

RATLARDA HOMOSİSTEİNİN OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN SİSTEM İLE KORONER DAMARLARDA OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE E VİTAMİNİNİN ETKİSİ*

Abdurrauf YÜCE Mesut AKSAKAL

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 28.07.2005 Kabul Tarihi: 20.02.2006

ÖZET

Bu çalışma, uzun süreli homosistein uygulanan ratlarda antioksidan enzim düzeylerini ve koroner arterlerin yapısındaki değişimleri ve bu değişimlere E vitamininin etkilerini araştırmak için yapılmıştır.

Bu amaçla 30 dişi ve 30 erkek, toplam 60 Wistar albino rat kullanıldı. Hayvanlar rast gele 3 gruba ayrıldı. Bu gruplar kontrol, homosistein ve Vit-E olarak isimlendirildi. Altı hafta boyunca her gün kontrol grubuna serum fizyolojik, homosistein grubuna 0.71 mg/kg homosistein, Vit-E grubuna da 0.71 mg/kg homosistein + 125 mg/kg dl- α tokoferol asetat periton içi olarak uygulandı.

Plazma homosistein, Malondialdehit (MDA) ve doku MDA düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında homosistein grubunda önemli derecede artma ($P<0.05$), Vit-E grubunda ise azalma ($P<0.05$) tespit edilmiştir. Plazma Süperoksit dismutaz (SOD), Redükte Glutasyon (GSH), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), katalaz (KAT) ve doku GSH, GSH-Px düzeyleri kontrole göre homosistein grubundaki ratlarda düşük ($P<0.05$), Vit-E grubu ratlarda ise yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, homosistein grubu ratların koroner arter endotelinde dejenerasyonlar, hücre infiltrasyonu ve kalınlaşma tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; homosistein uygulaması; plazma homosistein, MDA ve doku MDA düzeylerini artırırken, plazma SOD, KAT, GSH, GSH-Px ve doku GSH, GSH-Px düzeylerini azaltmıştır. Buna karşılık vitamin E uygulaması plazma homosistein, MDA ve doku MDA düzeylerini azaltırken, plazma SOD, KAT, GSH, GSH-Px ve doku GSH, GSH-Px düzeylerini artırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aterosklerozis, E vitamini, Homosistein, Lipid Peroksidasyon, Rat.

ABSTRACT

Effect of Vitamin E on Homocysteine-Induced Changes in Oxidant, Antioxidant System and Coronary Artery in Rats

This study was conducted to investigate the changes in the levels of antioxidant enzyme and structure of coronary arteries in long-term homocysteine administered rats and to investigate the effects of vitamin E on these changes.

For this purpose, 30 male and 30 female Wistar albino rats were used. The rats were randomly divided into 3 groups. These groups were named as control, homocysteine and vit-E. Normal saline was intraperitoneally administered to the control group; dl-homocysteine (0.71 mg/kg) was intraperitoneally administered to the homocysteine group; dl-homocysteine (0.71 mg/kg) + dl- α tocopheryl acetate (125 mg/kg) were intraperitoneally administered to the vit-E group daily for 6 weeks.

Compared to the control group, levels of plasma homocysteine, MDA and tissue MDA significantly ($P<0.05$) increased in homocysteine group, while significantly ($P<0.05$) decreased in vit-E group. When compared to the control group, levels of plasma SOD, GSH, GSH-Px, CAT and tissue GSH, GSH-Px significantly ($P<0.05$) decreased in homocysteine group, whereas significantly ($P<0.05$) increased in vit-E group.

Degeneration, cell infiltration and thickness were determined in the endothelium of coronary artery of homocysteine group in comparison to the control group.

In conclusion, administration of homocysteine caused an increase in the levels of plasma homocysteine, MDA and tissue MDA, while it caused a decrease in the levels of plasma SOD, CAT, GSH, GSH-Px and tissue GSH, GSH-Px. On the other hand, administration of vitamin E decreased the levels of plasma homocysteine, MDA and tissue MDA, while it increased the levels of plasma SOD, CAT, GSH, GSH-Px and tissue GSH, GSH-Px.

Key Words: Atherosclerosis, Vitamin E, Homocysteine, Lipid Peroxidation, Rat..

* Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP-651) tarafından desteklenen doktora tezinden özetlenmiştir.

GİRİŞ

Homosistein, kükürt içeren bir aminoasit olmakla birlikte, bütün proteinlerin yapısal bileşeni olarak görev yapan 20 aminoasit arasında yer almayan, diğer aminoasitlerin aksine diyetle birlikte alınan metiyoninin metabolizması sonucu oluşan metabolik bir ara üründür (1). Hem homosistein hem de metiyonin birbirlerinin öncü maddeleri olup birinin detoksifikasyonu diğerinin sentez aşamasını oluşturmaktadır. Bu ilişkinin temelini metiyonin metabolizması oluşturur (2). Homosistein-metiyonin ilişkisindeki doğmasal bozukluklar klinik olarak hiperhomosisteinemiye neden olurken son zamanlarda genetik bozukluklar yanında edinsel patoloji, toksisite ve beslenme yetersizliğinden kaynaklanan hiperhomosisteinemi üzerinde durulmaktadır. Homosisteinin koroner kalp hastalıkları (KKH) ve vasküler hastalıklar ile ilişkisi uzun yıllardan beri bilinmektedir. Birçok araştırma, koroner kalp hastalığı için plazma homosistein yüksekliğinin bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (3, 4). Homosisteinüri nedenli ölümler sonucu yapılan incelemelerde (5) ise, arteriyel ve venöz tıkaçlar, odaksal venöz patolojiler, koroner, serebral ve karotit arterlerde aterosklerotik değişiklikler saptanmıştır. Daha sonra araştırmacılar bu değişikliklerin sadece homosisteinüride olduğu gibi genetik nedenli hastalıklarda değil, hiperhomosisteinemi olan diğer hastalıklarda da meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Hiperhomosisteinemide aterojenik olaylar iki alanda toplanmaktadır. Bunlar damar endotelindeki fonksiyonel anomaliler ile endotel hasarı ile başlayıp bunu takip eden trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin değişikliğe uğraması ve pıhtı oluşumu sonucu endotel üzerine daha zehirli etki göstermesidir (6).

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir. (7, 8). Pek çok hastalık sürecinde önemli rol oynarlar. Miyokardiyal enfarktüs, diyabet, kanser, katarakt, romatoid artrit, infertilite, solunum, sinir ve üriner sistem hastalıkları ile stres ve yaşlanma sürecinde antioksidan enzim düzeylerinde önemli değişiklikler ve lipit peroksidasyonunda artış, birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (9, 10).

E vitamini tokoferol yapısında olup doğal olarak alfa, beta, gama, delta gibi çeşitli formlarda bulunmaktadır. Bunlar içerisinde α -tokoferol en geniş doğal dağılıma ve en yüksek

antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonunu önler ve hücre zarı fosfolipitlerinde bulunan çok doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak ilk savunma hattını oluşturur. Doymamış yağ asitleri, çift bağlara sahip oldukları için oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek mitokondri, mikrozom ve hücre içi zarların yapısını ve metabolizmasını bozan peroksit ve hidroperoksitleri doyurarak peroksit radikallerinin tekrar etkinliğini azaltır. Böylece peroksit oluşumu önlenmiş olur (10, 11).

Hiperhomosisteineminin etiolojisinde en sık rastlanan neden vitamin eksikliğidir. Bu nedenle hiperhomosisteinemi tanısı konulan şahıslara ilk uygulanan tedavi yöntemi vitamin takviyesidir (12). Buna istinaden bu çalışmada, ratlara uzun süreli homosistein uygulamalarından sonra antioksidan enzim düzeyleri ve koroner arterlerin yapısal değişimleri incelenmiş ve E vitamininin bu değişimler üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Kasım 2002-Ocak 2003 tarihleri arasında yapılmıştır. Araştırmada F.Ü. Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edilen ağırlıkları 350–400 g arasında değişen 6–7 aylık 60 adet Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar çalışmaya başlamadan bir ay önce alınarak ortama adaptasyonları sağlandı. Ratların beslenmesinde Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen rat yemi kullanıldı. Ratlara yem ve su ad libitum verildi. Ratlar her grupta 20 adet (10 dişi, 10 erkek) olacak şekilde 3 gruba ayrıldı ve gruplar kontrol, homosistein ve Vit-E grubu olarak isimlendirildi. Altı hafta boyunca her gün kontrol grubuna serum fizyolojik, homosistein grubuna 0.71 mg/kg homosistein, Vit-E grubuna da 0.71 mg/kg homosistein + 125 mg/kg dl- α tokoferol asetat periton içi olarak uygulandı.

Gruplardaki bütün ratlar 6 haftalık uygulamadan sonra eterle uyutularak karın boşluğu açıldı. Daha önceden EDTA ile yıkanmış enjektörlerle a. femoralis'in bifurkasyon bölgesinden girilerek yaklaşık 10–12 ml kan alındı. EDTA'lı kanlar 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan plazma kısmı polipropilen tüplere alınarak yapılacak analizler için $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki derin dondurucuda muhafaza edildi.

Plazma Homosistein Düzeyinin Belirlenmesi

Plazma homosistein düzeyleri ELISA yöntemiyle ticari kit kullanılarak üretici firmanın belirttiği şekilde ölçülüp sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edildi.

MDA ve Antioksidan Enzim Düzeylerinin Tayini

Plazma ve dokuda MDA tayini Placer ve ark. (13)'nın tanımladığı spektrofotometrik yöntemle göre belirlenerek elde edilen sonuçlar nmol/ml olarak ifade edildi.

GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay (14)'ın belirttiği şekilde spektrofotometre ile ölçülerek $\mu\text{mol/ml}$ olarak ifade edildi. GSH-Px aktivitesi Lawrence ve ark. (15)'nin bildirdikleri şekilde spektrofotometre ile belirlenerek IU/gr-protein olarak ifade edildi. Plazma katalaz tayini Goth (16)'un tarif ettiği şekilde spektrofotometre ile yapılarak KU/L olarak ifade edildi.

Plazma SOD düzeyinin tayini Flohe ve ark. (17)'nin tarif ettiği şekilde spektrofotometrik olarak belirlenerek U/ml olarak ifade edildi.

Doku Kesitlerinin Hazırlanması

Kalp damarlarındaki morfolojik değişiklikleri belirlemek için kalbin koroner damarlarını içeren kısımlarından örnek parçalar alınarak 3 gün süre ile %10'luk formol çözeltisinde [Ticari formol (%37) 10 ml, distile su 90 ml] tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokular rutin alkol ve xylol serilerinden geçirilerek yüzeyi düzgün kartondan yapılmış dikdörtgen şeklindeki küçük kutular içerisinde bloklandı. Dokular parafinle bloklandıktan sonra mikrotom ile 5 mikron kalınlığında ince kesitler yapıldı. Daha sonra bu kesitler hematoksilin-eozin ile boyanarak preparatlar mikroskop altında 400x büyütmede histolojik yönden incelendi (18, 19). Mikroskop sahasında gözlenen damar kesitleri fotoğraflarla tespit edildi (H.E. X200).

İstatistikî Analizler

Araştırma sonucunda elde edilen ortalama değerler $X \pm S_x$ olarak gösterildi. İstatistiksel analizler SPSS 10.0 paket programıyla yapıldı. Plazma homosistein, SOD, MDA, GSH, GSH-Px, katalaz, doku MDA, GSH, GSH-Px düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırmalarında varyans analizi (parametrik test varsayımları yerine gelmediğinden dolayı Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı) yapıldı ve ardından önemli çıkan parametreler için Duncan testinden yararlanıldı ($P < 0.05$). Her grup içerisindeki erkek

ve dişilere ait plazma homosistein, SOD, MDA, GSH, GSH-Px, katalaz, doku MDA, GSH, GSH-Px değerleri için karşılaştırmalarda ise Mann-Whitey-U testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Erkek ve dişi ratların plazma homosistein, MDA, GSH, GSH-Px, SOD, KAT ve doku MDA, GSH, GSH-Px düzeyleri Tablo 1'de verilmiştir.

Plazma Homosistein Düzeyleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların plazma homosistein düzeyleri arasında (erkek ratlarda daha fazla olmak üzere) anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P < 0.001$). Hem erkek hem de dişi ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların plazma homosistein düzeyleri kontrol grubu ratların plazma homosistein düzeyinden yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$). Vit-E grubu ratların plazma homosistein düzeyleri kontrol ve homosistein grubu ratların plazma homosistein düzeylerinden düşük ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Plazma MDA Düzeyleri

Sadece homosistein grubundaki erkek ve dişi ratların plazma MDA düzeyleri arasında erkek ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P < 0.001$). Gruplar arası erkek ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların plazma MDA düzeyleri, kontrol grubu ratların plazma MDA düzeylerinden yüksek ($P < 0.05$) bulunmuştur. Vit-E grubu ratların plazma MDA düzeyleri, homosistein grubu ratların plazma MDA düzeylerinden düşük ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Plazma GSH Düzeyleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların plazma GSH düzeyleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P < 0.001$). Gruplar arası erkek ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların plazma GSH düzeyleri, kontrol ve vit-E grubu ratların plazma GSH düzeylerinden düşük ($P < 0.05$) bulunmuştur. Gruplar arası dişi ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; vit-E grubu ratların plazma GSH düzeyleri, hem kontrol hem de homosistein grubu ratların plazma GSH düzeylerinden yüksek ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Tablo 1. Homosistein, MDA ve Antioksidan Enzim Düzeyleri.

Gruplar (n=20) 10 Dişi 10 Erkek	Plazma Homosistein Düzeyi ($\mu\text{mol/L}$)	Plazma MDA Düzeyi (Nmol/ml)	Plazma GSH Düzeyi ($\mu\text{mol/ml}$)	Plazma GSH-Px Düzeyi (IU/grprotein)	Plazma KAT Düzeyi (KU/L)	Plazma SOD Düzeyi (U/ml)	Doku MDA Düzeyi (Nmol/ml)	Doku GSH Düzeyi ($\mu\text{mol/ml}$)	Doku GSH-Px Düzeyi (IU/grprotein)	
Kontrol	Erkek	4.82 $\pm 0.07^a$	1.44 $\pm 0.02^a$	0.186 $\pm 0.002^a$	2.54 $\pm 0.03^a$	18.94 $\pm 0.19^a$	2.88 $\pm 0.02^a$	26.24 $\pm 0.20^a$	2.62 $\pm 0.01^a$	18.01 $\pm 0.09^a$
	Dişi	3.95 $\pm 0.03^A$	1.42 $\pm 0.02^A$	0.198 $\pm 0.001^A$	2.59 $\pm 0.01^A$	20.08 $\pm 0.32^A$	3.04 $\pm 0.01^A$	26.51 $\pm 0.10^A$	2.74 $\pm 0.02^A$	19.91 $\pm 0.17^A$
	P	***	–	***	***	***	***	–	***	**
Homosistein	Erkek	5.07 $\pm 0.01^b$	1.71 $\pm 0.02^b$	0.177 $\pm 0.002^b$	2.23 $\pm 0.02^b$	14.73 $\pm 0.14^b$	2.81 $\pm 0.07^b$	28.38 $\pm 0.18^b$	2.56 $\pm 0.03^b$	13.57 $\pm 0.12^b$
	Dişi	4.5 $\pm 0.02^B$	1.46 $\pm 0.04^A$	0.194 $\pm 0.002^A$	2.41 $\pm 0.02^B$	18.63 $\pm 0.12^B$	3.03 $\pm 0.02^A$	28.84 $\pm 0.11^B$	2.61 $\pm 0.01^B$	14.51 $\pm 0.12^B$
	P	***	***	***	**	**	***	*	***	***
Vit-E	Erkek	4.09 $\pm 0.02^c$	1.42 $\pm 0.03^a$	0.185 $\pm 0.002^a$	2.75 $\pm 0.01^c$	20.86 $\pm 0.23^c$	3.04 $\pm 0.01^c$	23.98 $\pm 0.11^c$	2.74 $\pm 0.02^c$	24.26 $\pm 0.18^c$
	Dişi	3.89 $\pm 0.04^A$	1.40 $\pm 0.04^A$	0.203 $\pm 0.002^B$	3.00 $\pm 0.03^C$	20.95 $\pm 0.23^C$	3.45 $\pm 0.02^B$	20.86 $\pm 0.20^C$	2.80 $\pm 0.01^C$	25.86 $\pm 0.23^C$
	P	***	–	***	***	**	***	***	***	***

a,b,c: Aynı sütun içerisinde değişik harfler taşıyan ortalama erkek birey değerleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ($P < 0.05$).

A,B,C: Aynı sütun içerisinde değişik harfler taşıyan ortalama dişi birey değerleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ($P < 0.05$).

– : Önemli değil ($P > 0.05$), * : ($P < 0.05$), ** : ($P < 0.01$), *** : ($P < 0.001$): Aynı gruptaki dişi ve erkek bireyler arasında yapılan karşılaştırmalar için geçerlidir.

Plazma GSH-Px Düzeyleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların plazma GSH-Px düzeyleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P < 0.01$, $P < 0.001$). Gruplar arası hem erkek hem de dişi ratların kendi aralarında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların plazma GSH-Px düzeyleri, kontrol grubu ratların plazma GSH-Px düzeylerinden düşük ($P < 0.05$) bulunmuştur. Vit-E grubu ratların plazma GSH-Px düzeyleri ise hem kontrol hem de homosistein grubu ratların plazma GSH-Px düzeylerinden yüksek ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Plazma KAT Düzeyleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların plazma KAT düzeyleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P < 0.01$, $P < 0.001$). Gruplar arası hem erkek hem de dişi ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların plazma KAT düzeyleri, kontrol grubu

ratların plazma KAT düzeylerinden düşük ($P < 0.05$) bulunmuştur. Vit-E grubu ratların plazma KAT düzeyleri, hem kontrol hem de homosistein grubu ratların plazma KAT düzeylerinden yüksek ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Plazma SOD Düzeyleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların plazma SOD düzeyleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P < 0.001$). Gruplar arası erkek ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların plazma SOD düzeyleri kontrol grubu ratların plazma SOD düzeylerinden düşük ($P < 0.05$) bulunmuştur. Vit-E grubu ratların plazma SOD düzeyleri hem kontrol hem de homosistein grubu ratların plazma SOD değerlerinden yüksek ($P < 0.05$) bulunmuştur. Gruplar arası dişi ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; vit-E grubu ratların plazma SOD değerleri hem kontrol hem de

homosistein grubu ratların plazma SOD değerlerinden yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur.

Doku MDA Düzeyleri

Homosistein grubundaki erkek ve dişi ratların plazma MDA düzeyleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmesine ($P<0.05$) rağmen vit-E grubunda ise erkek ratlarda daha fazla bulunmuştur ($P<0.001$). Gruplar arası hem erkek hem de dişi ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların doku MDA düzeyleri, kontrol grubu ratların doku MDA düzeylerinden yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur. Vit-E grubu ratların doku MDA düzeyleri ise hem kontrol hem de homosistein grubu ratların doku MDA düzeylerinden düşük ($P<0.05$) bulunmuştur.

Doku GSH Düzeyleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların doku GSH düzeyleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P<0.001$). Gruplar arası hem erkek hem de dişi ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların doku GSH düzeyleri, kontrol grubu ratların doku GSH düzeylerinden düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Vit-E grubu ratların doku GSH düzeyleri ise hem kontrol hem de homosistein grubu ratların doku GSH düzeylerinden yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur.

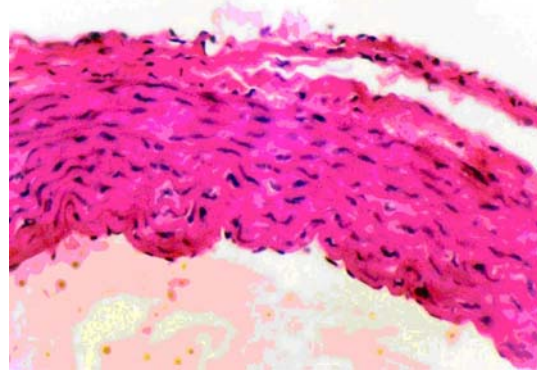
Doku GSH-Px Düzeyleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların doku GSH-Px düzeyleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P<0.01$, $P<0.001$). Gruplar arası hem erkek hem de dişi ratların kendi arasında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların doku GSH-Px düzeyleri, kontrol grubu ratların doku GSH-Px düzeylerinden düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Vit-E grubu ratların doku GSH-Px düzeyleri ise hem kontrol hem de homosistein grubu ratların doku GSH-Px düzeylerinden yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur.

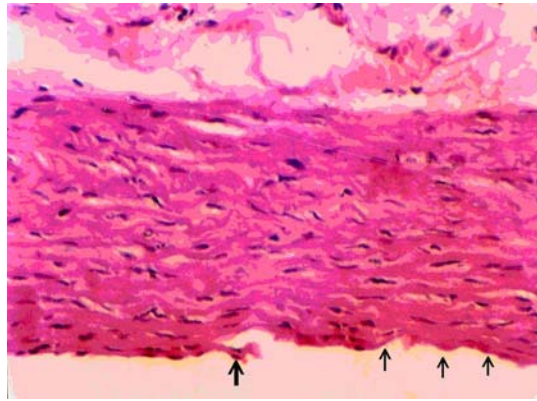
Kalp Damarlarının Morfolojik Yapısındaki Değişimler

Kontrol grubu (Şekil 1) erkek ratlar ile karşılaştırıldığında homosistein grubu (Şekil 2) erkek ratların kalp damarları endotel hücrelerinin yer yer deskuamasyona uğradığı ve bu alanda epitel hücrelerin dökülmesiyle karakterize erken dönem aterosklerozis şekillendiği dikkati çekmiştir. E vitamini uygulaması ise homosistein grubu erkek ratların damar endotelinde

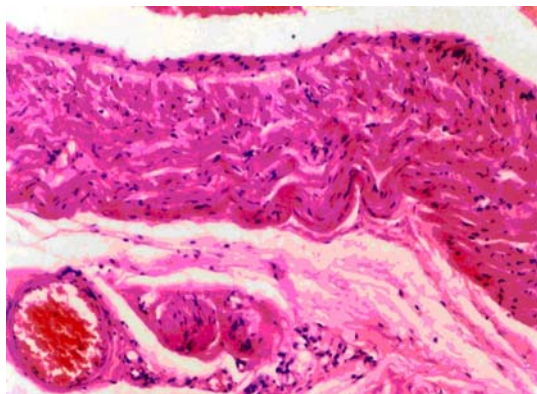
gözlenen patolojik durumları düzeltmiş olup kontrol grubunun damar endotel yapısına benzer duruma getirmiştir (Şekil 3). Ayrıca bu araştırmada homosistein uygulamasının dişi ratların damar morfolojilerinde herhangi bir patolojik lezyona neden olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 1. Kontrol grubu erkek ratların kalp damarlarındaki endotel hücrelerinin görünümü. Normal histolojik yapı (H.E, x200).



Şekil 2. Homosistein grubu erkek ratların kalp damarlarındaki endotel hücrelerinin görünümü. Hücrelerde ayrılma (büyük ok) ve endotel hücrelerinden yoksun kısım (küçük oklar) (H.E, x200).



Şekil 3. Vit-E grubu erkek ratların kalp damarlarındaki endotel hücrelerinin görünümü. Kontrol grubuna benzer normal histolojik yapı (H.E, x200).

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalar (20, 21), koroner arter hastalıkları için geleneksel risk faktörlerinin (sigara, alkol, diyabet, kolesterol, tansiyon vb.) dışında vasküler hastalıkların patolojisinde rol oynayan beslenme ve biyokimyasal faktörler (diyetteki antioksidanlar ve plazma homosistein miktarı) üzerinde yoğunlaşmıştır. Homosistein, koroner arter hastalıkları ve periferik vasküler hastalıklar için göz önünde bulundurulması gereken önemli ve bağımsız bir risk faktörüdür. Kardiovasküler hastalıkların gelişiminde plazma homosistein artışının etkili olduğu genel bir anlayış olarak benimsenmiştir. Kesin olmamakla birlikte homosisteinin patolojik etkileri vasküler lezyonlara sebep olması şeklinde gösterilebilir. Vasküler hastalık ölüm ve hastalıkların oluşumunda en önemli risk faktörleridir. Sigara, hiperkolesterolemi, hipertansiyon ve diyabet vasküler hastalıkların oluşumunda etkili risk faktörleridir. Yüksek homosistein düzeyleri periferik, koroner ve serebrovasküler hastalıklar için bir başka risk faktörü olarak son zamanlarda belirlenmiştir (22, 23).

Yapılan birçok çalışmada östrojenin plazma homosisteinini farklı yollarla etkilediği belirtilmiş fakat yine de plazma homosistein düzeyine östrojenin etkisi tam olarak açıklanamamıştır (24, 25). Dimitrova ve ark. (26) erkek ratlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada östrojen uygulamalarının total plazma homosistein düzeyini düşürdüğünü ve diyetlerinde homosistein bulunan ratların endotel değişimleri (damar endotelinin kalınlaşması ve hücre infiltrasyonu gibi) gösterdiği bildirilmiştir. Diyetlerinde homosistein bulunan ratların miyokardiyal GSH düzeyinin önemli derecede azaldığı ve doza bağlı olarak östrojen uygulamalarının miyokardiyal GSH miktarını artırdığı bildirilmiştir. Kim ve ark. (27), kortizol ve östrojenin karaciğer ve böbrekteki enzim aktivitelerini etkileyerek plazma homosistein seviyesini düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Bu çalışmada dişi ratların plazma homosistein değerlerinin bütün gruplarda erkek ratlardan anlamlı derecede düşük bulunduğu görülmektedir. Dişilerde plazma homosistein düzeyinin erkeklerinkine oranla düşük bulunması östrojenin toplam plazma homosisteinini düşürücü etkisinin olduğunu belirten literatür bilgileriyle paralellik göstermektedir (26).

Normal şartlar altında serbest radikallerin oluşturacağı zararlı etkiler hücrel koruma sistemi ile kontrol edilmektedir. Bu koruyucu sistemler vitamin E, Vitamin C ve glutatyon gibi enzimatik veya enzimatik olmayan mekanizmalar aracılığı ile etkilerini göstermektedirler (28).

Baydaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (29), bazı minerallerin ve melatoninin plazma lipit, lipit peroksidasyon ve homosistein düzeyleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve plazma MDA düzeylerinde; melatonin, lipoik asit ve E vitamini uygulanan gruplarda önemli düşüşler tespit etmişlerdir.

Serafinowicz ve ark. (30), hiperhomosisteinemik ratlarda lipit peroksidasyon ürünlerinin ve karotit intimal media kalınlığının artmış olduğunu belirtmişlerdir. Cavalca ve ark. (31), plazma homosistein ve plazma MDA artışının kalp-dolaşım hastalıkları ile birlikte olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki tüm grupların plazma ve doku MDA değerleri incelenerek; sadece homosistein uygulanan ratların plazma MDA değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Bu sonuç, artan homosistein miktarının, lipit peroksidasyon oluşumunu önleyen ve antioksidan enzimlerden biri olan GSH-Px'in aktivitesini azaltarak oluşturduğu görüşünü destekler niteliktedir (31).

Homosistein ile birlikte E vitamini uygulanan Vit-E grubu ratların plazma MDA değerleri, kontrol grubu ratları ile karşılaştırıldığında; anlamlı bir farklılık bulunamamasına rağmen, Vit-E grubu erkek ratların MDA düzeyleri homosistein grubu erkek ratların MDA düzeylerinden düşük bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda E vitamini plazma MDA seviyesini azalttığı bildirilmiştir (32, 33). Kontrol ve Vit-E grubu erkek ratlar açısından, E vitamini antioksidan etkisi sonucu lipit peroksidasyonu inhibe ettiğini bildiren literatür bilgileri (32, 33) ile bu bulgularımızın uyumadığı tespit edilmiştir. Bu farklılık, gruplarımıza lipit peroksidasyonu önleyen E vitamini ile birlikte lipit peroksidasyonu artıran homosisteinin birlikte verilmesinden kaynaklanabilmiş olabileceği düşünülmektedir. Ancak homosistein grubu erkek ratların MDA düzeyleri ile kıyaslandığında Vit-E grubu erkek ratların MDA düzeylerinde tespit edilen anlamlı düşüş E vitamini antioksidan etkisi sonucu lipit peroksidasyonu inhibe ettiğini bildiren bazı araştırmacıların (32, 33) bulguları ile uyum göstermektedir.

Gilad ve arkadaşları tarafından homosisteinin peroksinitritlere karşı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (34), homosisteinin hem GSH-Px aktivitesini inhibe ettiği hem de bu enzimin mRNA' sını önemli olarak azalttığı bildirilmiştir. Ovrebo ve Svardal (35), ratlarda plazma homosistein miktarı ile plazma sistein ve glutasyon düzeyleri arasında negatif bir ilişkinin var olduğunu belirtmişlerdir. Dayal ve ark. (36), yüksek miktarda metiyonin içeren diyetle beslenen farelerde total plazma homosistein düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ve glutasyon peroksidaz yetersizliğinin oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada homosistein uygulanan erkek ratların hem plazma hem de doku GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre azalma tespit edilirken, E vitamini uygulamasının ise homosistein grubunda görülen bu azalmaları artırdığı görülmüştür. Ancak dişilerde homosistein uygulaması sadece doku GSH düzeylerinde bir azalmaya neden olmuştur. Bu araştırmada homosistein uygulanan hem erkek hem de dişi ratların plazma ve doku GSH-Px değerleri incelendiğinde; kontrol grubuna göre düşük olduğu, ayrıca homosistein ile birlikte E vitamini uygulanan gruptaki ratların plazma ve doku GSH-Px değerlerinin, kontrol ve homosistein grubu ratlardan daha yüksek olduğu ve yukarıda belirtilen literatür bildirimleri ile benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır (34-36).

Can ve ark. (37) E vitamini uygulamasının serum homosistein düzeylerinde önemli düşüşlere sebep olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonucu, E vitamininin homosisteinin remetilasyon aşamasını hızlandırarak plazma homosistein seviyesini düşürdüğü şeklinde izah etmişlerdir. Çalışmamızdaki tüm grupların plazma homosistein değerleri incelendiğinde; homosistein ile birlikte E vitamini uygulanan ratların plazma homosistein düzeyleri, kontrol ve homosistein grubu ratlarından düşük bulunmuştur. Bu bulgularımız yukarıdaki literatür bildirimleri ile tam bir uyum içerisinde.

Yamamoto ve ark. (38), endotel hücre yüzeyine hücre dışı SOD'nin bağlanması üzerine homosisteinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, homosisteinin SOD etkinliğini azalttığını ifade etmişlerdir. Homosistein, SOD'nin endotel hücre yüzeyine bağlanmasını sağlayan endotelial heparan sülfat proteoglikanını bozarak arteriyel endotel hücre yüzeyine SOD'nin bağlanmasını engellemektedir. Yüksek miktarda homosistein fibroblastarca ortama verilen SOD ekspresyonunu azaltmaktadır. Böylece

homosistein endotel hücrelerinin özellikle süperoksit radikali olmak üzere serbest radikallere karşı savunma yeteneğini azaltmış olur (38). Wyse ve ark. (39) homosistein uygulamasının ratlarda KAT aktivitesinde azalmalara neden olduğunu, vitamin E'nin ise azalan bu KAT aktivitesi üzerine koruyucu bir etki sergilediğini bildirmektedirler. Çalışmamızda; homosistein uygulanan ratların plazma SOD ve KAT değerleri, kontrol ve Vit-E grubu ratların plazma SOD ve KAT değerlerinden düşük bulunmuştur. Elde edilen değerler homosisteinin plazma SOD ve KAT düzeyini azalttığı ve Vit E'nin de bu azalmaları önceki değerine artırdığı yönündeki literatür bildirimleriyle (38) paralellik göstermektedir.

Periton içi homosistein uygulamaları karotid arterlerde intimal hiperplaziye ve hücre proliferasyonuna sebep olmaktadır (40). Plazma toplam homosistein miktarları ile karotid arterlerin duvar kalınlığı arasında pozitif bir ilişkinin var olduğu bildirilmektedir (41). Toborek ve ark. tarafından rasyonlarında fazla miktarda metiyonin bulunan tavşanlarda yapılan bir çalışmada (42), ateroskleroz riskinin ve lipid peroksidasyonun artmış olduğu ayrıca antioksidan enzimlerin etkinliğinde düzensizlikler tespit edilmiştir. Farhat ve ark. (43), hiperhomosisteinemili ratlarda oluşmuş olan aterosklerotik lezyonlara karşı östrojen uygulamalarının koruyucu etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızdaki kalp damarlarının histolojik kesitleri incelendiğinde kontrol grubuna nazaran homosistein uygulaması yapılmış olan erkek ratların kalp damar endotel hücrelerinin yer yer deskuamasyona uğradığı ve endotel hücrelerinden yoksun kısımların oluşumuyla karakterize erken dönemde aterosklerozisin şekillendiği dikkati çekmektedir. E vitamini uygulaması ise homosistein grubu erkek ratların damar endotelinde gözlenen patolojik durumları düzeltmiş olup kontrol grubunun damar endotel yapısına benzer duruma getirmiştir. Bu bulgular homosisteinin kalp damarları üzerine olumsuz yönde etkilerinin olduğunu belirten literatür bildirimleriyle paralellik göstermektedir (40, 41, 42, 43). Ayrıca bu araştırmada homosistein uygulamasının dişi ratların damar yapılarında herhangi bir patolojik lezyona neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum östrojenin damar endotelinde lezyonların oluşmasına yol açan homosisteini baskılaması (43) ile izah edilebilir

Sonuç olarak; homosisteinin lipit peroksidasyon ürünlerini (MDA) artırdığı, plazma ve dokulardaki antioksidan enzim düzeyleri üzerinde ise azaltıcı bir etki gösterdiği, ayrıca kalp damarlarında dejeneratif değişiklikler oluşturduğu tespit edilmiştir. Antioksidan bir madde olan E vitamininin ise lipit peroksidasyon

ürünleri üzerine (MDA) indirgeyici bir etki gösterdiği ve antioksidan enzim (SOD, KAT, GSH-Px) aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte E vitamininin kalp damarlarında oluşabilecek dejeneratif değişiklikleri önleyebileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cooper AJL. Biochemistry of sulfur-containing Amino Acids. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 187-222.
2. James DF, John JM. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 385-389.
3. Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, et al. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 704-709.
4. Den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WBJ. Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis?. *Lancet* 1995; 345: 882-885.
5. Malinow M, Nieto F, Szklo M. Carotid artery intima medial wall thickening and plasma homocysteine in asymptomatic adults. *Circulation* 1993; 87: 1107-1113.
6. Brattstrom L, Israelson B, Tengborn L. Homocysteine, factor VII, and antithrombin III in subjects with difference gene damage for cystathionine β synthase. *J Inher Metab Dis* 1989; 12: 475-482.
7. Freeman BA, Crapo ID. Biology of disease-free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412.
8. Lunec J, Blake D. Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes, P. 1990; 189-212, Ed. R.D. Cojhen, Balliere Tindall, London.
9. Ak H, Dingiloğlu T, Habif N, et al. Plasma lipid peroxidation, Vit. E, superoxide dismutase and glutathione peroxidase alterations in coronary atherosclerosis. *Tr J Med Sci* 1994; 26: 11-15.
10. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, 2. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
11. Faulder CG, Pamela AH. Vitamin E in biological systems. *Antiox Ther Preven Med* 1990; 3: 234.
12. Jacques P, Bostom A, Williams R. Relations between folat status a common mutation in MTHFR and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7-12.
13. Placer AZ, Linda LC, Johnson B. Estamination of product of lipid peroxidation (Malonyl Dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
14. Sedlak J, Lindsay RHC. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
15. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Bioch Bioph Res Commun* 1976; 71, 4: 952-958.
16. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143-152.
17. Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 1984; 105: 93-104.
18. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3th Ed. London: Churchill Livingstone, 1990.
19. Clarke R, Daly L, Robinson K. Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-1155.
20. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 1995; 274: 1049-1057.
21. Chen P, Poddar R, Tiba EV, et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: Implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Advan Enzyme Regul* 1999; 39: 93-109.
22. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
23. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 230-236.
24. Brattstrom L, Israelsson B, Olsson A, et al. Plasma homocysteine in women on oral oestrogen-containing contraceptives and in men with oestrogen-treated prostatic carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: 283-287.
25. Van Der Mooren MJ, Wouters MGAJ, et al. Hormone replacement therapy may reduce high

- serum homocysteine in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 733-736.
26. Dimitrova KR, Degroot KW, Pacquing AM, et al. Estradiol prevents homocysteine-induced endothelial injury in male rats. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 589-596.
 27. Kim MH, Kim E, Passen EL. Cortisol and estradiol: non genetic factors for hyperhomocystinemia. *Metabolism* 1997; 46: 247-249.
 28. Baydaş G, Gürsu MF, Yılmaz S, et al. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neurosci Lett* 2002; 323: 195-198.
 29. Baydaş G, Yılmaz O, Çelik S, et al. Effects of certain micronutrients and melatonin on plasma lipid, lipid peroxidation, and homocysteine levels in rats. *Arch Med Res* 2002; 33: 515-519.
 30. Serafinowicz A, Kukula K, Cieciora T, et al. Homocysteine and lipid peroxidation products: Important atherosclerosis risk factors in renal allograft recipients?. *Transplant Proc* 2000; 32: 1367-1368.
 31. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, et al. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem* 2001; 47 (5): 887-892.
 32. Oriani G, Corino C, Pastorelli G, et al. Oxidative status of plasma and muscle in rabbits supplemented with dietary vitamin E. *J Nutr Biochem* 2000; 12: 138-143.
 33. Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. *Am Heart J* 1993; 125: 958-973.
 34. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, et al. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sciences* 1997; 60(10): 169-174.
 35. Ovrebø KK, Svardsdal A. The effect of glutathione modulation on the concentration of homocysteine in plasma of rats. *Pharmacol Toxicol* 2000; 87 (3): 103-107.
 36. Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, et al. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1996-2002.
 37. Can C, Çınar MG, Kosay S, et al. Vascular endothelial dysfunction associated with elevated serum homocysteine levels in rat adjuvant arthritis: effect of vitamin E administration. *Life Sciences* 2002; 71: 401-410.
 38. Yamamoto M, Hara H, Adachi T. Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* 2000; 486: 159-162.
 39. Wyse AT, Zugno AI, Streck EL, et al. Inhibition of Na(+), K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 2002; 27: 1685-1689.
 40. Chen C, Surowiec SM, Morsy AH, et al. Intraperitoneal infusion of homocysteine increases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *Atherosclerosis* 2002; 160: 103-114.
 41. Tsai MY, Arnett DK, Eckfeldt JH, et al. Plasma homocysteine and its association with carotid intimal-medial wall thickness and prevalent coronary heart disease: NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2000; 151: 519-524.
 42. Toborek M, Kopiczna-Grzebieniak E, Drozd M, et al. Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1995; 115: 217-224.
 43. Farhat MY, Dingaan B, Fader M, et al. Estradiol 17 β protects against homocysteine-induced vascular injury in rat thoracic aorta. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25(2): 72 A.