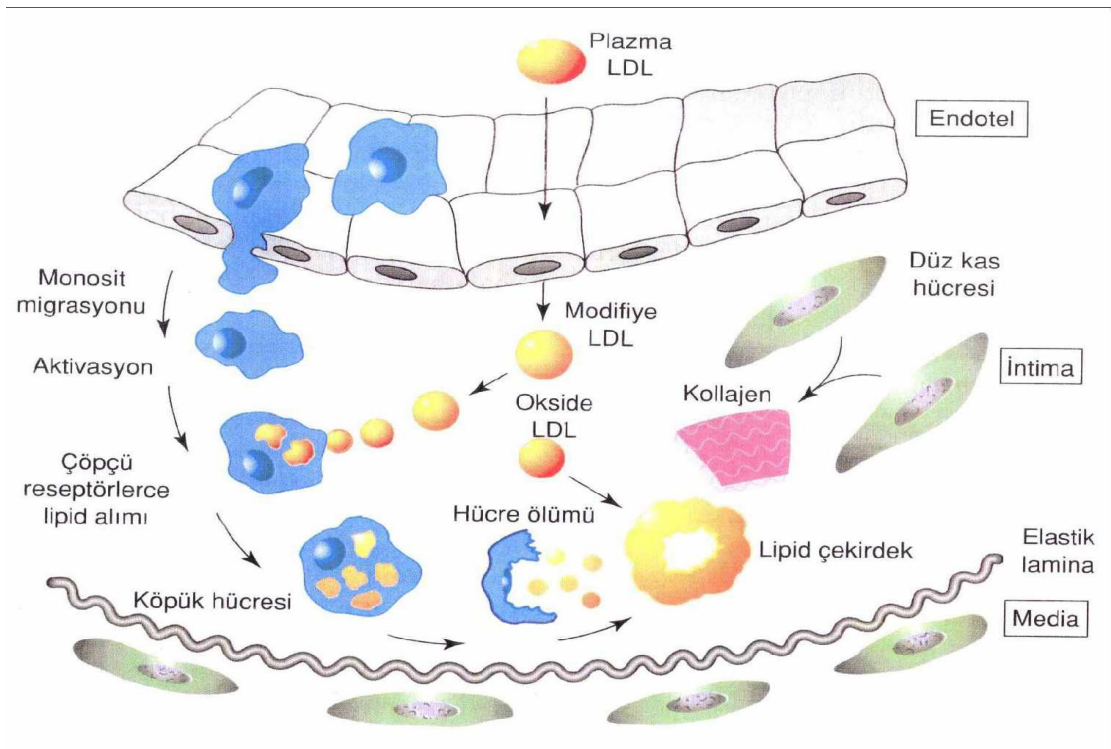
2.1.3.6. İmmun mekanizmalar

Plaklarda T-lenfositlerin bulunduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerin görevi olasılıkla interferon salgılayarak düz kas hücre proliferasyonunu düzenlemektir. B-lenfositler ise plakların yapısında bulunmamalarına rağmen, çevre adventisyada bol miktarda bulunurlar ve okside LDL'ye karşı antikor üretirler. Bu antikorların düzeyi plazmada ölçülerek aterosklerotik olayın aktivite ve yaygınlığı belirlenebilir (54).

2.1.3.7. Plak vaskülarizasyonu

Normal medya damarsız bir yapıdır. Ancak intimal kalınlaşma olduğunda, adventisya tabakasından lezyonun tabanına doğru yönelen yeni damarlanmalar olur. Bu damarlarda yoğun biçimde adezyon molekülü sunumu olduğu gösterilmiştir. Büyük olasılıkla monositlerin lezyona girdikleri bir başka yol da yeni gelişen bu damarlardır (55).

Aşağıdaki şemada temel ateroskleroz süreci özetlenmiştir (56).



Şekil 2.1.3.2. Temel Ateroskleroz Süreci: Plazmadaki LDL intimaya girer, modifiye olur ve endotelde monosit migrasyonu ile sonuçlanan değişiklikleri başlatır. İntimada daha da fazla okside olan LDL, makrofajlar tarafından aktif biçimde alındığında köpük hücreleri oluşur. Makrofaj ölümüyle, lipidler serbest kalarak çekirdeği oluşturur. Endotel hücreleri ve makrofajlar tarafından salınan büyüme faktörleri, düz kas hücresinde büyümeyi ve bağ dokusu matriksinde sentezi uyarırlar.

2.1.4. Ateroskleroz Hipotezini Açıklamaya Yönelik Hipotezler

Aterosklerotik süreci hangi olayın ya da olaylar dizisinin başlattığı bilinmemektedir. Bu süreci açıklamaya yönelik geliştirilen hipotezler içinde en yaygın kabulü **hasara tepki** ("*response to injury*") hipotezi görmektedir. Ross tarafından ortaya atılan bu varsayımda olayları endotel disfonksiyonu başlatmaktadır (57). Metabolik, mekanik, toksik, immünolojik olaylar ile infeksiyonlar endotel disfonksiyonuna neden olurlar.

Bilinen risk faktörlerinin hemen hepsi (sigara, hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi, okside LDL kolesterol) endotelde işlevsel bozukluğa yol açabilir. Disfonksiyon, tek hücre sırasından oluşan bu tabakanın, kan ile damar duvarı arasında bariyer olma özelliğini, seçici geçirgenliğini ve antitrombotik yapısını bozar. Bunun sonucunda gelişen inflamatuvar ve proliferatif olaylar dizisi aterosklerotik plağın oluşmasına neden olur.

Monoklonal hipoteze göre ise, aterosklerotik lezyon içindeki bütün hücrelerin kaynağı tek bir kas hücrelidir. Virüsler, kimyasal ajanlar ve diğer mitojenlerin etkisi ile gelişen hücre transformasyonundan oluşan benign neoplaziler aterosklerotik lezyonu oluşturmaktadırlar (33).

Lipid hipotezine göre, kronik hiperkolesterolemi endotel hücre membranında kolesterol moleküllerinin sayısını artırarak endotel hasarına neden olabilir. Endotelial plazma membranında kolesterol / fosfolipid oranı yükseldiği zaman membran viskozitesi artar. Daha visköz ve daha rijit olan endotelial yüzey, akım değişikliklerinin neden olduğu strese karşı koyamaz. Bu da endotel hücrelerinin birbirinden ayrılmasına, retraksiyonlarına neden olur. Hiperkolesterolemi ayrıca monosit- endotel adezyonunda da değişikliğe yolaçabilir (33). Monositler kan dolaşımından hasara uğrayan endotelin olduğu bölgelerde toplanır. LDL'yi alıp makrofaj morfolojisini alacağı subintimal bölgeye endoteli geçerek girerler. Modifiye olmamış LDL, makrofajlar tarafından ya çok yavaş alınır, ya da alınmazlar. Köpük hücre oluşumunu aktive etmeden önce, bazı modifikasyonlara uğramalıdır. Yakın zamanda ilgiyi çeken modifikasyon, oksidasyondur (58). Endotel hücreleri ve onlara yapışmış monositlerden oluşan mikroçevredeki LDL'nin, bu aktive hücrelerce oluşturulmuş serbest radikallere maruz kaldığı varsayılmaktadır (2).

Hayvanlarda yağ içeriği çok yüksek diyetler vererek ya da lipid metabolizmasında genetik bozukluk olan hayvanlar kullanılarak insandaki aterosklerozun tüm bileşenleri yeniden oluşturulabilmiştir. Bu bulgu ile birlikte insanlarda yüksek lipid düzeylerinin aterosklerozun majör risk faktörü olduğunu gösteren çok güçlü epidemiyolojik kanıtlar birlikte değerlendirildiğinde, hastalığın lipid birikiminin arter duvarında yolaçtığı harabiyete karşı bir yanıt olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (57).

2.1.5. Aterosklerozun Lezyonları

Yağlı çizgi, yaygın intima kalınlaşması ve fibröz plak diye üçe ayrılır (59).

1. Yağlı çizgi: On yaşındaki çocuklarda bile görülebilen ateroskleroz lezyonudur. Makroskopik olarak bakıldığında damar lümeninde sarı alanlar olarak görülürler. Bu görünümü, endotel altında birikmiş olan, içleri yağ damlacıkları ile dolu köpük hücreleri verir. Bu evrede, lipidlerin lezyona girişi ile çıkışı arasında dinamik bir denge vardır. Yağlı çizgilerinin esas hücresel elemanı içi yağ damlacıkları ile dolu köpük hücreleridir. Bir kez köpük hücresi oluştu mu, bunun hangi hücreden kaynaklandığını söylemek güçtür.

2. Yaygın intima kalınlaşması: İntimada, bağ dokusu ile çevrelenmiş düz kas hücrelerinden oluşan bir yapıdır. Makrofajlar, T-lenfositler ve hücre dışı lipid birikintileri öbür elemanlarıdır.

3. Fibröz plak: Ateroskleroz lezyonunun en ileri biçimidir. Kireç içerir ya da trombüs ve / veya hemoraji ile birlikte bulunur ise komplike lezyon'dan söz edilir. Makroskopik olarak beyaz renklidirler. Lümene doğru büyürler ve lümeni kritik düzeyde daraltırlar ise klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olurlar. Mikroskopik olarak bu lezyonda da büyük miktarlarda düz kas hücreleri, makrofajlar ve T-lenfositleri bulunur. Bu evrede medyadan intimaya çekilen düz kas hücreleri bir *fibröz başlık ("fibrous cap")* oluşturmak üzere dizilirler. Fibröz başlığın temel işlevi lümendeki kan ile lezyonun merkezindeki aterojenik lipid çekirdeği birbirinden ayırmaktır. Fibröz başlıktaki düz kas hücreleri ekstraselüler matriks yapma yeteneği olan *onarıcı* fenotiptedir. Bir plakta fibröz başlığı onarma yeteneği bir tek bu hücrelerde vardır (60,61). Fibröz başlıkta düz kas hücrelerinin yanında kollajen fibrilleri, elastin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar bulunur (62). Fibröz başlığın hacminin bütün plağın hacmine oranı, ya da daha basit bir deyiş ile kalınlığı, oluşacak klinik durumları belirlemede en önde gelen etmendir (2).

2.1.6. Ateroskleroz Lezyonlarının Evreleri

Amerikan Kalp Birliği (American Heart Association, AHA) ateroskleroz lezyonlarının tipleri ve evrelerini 1995 yılında yeniden tanımlamıştır. Buna göre lezyonlar ilerleme süreci göz önüne alınarak sekiz tipe ve beş evreye ayrılmaktadır (63).

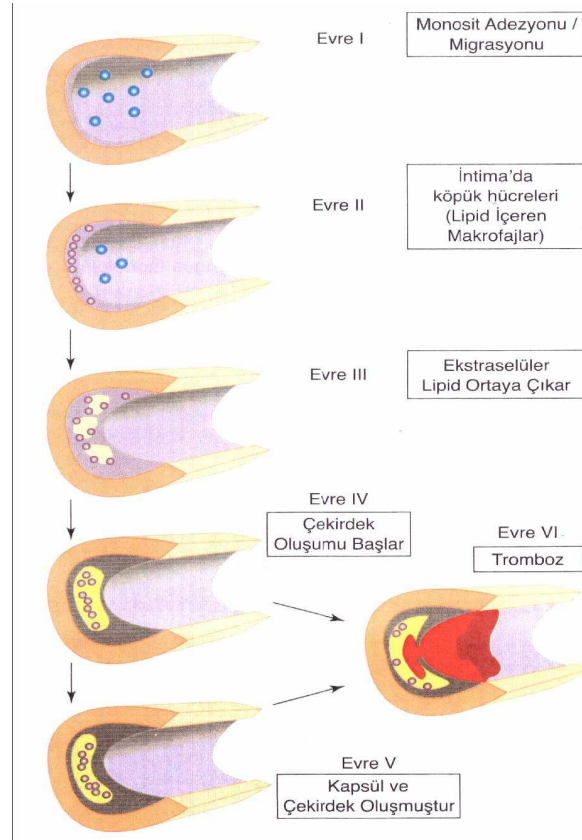
Evre 1: Küçük bir lezyondur ve genellikle 30 yaşın altındaki kişilerde görülür. Yıllar içinde ilerleyebilirler. Tip I-III lezyonlar bu evreye girerler.

Evre 2: Bu evrede artık bir aterom plağı oluşmuştur. Histolojik olarak temel özellikleri birbirine benzeyen bu plakların ille de damar lümenini kritik düzeyde daraltması gerekmez. İntimanın temel yapısı bozulmuştur. Bu bozulmanın başlıca ortak nedeni hücre dışı birikintilerin birleşerek bir lipid çekirdek oluşturması, bu çekirdeğin bulunduğu yerleşimdeki intimanın tüm elemanlarının yerini alması ve sonuç olarak da normal damar intimasına göre daha dirençsiz ve yumuşak bir nitelik kazanmasıdır. Lipid içeriğinin fazla olması nedeniyle bu plak hasar görmeye (komplike olmaya) açıktır.

Evre 3: Hasarlı plak üzerine trombüs oturur. Trombüs, lümeni tam olarak tıkayabileceği gibi küçük de olabilir. Hasarın onarımı ve duvarda oturan trombüsün organize olması sonucunda plağın boyutu büyür ve daha tıkayıcı lezyon tipleri oluşur.

Evre 4: Bu evrede de akut "komplike" olmuş tip VI lezyonlar vardır. Bu lezyonların evre 3'tekilerden farkı duvardaki trombüsün büyüklüğüdür. Tıkayıcı bir trombüstür ve akut koroner sendromlara neden olur.

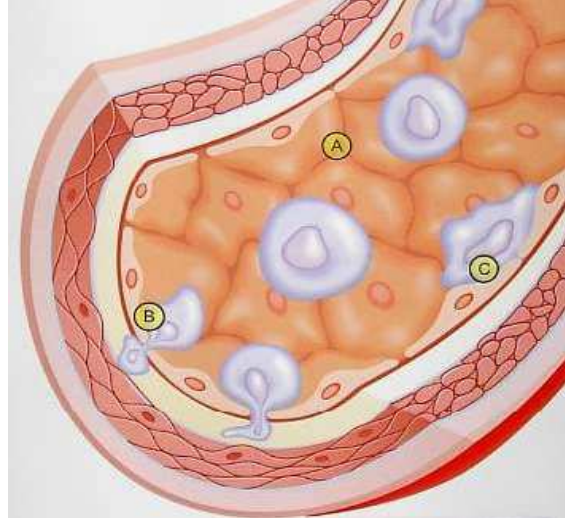
Evre 5: Evre 3 ve 4 ün etkileri bir arada görülür.



Şekil 2.1.6.1. Amerikan Kalp Derneği'ne göre plak evreleri. Şemada hem evrenin derecesi, hem de her evrede rol oynayan faktörler yer almaktadır (56).

2.1.7. Ateroskleroz Lezyonlarının Tipleri

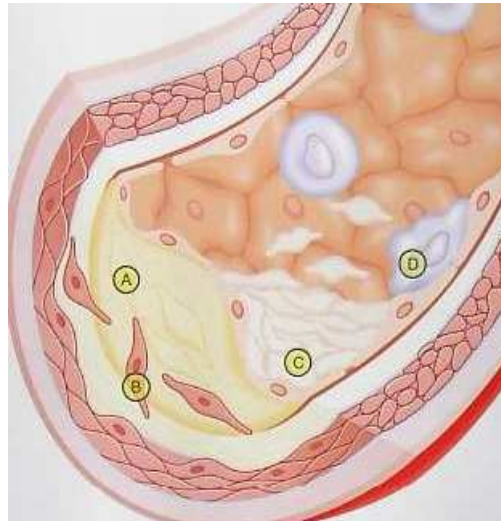
Amerika Kalp Birliği, plak tiplerini gelişimine göre şöyle sınıflamayı önermektedir; ilk lezyon **Tip I**, minör lipid birikimi ve monositlerin endotel yüzeyine yapışıp arter lümeninden intimaya geçmeleriyle oluşan seyrek makrofaj köpük hücrelerinden oluşur (**Şekil 2.1.7.1.**).



Şekil 2.1.7.1. Tip I aterosklerotik lezyonun progresyonu (A endotel geçirgenliği, B lökosit göçü, C lökosit adhezyonu) (64).

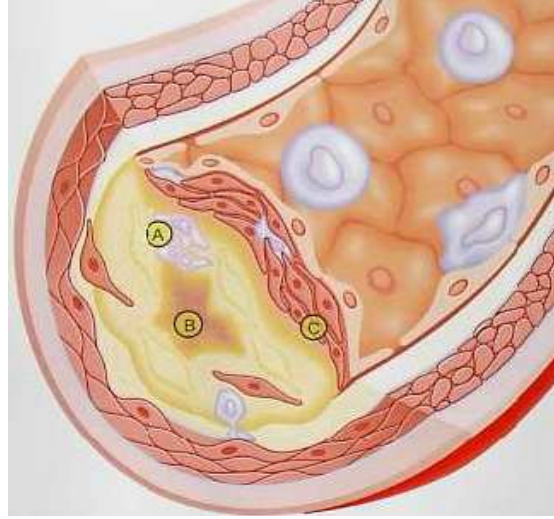
Tip II lezyon, çoğunluğu monosit kökenli olan lipid yüklü köpük hücrelerinin, sağlam endotel altında bölgesel kümelenmesiyle oluşan yağlı çizgilerdir. Bu lezyonlarda az miktarda T lenfositleri, mast hücreleri ve lipidle dolu düz kas hücreleri de vardır (**Şekil 2.1.7.2.**).

Tip III lezyon, ek olarak az miktarda ekstrasellüler lipid kümeleri içerir. Tip I-III lezyonlar daha sonraki lezyonların öncüleri olmasına karşılık klinik semptomaya yol açmazlar.



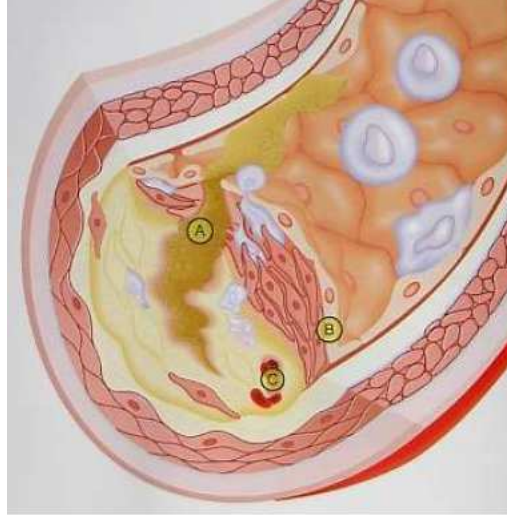
Şekil 2.1.7.2. Tip II aterosklerotik lezyonlarının progresyonu (64). A- köpük hücreleri B- Kas hücresi göçü, C- Trombosit adhezyon ve agregasyonu, D- Lökosit adhezyonu ve girişi.

Tip IV lezyonda ekstrasellüler lipid kümeleri biraraya gelerek bir lipid çekirdek oluşturur. Bu lipid çekirdek inflamatuvar hücreler tarafından çevrelenmiş ve ince bir düz kas hücre tabakası ve bağ dokusu tarafından kaplanmıştır (**Şekil 2.1.7.3**). Tip IV lezyon genellikle yarım ay şeklindedir ve damar duvarı kalınlığını artırır. Bu evrede orjinal lümen çapını korumak için arterde yeniden yapılanma oluşur.



Şekil 2.1.7.3. Tip IV atrosklerotik lezyonların progresyonu (64). A- Makrofaj birikimi, B- Nekrotik çekirdek oluşumu, C- Fibröz tabaka oluşumu.

Tip V lezyonda yoğun bağ doku depolanması vardır ve lipid çekirdeği çevreleyen fibröz bir kapsül oluşur. Çekirdeği lümeden ayıran kapsül kısmı plak başlığıdır. Bu lezyonlar çoğunlukla çok büyüktür ve bu nedenle arter duvarında yeniden yapılanma (remodeling) ile kompensasyon gelişemediğinden lümen daralır. (21,22).



Şekil 2.1.7.4. Tip VI aterosklerotik lezyonların progresyonu (64). A- Plak rüptürü, B- Fibröz plak kalınlaşması, C- Plak kanaması.

Tip VI plaklar çoğunlukla tip V plaklarda gelişen trombozun veya kanamanın komplike ettiği plaklardır. Bu lezyonun gelişmesinin nedeni plak yırtılmasıdır ve subendotelyal fibröz dokuda fissürler, erozyonlar ve ülserasyonlar sık olarak gözlenir (**Şekil 2.1.7.4.**). Akut myokard infarktüsü ve kararsız angina gibi klinik olaylar bir kaç istisna dışında tip VI lezyona bağlıdır.

Tip VII plaklarda yoğun kalsifikasyon vardır.

Tip VIII plaklar ise neredeyse tümüyle kollajen ve düz kas hücrelerinden oluşur. Bu lezyonlar tip V ve VI lezyonlara göre daha stabildir. Bu nedenle tip V ve VI lezyonlar tip VIII lezyona dönüştürülebilirse klinik açıdan büyük bir kazanç elde edilmiş olur. Son zamanlarda statinlerin bu şekilde plak stabilizasyonu sağladığını gösteren çalışmalar vardır (21).

İleri tip IV ve tip V plakların varlığı klinik semptomlara yol açar. Batı toplumlarında hemen herkeste plak bulunmasına karşılık herkeste iskemik kalp hastalığı gelişmez. İskemik kalp hastalığı gelişenlerde risk faktörleri ile plak sayısı ilişkilidir. Sigara, hiperlipidemi, hipertansiyon ve DM gibi faktörler semptoma yol açabilecek plakların sayısını artırır (71). Tip IV ve tip V plakların çoğu koroner anjiyografide görülemeyebilir. Çünkü aterosklerotik bir plağın gerisinde media inceliş ve atrofiye olarak plağın dışarı değil de içeri doğru tümsekleşmesine olanak sağlar. Ayrıca intimal bir plağın gelişmesi, arter duvarının yeniden yapılanmasına ve dış çapın kalınlaşmasına neden olarak plağın lümen boyutlarını etkilemeden yerleşmesine katkıda bulunur. İntravasküler ultrasonografi bu plakların

saptanmasında yardımcıdır (21,22). Tip V plakların hepsinde ortak olarak fibromüsküler bir başlık bulunur. Bu başlık göreceli olarak kalın ve uniform olabilir veya araya giren ince alanlarla kalınlık değişebilir. Lipid çekirdek plak hacminin %10- 70'ini oluşturabilir. İnflamatuvar aktivitenin derecesi de plak heterojenitesinin önemli bir parçasıdır (22).

2.1.8. Semptomları Ortaya Çıkaran Olaylar

Klinik semptomlara üç majör mekanizma yol açar. Birincisi, tromboz koroner akımda ani azalmaya neden olur. İkincisi, tromboz eşlik etmeden plak, lümen çapının efor sırasında akımı azaltacak düzeyde daralmasına yol açacak şekilde büyür. Koroner ateroskleroz olan kişilerde koroner vasomotor tonal yanıtlar normal değildir. Kısmen endotel disfonksiyonu olarak beliren tonustaki kötü kontrol sonucu, eksantrik bir plak bölgesinde bulunan residü normal damar duvar segmentinde bölgesel bir spazm oluşabilir ya da lokal gelişen vasospazm daha yaygın bir hal alabilir (22).

2.1.9. Aterosklerozda Lipid Profili ve Değerlendirilmesi

Kanda total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri yükseldikçe kardiyovasküler risk artar. Yapılan çalışmalar LDL'nin primer aterojenik faktör olduğunu desteklemektedir ve kontrollü çalışmalar LDL'nin düşürülmesinin koroner kalp hastalığı riskini azalttığını göstermiştir (65). Buna göre Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (NCEP), lipid düşürücü tedavide LDL kolesterolünü primer hedef olarak belirlemiştir (66).

Laboratuar hayvanları üzerinde yapılmış birçok çalışma serum LDL ve bununla ilgili lipoprotein seviyelerinin yükseltilmesinin aterogenezi başlattığı ve bu prosesi devam ettirdiğini işaret etmektedir (67). Ayrıca yüksek LDL genetik formlarına sahip insanlar erken aterosklerotik hastalık göstermektedir (68). Sözü edilen her iki örnek de diğer risk faktörleri olmaksızın tek başına yüksek LDL seviyelerinin aterojenik olduğunu saptamaktadır.

Yıllar boyunca LDL'nin esas fonksiyonunun arter duvarında kolesterol depozisyonu olduğu düşünülmüştür. Son zamanlarda LDL'nin proinflamatuvar bir ajan olduğu bulunmuştur; aterosklerotik lezyonun en önemli belirtisi olan kronik

inflatuar cevabı harekete geçirmektedir (69). Yüksek LDL seviyeleri aterosklerozun tüm evrelerinde rol almaktadır; endotel disfonksiyonu, plak formasyonu ve büyümesi, kararsız plak, plak yırtılması ve tromboz. Plazmada yüksek LDL kolesterol seviyelerinin mevcudiyeti LDL partiküllerinin arter duvarında retansiyonunun artmasına, oksidasyonuna ve çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin sekresyonuna neden olur (70). Bu olayların bir sonucu okside LDL tarafından endotel hücre fonksiyonlarının bozulması ve bunun sonucunda nitrik oksid üretiminin azalmasıdır. Yüksek LDL kolesterol seviyelerinin tedavi edilmesi asetilkoline karşı normal vazodilatör cevabın geri dönmesine sebep olur (71,72). LDL ayrıca düz kas hücrelerinin güçlü bir mitojenidir (65).

Farklı populasyonlarda koroner kalp hastalığı riski serum total kolesterol seviyeleri ile pozitif ile ilişkilidir, total kolesterol seviyeleri büyük ölçüde LDL kolesterol seviyeleri ile ilişkilidir (66,73). Serum kolesterol seviyeleri ile koroner kalp hastalığı riski arasındaki ilişki doğrusaldır (73). Düşük total ve LDL kolesterol seviyelerine sahip olan toplumlarda diğer risk faktörleri (sigara içiciliği, hipertansiyon, diyabet) sık olsa bile koroner kalp hastalığı riski düşüktür (68). Sözü edilen son gözlem LDL kolesterol seviyelerinin primer risk faktörü olduğunu öne sürmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilmiş çok sayıda kanıt plazma HDL kolesterol düzeyi ile daha sonra koroner olay gelişme riski arasında güçlü bir ters ilişkinin varlığını göstermektedir (74,75). Bu tersine ilişki hem erkekler hem de kadınlar için geçerli olup, koroner kalp hastalarında da asemptomatik kişiler kadar güçlüdür (31). Ortalama 1 mg/dl HDL kolesterol düşmesi koroner kalp hastalığı riskini % 2-3 artırmaktadır (76).

Koroner kalp hastalığı için düşük (<40 mg/dl) HDL kolesterol seviyelerinin bir risk faktörü, buna karşılık yüksek (> 60 mg/dl) HDL kolesterol seviyelerinin ise koruyucu bir faktör olduğu kılavuzlarda vurgulanmıştır (66).

Epidemiyolojik çalışmalara ilişkin gözlemler, koroner arter hastalığı riskinin belirlenmesinde değişik plazma lipidlerinin bir aradaki etkisini hesaba katmanın önemini ve koroner arter hastalığı riskinin önceden kestirilmesinde plazma total kolesterol / HDL kolesterol oranının yararını vurgulamaktadır. Normal olarak bu

oranın 5'in altında olması istenir ve total kolesterol düzeyleri 200-250 mg/dl olanlarda girişim gereksiniminin belirlenmesinde özel önem taşır (77).

Trigliseridlerle koroner arter hastalığı ilişkisi büyük oranda diyabet, obezite, hipertansiyon, yüksek LDL kolesterol ve düşük HDL kolesterol gibi diğer faktörlerle ilişkilidir (78). Ayrıca, hipertrigliseridemi sıklıkla hemostatik faktörlerle de ilişkili bulunmuştur (79). Ancak yakın zamanda prospektif çalışmaların metaanalizi ile sınır (150-199 mg/dl) ya da yüksek (200 mg/dl'den yüksek) trigliserid düzeylerinin koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (66,80,81).

Daha önce yapılmış çeşitli çalışmalar hipertrigliseridemini çeşitli aterojenik faktörler ile güçlü bir birliktelik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu faktörler arasında aterojenik dislipidemi (artmış serum trigliseridleri, küçük yoğun LDL partikülleri ve düşük HDL kolesterol'den oluşan lipid triadı) ve metabolik sendrom sayılabilir. Bu nedenle, hipertrigliseridemili hastaların tedavisine klinik yaklaşım geniş tabanlı bir stratejiyi gerektirir; yani böyle bir yaklaşım, aterojenik trigliseridlerden zengin lipoproteinlerin azaltılması, lipid triadının düzeltilmesi, ve metabolik sendromun uygun biçimde modifiye edilmesini kapsamalıdır (31).

2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron (e) içeren atom veya moleküllerdir. Oldukça reaktif olup kısa ömürlüdürler. Elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilir (82,83).

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 e-'larından dolayı oldukça reaktiftirler (84,85). İki radikal karşılaştığı zaman çift olmayan e-'larını birleştirirler ve bir kovalent bağ teşkil ederler. Hidrojen atomu eşleşmemiş e-'uyla bir radikaldir ve iki hidrojen atomu diatomik bir hidrojen molekülü oluşturmak üzere kolayca birleşebilirler (86-88).

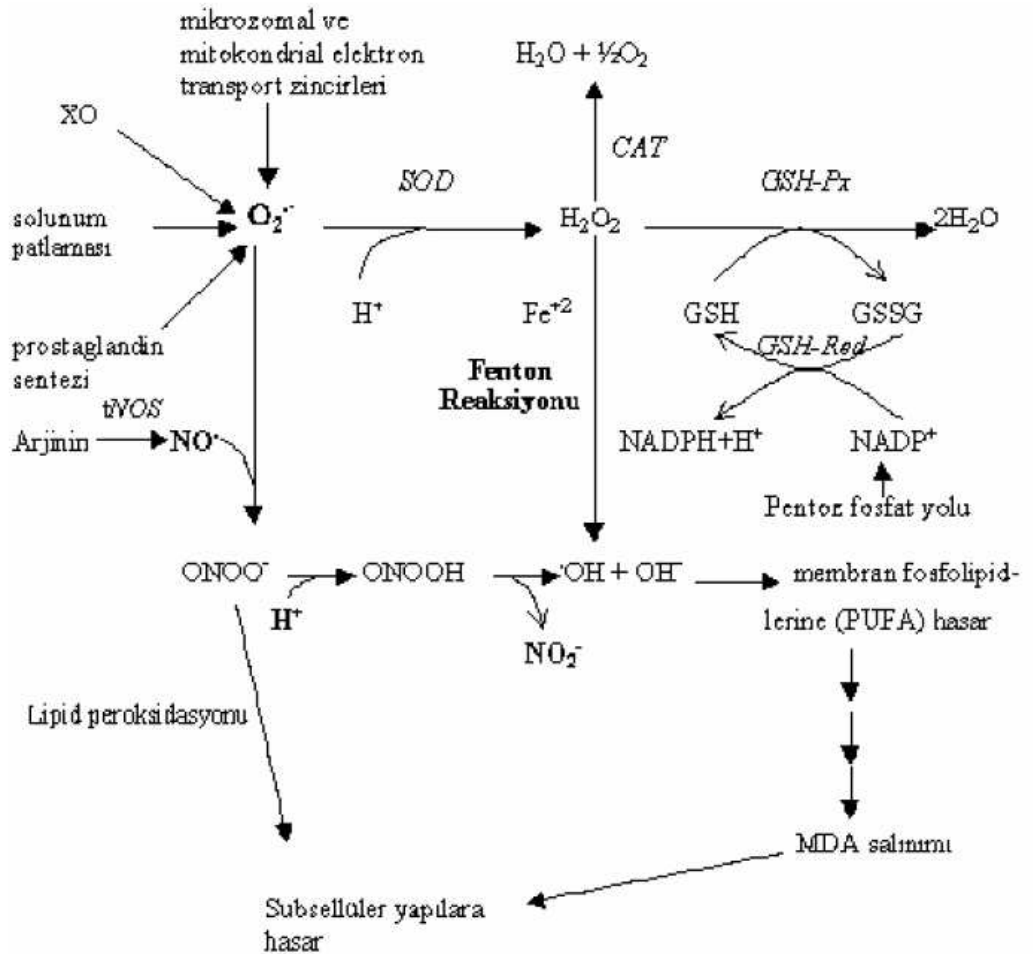
Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış e- 'ları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat reaksiyonları kataliz ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (84,88,89).

Radikaller nonradikallerle bir kaç yoldan reaksiyona girerler. Bir radikal ortaklanmamış e^- 'unu bir nonradikale verebilir (redükte edici radikal) veya bir çift oluşturmak için diğer bir molekülden bir e^- alabilir (okside edici radikal) ya da bir nonradikalle birleşebilir. Bu üç reaksiyon tipinden hangisi ile olursa olsun nonradikal ürün sonunda bir radikale dönüşür (88).

Biyolojik sistemler için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir (O_2). 1924'te O_2 'in eşleşmemiş e^- 'lar içerdiği saptanmıştır. O_2 bir e^- alınca $O_2^{\cdot-}$ oluşur. Eğer iki e^- transfer edilirse oluşan ürün hidrojen peroksittir. H_2O_2 bir radikal değildir, fakat kuvvetli oksidan bir maddedir. İki e- 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 $\cdot OH$ oluşur (86,88).

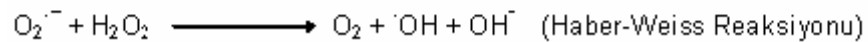
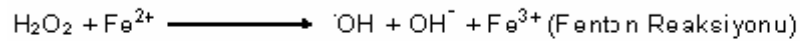
Bu reaktif ara ürünlerinin hepsi radikal olmadığı için sıklıkla hatalı olarak kullanılan “serbest oksijen radikalleri” yerine “reaktif oksijen ürünleri” terimini kullanmak yerinde olur (86).

Mikrozomal ve mitokondriyal e^- transport zincirinden e^- 'ların diffüze olması esnasında, nükleotid metabolizmasında hipoksantin ve ksantin basamaklarında, fagositik hücrelerde solunum patlaması esnasında, araşidonik asid metabolizması esnasında ve argininden nitrik oksit (NO) sentezi esnasında ROS üretilmektedir (Şekil 2.2.1).



Şekil 2.2.1. Reaktif oksijen ürünlerinin kaynakları ve meydana gelen reaksiyonlar

$\cdot OH$ H_2O_2 'in geçiş metalleri varlığında indirgenmesi (Fenton reaksiyonu) ile oluşan son derece reaktif bir radikaldir. Ayrıca H_2O_2 'in $O_2^{\cdot -}$ ile reaksiyonu sonucunda da (Haber-Weiss reaksiyonu) meydana gelir. Haber-Weiss reaksiyonu katalizörsüz çok yavaş olduğu halde Fe^{2+} katalizörlüğünde çok hızlı oluşur.



Reaktif Oksijen Ürünleri	
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit anyon radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$\cdot OH$	Hidroksil radikali
1O_2	Singlet oksijen
$RO\cdot$	Alkoksil radikali
$ROO\cdot$	Peroksil radikali
$Q\cdot$	Semikinon radikali
$NO\cdot$	Nitrik oksit radikali
$ONOO\cdot$	Peroksinitrit radikali

Tablo 2.2.1. Reaktif oksijen ürünleri

2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres; üretilen ROS'nin, sistemin bunları nötralize ve elimine etme yeteneğinin üzerinde üretilmeleri sonucu ortaya çıkan durum olarak tanımlanmıştır (8).

Bu dengesizlik, ürünlerden, dağılımdan veya endojen kaynaklar veya çevresel stresörler tarafından çok fazla ortaya çıkan ROS'ne karşı yetersiz kalan antioksidan kapasitesinin eksikliği sonucu oluşur. Eğer tamamen kontrol edilmezse aşırı miktardaki ROS hücrel lipidlerin, proteinlerin veya DNA'nın hasara uğramasına neden olabilir, bunun sonucunda sinyal iletim yolları ve genellikle normal hücrel fonksiyonlar inhibe olur. Bu nedenle, oksidatif stres, kardiyovasküler ve nörodejenaratif hastalıklar, kanser gibi hastalıkların ve yaşlanma prosesinin ilerlemesinde ilişkili olduğu belirtilmektedir (90).

ROS oksidatif fosforilasyon sırasında enzimlerden ve mitokondriyal elektron taşıyıcılardan elektron sızması gibi hücrel metabolizma sonucu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca fagositik ve non-fagositik hücrelerin hücrel membranlarında veya organellerinde lokalize olmuş diğer hücrel enzimler veya enzim kompleksleri sonucu ROS'in oluştuğu tanımlanmıştır (91).

ROS için ultraviyole ışık ve radyasyon gibi redoks çember ksenobiyotikleri, eksternal kaynaklara örnektir (92,93). Çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin, sinyal bileşenlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin hareket mekanizmalarını kullanarak proteinlerin intrasellüler redoks durumunu ve/veya oksidatif modifikasyonunu değişime uğratarak ROS oluşturduğu bilinmektedir (94).

2.3.1. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Protein oksidasyonu, proteinlerin ROS veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir (95). 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 (96,97). ROS tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, bir dizi bozukluk ve hastalığın etyolojisi ile ilerlemesinde rol oynar (98).

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar PCO oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol gruplarının kaybı, nitrotirozin (NT) ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) oluşumu olarak sıralanabilir (95,99).

ROS ya peptit bağları ile ya da amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar, redoks reaksiyonlarına giren demir ve bakır gibi metal katyonlardan etkilenir. Oksidatif modifikasyona uğramış proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılır ya da çapraz bağlı yüksek molekül ağırlıklı ürünleri oluşturur (15).

Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte, süperoksit anyon radikali, ve süperoksit radikalinin protonlanmış formu olan hidroperoksil (HO_2^{\cdot})'in varlığı da gereklidir. Adı geçen bu reaktif oksijen türevleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile protein fragmentasyonuna neden olur (15,100).

Doymamış bağ ve sülfür içeren aminoasitlerden meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Proteinlerin lizin, arjinin, prolin ve threonin rezidülerinin yan zincirlerinin metal katalizli oksidasyonu protein karbonil türevlerinin oluşumuna yol açar. PCO aynı zamanda α -amidasyon ve glutamil oksidasyon yolları ile polipeptid zincirlerinin uyarılmasıyla da oluşurlar. Protein karbonilleri sadece proteinlerin direkt oksidasyonu ile değil, aynı zamanda indirgeyici şekerler veya poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyon ürünleri ile proteinlerin fonksiyonel

gruplarının etkileşimi ile de oluşabilirler. Böylece protein-protein çapraz bağları da oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda albümin ve immünoglobülin-G gibi çok sayıda disülfit bağları içeren proteinlerin tersiyer yapıları bozulur. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelir (101-102).

ROS'un -SH gruplarının oksidasyonuna da yol açtığı gösterilmiştir (103,104). Sisteinin -SH grubu oksidatif atağa oldukça yatkındır ve -SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan tiil radikali (-S[·]) proteinlerdeki disülfit bağlarının oluşumuna öncülük eder (95). -SH gruplarının disülfitlere ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal aracılı protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir (105). Tiyol gruplarının diğer bir oksidasyon şekli; 4-Hidroksinonenal'in, proteinlerdeki -SH gruplarına Michael reaksiyonu sonucunda tioeter bağıyla bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Michael reaksiyonu geri dönüşümlü bir reaksiyondur (100,105).

2.3.2. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkileri

Hücrelerin reaktif oksijen ürünlerine karşı en hassas komponentleri lipitlerdir. Membran lipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen ürünleri tarafından oksidasyonu lipit peroksidasyonu olarak bilinir (87).

Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. PUFA'nın oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (84). Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipidperoksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer PUFA'yı etkileyerek yeni lipid

radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak hidroperoksidlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder.

Reaktif oksijen ürünleri membranlara yakın bölgelerde ortaya çıktığında membran fosfolipitlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla lipid peroksidasyonu başlar. $\cdot\text{OH}$ radikali çok doymamış yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından bir H uzaklaştırır.

Reaksiyon $\cdot\text{OH}$ radikalini ortadan kaldırır, fakat membranda C merkezli ($\cdot\text{CH}$ -) lipid radikali oluşur. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitleriyle reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H atomuyla birleşerek lipid hidroperoksidlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Araşidonik asit metabolizması sonucu oluşan serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna “enzimatik lipid peroksidasyonu”, diğer radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna ise “non enzimatik lipid peroksidasyonu” denir (87).

Lipid peroksidasyonu sonucunda; konjuge dienler, MDA, 4-hidroksinonenal (4-HNE), akrolein, izoprostanlar ile etan ve pentan gibi alkanlar meydana gelir. Lipid peroksidasyonunun değerlendirilebilmesi için oksidasyon ürünlerinin kantitatif ölçümleri gerekmektedir (106).

Lipit peroksitleri geçiş metalleri katalizi ile yıkıldığında çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. Oluşan aldehitler içinde en çok dikkati MDA çekmiştir. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. Peroksil radikalinin ($\text{LOO}\cdot$) hidrofobik yapıda olması dolayısıyla reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. $\text{LOO}\cdot$ ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlama ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler. Plazma

lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinlerde oksidasyona uğrayabilirler. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler (87).

2.3.3. Malondialdehit

Organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları, mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiotiklerin metabolizması, doğal uyararla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biosentetik ve biokimyasal yıkım olaylarıdır. Serbest radikallerin hücre dışı etkileri hücreler arası boşluk ve sıvılarda ortaya çıkar (149). Özellikle eklem ve beyin omurilik sıvılarında antioksidan savunmanın yetersiz olması nedeniyle, bu bölgelerde serbest radikallere bağlı yıkımın daha fazladır. Serbest radikallerden etkilenen membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda lipid peroksidasyonu gelişir. Oluşan lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşmesi sonucunda gelişen MDA, oksidatif hasarın, sistemik dolaşımda düzeyi saptanabilen dolaylı bir göstergesidir. Malign tümör patogeneğinde ROS'un potansiyel bir rol oynayabileceği bildirilmiştir.

Yaşlanma, koroner kalp hastalıkları ve kanser başta olmak üzere birçok hastalıkta lipid peroksidasyonunun önemli rol oynadığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA doku reaksiyon zincir hızının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. MDA, ROS'nin seviyesinin tesbitinde kullanılan önemli bir göstergedir. Plazma MDA konsantrasyonu enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksid parçalanması sonucu oluşur. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidler veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir (150).

2.4. Antioksidanlar

ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" olarak bilinirler Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de

hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; GSH, membranlara bağlanabilen α -tokoferol ve β -karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir . Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler SOD, glutatyon-S-transferaz, GPx, GSSG-R, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (107).

Memeli hücrelerinde oksidan ürünlere karşı korunma bazı prensipler içinde gerçekleşmektedir. Oksidanların organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması ilk yapılması gereken girişim olmalıdır. İkinci girişim ise ROS 'larla tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları bir yada birkaç basamağında kırmaktır. Üçüncü mücadele yolu, oluşan mediyatörlerle aktive olan inflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunu ve orada aşırı birikimini önlemektir. Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulacak esas girişim ise belirli düzeyi aşmış oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidanlardır. Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır (108).

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutatyon (GSH)	Albümin
Katalaz (CAT)	α -tokoferol (vit E)	Serüloplazmin
Glutatyon peroksidaz (GPer)	Askorbat (vit C)	Transferin
Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGPer)	β -karoten	Ferritin
	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutatyon-S-transferaz (GST)	Ürat	Melatonin
Glutatyon redüktaz (GSSGR)	Bilirubin	Sistein

Tablo 2.4.1. Enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar

Antioksidanlar etkilerini, şimdiye kadar tesbit edilebilen altı değişik mekanizma ile gösterirler (109, 110). Bu mekanizmalar, birbirinden bağımsız veya bir arada işleyebilmektedirler.

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.

2. Hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.

3. Membran lipidlerine direkt etkiyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni baskılayabilir ya da temizleyebilirler (111).

4. Metal iyonlarını bağlamak yoluyla reaktif grupların (OH[·], ferril ya da Fe²⁺/Fe³⁺/O₂ kompleksleri gibi) ve /veya lipid peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler. Membranlarda lipid peroksinin (LPO) oluşumunun başlamasına hangi reaktif ürünlerin neden olduğu tartışılmaktadır, ancak hem başlangıç için ve hem de oluşan lipid peroksitlerinin dekompozisyonu için transiyonel metal iyonlarına ihtiyaç olduğu konusunda genel bir kanı vardır.

5. Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GPx, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.

6. Zinciri kırabilirler yani; zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar için de fenoller, aromatik aminler ve en yaygın olanı α-tokoferol yer almakla birlikte başka lipid solubl zincir kırıcı antioksidanlar da vardır (112).

Bir oksidatif zincirde antioksidanlar, farklı basamaklarda etki gösterirler. LPO oluşumunu yukarıdaki mekanizmalardan ilk dört tanesi ile önleyenler “Koruyucu Antioksidanlar” olarak kabul edilmektedir. Dördüncü mekanizma ile etki edenler reaksiyon sırasında tüketilemezler. Beşinci mekanizma ile etki eden antioksidanlar ise koruyucu olmakla birlikte reaksiyon sırasında kimyasal karakterlerine göre, tüketilebilir ya da tüketilemezler. Altıncı mekanizma ile etki eden zincir kırıcı antioksidanlar ise zincir uzama reaksiyonlarına neden olan radikallerle kompleks yaptıklarından kırma reaksiyonu sürecinde tüketilirler. Burada, özellikle vurgulanması gereken nokta antioksidanların pek çoğunun tek bir mekanizma üzerinden etki etmediği, birden fazla mekanizma ile asıl etkisini oluşturduğudur. Ek olarak oksidatif hasarın hızlı tamiri ki bu, peroksidize yağ asitlerinin membran lipidleri arasından temizlenmesi şeklinde olur, LPO’nu yavaşlatabilir. Membrandaki yapısal değişiklikler de peroksidabiliteye etki edebilir. Antioksidanlar sadece lipidlerin değil, belki okside olmaları çok daha zararlı olabilen DNA ve proteinlerin de korunmasında etkindirler (112-114).

Bu mekanizmalar normal biyokimyasal olaylar sırasında az miktarda oluşan radikalleri nötralize edebilirler. Ancak hiperoksi, iskemiden sonra reperfüzyon, dokularda reaktif oksijen radikalleri oluşturan ksenobiyotiklere maruz kalma ve bu radikalleri bol miktarda oluşturan aktive edilmiş nötrofillerle diğer fagositlerin

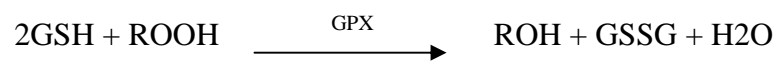
dokuda toplanması gibi durumlar oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına, antioksidan mekanizmaların tükenmesine (deplezyon) ve sonuçta sitotoksik radikal etkinliğinin artmasına bağlı olarak hücre zedelenmesine ve ölümüne yol açar (115).

SOD, süperoksidin hidrojen peroksid'e dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir. Memeli hücrelerinde SOD'ın üç tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilki sitozolde ve mitokondrial membranın iç bölümünde bulunan dimerik yapıdaki sitozolik bakır-çinko süperoksit dismutaz (Cu-Zn SOD) enzimidir. İkinci izomer ise mitokondrial matrikste ve kısmen stoplazmada fonksiyon gösteren mitokondrial mangan süperoksit dismutazdır (Mn-SOD). Ayrıca 1982 yılında glikoprotein yapısında olan ekstrasellüler SOD (EC-SOD) tanımlanmıştır.

Süperoksit radikallerinin dismutasyonu ile ya da direkt olarak oluşan hidrojen peroksit ise GPx ve CAT enzimleri tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir. Normal koşullarda hücrede oluşan hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda esas olarak bir selenoenzim olan GPx fonksiyona sahiptir. CAT'ın hidrojen peroksit oluşumunun arttığı durumlarda önemli etkinliğinin olduğu kabul edilmektedir.

SOD, GPx ve CAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitamini de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir. Her ikisi de hücre membranlarındaki lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır. Bu nedenle hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan minör olarak enzimler, major olarak E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin, seruloplasmin, albumin, bilirubin, p-karoten, ürik asit, glukoz, sistein, trakeobronşial mukus ve α -1 antitripsin sorumludur (108).

Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GPx, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur. Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutatyon (GSSG), GSSG-R'ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür (84).



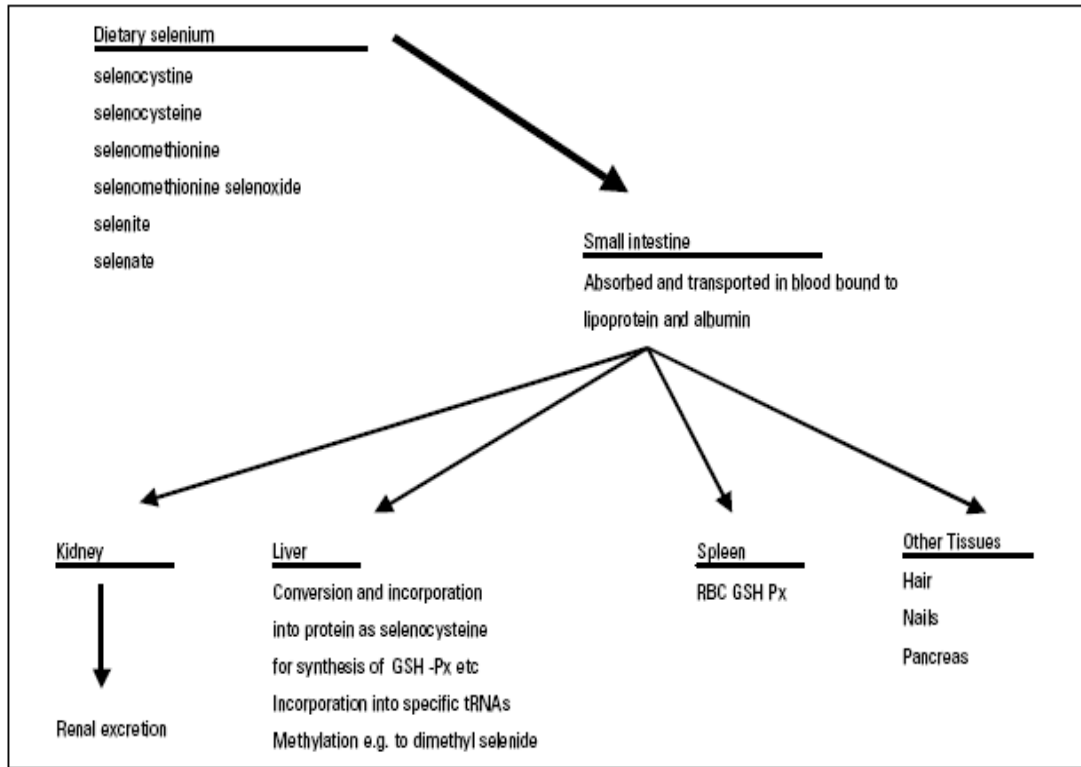
2.4.1. Selenyum

Selenyum (Se), 1957’de memeli biyokimyasında rolü olduğu tanımlanan bir eser elementtir. Bununla birlikte, selenyumun insan beslenmesi için gerekli olduğu, 1979 yılında Çinli araştırmacıların Çin’in Keshan coğrafik bölgesinde düşük selenyum konsantrasyonu ile Keshan hastalığı arasındaki ilişkiyi keşfedinceye kadar bilinmiyordu. Keshan hastalığı konjestif kardiomyopatidir ve primer olarak 2-10 yaş arasındaki çocuklarla premenapozal kadınları etkilemektedir.

Selenyum çok sayıda biyolojik fonksiyona sahiptir ve en önemlisi antioksidan etkisidir. Bu etkisi, selenosistein formunun tiyoredoksin (Txn) redüktazlar ve GPx’ların aktif sitesinde bulunmasındandır. Düşük selenyum durumunda bu enzimlerin aktivitesi bu nedenle azalmaktadır. Txn redüktazlar ve GPx’lar protein seviyelerinin azalmasından da etkilenmektedir fakat bu etkilenme daha ziyade içerdiği selenyum miktarıdır (116-118).

2.4.1.1. Selenyum Biyokimyası ve Metabolizması

Selenyum metabolizması diyetdeki formundan etkilenmektedir (Şekil 2.4.1.1.). Memelilerde inorganik ve organik selenyumun her ikisi de gıda gibi değerlendirilmektedir. İnorganik selenyum (selenit ve selenat) selenide indirgenmektedir. Organik selenyum ise selenosistein ve selenometiyonin olarak bulunmaktadır. Bu aminoasitler beta-liyaz tarafından selenide metabolize olmaktadır ve daha sonra selenoproteinlerin sentezinde kullanılmaktadır. Hidrojen selenid boşaltım pathwayine de girebilir ve mono- di- veya tri-metilasyona uğrar. Tri-metilasyona uğramış form temel boşaltım ürünüdür ve idrarda bulunur (119).



Şekil 2.4.1.1. Selenyum Metabolizması (119)

Kompleks bir reaksiyon kaskadı ile selenat ve selenit gibi inorganik Se bileşikleri organik forma dönüştürülür (120). Hidrojen selenit (H_2Se), selenitin (SeO_3^{2-}) glutatyonla birleşerek selenoglutatyon ($GS-Se-SG$) ve glutatyon selenopersülfid ($GS-SeH$) oluşumunda merkezi bir rol oynar. H_2Se 'e genellikle sistein sentaz tarafından selenosistein (Sec) biyosentezi için substrat, selenofosfat sentaz tarafından selenofosfat ($H_2SePO_3^-$) transformasyonu için bir molekül gibi bakılmaktadır ve her ikisi de selenoproteinlerin biyosentezi için gereklidir. (121, 122)

25 ökaryotik selenoprotein tanımlanmıştır (123). Bununla birlikte 30 ile 50 arasında memeli selenoprotein olduğu düşünülmektedir. Selenoproteinlerin yaşamdaki önemi Sec -tRNA Sec geni eksik farelerin erken embriyonik ölümü ile gösterilmiştir. Bilinen selenyum içeren proteinler 3 gruba ayrılmıştır (124).

- i) Proteine spesifik olarak katılmamış Se içerenler
- ii) Proteine spesifik olarak bağlanmış Se içerenler
- iii) “doğru” selenoproteinler, genetik olarak selenosistein şeklinde kodlanmış Se içerenler.

Selenoproteinlerin çeşitli biyolojik proseslerde kritik rol oynadığı bilinmektedir ve bunların birkaçı antioksidan savunma ile ilgilidir. Örneğin 4 glutatyon peroksidaz arasında sitozolik glutatyon peroksidaz ilk tanımlanan selenoproteindir ve hücreleri hidrojen peroksidi, serbest yağ asit hidroperoksitleri ve fosfolipid hidroperoksitleri azaltarak hücreyi peroksidatif hasara karşı korur (125, 126). Üç üyeden oluşan deiyodinaz ailesinin tiroid hormonlarının aktivasyon ve inaktivasyonlarını katalizlemelerindeki rolleri ve dokulardaki farklı dağılımları göz önünde tutulmaktadır (127).

Tiyoredoksin redüktaz, tiyoredoksin ve diğer substratları azaltarak hücrel redoks homeostazisini sağlamaktadır (128). Selenoproteinlerden fonksiyonu bilinmeyen veya çok az keşfedilenler kardiyak veya iskelet kasında gösterilen Selenoprotein W (SelW)' dir (121). Selenoprotein P' nin antioksidan fonksiyonunun yanında hepatik selenyumu hedef hücrelere dağıtan bir mil görevi üstlendiği düşünülmektedir (129).

2.4.1.2. Selenyumun Klinik Önemi

Selenyum çeşitli türde yiyeceklerle alınmaktadır ve günlük alınması gereken miktar 50-70 µg/gün'dür. Hayvan dokularında proteinle birleştiğinden et ve et ürünleri ile deniz yiyecekleri güvenilir diyet kaynaklarıdır. Tahıl ve tohumlar da yetiştiği toprağın selenyum içeriğine bağlı olarak çeşitli miktarlarda selenyum içermektedir. Toprakta yetişen çeşitli otlarla beslenen hayvanların ve etlerinin selenyum içeriği de toprağın selenyum içeriğine bağlıdır (116,130,131).

İnsanlarda selenyum eksikliği nadir olmakla beraber sadece çok düşük (20 µg/gün'den daha az) selenyum miktarında görülürken ılımlı selenyum eksikliği daha geneldir ve genellikle düşük selenyum içeren topraklarda ortaya çıkması beklenir (116,130,132). Bununla birlikte ılımlı selenyum eksikliğinin kardiyovasküler hastalık, kanser, diabetes mellitus, karaciğer hastalığı gibi bazı hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (117,130).

Selenyum eklenmesi, selenosistein içeren enzimlerin in-vivo ve in-vitro koşullarda aktivitesinin up-regülasyonu için transgenik hayvanların jenerasyonu veya gen transfeksiyonu aracılığıyla genetik modifikasyonundan daha kolay, ucuz ve pratik bir metottür. İnsan ve hayvanlarda eksiklik ve toksisiteye neden olabilecek

konsantrasyon aralığı dar olduğundan selenyum toksisitesine neden olmadan Txn redüktaz ve GPx'ların aktivitesini artırmak için diyete eklenmesi gereken optimal selenyum miktarı kritiktir (116,117).

2.4.1.3. Selenyum ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıkların etiolojisinde Se'un önemi araştırmaların 20 yıldan fazla sürmesine rağmen halen kesin değildir. Düşük Se alımı ile koroner kalp hastalığı riskinin artması arasındaki bağlantı üzerine kanıtlar zayıftır. Bununla birlikte marjinal Se eksikliği kolaylıkla gözlenebilir. Çeşitli ekolojik/epidemiyolojik çalışmalarda bozulmuş selenyum durumunun önemi araştırılmıştır (133).

Çeşitli çalışmalarda, akut miyokardiyal infarktüs (MI), konjestif kalp yetmezliği kardiyomiyopati, hipertansiyon, kronik kalp hastalığı, iskemik kalp hastalığı ve ateroskleroz gibi farklı kardiyopatili hastaların serum veya plazma selenyum konsantrasyonlarında anlamlı azalma gösterilmiştir. Selenyum seviyesinin etiolojik faktörler veya biyolojik sonuç olarak azalıp azalmadığı tam olarak aydınlatılamamışsa da selenyum eksikliğinin bu durumları artırma riski bilinmektedir. Selenyum eksikliğiyle birlikte oluşan GPx ve Txn redüktazın azalmış antioksidan aktivitesi de göz önünde tutulması gereken bir diğer faktördür. Selenyum eksikliği bu nedenle iskemi-reperfüzyon hasarla bunu takiben akut miyokardiyal infarktüs, koroner bypass ameliyatı, kalp nakli ve koroner anjiyoplastiye neden olabilmektedir. Aynı yönde, selenyum ilavesinin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı kardiyokoruyucu olabileceği Toufektsian ve ark., Poltronieri ve ark. ve Sinci ve ark. tarafından gösterilmiştir (117,132,134-136). 46 hastayla yapılan küçük bir çalışmada da selenyum eklenmesinin (400 µg/gün, 7 gün boyunca) hastalar üzerinde kalp ameliyatı gereksinimini azalttığı gösterilmiştir. İlginç olarak bu çalışmada aynı zamanda selenyum eklenen hastalarda glutatyon peroksidaz mRNA ekspresyonunun arttığı da rapor edilmiştir (137).

2.4.2. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidazlar çoğu dokuda eksprese olan selenosistein içeren enzimlerdir. Günümüzde 5 GPx izoenzimi tanımlanmıştır; Sitolik ve mitokondriyal GPx (GPx1) 1957'de memelilerde ilk tanımlanan selenoproteindir ve her yerde eksprese

olduğu belirtilen bu enzim hücre sel defansta hidroperoksitlere karşı merkezi bir rol oynar. Fosfolipid hidroperoksit GPx (GPx-4 veya PHGPx) ilk defa 1982'de tanımlanmıştır ve çoğu dokuda bulunmaktayken gastrointestinal GPx (GPx-2) ve ekstraselüler/plazma GPx (GPx-3) sırasıyla gastrointestinal sistemde ve plazmada lokalize olmuştur. GPx-5 selenyum içermeyen bir GPx'dır ve spesifik olarak fare epididimisinde eksprese olmaktadır (138-140).

Bütün GPx izoenzimleri hidrojen peroksit ve alkil hidroperoksitleri indirgemektedir ancak hepsinin hidroperoksit substratları için özgülükleri farklıdır. Hidroperoksit substratlarının GPx tarafından redüksiyonu için önerilen katalitik mekanizma aktif bölgesi olan selenolatın selenoik asite oksidasyonudur. Bu sonuçlar GPx'in inaktif durumda oksidize olduğunu, aktif duruma rejenerasyonu için GSH'un gerektiğini göstermektedir. Glutasyon katalitik merkeze çok yakın iki arginin rezidülerini bağlar, bunun amacı sisteindeki SH gruplarının oksidize selenyum (selenik asit) yönüne doğru yaklaşmasıdır ve sonuçta selenosülfite köprü biçimini alırlar. Bu köprü, selenolat ve indirgenmiş (aktif) GPx rejenerasyonu için ikinci bir GSH molekülüyle ayrılmaktadır. Bu proseste iki molekül GSH glutasyon disülfite (GSSG) oksidize olur. Bu iki molekül olan GSSG, NADPH'dan elektron kullanan GR tarafından tekrar indirgenmiş hali olan GSH'a dönüşürler.

NADPH indirgenmiş ekivalentleri heksoz monofosfat şaftında glukoz-6-fosfat oksidasyonu aracılığıyla meydana gelir (139,141-144).

2.4.3. Glutasyon

Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan glutasyon hemen hemen bütün hücrelerde, oldukça yüksek konsantrasyonlarda mevcuttur. İlk kez 1921 yılında Hopkins rafından keşfedilmiştir. İlk önceleri glutamil-sisteinden ibaret bir dipeptid olduğu zannedilmiştir. Fakat 1929 yılında kristal halinde elde edildikten sonra yapısının tripeptid olduğu anlaşılmıştır. 1935 yılında ise Harrington ve Mead tarafından δ -L-glutamil-L-sistein- glisin halinde sentez edildiği gösterilmiştir (145).

GSH, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez 2 basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutasyon sentetaz, glisin

ve γ -glutamil-sisteinden glutasyonu oluşturur. GSH negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP hidrolizi gerekir. GSH sürekli olarak hücreler tarafından kullanıldığından, sentezinin inhibisyonu hızlı tükenmesine yol açabilir (146). İndirgenmiş glutasyon, serbest bir sülfidril gurubu içeren bir tripeptiddir. İndirgenmiş durumda hemoglobin ve eritrosit hücre proteinlerinin sistein artıklarını muhafaza eden bir sülfidril tamponu olarak hizmet eder. İndirgenmiş glutasyonun, oksitlenmiş forma oranı normalde yaklaşık 500/1'dir. İndirgenmiş form H_2O_2 ve organik peroksitlerin sebep olduğu detoksifikasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynar (145).

GSH aynı zamanda GPx'lar (selenyum içeren ve diğerleri) için substrat olabilir. GSH askorbatın yanı sıra birçok hücrenel komponentin indirgenmesinden de sorumlu olan bir yapıya sahiptir GSH'in eritrositlerin normal hücre yapısının korunması ve hemoglobindeki demirin ferro durumunda tutulması için de gerekli olduğu ileri sürülmektedir. Daha düşük düzeyde indirgenmiş glutasyon içeren hücreler, hemolize daha hassastır. Eritrositlerdeki GSH konsantrasyonu bir çift otozomal allel gen tarafından düzenlenmektedir ve yüksek düzeydeki glutasyonu (GSHH) kontrol eden genin, düşük düzeydeki glutasyonu (GSHh) kontrol eden gene karşı dominant olduğu ileri sürülse de temel gen etkisi çevre ve diğer genetik faktörlerin etkisi altındadır.

GSH doğadaki en bol ve her yerde bulunan küçük organik moleküllerden biridir. Nerdeyse tüm yaşayan hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bu endojen antioksidanın birçok önemli fonksiyonel rolü olduğu birçok defa incelenmiştir. Ksana biotikler, karsinojenler, serbest radikaller ve lipid peroksidler gibi birçok endojen ve ekzojen maddelerin detoksifikasyonu, intraselluler indirgenme reaksiyonlarında, kataliz olaylarında, metabolizmada ve aminoasitlerin transportunda, protein yapılarının ve fonksiyonlarının korunması, protein sentezinin ve yıkımının düzenlenmesi, oksidatif zarara karşı koruma ve immun fonksiyonun korunması bu rollerden bazılarıdır.

Kanser, diyabet, kalp hastalıkları alkolik karaciğer hastalığı, katarakt, AIDS ve Parkinson hastalığı da dahil olmak üzere bir çok dejeneratif durumunun ve hastalığın patogeneğinde bozulmuş GSH statüsü gösterilmiştir.

GSH in ayrıca serbest radikallerin genotoksik etkilerine karşı koruduğu düşünölmüştür. Oksidatif ve serbest radikaller, radyasyona bağlı mutasyon oluşumu ve karsinogenezde de önemli faktör olduğu düşünölmüştür. Glutasyon, GSH peroksidazlar, GSH disulfat reduktazlar ve yardımcı NADPH saptayıcı reaksiyonlar ile beraber hücredeki oksidatif stres ve serbest radikal hasarında savunmada anahtar rol oynar (147).

GSH içerdđi tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur, GPx isimli enzimin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda; çeşitli stres faktörleri, ROS oluşumunu hızlandırdığı ve lipid peroksidasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir. ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar oksidan stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidan stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir (145). Oksidan stres sonucunda artan ROS oluşumunun hücre hasarlarındaki etkileri bilinmektedir. Bu ürünlerin detoksifikasyonu, glutasyonun indirgenmiş formunun oksitlenmiş dimer formuna dönüşümü ile sağlanmaktadır.

Hücre yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında, GSSG oluşumu metabolik sınırını aşmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. Detoksifiye olamayan oksidanlar membran lipidlerinin ve hücrenin çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca GSSG'nin kendisi de, proteinlerin sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girerek kalıcı zararlı etkiler meydana getirmektedir (148).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Denekler

Çalışma, A.K.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kardiyoloji Bölümü tarafından koroner anjiyografi endikasyonu konan ve koroner anjiyografi yapılan 59 hasta üzerinde yapılmıştır. Olguların 21'i kadın (% 35,59) ve 38'i erkek (% 64,41) iken; ortalama yaş 58.20 ± 12.64 'dür. Kontrol grubu, koroner anjiyografi sonucu normal olan 12'si kadın (% 63,16) ve 7'si erkek (% 36,84) 19 (yaş ortalaması: $56,50 \pm 10,50$) kişiden oluşmaktadır.

Hastaların ve kontrol grubunun venöz kanları anjiyografi öncesi aç karına düz ve EDTA içeren iki tüpe alındı. Alınan kan örneklerinden hazırlanan serum, plazma ve eritrosit paketleri testler çalışılincaya kadar -20°C de saklandı. Hastalar tıkalı damar sayısına göre 3 gruba ayrıldı.

- I. grup bir damarı tıkalı olanlardan (n= 21)
- II. grup iki damarı tıkalı olanlardan (n= 18)
- III. grup üç damarı tıkalı olanlardan (n= 20)

oluşturuldu.

MDA, protein karbonil grupları, GSH, GPx ve GSSG-R ölçümlerinde Shimadzu UV-1601 spektrofotometresi, total protein SH grubu ölçümünde Biotech Trinity Elisa okuyucu cihazı kullanıldı. Lipid paneli ölçümü Roche-Hitachi Modular P800 otoanalizöründe yapıldı.

3.2. Biyokimyasal Analiz

3.2.1. Plazma MDA Düzeylerinin Ölçümü

Plazma MDA düzeyleri Ohkawa ve ark. yöntemine göre ölçüldü (151).

Prensip:

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

Reaktifler:

- | | |
|-----------------------------|--------------|
| ➤ Potasyum fosfat tamponu | 0,1 M pH 7,4 |
| ➤ Sodyum dodesil sülfat | % 8,1 |
| ➤ Asetik asit | % 20 pH 3,5 |
| ➤ Thiobarbütirik asit (TBA) | % 0,8 |

Prosedür:

Plazma MDA düzeyinin ölçümü için, 200 µl numune üzerine, 100 µl sodyum dodesil sülfat, 750 µl asetik asit, 750 µl TBA solüsyonu ve 300 µl distile su eklenerek 95⁰C de 60 dk kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 500 µl distile su ve 1500 µl n-bütanol eklendi ve karıştırılıp, 10 dk 4000 rpm de santrifüj edildi. Üst tabakadaki rengin absorbansı reaktif körüne karşı 523 nm dalga boyunda okutuldu.

Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan'ın 4,173 µmol/l 'lik çözeltisi kullanıldı. MDA düzeyleri plazmada nmol/L olarak ifade edildi ve aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

C_N : Numunenin konsantrasyonu

A_N : Numunenin absorbansı

A_S : Standartın absorbansı

C_S : Standartın konsantrasyonu

3.2.2. Plazma Protein Karbonil Grupları Tayini

Plazma protein karbonil grupları Levine ve ark. modifiye spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (152).

Prensip:

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

Reaktifler:

- | | |
|----------------------------|----------|
| ➤ DNP | 10 Mm |
| ➤ HCl | 2 N |
| ➤ Trikloroasetikasit (TCA) | %10, %20 |
| ➤ NaOH | 1 M |

Prosedür:

500 µl numune 500 µl numune %20 TCA ile karıştırıldı. 4000 rpm' de 15 sn kadar santrifüj edilip süpernatant döküldü. Pelet, 500 µl DNP ile karıştırılıp, 1 saat karanlıkta, oda ısısında bekletildi. Her 10 dk da bir vortelenerek peletin DNP ile muamelesi sağlandı. Daha sonra 500 µl %20'lik TCA ile karıştırılıp 2-3 dk oda ısısında bekletildi. 4000 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü ve aynı işlem % 10'luk TCA ile üç kez tekrarlandı. Presipitat 2 ml 1 M NaOH içinde 37⁰C de 30 dk bekletilerek çözüldü. Numunenin absorbansı NaOH körüne karşı 360 nm dalga boyunda Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde okutuldu.

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

3.2.3. Plazma Total Protein –SH Grupları Tayini

Plazma –SH grupları Koster ve ark. spektrofotometrik metoduna göre belirlendi (153).

Prensip:

Protein –SH grupları, 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) tarafından indirgenir ve disülfit bağı oluşturularak bir kromofor (5-merkapt-2-nitrobenzoik asit) açığa çıkarılır. Oluşan kromoforun absorbansı 412 nm dalga boyunda okunmaktadır.

Reaktifler:

- | | |
|---------------------------|--------------|
| ➤ DTNB | 2 mM |
| ➤ Potasyum fosfat tamponu | 0,1 M pH 7,4 |
| ➤ Sodyum sitrat | %1 |

Prosedür:

10 µl numune üzerine 150 µl numune fosfat tamponu eklendi, 40 µl DTNP (%1 sodyum sitrat içinde) ilave edildikten sonra 5 dk 37⁰C de bekletildi. Numunenin absorbansı 412 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı Biotech Trinity cihazında okundu.

Glutasyon ile kalibrasyon grafiği çizdirilerek SH konsantrasyonları belirlendi.

3.2.4. Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması

EDTA'lı tüplere toplanan kan 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan plazma ve beyaz küre tabakası aspire edildi. Ardından eritrosit % 0.9'luk NaCl solüsyonu ile 3 defa yıkandı. Her yıkama sonrası 3000 rpm'de 10'ar dakika santrifüj edildi. Her santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek atıldı. Hazırlanan eritrosit paketinden 50 µl alınıp bir başka tüpe aktarıldı. Yıkanan eritrositler soğuk bidistile su ile 2 ml'ye tamamlandı. Vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra + 4°C'de 15 dakika bekletildi.

3.2.5. Hemolizat hemoglobin tayini**Prensip :**

Drapkin çözeltisinde bulunan ferrisiyanür Hb'deki +2 değerlikli demiri (ferro= Fe^{2+}) +3 değerlikli demire (Ferrik= Fe^{3+}) çevirerek methemoglobine dönüştürür. Sonra potasyum siyanür ile birleşerek stabil bir molekül olan siyanmethemoglobin meydana gelir. Siyanmethemoglobinin 540 nm'de ölçülen absorbansı hemoglobin ile doğru orantılıdır (154).

Drapkin Reaktifi:

- | | |
|---|---------|
| ➤ Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$) | % 1 |
| ➤ Potasyum Ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$) | % 0.2 |
| ➤ Potasyum Siyanür (KCN) | % 0,05 |
| ➤ Distile Su | 200 ml |
| ➤ Buzlu su | 1000 ml |

Prosedür:

Hazırlanan hemolizattan 10 µl alınarak tüpe alındı, üzerine drapkin reaktifinden 3 ml eklendi ve tüpler iyice çalkalanıp 15 dk oda ısısında bekletildi. Standart olarak kontrol kanı, kör olarak drapkin çözültisi kullanılarak tüm örnekler 540 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.2.6. Eritrosit Redükte Glutasyon Düzeylerinin Ölçülmesi

Eritrosit GSH düzeyleri spektrofotometrik olarak Beutler yöntemi ile belirlendi (155).

Prensip:

Eritrositteki GSH'ın SH grupları bir disülfid kromojeni olan DTNB'i indirgemesi ile sarı renkli bir bileşik oluşur. Bu bileşiğin 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbansı GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Reaktifler:

- Çöktürücü solüsyon (Proteinsizleştirme çözültisi)
 - o Metafosforik asit 1,67 g/dl,
 - o EDTA 0,2 g/dl
 - o NaCl 30 g/dl
- Na₂HPO₄ çözültisi 0,3 M
- DTNB 2 mM
- Sodyum sitrat % 1

Prosedür:

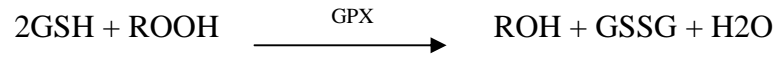
Eritrosit GSH'ı için 0,1 ml eritrosit numuneleri üzerine 1,9 ml distile su ve 3 ml çöktürücü solüsyondan (1,67 g/dl metafosforik asit, 0,2 g/dl EDTA ve 30 g/dl NaCl içeren) eklenerek karıştırıldı. 5 dakika oda ısısında bekledikten ve renk kıvamına geldikten sonra süzgeç kağıdından süzülerek filtrat elde edildi. 0,4 ml filtrat üzerine 2 ml 0,3 M Na₂HPO₄ çözültisi ve 0,5 ml 40 mg/dl DTNB (%1'lik sitrat içerisinde çözülen) ile muamele edilerek oluşan rengin absorbansı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 412 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı okundu. Tam kan GSH düzeyleri µmol/g Hb olarak ifade edildi.

3.2.7. Eritrosit GPx Düzeylerinin Ölçülmesi

Eritrosit GPx düzeyleri Randox (Randox Laboratories Ltd., United Kingdom) kiti ile ölçüldü.

Prensip:

GPx, glutatyonun kümen hidrojenperoksitle oksidasyonunu katalizler. Ortamda bulunan GSSG-R okside glutatyonu hemen redükte forma dönüştürür. Bu sırada ortamdaki NADPH, NADP⁺'ye oksitlenir. NADPH'ın absorbanstaki azalış 340 nm de izlenir.



Reaktifler:

- Reaktif
 - Glutatyon 4 mmol/L
 - Glutatyon Redüktaz $\geq 0,5$ U/L
 - NADPH 0,34 mmol/L
- Tampon
 - Fosfat Tamponu 0,05 mol/L, pH 7,2
 - EDTA 4,3 mmol/L
- Kümen Hidrojenperoksit 0,18 mmol/L
- Dilüent

Prosedür:

Eritrosit GPx'ı için 25 µl eritrosit 1 ml dilüent ile dilüe edildi. 5 dakika inkübasyondan sonra 1 ml Drapkin reaktifi eklenerek karıştırıldı. Bu karışımdan 20 µl alınarak üzerine 1 ml reaktif ve 40 µl kümen hidrojenperoksit ilave edilerek karıştırıldı. Absorbanstaki azalış, Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 340 nm de 1., 2. ve 3. dakikalarda reaktif körüne karşı okundu. Sonuçlar U/g Hb olarak verildi.

$$\text{U/L Hemolizat} = 8412 \times \Delta A_{340 \text{ nm}} / \text{dakika}$$

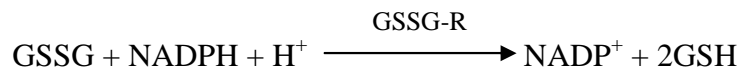
$$\text{U/g Hb} = \text{U/L Hemolizat} / \text{g/L Hb}$$

3.2.8. Eritrosit GSSG-R Düzeylerinin Ölçülmesi

Eritrosit GSSG-R düzeyleri Randox (Randox Laboratories Ltd., United Kingdom) kiti ile ölçüldü.

Prensip:

Glutasyon Redüktaz okside glutasyonu redükte forma dönüştürür. Bu sırada ortamdaki NADPH, NADP⁺'ye oksitlenir. NADPH'ın absorbansındaki azalış 340 nm de izlenir.



Reaktifler:

- Tampon
 - Potasyum fosfat 250 mmol/L, pH 7,3
 - EDTA 0,5 mmol/L
- Substrat
 - GSSG 2,2 mmol/L
- NADPH 0,17 mmol/L

Prosedür:

Eritrosit GSSG-R'ı için 250 µl eritrosit 250 µl soğuk distile su ile lizise uğratıldı. 10 dk +2-+8 oC'de inkübe edildi. 5 dk 2000 rpm de santrifüj edilerek stroma uzaklaştırıldı. Lizattan 100 µl alındı ve 1,9 ml %0,9 'luk NaCl solüsyonu ilave edilerek ölçüme hazır hale getirildi. Bu karışımdan 40 µl alınarak 1 ml substrat eklenerek karıştırıldı ve karışıma 200 µl NADPH ilave edildi. Süre başlatıldı ve 1., 2., 3., 4., ve 5. dakikalarda absorbanslar reaktif körüne karşı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 340 nm de ölçüldü. Sonuçlar U/g Hb olarak verildi.

U/L Hemolizat = 4983 x ΔA 340 nm / dakika x 20 (Dilüsyon Faktör)

U/g Hb = U/LHemolizat / g/L Hb

3.2.9. Serum Lipid Paneli Düzeylerinin Ölçülmesi

Serum Total Kolesterol, Trigliserid ve HDL düzeyleri Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ticari kitleri kullanılarak Roche-Hitachi Modular P800 otoanalizöründe ölçüldü. Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

Serum LDL ve VLDL düzeyleri Friedewald formülü kullanılarak hesaplandı (156).

$$\text{VLDL} = \text{TG}/5$$

$$\text{LDL} = \text{T. kolesterol} - (\text{VLDL} + \text{HDL})$$

3.3. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler SPSS paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda Oneway-ANOVA analizi kullanıldı. Varyansların homojenliği levene testi ile test edildi. Anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

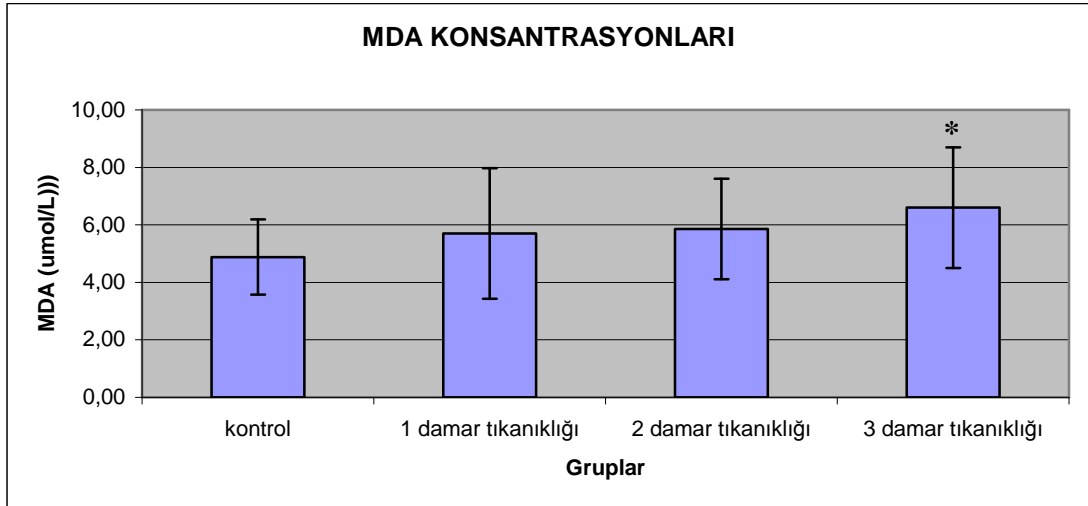
4.1. Plazma MDA Düzeyleri

Plazma MDA düzeyleri Tablo 4.1.1. ve Şekil 4.1.1. de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre MDA düzeyleri 3-damar tıkalı grupta, kontrol grubuna ($p<0,05$) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.1.1. Plazma MDA Düzeyleri

Gruplar	MDA (nmol/L) (ortalama±standart sapma)
Kontrol (n=19)	4,88±1,31
1 damar tıkanıklığı(n=21)	5,70±2,27
2 damar tıkanıklığı (n=18)	5,86±1,75
3 damar tıkanıklığı (n=20)	6,60±2,10*

* $p<0,05$ kontrol grubuna göre



Şekil 4.1.1. Plazma MDA düzeylerinin karşılaştırması

4.2. Plazma Karbonil Düzeyleri

Plazma karbonil düzeyleri Tablo 4.2.1.'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo 4.2.1. Plazma Karbonil Düzeyleri

Gruplar	Karbonil ($\mu\text{mol/L}$) (ortalama\pmstandart sapma)
Kontrol (n=19)	170 \pm 16
1 damar tıkanıklığı (n=21)	180 \pm 23
2 damar tıkanıklığı (n=18)	171 \pm 26
3 damar tıkanıklığı (n=20)	172 \pm 23

4.3. Plazma -SH Düzeyleri

Plazma -SH düzeyleri Tablo 4.3.1.'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo 4.3.1. Plazma -SH Düzeyleri

Gruplar	-SH (μM) (ortalama\pmstandart sapma)
Kontrol (n=19)	716 \pm 225
1 damar tıkanıklığı (n=21)	651 \pm 104
2 damar tıkanıklığı (n=18)	593 \pm 134
3 damar tıkanıklığı (n=20)	597 \pm 148

4.4. Eritrosit GSSG-R Aktiviteleri

Eritrosit GSSG-R aktiviteleri Tablo 4.4.1’de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo 4.4.1. Eritrosit GSSG-R Aktiviteleri

Gruplar	GSSG-R (U/gHb) (ortalama±standart sapma)
Kontrol (n=19)	10,82±2,26
1 damar tıkanıklığı (n=21)	10,75±2,44
2 damar tıkanıklığı (n=18)	11,11±1,75
3 damar tıkanıklığı (n=20)	10,81±1,81

4.5. Eritrosit GPx Aktiviteleri

Eritrosit GPx aktiviteleri Tablo 4.5.1 ve Şekil 4.5.1’ de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre 2-damar ve 3-damar grubu kontrol grubuna ($p<0,05$ ve $p<0,001$) ve 1-damar grubuna ($p<0,05$ ve $p<0,001$) göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Tablo 4.5.1. Eritrosit GPx Aktiviteleri

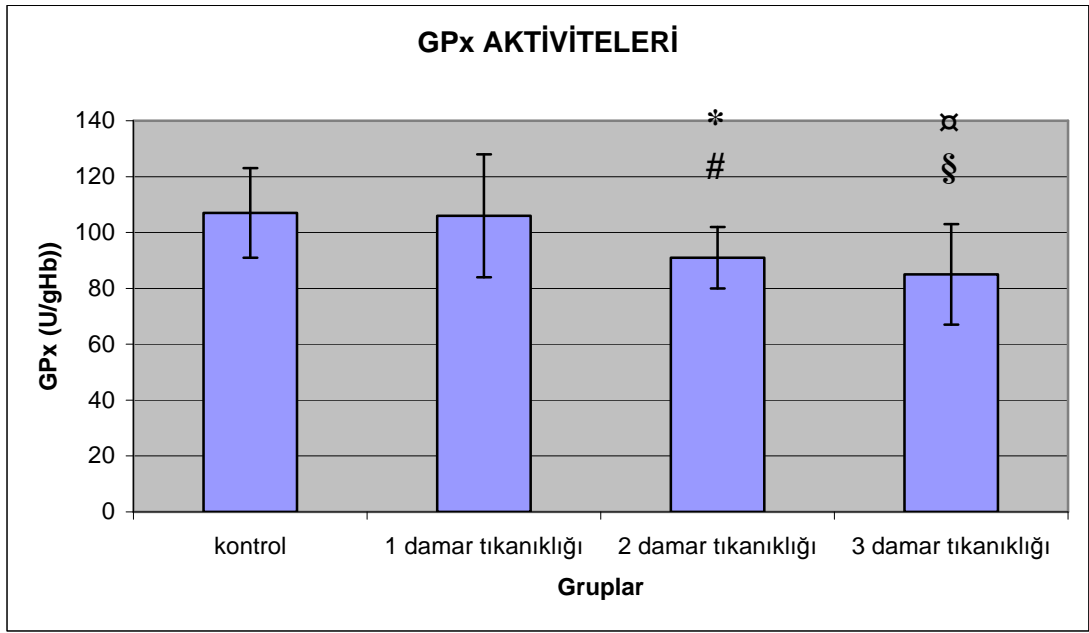
Gruplar	GPx (U/gHb) (ortalama±standart sapma)
Kontrol (n=19)	107±16
1 damar tıkanıklığı (n=21)	106±22
2 damar tıkanıklığı (n=18)	91±11*#
3 damar tıkanıklığı (n=20)	85±18α§

* $p<0,05$ kontrol grubuna göre

α $p<0,001$ kontrol grubuna göre

$p<0,05$ 1-damar grubuna göre

§ $p<0,001$ 1-damar grubuna göre



Şekil 4.5.1. Eritrosit GPx karşılaştırması

4.6. Eritrosit GSH Düzeyleri

Eritrosit GSH düzeyleri Tablo 4.6.1.'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo 4.6.1. Eritrosit GSH Düzeyleri

Gruplar	GSH ($\mu\text{mol/gHb}$) (ortalama \pm standart sapma)
Kontrol (n=19)	5,49 \pm 1,69
1 damar tıkanıklığı (n=21)	5,61 \pm 1,95
2 damar tıkanıklığı (n=18)	5,04 \pm 1,92
3 damar tıkanıklığı (n=20)	5,36 \pm 1,59

4.7. Serum Total Kolesterol Düzeyleri

Serum Total Kolesterol düzeyleri Tablo 4.7.1.'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo 4.7.1. Serum Total Kolesterol Düzeyleri

Gruplar	Total Kolesterol (mg/dl) (ortalama±standart sapma)
Kontrol (n=19)	206±27
1 damar tıkanıklığı (n=21)	188±33
2 damar tıkanıklığı (n=18)	188±33
3 damar tıkanıklığı (n=20)	187±51

4.8. Serum Trigliserid Düzeyleri

Serum Trigliserid düzeyleri Tablo 4.8.1.'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo 4.8.1. Serum Trigliserid Düzeyleri

Gruplar	Trigliserid (mg/dl) (ortalama±standart sapma)
Kontrol (n=19)	171±61
1 damar tıkanıklığı (n=21)	200±102
2 damar tıkanıklığı (n=18)	148±52
3 damar tıkanıklığı (n=20)	171±69

4.9. Serum HDL-Kolesterol Düzeyleri

Serum HDL-Kolesterol düzeyleri Tablo 4.9.1.'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo 4.9.1. Serum HDL-Kolesterol Düzeyleri

Gruplar	HDL (mg/dl) (ortalama±standart sapma)
Kontrol (n=19)	51±11
1 damar tıkanıklığı (n=21)	45±8
2 damar tıkanıklığı (n=18)	50±16
3 damar tıkanıklığı (n=20)	45±10

4.10. Serum LDL-Kolesterol Düzeyleri

Serum LDL-Kolesterol düzeyleri Tablo 4.10.1.'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo 4.10.1. Serum LDL-Kolesterol Düzeyleri

Gruplar	LDL (mg/dl) (ortalama±standart sapma)
Kontrol (n=19)	108±29
1 damar tıkanıklığı (n=21)	103±27
2 damar tıkanıklığı (n=18)	111±24
3 damar tıkanıklığı (n=20)	113±30

4.11. Serum VLDL Düzeyleri

Serum VLDL düzeyleri Tablo 4.11.1.'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo 4.11.1. Serum VLDL Düzeyleri

Gruplar	VLDL (mg/dl) (ortalama±standart sapma)
Kontrol (n=19)	40±17
1 damar tıkanıklığı (n=21)	39±18
2 damar tıkanıklığı (n=18)	28±11
3 damar tıkanıklığı (n=20)	34±14

5. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında, mortalite ve morbiditenin majör nedeni olma yolunda gittikçe artan bir rol üstlenmektedir. Çalışmalar, tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranının 1990 ve 2020 yılları arasında, % 28.9'dan % 36.3'e yükseleceğini göstermektedir (1).

Tek başına ateroskleroz batı dünyasındaki ölümlerin yarısından fazlasında rol alır. Koroner ateroskleroz, İskemik Kalp Hastalığına yol açabilir ve arteriyal lezyonlara trombus eklendiğinde, İskemik Kalp Hastalığının en ağır formu olan Myokard İnfarktüsü gelişir ki, bu durum tek başına ABD'deki ölümleri % 20-25'inden sorumludur. Birleşik Devletlerde ve diğer gelişmiş ülkelerde aterosklerozdan daha fazla ölümden sorumlu olan, araştırma yapılmasını uyaran ve en iyi nasıl kontrol edileceğine dair tartışma yaratan başka bir hastalık yoktur (2).

Türk Kardiyoloji Derneği'nin öncülüğünde 1990 yılından beri yürütülen TEKHARF çalışmasının 12 yıllık izlem verilerine göre, Türkiye'de 2.0 milyon koroner kalp hastasının bulunduğu ve yılda 160 bin yurttaşımızın koroner kalp hastalığından öldüğü tahmin edilmektedir (3).

Ateroskleroz arterlerde kalınlaşma ve elastikiyet kaybı ile kendini gösteren ve özellikle aorta, koroner ve serebral arterleri tutan bir damar hastalığıdır. Ateroskleroz patojenezi ile ilgili çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Bu hipotezler arasında en geçerli olanı oksidatif stres hipotezidir (157,158). Birçok araştırma grubu insanlarda (159,160) ve deney hayvanlarında (161,162) yaptıkları çalışmalarda plazma ve eritrositlerde, karaciğer, kalp ve aorta gibi dokularda ve aterom plaklarında prooksidan-antioksidan dengeyi inceleyerek ateroskleroz ve oksidatif stress arasındaki ilişkiyi çözmeye çalışmışlardır (163).

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir. (164,165). Pek çok hastalık sürecinde önemli rol oynarlar. Ateroskleroza bağlı gelişen 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, birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (84,166).

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri, süperoksit anyonu, hidroksil radikali, nitrik oksit, peroksil radikali (ROO[•]), ve radikal olmayan hidrojen peroksit gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar (167). Serbest radikal zincir reaksiyonları genellikle, moleküllerden H'nın uzaklaştırılmasıyla başlar. Lipid peroksidasyonu serbest radikal zincir reaksiyonu için iyi bir örnektir (doymamış yağ asitlerinin hücre membranlarında ve lipoproteinlerdeki oksidasyonu). Bu reaksiyonun özellikle aterosklerozun gelişiminde çok önemli olduğu araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır (168).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da 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 (169).

Bizim çalışmamızda anjiyografik olarak koroner damar tıkanıklıkları tespit edilmiş ve damar tıkanıklığı sayılarına göre üç gruba ayrılmış hasta gruplarında plazma MDA, protein karbonil ve sülfhidril grupları, serum lipid panelleri, eritrosit GSH düzeyleri, GPx ve GSSG-R aktiviteleri yine anjiyografik olarak damar tıkanıklığı olmadığı tespit edilmiş kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Plazma MDA düzeyleri 3-damar tıkalı grupta, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Diğer grupların MDA değerleri de kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş olmasına rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık arz etmemektedir. Çalışmamızda MDA değerlerinin yanı sıra grupların lipid profillerini değerlendirdik. Fakat hastaların serum total kolesterol, LDL, VLDL ve HDL kolesterol değerleri ile trigliserid değerleri kontrol grubumuza göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadı.

Oksidatif stres ve ateroskleroz arasındaki ilişki gerek insanlarda (159,160) ve gerekse deney hayvanlarında (161,162) çeşitli araştırma gruplarınca incelenmiştir. Kolesterol yedirilerek ateroskleroz oluşturulan deney hayvanlarında prooksidan-

antioksidan dengenin etkilendiği, aterom plaklarının ciddiyeti ile bu değişiklikler arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur (158,162,170). Buna karşılık insanlarda yapılan çalışmalarda genellikle kan örnekleri kullanılmış ve analizlerde daha çok lipit peroksidasyonu göstergelerine bakılmış. Aterosklerotik kalp-damar hastalıklarında serumda MDA, dien konjugatları veya lipit hidroperoksitlerinin arttığı bir çok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (159,160).

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü MDA' dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda 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 (17).

Koroner kalp hastalığı multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu hastalıktaki en önemli risk faktörleri serumda LDL kolesterol düzeyinin yükselmesi, HDL kolesterol düzeyinin azalması ve trigliserid düzeyinin artmasıdır (171). Yükselmiş LDL seviyesi, ateroskleroz riski için önemli bir rol oynuyor gibi görünse de, LDL in-vitro olarak tek başına aterojenik değildir, fakat aterogenezin ilerlemesine katkı sağlamaktadır (172). LDL'nin oksidasyonu, glikasyonu, agregasyonu ve proteoglikanlarla veya immün komplekslerle birleşebilmesi endotelyumun ve düz kasın hasara uğramasının altında yatan temel nedendir. LDL partikülleri arterde tuzak haline geldiği zaman, oksidasyona uğrayabilir ve makrofaj hücrelerinin yüzeylerindeki çöpçü reseptörler aracılığıyla hücre içine alınırlar. Hücre içine alınması, lipit peroksitlerin oluşumunu sağlar, kolesterol esterlerinin birikimi kolaylaşır ve sonuçta köpük hücre oluşur (173,174).

Böylece lipit peroksidasyonu, LDL yüzeyindeki fosfolipidlerdeki poliinsatre yağ asitlerinde başlar, poliinsatre yağ asitleri, kolesterol ve fosfolipidlerin oksidatif modifikasyonu ile sonuçlanır. Lipid peroksidasyonu sonucu terminal karbonil gruplarıyla bileşik oluşturan MDA, bu lipoproteinlerle etkileşim yeteneğinde olduğundan oksidatif hasar göstergesi olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Bu modifiye lipoproteinlerin makrofajlar tarafından alınarak köpük hücrelerine dönüştürülmesi, aterosklerotik plak gelişiminde ve aterogenezin ilerlemesinde temel faktördür (175,176). Bu nedenle, peroksidasyon sürecinin değerlendirilmesinde, peroksit oluşturan serbest radikal mekanizması, peroksit

uzaklaştıran antioksidan sistem ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA göz önünde tutulmalıdır (171).

Yagi ve ark. (177) lipid peroksidasyonu artışının aterosklerozda bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir. Dolaşımdaki serbest oksijen radikalleri damar duvarı üzerine toksik etki ile mevcut aterosklerozu arttırırken, eritrosit membran geçirgenliğindeki değişiklikler sonucunda hemolize yol açarlar ve sonuçta hipoksik bölgeye oksijen taşıma kapasitesi azalır. Bu tıkanıklığın distalindeki ekstremitenin beslenmesinin daha da bozulması anlamına gelir (178).

Cavalca ve ark. (179) koroner arter hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada lipid peroksidasyonunu incelemişler ve hasta grubunun plazma serbest ve total MDA seviyelerini kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır. Benzer şekilde Tamer ve ark. (180) aterosklerotik hastalarda serum MDA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Ledwozyw ve ark. (181) plazma trigliserid, kolesterol, total lipidler ve lipid peroksidlerini aterosklerotik lezyonları olan hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlar ve lipid peroksidlerinin plazma ve arteriyal duvardaki düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermişlerdir.

Türkoğlu ve ark. (182) koroner anjiyografi ile damar tıkanıklığı tanısı konmuş ve sağlıklı gönüllüler ile yaptıkları çalışmada serum total kolesterol, LDL ve VLDL kolesterol ve trigliserid değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı bir artış, HDL kolesterol düzeylerinde ise anlamlı bir azalma saptamışlardır. Bunun yanı sıra plazma MDA düzeylerini hasta grubunda kontrol grubuna göre artmış bulmuşlardır.

Shuko ve ark. (183) serum total kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinde koroner arter hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamışlardır. Serum HDL kolesterol düzeyinin CAD hastalarında kontrol grubuna göre düşük, trigliserid düzeyinin ise yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Sağ ve ark. (184) koroner damar tutulumunun risk faktörleri ile ilişkisini inceledikleri çalışmalarında, anjiyografik olarak damar tutulumu kanıtlanmış 49 hastayı damar tıkanıklığı sayılarına göre gruplara ayırmışlardır. LDL kolesterol düzeylerini iki ve üç damar tıkanıklığı olan hastalarda daha düşük değerlerde ancak istatistiksel olarak düşük ($p=0,051$) anlamlılıkta, HDL kolesterol düzeylerini ise

tutulan damar sayısına göre anlamlı olarak düşük ($p=0,004$), trigliserid seviyelerinin ise iki damar tıkalı grupta daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızdaki MDA değerleri üç damar tıkalı grupta, kontrol grubundan yüksek bulundu. Bu sonucumuz literatürdeki diğer verilerle paralellik göstermektedir. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz lipid panelinde yer alan total kolesterol seviyeleri bir, iki ve üç damar tıkalı grupta yaklaşık olarak aynı, trigliserid düzeyleri bir damar tıkalı grupta en yüksek, HDL kolesterol düzeyleri damar tıkanıklığı olan gruplarda daha düşük ve LDL kolesterol düzeyleri ise üç damar tıkalı grupta en yüksek olarak bulunmuştur. Fakat lipid paneli sonuçlarımız gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık oluşturmamıştır. Biz bunun nedeni oluşturduğumuz grupların daha önceki lipid paneli verilerine dayanarak yağ oranı düşük beslenmeye dikkat etmelerine, belli bir sosyoekonomik düzeye sahip olmalarına, bazı hastaların hastalıklarının subklinik seyretmesine, hastaların anjiyografik olarak tanıları konmadan daha önceki lipid panelleri değerlendirmelerine göre antilipemik ilaç kullanmalarına bağlayabiliriz.

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir (84,185).

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir (95,186). Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal iyon katalizli reaksiyonlar, lipid ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinlerde dahil olmak üzere diğer hücrel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar (95,186).

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz bir diğer parametre protein oksidasyonu göstergesi olan serum protein karbonil düzeyleridir. Hasta grubumuzun protein karbonil düzeylerini kontrol grubumuza göre yüksek bulmuş olmamıza rağmen, verilerimizde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa rastlanmadık.

Dalle-Donne ve ark. (187), aterosklerozda karbohidratlar ve lipidler tarafından proteinlerin kimyasal modifikasyonunun arttığını, bunu da karbonil strese neden olduğunu belirtmişlerdir.

Bazı oksidatif protein modifikasyonları, hem oksidasyona uğrayan amino asit bakiyesi, hem de oluşturulan ürünler bakımından gayet spesifikdir. Spesifik modifikasyonlara tirozin'nin ditirozine (diTyr) dönüşümü reaksiyonu sonucunda oluşan PCO'ler örnek olarak gösterilebilir (186). Leeuwenburgh ve ark. (188) yaptıkları bir çalışmada; insan aort'unun aterosklerotik bölgelerinde, erken yağ izlerinin bulunduğu alandaki diTyr düzeyini normal aort dokusundakiyle karşılaştırıldığında 11 kat arttığını ortaya koymuşlardır. İnsan kaynaklı, bir başka çalışmada; ilerlemiş aterosklerotik plaklardaki intima proteinlerinin diTyr içeriği ,normal arterlerin intima proteinlerinin çok üzerinde bulunmuştur (189). Fu ve ark. (189) bu çalışmada aterosklerotik ve normal arterlerin intima proteinlerinin diTyr içeriğini, intima dokusunun yaş ağırlığının miligramı başına 0.63 ± 0.41 , 4.75 ± 5.17 pmol olarak saptamışlardır.

Upston ve ark. (190), insanlarda aterosklerotik lezyonlarda protein oksidasyonunun arttığını bildirmişlerdir. Türkoğlu ve ark., (182) yaptıkları çalışmada koroner kalp hastalığı olan kişilerde plazma protein karbonil grupları değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış, antioksidan aktivitede ise anlamlı bir azalma bulmuşlardır. Yapılan çalışmaların pek çoğu aterosklerozda ROS'un indüklediği oksidatif stresin etkisiyle protein karbonil düzeylerinde artışa sebep olduğunu ortaya koymuştur.

Antioksidanlar, günümüzde içinde buldukları besinler, yaygın kullanım özellikleri ve koroner kalp hastalığı koruma ve tedavisindeki yeri sebebiyle ilgi çekmeye devam etmektedir. Antioksidanlar, içinde bulunduğu bir ortamda, okside edilebilen bir maddeye göre daha az bulunmasına rağmen, o maddenin oksidasyonunu önleyen veya geciktiren madde olarak tanımlanabilir. Antioksidanlar fizyolojik rolü, kimyasal reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerin dokuya zararını önlemektir (191).

Oksidatif protein hasarı, protein karbonil düzeylerinde ki artış ve protein tiyol düzeylerindeki azalma ile karakterizedir. Serbest radikallerin proteinlerdeki –SH gruplarının oksidasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (103,104). Glutatyon, sistein,

albumin ve diğer yapılarda ki protein –SH grupları oksidasyon zincirini kırma özelliğine sahip önemli antioksidanlardır. Oksidatif hasara karşı hassas olup koroner arter hastalığı, romatoid artirit, diabetes mellitus gibi oksidatif hasarın olduğu hastalıklarda düştüğü gösterilmiştir. (192).

Bizim çalışmamızda damar tıkanıklığı olan gruplarda –SH düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuş olmasına rağmen bu sonuçlar gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık oluşturmamaktadır.

Katoda ve ark. (193) koroner arter hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada hastaların serum total –SH düzeylerini düşük saptamışlar ve bu değerlerin serum albumin düzeyi ile pozitif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Merkaptalbumin ve total –SH içeriğinin koroner arter hastalığının şiddetiyle orantılı olarak azaldığını göstermişlerdir. Forgione ve ark. (194), tiyol gruplarının oksidasyonunun ve daha önemli olarak GPx'in hücresel formunun ekspresyonunun baskılanmasının ROS'de artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ayrıca hasta gruplarının ve kontrol grubunun kan örneklerinden hazırladığımız eritrosit paketlerinden enzimatik antioksidanlar olan ve selenyum içeren glutatyon peroksidaz ve glutatyon reduktaz aktivitelerini, intrasellüler ve enzimatik olmayan antioksidan olan redükte glutatyon düzeylerini ölçtük. GSH düzeyleri ve GSSG-R aktivitesi hasta grupları arasında ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamıştır. GPx aktivitesi ise 2-damar ve 3-damar grubunda kontrol grubuna ve 1-damar grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Glutatyon enzimatik olmayan önemli bir antioksidandır. En önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da O₂'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelerini yitirirler. İşte GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. Özellikle H₂O₂'nin elimine edilmesinde de GSH'ın oksitlenebilirliğinden faydalanılır (84,195).

Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutatyon, GSSG-R'in katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte olarak GSH'a dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır (84,184).

GPx iyi bilinen doğal bir antioksidandır (196). Birbirinin aynı dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür. GPx, organik peroksitleri indirgenmiş GSH ile elimine eder. GPx toksik hidroperoksitlerin alkol ve suya indirgenmesini GSH'nun GSH disülfid (GSSG) oksidasyonu ile meydana getirir. GSSG tekrar NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir, böylece sağlıklı eritrositler antioksidan sistemler ile oksidatif zarara direnç gösterirler. GPx'in hücredeki dağılımı, GSSG-R'a bağımlıdır. Her iki enzim de sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur (197).

Copola ve ark. yaptıkları hemoreolojik bir çalışmada eksojen GSH verilmesinin antioksidan etki yanında kan filtrasyonunu iyileştirdiği ve kan viskozitesini azalttığı gösterilmiş ve GSH tedavisinin aterosklerotik hastalarda önemli bir tedavi yöntemi olduğu öne sürülmüştür (198).

Köksal ve ark. (199), periferik arter hastalarında eritrosit GSH miktarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir.

Santos ve ark. (200), elli miyokard infarktüsülü hasta ile yaptıkları çalışmada eritrosit GSH seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını, MDA seviyesinin arttığını belirtmişler, MDA ve GSH düzeylerini korale bulmuşlardır.

Firoozrai ve ark. (201), yaptıkları çalışmada, anjiyografik olarak damar tıkanıklığı tanısı konmuş ve damar tıkanıklıklarına göre üç gruba ayrılmış doksan koroner arter hastasının eritrosit GSSG-R aktivitesini kontrol grubu ile kıyaslandıklarında enzim aktivitesinde bizim çalışmamızda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulmamışlardır. Aynı çalışmada hastaları ayrıca sigara içenler ve içmeyenler olarak gruplandırmışlar ve sigara kullanan grupta eritrosit GSSG-R değerlerini daha düşük bulmuşlardır.

Eritrosit GSSG-R enzimi antioksidan aktivitesini GSH düzeyine bağlı olarak indirek olarak göstermektedir. Bulduğumuz GSH düzeyleri de GSSG-R düzeyleri ile paraleldir. Her ikisi de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamıştır.

Yeğin ve ark. (202), anjiyografik olarak koroner arter hastalığı tanısı konmuş otuz yedi hasta ve onbeş kontrol ile yaptıkları çalışmada, eritrosit GPx aktivitesinin ve Se seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını, GSSG-R

aktivitesinde ise anlamlı bir farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir. Koroner arter hastalığının şiddetinin artması ile eritrosit Se-GPx ve eritrosit Se düzeyinin düştüğünü göstermişlerdir.

Cheng ve ark. (203), plak sayısı ile plazma trigliserid seviyesinin pozitif, GPx aktivitesinin ise negatif korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir.

Espinola-Klein ve ark. (204), aterosklerozun derecesine bağlı olarak kardiyovasküler risk artışıyla eritrosit GPx'ın azaldığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda bulduğumuz azalmış eritrosit GPx aktivitesini içeriğindeki Se element düzeyinin miktarında ateroskleroza bağlı oluşabilecek düşüşe bağlayabiliriz. Se düşüklüğünün, makromoleküllerden önce GPx enzim aktivitesini etkilemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Bu düşüncemizi destekleyen çalışmalarda mevcuttur (202).

6. SONUÇ

Çalışmanın sonuçları koroner arter tıkanıklığına, oksidatif streste artışın eşlik ettiğini desteklemektedir. Tıkalı olan damar sayısındaki artış ile MDA düzeyindeki artışın paralel olması, aterosklerotik tıkanıklıkların değerlendirilmesinde MDA düzeyinin de klinikte kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca sonuçlarımız, koroner arter tıkanıklıklarının her zaman lipid profilinde değişikliklerle beraber gitmediğini göstermiştir. Selenyum içeren bir enzim olan GPx'in ateroskleroz gelişimindeki oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılabileceği de düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Charles H, Hennekens, MD,DrPH. (1998) Increasing burden of cardiovascular disease. Current knowledge and future firections for research on risc factors. *Circulation.*; **97**: 1095-1102
2. Kumar V., Cotran S., Robbins S. L., (2000) *Robbins Basic Pathology* Türkçesi, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. Temmuz Sayfa 283-289
3. Onat A., Sansoy V., Soydan İ., Tokgözoğlu L., Adalet K., (2003) *TEKHARF*; Oniki Yıllık İzleme Deneyimine Göre Türk Erişkinlerinde Kalp Sağlığı. Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret Anonim Şirketi, İstanbul.
4. Anonymus (1993) Summary of the second report of the NCEP expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA* **269**,3015
5. Lorber A, Pearson CM, Wrother L. et al. (1964) Serum sulphhydryl determinations and significance in connective tissue diseases. *Ann Int Med.*, **61**, 423- 434.
6. Whitaker, J. (1994) Dr. Whitakers Guide to Natural Healing. Rocklin CA: *PrimaPublishing*;. Pp.192.
7. Sies, H., (1985). Oxidative stres: Introdoctory remarks. In: Sies, H. (Ed.), Oxidative Stres. Academic Pres, San Diego, New York, Lonndon, pp.1-8
8. Sies, H., (1986) Biochemistry of oxidative stres. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**, 1058-1071
9. Sies, H., Cadenas, E., (1985) Oxidative stres: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **311**,617-631
10. Sinclair A.I, Barnett AH, Lunec J., (1990) Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med.* **43**,334-344.
11. Sies, H., (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**,213-219
12. Schwenke DC., (1998) Antioxidants and atherogenesis. *J Nutr Biochem*, **9**, 424-445.
13. Kadota K, Yui Y, Hattori R. et al. (1991) Decreased sulphhydryl groups of albumin in coronary artery disease. *Jpn. Circ. J.*, **55(10)**, 937-941.

14. Collier A, Wilson R, Bradley H. et al. (1990) Free radical activity in type 2 diabetes. *Diabet Med*, **7(1)**, 27- 30.
15. Stadtman E. R., Levine RL. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, **25**, 207-218.
16. Stadtman E. R., (1988) Protein modification in aging. *J Gerontol* **43**, 112-120.
17. Kehrer JP, (1993) Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit. Rew. Toxicol.*, **23**, 21-48.
18. Onat A. (2000) Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı, yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı. *TEKHARF*, Ohan matbaacılık, İstanbul, TR; 16-23.
19. Türk halkında kalp kökenli ölümler (2000). Türkiye Kalp Raporu, Yenilik Basımevi; 11-15.
20. Falk E, Fuster V. (2001) Atherogenesis and its Determinants. *Hurst's The Heart*. 10th ed. USA. International Edition McGraw-Hill Medical Publishing Division. Ch**35**, p. 1065-1093.
21. Hansson G, Nilsson J. (2001) Pathogenesis of atherosclerosis. *Cardiology* 1st ed. USA. Elsevier Science Limited. p. **1.1.**, 1-12
22. Davies MJ. (2001) Pathology of Coronary Atherosclerosis. *Hurst's The Heart*. 10th ed. USA. International Edition McGraw-Hill Medical Publishing Division. Ch**36**, p. 1095-1105.
23. Sary H. C., Blankenhorn DH., Chandler AB. et al (1992). A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis prone regions, **85**:391-405.
24. Sary H. C. (2003). *Atlas of atherosclerosis progression and regression*, 2nd ed. The Partheonon Publishing Group, New York, USA, 13-15.
25. Vallace P. (1996). *Vascular endothelium, its physiology and pathophysiology*. Oxford Text Book of Medicine, 3rd ed. Oxford Medical Publications, Oxford, UK; **2**:2295-2300.
26. Ross R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *NEJM*; 314:488.

27. Schwenke D.C., Carew T.E. (1989). Initiation of atherosclerotic lesion in cholesterol fed rabbits. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible site of arteries. *Atherosclerosis*; **9**:908-918.
28. Tsao P.S., Wang B., Buitrago R., Shyy J.Y., Cooke J. P., (1997) Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* **96(3)**, 934–940,.
29. Tsao P.S. Buitrago R., Chan J. R., Cooke L. P. (1996). Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation*, **94 (7)**,1682-89.
30. De Caterina R., Libby P., Peng H.B., et al. (1995). Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, **96**, 60-68.
31. Kültürsay H., (2001) Koroner Kalp Hastalığı Primer ve Sekonder Korunma, Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret Anonim Şirketi. Sayfa 101-190
32. Iliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalin S, Süleymanlar G. (1996) Temel İç Hastalıkları. Güneş Kitabevi, 449-474
33. Vink H., Constantinescu A.A., Spaan J.A., (2000) Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer; implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation*, **101**,1500-1502.
34. Kuhn F., Mohler E.R., Satler E., et al, (1991) Effects of high density lipoprotein. on acetylcholine induced coronary vasoreactivity. *Am J Cardiol*, **68**,1425.
35. Boger R.H., Bode-Boger S.M., Thiele W., et al. (1997) Biochemical evidence of impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*, **95**, 2068-2074.
36. Diodali J.G., Dakak N., Gilligan D.M., et al. (1998) Effect of atherosclerosis on endothelium dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation*, **98**, 17-24.
37. Wenzel R.R., Puthiers N., Noll G., et al. (1996) Endotelin and calcium antagonists in the skin microcirculation of patients with coronary artery disease. *Circulation*, **94**, 316-322.
38. Ito A., Tsao P.S., Adimoolan S., et al. (1999) Novel mechanisms for endothelial

- dysfunction: Dysregulation of dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, **99**, 3092-3095.
39. Boger R.H., Bode-Boger S.H., Szuba A., et al. (1998) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction. *Circulation*, **98**, 1842-1847.
 40. Vergnani L., Hatik S., Ricci F., et al. (2000) Effect of native and oxidized LDL on endothelial nitric oxide and superoxide production: key of L-arginine availability. *Circulation*, **101**, 1261-1266.
 41. Libby P. (1996) Atherom: More than mush. *Lancet*, **348** (supp I), 4-7.
 42. Celermajer D.S. (1997) Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*, **30**, 325-333.
 43. Steinberg D. (1997) Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, **9**, 1062-1071.
 44. Parthasarathy S. (2000) Low density lipoproteins in atherogenesis. In Wilson P.W.F. *Atlas of atherosclerosis*. 2nd ed. Current Medicine, Philadelphia, 91-109.
 45. Witztum J.L. (1994) The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*, **334**, 793-795.
 46. Witztum J.L., Steinberg D. (1991) Role of oxidized LDL in atherogenesis. *J Clin Invest* **88**, 1785-1792
 47. Takahashi M., Kitagawa S., Masuyama J.T., et al. (1996) Human monocyte-endothelial cell interaction induces synthesis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation*, **93**, 1185-1193.
 48. Annex B.H., Denning S.M., Channon K.M., Sketch M.H., Stack R.S., Morissey J.H., et al. (1995) Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation*, **91**, 619-622.
 49. Ball R.Y., Stower E.C., Burton J.H., Caiy N.R. (1995) Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipidcore of atheroma. *Atherosclerosis*, **114**, 45-54.
 50. Raines E.W., Ross R. (1993) Smooth muscle cells and pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *BHJ*, **69**, 30-37.
 51. Davies M.J., Richardson P.D., Woolf N., Katz D.R., Mann J. (1993) Risk of

- thrombosis in human atherosclerotic plaques: Role of extracellular lipid, macrophage and smooth muscle cell content. *BHJ*, **69**, 377-381.
52. Davies M.J., Thomas A.C. (1985) Plaque fissuring - The cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death and crescendo angina. *BHJ*, **53**, 363-373.
 53. Mann J.M., Davies M.J. (1996) Vulnerable plaque: Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation*, **94**, 928-931.
 54. Salonen J.T., Yla Hertkuala S., Yamamoto R., et al. (1992). Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, **339**, 883-887.
 55. O'Brien K.D., McDonald T.O., Chait A., Allen M., Alpers C. (1996) Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*, **93**, 672-682.
 56. Lippincott – Publishers (2000) *Atlas of Coroner Artery Disease*, Türkçesi Yelkovan Yayıncılık Sayfa 23-54
 57. Ross R, (1993) The pathogenesis of atherosclerosis. *Nature*, **362**, 801-809.
 58. Durrington P., Sniderman A. (2001) *Fast Facts-Hyperlipidaemia 1*. Baskısının Türkçesi. Çeviri: Genç B. And Danışmanlık Eğitim Yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. 18-28.
 59. Ross R., (1997) The pathogenesis of atherosclerosis. In: Braunwald E, ed. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia, Pa: WB Saunders, 1105-1125.
 60. Frenette P.S., Wagner D.D. (1996). Adhesion molecules-part 1. *N Engl J Med*, **334**, 1526-1529.
 61. Weissberg P. (1999) Mechanisms modifying atherosclerotic disease from lipids to vascular biology. *Atherosclerosis*, **147**, 3-10.
 62. Shah P.K. (1997) New insights into the pathogenesis and prevention of acute coronary syndromes. *Am J Cardiol*, **79**, 17-23.
 63. Sary H.C., Chandler A.B. et al (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, *American Heart Association*, **95**, 1355-1374.

64. *Kardiyoloji MiniAtlas* (2003) 1. Baskı. AND Danışmanlık, Eğitim, yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. p. 155-162.
65. Fuster V., Alexander R.W., O'Rourke R. (2002) *Hurt's The Heart*. 10. Baskısının Türkçe çevirisi. And Danışmanlık Eğitim Yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. 1. Basım. 1065-1109
66. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. National Cholesterol Education Program National Heart, Lung, and Blood Institute. (2002) National Institutes of Health, NIH Publication No. 02-5215
67. Babiak J., Rudel L.L. (1987) Lipoproteins and atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, **1 (3)**, 515-550
68. Goldstein J.L., Kita T., Brown M.S. (1983) Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis : Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N Eng J Med*, **309**, 288-296
69. Navab M., Berliner J.A., Watson A.D., et al. (1996) The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak: A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, **16**, 831-842
70. Flavahan N.A. (1992) Atherosclerosis or lipoprotein induced endothelial dysfunction: Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/ nitric oxide activity. *Circulation*, **85**, 1927-1938
71. Treasure C.B., Klein J.L., Weintraub W.S., et al. (1995) Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* **332**, 481-487
72. Anderson T.J., Meredith I.T., Yeung A.J., et al. (1995) The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on the coronary endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med*, **332**, 488-493
73. Law M.R., Wald N.J., Thompson S.G. (1994) By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ*, **308**, 367-372

74. Manninen V., Huttunen J.K., Heinonen O.P., et al. (1989) Relationships between baseline lipid and lipoprotein values and the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Am J Cardiol*, **63**, 42-47
75. Pocock S.J., Shaper A.G., Phillips A.N. (1989) HDL-Cholesterol, triglycerides and total cholesterol in ischaemic heart disease. *Br Med J*, **298**, 998-1002
76. Gordon D.J., Probsfelt J.L., Garrison J.W., et al. (1989) High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: Four perspective American Studies. *Circulation*, **79**, 8-15
77. Assman G., Schulte H. (1992) Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerosis and coronary artery disease. (the PROCAM experience). *Am J Cardiol*, **70**, 733-737.
78. Reaven G.M. (1991) Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: role in hypertension, dyslipidemia, and coronary heart disease. *Am Heart J*. **121**, 1283-1288.
79. Grundy S.M., Vega G.L. (1992) Two different views of the relationship of hypertriglyceridemia to coronary heart disease: Implications for treatment. *Arch Intern Med*, **152**, 28-34.
80. Assmann G., Schulte H., Funke H., et al. (1998) The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *Eur Heart J*, **19**, (suppl M): M8-M14.
81. Austin M.A., Hokanson J.E., Edwards K.L. (1998) Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*, **81**, 7-12
82. Floyd R.A. (1993) Basic Free Radical Chemistry, Free Radical In Aging. Edited By B.P. Yu Boca Raton, F.L. *Crc P*. 39-55.
83. Fridovich I. (1978) The Biology of Oxygen Radicals. *Science* **201**, 875-880.
84. Akkuş İ. (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları. Konya
85. Weisiger R.A. (1986) Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology*, **90**, 494-496.

86. Koch O.R., Pani G., Borrello S., Colavitti R., Cravero A., Fare S., Galeotti T. (2004) Oxidative stress and antioksidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Asp Med*, **25**, 191-198.
87. Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*, **91**, 11-12.
88. McCord J.M. (1992) Human disease, free radicals and oxidant balance. *Clin Biochem*, **26**, 351-357.
89. 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.
90. Sies H., (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, **91**, 31S-38S.
91. Meier B., Radeke H.H., Selle S. et al. (1989) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J*, **263**, 539-545.
92. Kappus H., Sies H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, **37**, 1233-1241.
93. Brenneisen P., Wenk J., Klotz L.O. et al. (1998) Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, **273**, 5279-5287.
94. Thannickal V.J., Fanburg B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell.Mol.Physiol.* **279**, L1005-L1028.
95. Shacter E. (2000) Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*, **319**, 428-436.
96. Shacter E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev*, **32**, 307-326.
97. Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T. (1999) Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med*, **27**, 1151-1163.
98. Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*, **9**, 169-176.

99. Alderman C.J.J., Shah S., Foreman J.C., Chain B.M., Katz D.R. (2002) The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic Biol Med*, **32**, 377-385.
100. Berlett B.S., Stadtman E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, **272**, 20313-20316.
101. Stadtman E.R. (1993) Oxidation Of Free Aminoacids and Aminoacids Residues In Protein By Radiolysis and Metal Catalyzed Reactions. *Annu Rev Biochem*, **62**, 797- 821.
102. Stadtman E.R. (1992) Protein Oxidation and Aging. *Science*, **257**, 1220-1224.
103. Bindoli A., Rigobello M.P. (2002) Mitochondrial thioredoxin reductase and thiol status. *Methods Enzymol*, **347**, 307-316.
104. Netto L.E.S., Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. (2002) Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol*, **348**, 260-270.
105. Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, **324**, 1-18.
106. Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk I. (2004) Lipid Peroxidation Cannot Be Used As a Universal Criterion Of Oxidative Stress. *Progres in Lipid Research* **43**, 200-227.
107. Halliwell B. (1995) Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, **49**, 1341-1348.
108. Halliwell B. (1991) Drug antioxidant effects. *Drugs*, **42**, 569 - 605.
109. Cross C.E., Halliwell B., Borish E. T. (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*, **107**, 526-545.
110. Guemouri L., Artur Y., Herbeth B., Jeandel C., Cuny G., Siest G. (1991) Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem*, **37**, 1932-1937.
111. Halliwell B., Gutteridge JM. (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, **23**, 1(8391):1396-1397.
112. Halliwell B., Gutteridge J.M. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, **280**, 1-8.

113. Jialal I., Fuller C.J. (1993) Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol*, **16**, (4 Suppl 1), 6-9.
114. Maxwell S.R. (1995) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, **49**, 345-361.
115. Yanbeyi S. (1999) Aspirin ve antioksidant 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
116. Holben D., Smith A. (1999) The diverse role of selenium within selenoproteins; a review. *J Am Dietetic Assoc*, **99**, 1-16.
117. Allan C., Lacourciere G., Stadtman T. (1999) Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Ann Rev Nutr*, **19**, 1-16.
118. Berggren M., Mangin J., Gasdaska J., Powis G. (1999) Effect of selenium deficiency on Rat Thioredoxin Reductase Activity. *Biochem Pharm*, **57**, 187-193.
119. Vadhanavikit S, Ip C, Ganther HE: Metabolites of sodium selenite and methylated selenium compounds administrated at cancer chemoprevention levels in the rat. *Xenobiotica*, 1993; 23: 731-45
120. Ip C. (1998) Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr*, **128**, 1845–1854.
121. Birringer M., Pilawa S., Flohe´ L. (2002) Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep*, **19**, 693–718.
122. Ganther H.E. (1999) Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, **20**, 1657–1666.
123. Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V. et al. (2003) Characterisation of mammalian selenoproteomes. *Science*, **300**, 1439–1443.
124. Behne D., Kyriakopoulos A. (2001) Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr*, **21**, 453–473.
125. Flohe´ L., Gunzler, W.A., Schock H.H. (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*, **32**, 132–134.

126. Brigelius-Flohe´ R., Flohe´ L. (2003) Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? *Biofactors*, **17**, 93–102.
127. Behne D., Kyriakopoulos A., Meinhold H., Kohrle J. (1990) Identification of type I iodothyronine 50-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, **173**, 1143–1149.
128. Tamura T., Stadtman T.C. (1996) A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci*, **93**, 1006–1011.
129. Schomburg L., Schweizer U., Holtmann B., Flohe´ L., Sendtner M., Kohrle J. (2003) Gene disruption discloses role of SeP in selenium delivery to target tissues. *Biochem J*, **370**, 397–402.
130. Novarro-Alarcon M., Lopez-Martinez M. (2000) Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sc Total Environ* **249**, 347-371.
131. World Health Organization. (1987) *Selenium*. In: International Programme on Chemical Safety. World Health Organization: Geneva
132. Levander O., Burk R. (1994) *Selenium, Modern nutritionin health and disease*. (Ed) M. Shike. Lea and Febiger: Philadelphia.
133. Alissa E.M., Bahijri S.M., Ferns G.A. (2003) The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Med Sci Monit*, **9**, 9-18
134. Toufektsian M-C., Boucher F., Pucheu S. et al. (2000) Effects of selenium deficiency on the response of cardiac tissue to ischemia and reperfusion. *Toxicol*, **148**, 125-132.
135. Polronieri R., Cevese A., Sbartai A. (1992) Protective effect of selenium in cardiac ischemia and reperfusion. *Cardioscience*, **3**, 155-160.
136. Sinci V., Gunaydin S., Kalaycioglu S., Songul H., Gokgoz L., Oz E. (1998) Effects of selenium enriched reperfusion solutions on isolated guinea pig hearts. *Keio J Med*, **47**, 219-222.
137. Liu D., Liu S., Huang Y., Liu Y., Zhang Z., Han L. (2000) Effect of selenium on human myocardial glutathione peroxidase gene expression. *Chin Med J (Engl)*, **113**, 771-775.

138. Brigelius-Flohe R. (1999) Tissue Specific Functions of Individual Glutathione Peroxidases. *Free Rad Biol Med*, **27**, 951-965
139. Grant C. (2001) Role of glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molec Microbiol*, **39**, 533-541.
140. Takeshita S., Inoue N., Ueyama T., Kawashima S., Yokoyama M. (2000) Shear Stress Enhances Glutathione Peroxidase Expression in Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 66-71.
141. Ferrari R., Ceconi C., Curello S. et al. (1991) Oxygen free radicals and myocardial damage: Protective role of thio-containing agents. *Am J Med*, **91**, 95-105.
142. Dolphin D., Auramovic O., Paulson R. (1985) *Glutathione chemical, Biochemical and medical aspects*. John Wiley and Sons, New York.
143. Griffith O. (1999) Biological and pharmacological regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med* 27: 922-935.
144. Moran L., Gutteridge J., Quinlan G. (2001) Thiols in Cellular Redox Signaling and Control. *Current Medic Chem*, **8**, 763-772.
145. Zengin Ulakoğlu E., Koray Gümüştas M., Belce A., Altuğ T., Kökoğlu E. (1998) Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi. *Cerrahpaşa J Med*, **29**, 127-131.
146. Alican F. (1995) *Mide tümörleri: Cerrahi Dersleri*. Cilt II. İstanbul, Afa matbaacılık, 216- 217.
147. John P. Richie J. (1992) The role of glutathione in aging and cancer. *Experimental Gerontology*, **27**, 615-626.
148. Uslu E, Belce E, Seymen P, Kökoğlu E. (2000) Kolorektal kanserde metastazın serum total siyalik asit düzeyleri üzerine etkisi. *Cerrahpaşa J Med*, **31**, 231-234.
149. Öztürk M., Güzelhan Y., Sayar K., Tüzün U. (2001) Yaygın Gelişimsel Bozukluğu Olan Çocuklarda Plazma Malondialdehit ve Glutasyon Düzeylerinin Araştırılması. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, **11**, 155-159
150. Yarıktas M., Fehmi D., Doğru H., Aynalı G., Yönden Z., Delibaş N. (2003) Baş-boyun maling tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri. **10**, 65-67.

151. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for Lipid Peroxidase in Animal Tissues By Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem*, **95**, 351-358.
152. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., (1990) Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Method Enzymol*, **186**, 464-478.
153. 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.
154. Fairbanks V.F., Klee G.G. (1999) Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1696-1697.
155. Beutler E., Robson M.J., Bittenwieser E. (1957) The Glutathione Instability of Drug Sensivity Red Cells. *J Lab Med*, **49**, 84.
156. Friedewald et al. (1972). *Clin Chem*, **18**, 499-502
157. Westhuyzen J: The oxidation hypothesis of atherosclerosis: *Ann Clin Lab Sci*, **27**, 1-9.
158. Uysal M. (2000) Ateroskleroz, kalp-damar hastalıkları ve serbest radikaller. *Aktüel Tıp Dergisi*, **5**, 15-21.
159. Glavind J, Hartmann S, Clemmesen J, et al. (1952) Studies on the role of lipid peroxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *Acta Pathol*, **30**, 1-6.
160. Doğru-Abbasoğlu S, Kanbağlı Ö, Bulur H, et al. (1999) Lipid peroxides and antioxidant status in serum of patients with angiographically defined coronary atherosclerosis. *Clin Biochem*, **32**, 671-672
161. Uysal M, Kutalp G, Seçkin Ş. (1988) The effect of cholesterol feeding on lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in the liver of rats. *Intern J Vit Nutr Res*, **58**, 339-342.
162. Balkan J, Kanbağlı Ö, Hatipoğlu A, et al. (2002) Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**, 1755-1758.
163. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. (1996) Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Japan J Physiol*, **46**, 15-32.

164. Freeman B.A., Crapo I.D. (1982) Biology of disease-free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, **47**, 412.
165. Lunec J., Blake D. (1990) *Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes*, 189- 212, Ed. R.D. Cojhen, Balliere Tindall, London.
166. 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.
167. Babior B.M. (2000) Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* **109**, 33-44.
168. Kuyvenhoven J.P., Meinders A.E. (1999) Oxidative stress and diabetes mellitus, Pathogenesis of long-term complications. *European Journal of Internal Medicine* **10**, 9-19.
169. Serafini M., Del Rio D. (2004) Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report*, **9**, 145-152.
170. De La Cruz J.P., Quintero L., Villalobos M.A. et al. (2000) Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits : influence of olive oil administration. *Biochem Biophys Acta*, **1485**, 36-44.
171. Surekha R.H., Srikanth B.B.M.V., Jharna P., Ramachandra R.V., Dayasagar R.V., Jyothy A. (2007) Oxidative stress and total anti oxidant status in myocardial infarction *Singapore Med J*, **48**, 137–142
172. Heinecke J.W. (2003) Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, **91**, 12-16.
173. Ross R. (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*, **40**, 115-26. Comment in: *N Engl J Med* **340**, 1928-1929.
174. Khoo J.C., Miller E., McLoughlin P., Steinberg D. (1988) Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis*, **8**, 348-358.
175. Sevanian A., Hochstein P. (1985) Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr*, **5**, 365-390.

176. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, **13**, 341-390.
177. Yagi K. (1984) Increased lipid peroxides initiate atherosclerosis. *Bioassays*, **1**, 58-60.
178. Sing R.B., Niaz A.M., Ghoch S. (1995) Randomized, controlled trial of antioxidant vitamins and cardioprotective diet on hyperlipidemia, oxidative stress and development of experimental atherosclerosis. The diet and antioxidant trial on atherosclerosis. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, **9**, 763-771.
179. Cavalca V., Cighetti G., Bamonti F., et al. (2001) Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem*, **47**, 887-892.
180. Tamer L., Sucu N., Polat G., et al. (2002) Decreased serum total antioxidant status and erythrocyte-reduced glutathione levels are associated with increased serum malondialdehyde in atherosclerotic patients. *Arch Med Res*, **33**, 257-260.
181. Ledwozyw A., Michalak J., Stepień A., Kadziolka A. (1986) The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, **155**, 275-283.
182. Türkoğlu Ü.M., Akalın Z., İlhan E. et al. (2004) Koroner Kalp Hastalığı Olan Kişilerde Oksidatif DNA Hasarının İncelenmesi, *Kocatepe Tıp Dergisi*, **5** Ek Sayı 55-58
183. Nojiri S., Daida H., Mokuno H. et al. (2001) Association of serum antioxidant capacity with coronary artery disease in middle-aged men. *Jpn Heart J*, **42**, 677-690
184. Sağ C., Özkan M., Uzun M. ve ark. (2006) Koroner risk katsayısı ile koroner anjiyografik olarak damar tutulumu ve risk faktörleri arasındaki ilişki. *Anadolu Kardiyol Derg*, **6**, 353-357
185. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. (1991) *Techniques in free radicals research*. Elsevier, Amsterdam, vol 22.

186. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, **329**, 23-38.
187. Dalle - Donne I., Aldini G., Carini M. et al. (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*, **10**, 389-406
188. Leeuwenburgh C., Rasmussen J.E., Hsu F.F., Mueller D.M., Pennathur S., Heinecke J.W. (1997) Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem*, **272**, 3520-3526.
189. Fu S., Davies M.J., Stocker R., Dean R.T. (1998) Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J*, **333**, 519-525.
190. Upston J.M., Niu X., Brown A.J. et al. (2002) Disease stagedependent accumulation of lipid and protein oxidation products in human atherosclerosis. *Am J Pathol*, **160**, 701-710.
191. Hertog M.G.L., Kromhout D., Aravanis C. et al. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the 7 countries study. *Arch Intern Med*, **155**, 381-386
192. Köken T., Kahraman A., Serteser M., Çetinkaya G. (2001) Hemodiyaliz protein karbonil içeriği ve sülfhidril grupları düzeyi üzerine etkileri. *Türk Nef Diy ve Transp Dergisi*, **2**, 83-85
193. Kadota K., Yui Y., Hattori R. et al. (1991). Decreased sulphhydryl groups of albumin in coronary artery disease. *Jpn Circ J*, **55**, 937-941.
194. Forgione M.A., Weiss N., Heydrick S. et al. (2002) *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **282**, 1255–1261
195. Carlberg I., Mannervik B. (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol*, **113**, 484-490.
196. Barber D.A., Harris S.R. (1994) Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharmacy*, **34**, 26-35.

197. Punchard A.S., Taylor J.A., Thompson R.P.H., Peerson T.C. (1991) Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol*, **47**, 287-291.
198. Copola L., Grassia A., Giunta R., Verrazzo G., Cova B., Trille A. (1992) Glutathione (GSH) improved haemostatic and haemorheological parameters in atherosclerotic subjects. *Drugs Exp Clin Res*, **8**, 493-498.
199. Köksal C., Konukoğlu D., Ercan M., Arslan C., Kazımoğlu K., Bozkurt K. (1999) Periferik Arter Hastalarında Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Kapasite, *GKDC Dergisi*, **7**, 244-246.
200. Shinde S., Kumar P., Patil N. (2005) Decreased Levels Of Erythrocyte Glutathione In Patients With Myocardial Infarction. *The Internet Journal of Alternative Medicine*,
201. Firoozrai M., Mehrabi H., Ehsani A., Najafi M., Ghaffari M. Activities of Anti-Oxidative Enzymes, Catalase and Glutathione Reductase in Red Blood Cells of Patients with Coronary Artery Disease. *Asian Journal of Biochemistry*, 91 AJB.
202. Yegin A., Yegin H., Aliciguzel Y., Deger N., Semiz E. (1997) Erythrocyte selenium-glutathione peroxidase activity is lower in patients with coronary atherosclerosis. *Jpn Heart J*, **38**, 793-798.
203. Cheng K.M., Aggrey S.E., Nichols C.R., Garnett M.E., Godin D.V. (1997) Antioxidant enzymes and atherosclerosis in Japanese quail: heritability and genetic correlation estimates. *Can J Cardiol*, **13**, 669-676.
204. Espinola-Klein C., Rupprecht H.J., Bickel C. et al. (2007) Glutathione Peroxidase-1 Activity, Atherosclerotic Burden, and Cardiovascular Prognosis. *The American Journal of Cardiology*, **99**, 808-812.