

RATLARDA HOMOSİSTEİNİN OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SİSTEM VE KORONER DAMARLARDA OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİSİ*

Abdurrauf YÜCE Mesut AKSAKAL

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

Geliş Tarihi: 28.07.2005 Kabul Tarihi: 15.12.2005

ÖZET

Bu çalışma, uzun süreli homosistein uygulanan ratlarda antioksidan enzim düzeyleri ve koroner arterlerin yapısındaki değişimler ve bu değişimlere melatoninin etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla 30 dişi ve 30 erkek, toplam 60 Wistar albino rat kullanıldı. Hayvanlar rasgele 3 gruba ayrıldı. Bu gruplar kontrol, homosistein ve melatonin grupları olarak isimlendirildi. Altı hafta boyunca her gün kontrol grubuna serum fizyolojik, homosistein grubuna 0.71 mg/kg homosistein periton içi, melatonin grubuna da 0.71 mg/kg homosistein (ip) + 1mg/kg melatonin derialtı olarak uygulandı.

Plazma homosistein, Malondialdehit (MDA) ve doku MDA düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında homosistein grubunda önemli derecede ($P<0.05$) artış, melatonin grubunda ise düşüş ($P<0.05$) tespit edilmiştir. Plazma Süperoksit dismutaz (SOD), Redükte Glutasyon (GSH), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), katalaz ve doku GSH, GSH-Px aktiviteleri kontrol grubuna göre homosistein grubu ratlarda düşük ($P<0.05$), melatonin 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; periton içi homosistein uygulaması; plazma homosistein, MDA ve doku MDA düzeylerini artırırken, plazma SOD, CAT, GSH, GSH-Px ve doku GSH, GSH-Px aktivitelerini azaltmıştır. Buna karşılık periton içi homosistein uygulamasına ek olarak derialtı 0.71 mg/kg dozda melatonin uygulaması plazma homosistein, MDA ve doku MDA düzeylerini azaltırken, plazma SOD, CAT, GSH, GSH-Px ve doku GSH, GSH-Px aktivitelerini artırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Homosistein, Lipid Peroksidasyon, Aterosklerozis, Melatonin, Rat.

ABSTRACT

Effect of Melatonin on Homocysteine-Induced Changes in Oxidant-Antioxidant Systems and Coronary Arteries 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 melatonin 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 melatonin. 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, intraperitoneally) + melatonin (1 mg/kg, subcutaneous) were administered to the melatonin 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 melatonin group. When compared to the control group, activities 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 melatonin 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 activities of plasma SOD, CAT, GSH, GSH-Px and tissue GSH, GSH-Px. On the other hand, administration of melatonin decreased the levels of plasma homocysteine, MDA and tissue MDA, while it increased the activities of plasma SOD, CAT, GSH, GSH-Px and tissue GSH, GSH-Px.

Key Words: Homocysteine, Lipid Peroxidation, Atherosclerosis, Melatonin, Rat.

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

GİRİŞ

Homosistein diyetle bulunmaz, fakat memelilerde metiyonin metabolizmasının esansiyel bir arametabolitidir. Hem homosistein hem de metiyonin birbirlerinin prekürsörleridirler, birinin yıkılması diğerinin sentez aşamasını oluşturmaktadır. Bu ilişkinin temelini metiyonin metabolizması oluşturur (1). Homosistein-metiyonin ilişkisindeki doğrusal bozukluklar klinik olarak hiperhomosisteinemiye neden olurken son zamanlarda genetik bozukluklar yanında edinsel patoloji, toksisite ve beslenme yetersizliğinden kaynaklanan hiperhomosisteinemi üzerinde de 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 (2, 3). Homosisteinüriye nedenli ölümler sonucu yapılan incelemelerde (4) 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. Hiperhomosisteinemi de aterosklerotik olaylar iki alanda toplanmaktadır. Bunlar damar endotelindeki fonksiyonel anomaliler ile endotel hasarı ile başlayıp bunu takip eden trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu ve trombüs formasyonu sonucu endotel üzerine daha toksik etki göstermesidir (5).

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir. (6, 7). 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 aktivitelerinde önemli değişiklikler ve lipid peroksidasyonunda artış, birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (8, 9).

Melatonin pineal bezden salgılanan bir nörohormondur. Sekresyonu gece en yüksek olmak üzere ritmik bir özellik gösterir. Son zamanlarda melatoninin oksidan stresi azaltıcı etkileri olduğu görülmüştür. Serbest radikallerin anormal üretimi protein, lipid ve nükleik asitleri etkileyerek bazı makromoleküllerin zararlı olmalarına yol açar ve birçok hastalığın temelinde bu yatar. Normal şartlar altında serbest radikallerin oluşturacağı zararlı etkiler hücre koruma sistemi ile kontrol edilir. Bu koruyucu sistemler melatonin, vitamin E, Vitamin C

ve glutasyon etkinliği, enzimatik olan veya enzimatik olmayan mekanizmalar olabilir (10). Melatonin sentezinin son basamağı, N-asetilserotoninin metilasyonudur ve bu mekanizma homosistein-metiyonin gibi kükürt içeren aminoasitlerin metabolizması sırasında oluşan metil verici S-adenozil metiyonini (SAM) gerektirir. Homosisteinin de metiyonine remetilasyonu için folat gerekmektedir. Melatonin salgılanmasının folat yetersizliğinden etkilendiği ileri sürülmüştür (11).

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

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Kasım 2002-Ocak 2003 tarihleri arasında yapıldı. Araştırmada Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde 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. Ratlara, Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen rat yemi ve su ad libitum verildi. Ratlar her grupta 20 adet (10 dişi, 10 erkek, n=20) olacak şekilde 3 gruba ayrıldı ve gruplar kontrol, homosistein ve melatonin olarak isimlendirildi. Altı hafta boyunca her gün kontrol grubuna serum fizyolojik, homosistein grubuna 0.71 mg/kg homosistein periton içi, melatonin grubuna da 0.71 mg/kg homosistein (ip) + 1 mg/kg melatonin derialtı olarak uygulandı.

Gruplardaki bütün ratlar 6 haftalık uygulamadan sonra eterle uyutularak karın boşlukları 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 °C'deki derin dondurucuda muhafaza edildi (2).

Plazmada Homosistein Düzeyinin Belirlenmesi

Plazma homosistein düzeyleri ticari test kitleri kullanılarak ELISA ile ölçülüp sonuçlar µmol/L olarak ifade edildi (2).

Malondialdehit (MDA), Glutasyon (GSH) ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini

Karın boşluğu açıldıktan sonra A. femoralis'in bifurkasyon bölgesinden antikoagülanlı tüplere kan alındı ve 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek plazması çıkarıldı. Karaciğer dokusundan 1 gr alınarak doku örnekleri hazırlandı. Plazma ve dokuda Malondialdehit (MDA) tayini Placer ve ark. (13)'ün tanımladığı spektrofotometrik yöntemle göre belirlenerek elde edilen sonuçlar nmol/ml, GSH düzeyi Sedlak ve Lindsay (14)'ün belirttiği şekilde spektrofotometre ile yapılarak µmol/ml, GSH-Px aktivitesi Lawrence ve ark. (15)'nin bildirdiği şekilde spektrofotometre ile belirlenerek IU/g-protein, plazma katalaz enzimi tayini Goth (16)'un tarif ettiği şekilde spektrofotometre ile yapılarak KU/L ve plazma SOD enzim aktivitesi tayini Flohe ve ark. (17)'nin tarif ettiği şekilde spektrofotometre ile 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 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 hematoksil-eozin boyama yöntemi 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 veriler $\bar{X} \pm S_x$ olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 10.0 paket programıyla yapıldı. Plazma homosistein, SOD, MDA, GSH, GSH-Px, katalaz, doku MDA, GSH, GSH-Px aktivitelerinin 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 yararlandı (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-Whitney-U testi kullanılmıştır (20).

BULGULAR

Erkek ve dişi ratların plazma homosistein, MDA, GSH, GSH-Px, SOD, CAT ve doku MDA, GSH, GSH-Px aktiviteleri 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). Gruplar arası 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). Melatonin grubu ratların plazma homosistein düzeyleri kontrol ve homosistein grubu ratların plazma homosistein düzeylerinden düşük (P<0.05) bulunmuştur.

Plazma Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Homosistein ve melatonin 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. Melatonin grubu erkek ve dişi ratların plazma MDA düzeyleri, hem kontrol hem de homosistein grubu ratların plazma MDA düzeylerinden düşük (P<0.05) bulunmuştur.

Plazma Redükte Glutasyon (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 grubu ratların plazma GSH düzeylerinden düşük (P<0.05) bulunmuştur. Melatonin grubu erkek ve dişi ratların plazma GSH düzeyleri, hem kontrol hem de homosistein grubu ratların plazma GSH düzeylerinden ise yüksek (P<0.05) bulunmuştur.

Tablo 1. Homosistein, MDA ve Antioksidan Enzim Düzeyleri.

Gruplar (n=20)	Plazma Homosistein Düzeyi ($\mu\text{mol/L}$)	Plazma MDA Düzeyi (Nmol/ml)	Plazma GSH Düzeyi ($\mu\text{mol/ml}$)	Plazma GSH-Px Aktivitesi (IU/grprotein)	Plazma Katalaz Aktivitesi (KU/L)	Plazma SOD Aktivitesi (U/ml)	Doku MDA Düzeyi (Nmol/ml)	Doku GSH Düzeyi ($\mu\text{mol/ml}$)	Doku GSH-Px Aktivitesi (IU/grprotein)
Kontrol	Erkek	4.82 $\pm 0.07^a$	1.44 $\pm 0.02^a$	0.186 $\pm 0.002^a$	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 $\pm 0.001^A$	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 $\pm 0.002^b$	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 $\pm 0.002^A$	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	***	***	***	**	***	*	***	***
Melatonin	Erkek	3.28 $\pm 0.02^c$	1.27 $\pm 0.02^c$	0.206 $\pm 0.003^c$	22.12 $\pm 0.21^c$	3.15 $\pm 0.01^c$	20.17 $\pm 0.18^c$	2.78 $\pm 0.02^c$	27.77 $\pm 0.18^c$
	Dişi	3.08 $\pm 0.02^C$	0.99 $\pm 0.02^B$	0.212 $\pm 0.001^B$	23.68 $\pm 0.28^C$	3.94 $\pm 0.01^B$	20.37 $\pm 0.11^C$	2.93 $\pm 0.02^C$	31.17 $\pm 0.12^C$
	P	***	***	***	***	***	—	***	***

a,b,c: Aynı sütun içerisinde değişik harfler taşıyan ortalama erkek birey değerleri arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemlidir ($P < 0.05$).A,B,C: Aynı sütun içerisinde değişik harfler taşıyan ortalama dişi birey değerleri arasındaki farklılıklar istatistik 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 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktiviteleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların plazma GSH-Px aktiviteleri 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 aktiviteleri, kontrol grubu ratların plazma GSH-Px aktivitelerinden düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Melatonin grubu ratların plazma GSH-Px aktiviteleri ise hem kontrol hem de homosistein grubu ratların plazma GSH-Px aktivitelerinden yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur.

Plazma Katalaz Aktiviteleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların plazma Katalaz aktiviteleri 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 katalaz aktiviteleri, kontrol grubu ratların plazma katalaz aktivitelerinden düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Melatonin grubu ratların plazma katalaz aktiviteleri, hem kontrol hem de homosistein grubu ratların plazma katalaz aktivitelerinden yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur.

Plazma Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktiviteleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların plazma SOD aktiviteleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P<0.001$). Gruplar arası erkek ratların kendi aralarında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların plazma SOD aktiviteleri kontrol grubu ratların plazma SOD aktivitelerinden düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Melatonin grubu erkek ve dişi ratların plazma SOD aktiviteleri hem kontrol hem de homosistein grubu ratların plazma SOD değerlerinden yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur.

Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Homosistein grubu erkek ve dişi ratların doku MDA düzeyleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P<0,05$). Gruplar arası hem erkek hem de dişi ratların kendi aralarında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların doku MDA düzeyleri, kontrol grubu ratların doku MDA düzeylerinden yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur. Melatonin grubu ratların doku MDA düzeyleri ise hem kontrol hem de homosistein grubu ratların doku MDA düzeylerinden düşük ($P<0.05$) bulunmuştur.

Doku Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyleri

Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların doku GSH düzeyleri arasında dişi ratlarda daha fazla

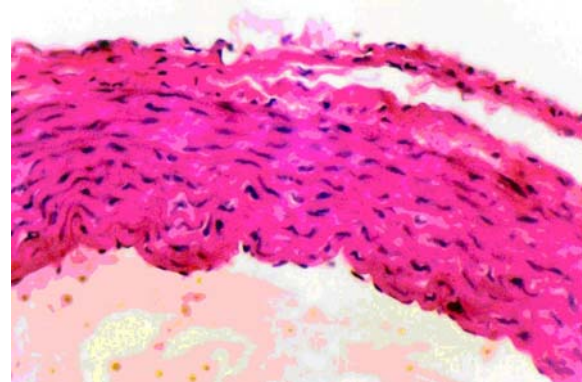
olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P<0.001$). Gruplar arası hem erkek hem de dişi ratların kendi aralarında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların doku GSH düzeyleri, kontrol grubu ratların doku GSH düzeylerinden düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Melatonin grubu ratların doku GSH düzeyleri ise hem kontrol hem de homosistein grubu ratların doku GSH düzeylerinden yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur.

Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktiviteleri

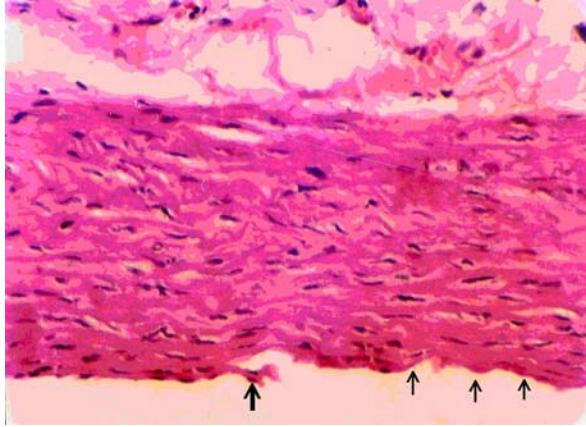
Bütün gruplardaki erkek ve dişi ratların doku GSH-Px aktiviteleri arasında dişi ratlarda daha fazla olmak üzere anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($P<0.01$, $P<0.001$). Gruplar arası hem erkek hem de dişi ratların kendi aralarında karşılaştırılması sonucu; homosistein grubu ratların doku GSH-Px aktiviteleri,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

Kalp Damarlarının Morfolojik Yapısındaki Değişimler

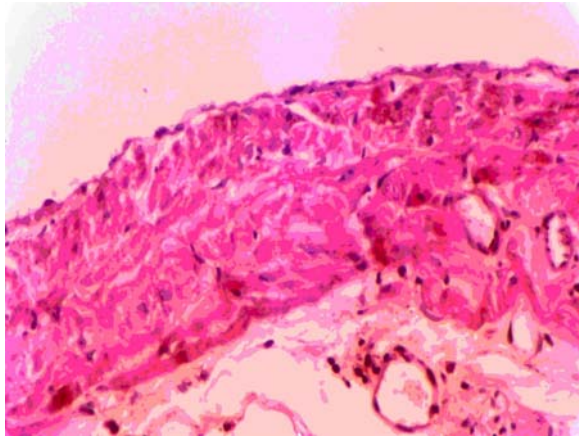
Kontrol grubu (Şekil 1) erkek ratlar ile karşılaştırıldığında homosistein grubu (Şekil 2) erkek ratların kalp damarları endotel hücrelerinin yer yer deskuamasyona uğradığı ve bu alanda epitel hücrelerin dökülmesiyle karakterize erken dönem aterosklerozis şekillendiği dikkati çekmiştir. Melatonin uygulaması ise homosistein grubu erkek ratların damar endotelinde gözlenen patolojik durumları düzeltmiş olup kontrol grubunun damar endotel yapısına benzer duruma getirmiştir (Şekil 3). Ayrıca bu çalışmada 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. Melatonin grubu erkek ratların kalp damarlarındaki endotel hücrelerinin görünümü. Kontrol grubuna benzer normal histolojik yapı (H.E, x200).

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalar (21, 22), koroner arter hastalıkları için geleneksel risk faktörlerinin (sigara içimi, 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. Kalp-damar hastalıklarının gelişiminde plazma homosistein derişiminin yükselmesinin 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 içimi,

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 (23, 24).

Östrojenin plazma homosisteinini farklı yollarla etkilediği belirtilmiş fakat yine de plazma homosistein derişimi üzerine östrojenin etkisi tam olarak açıklanamamıştır (25, 26). Dimitrova ve ark. (27) erkek ratlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada östrojen uygulamalarının total plazma homosistein derişimini düşürdüğünü ve yine aynı çalışmada diyetlerinde homosistein bulunan ratların endotelial değişimlere (damar endotelinin kalınlaşması ve hücre infiltrasyonu gibi) uğradığı 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. (28), kortizol ve östrojenin karaciğer ve böbrekteki enzim aktivitelerini etkileyerek plazma homosistein derişimini düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Bu çalışmada tüm gruplar incelendiğinde dişi ratların plazma homosistein değerlerinin bütün gruplarda erkek ratlardan anlamlı derecede düşük bulunduğu görülmektedir. Bu çalışmada dişilerde plazma homosistein düzeyinin erkeklerinkine oranla düşük bulunması östrojenin total plazma homosisteinini düşürücü etkisinin olduğunu belirten literatür bilgilerle paralellik göstermektedir (27).

Çalışmalar, melatoninin güçlü bir antioksidan olduğunu göstermiştir (10, 29). Melatonin serbest radikallerin ve reaktif türlerinin direkt temizleyicisidir. Diğer yandan melatonin glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon redüktaz (GSSG-Rd), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi çeşitli antioksidan enzimlerin uyarıcısıdır (10). Serbest radikallerin anormal üretimi protein, lipid ve nükleik asitleri etkileyerek bazı makro moleküllerin yıkılmasına yol açarak birçok hastalığın temelini oluşturur. Normal şartlar altında serbest radikallerin oluşturacağı zararlı etkiler hücre koruma sistemi ile kontrol edilmektedir. Bu koruyucu sistemler melatonin, vitamin E, Vitamin C ve glutasyon gibi enzimatik veya enzimatik olmayan mekanizmalar aracılığı ile etkilerini göstermektedirler (10).

Baydaş ve ark. (10) pinealektomize edilen ratların dokularında lipid peroksidasyon düzeyleri, glutasyon peroksidaz aktivitesi ve okside glutasyon gibi antioksidan enzimlerin günlük değişimlerini incelemişler ve hem ekzojen hem de endojen melatoninin antioksidan enzim aktivitesini artırdığını saptamışlardır. Bu enzimlerin bir kısmının

melatoninin sirkadiyan ritmi ile paralellik gösterdiği ve pinealektomize ratlarda bu ritmin etkilendiği belirtilmiştir. Çalışmamızda; homosistein ile birlikte melatonin uygulanan gruptaki ratların plazma SOD, GSH, GSH-Px, katalaz değerleri incelendiğinde kontrol ve homosistein grubu ratlardan yüksek olduğu belirlenmiştir. Bulgularımız, melatoninin direkt antioksidan enzimleri uyarıcı etkisiyle antioksidan özelliği gösterdiğini belirten literatür bildirimleriyle uygunluk göstermektedir (10, 29).

Melatonin, lipoik asit ve E vitamini ile plazma MDA düzeyleri arasında negatif bir ilişki bulunmaktadır (30). Serafinowicz ve ark. (31), hiperhomosisteinemik ratlarda lipit peroksidasyon ürünlerinin ve karotid intimal media kalınlığının artmış olduğunu belirtmişlerdir. Cavalca ve ark. (32), plazma homosistein ve plazma MDA artışının kalp-damar hastalıkları ile birlikte olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki tüm grupların plazma ve doku MDA değerleri incelendiğinde; 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 (32).

Gilad ve ark. (33), homosisteinin hem GSH-Px aktivitesini inhibe ettiğini hem de bu enzimin m-RNA' sını önemli düzeyde azalttığını bildirmişlerdir. Ovrebo ve Svardal (34), ratlarda plazma homosistein miktarı ile plazma sistein ve glutatyon konsantrasyonu arasında negatif bir ilişkinin var olduğunu belirtmişlerdir. Dayal ve ark. (35), yüksek miktarda metiyonin içeren diyetle beslenen farelerde toplam 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, melatonin uygulamasının ise homosistein grubunda görülen bu azalmaları derinleştirdiği görülmüştür. Ancak dişilerde homosistein uygulaması sadece doku GSH düzeylerinde bir azalmaya neden olmuştur. Bu araştırmada, homosistein uygulanan erkek ve dişi ratların plazma ve doku GSH-Px değerlerinin kontrol grubuna göre düşük olduğu, ayrıca homosistein ile birlikte melatonin uygulanan gruptaki ratların plazma ve doku GSH-Px değerlerinin, kontrol ve homosistein grubu ratlardan daha yüksek olduğu ve literatür bildirimleri (33-35) ile benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır.

Homosistein, SOD' ın endotel hücre yüzeyine bağlanmasını sağlayan endotel heparan sülfat proteoglikanını bozarak arteriyel endotel hücre yüzeyine SOD' ın bağlanmasını engellemektedir. Yüksek miktarda homosistein fibroblastarca ortama verilen SOD basımını azaltmaktadır. Böylece homosistein, endotel hücrelerinin özellikle süperoksit radikali olmak üzere serbest radikallere karşı savunma yeteneğini azaltmaktadır (36). Mevcut çalışmada grupların plazma SOD ve CAT değerleri incelendiğinde; homosistein uygulanan ratların plazma SOD ve CAT değerleri, kontrol ve melatonin grubu ratların plazma SOD ve CAT değerlerinden düşük bulunmuştur. Elde edilen değerler homosisteinin plazma SOD ve CAT aktiviteini azalttığı ve melatoninin de bu azalmaları derinleştirdiği yönündeki literatür bildiriyle (10, 36) paralellik göstermektedir.

Periton içi homosistein uygulamaları karotid arterlerde intimal hiperplaziye ve hücre proliferasyonuna sebep olmaktadır (37). Plazma toplam homosistein miktarları ile karotid arterlerin duvar kalınlığı arasında pozitif bir ilişkinin var olduğu bildirilmektedir (38). Rasyonlarında fazla miktarda metiyonin bulunan tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada (39), ateroskleroz riskinin ve lipit peroksidasyonun artmış olduğu ayrıca antioksidan enzimlerin etkinliğinde düzensizlikler tespit edilmiştir. Farhat ve ark. (40) hiperhomosisteinemili ratlarda oluşmuş olan aterosklerotik lezyonlara karşı östrojen uygulamalarının koruyucu etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada 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. Melatonin 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 (37-40) paralellik göstermektedir. Ayrıca bu araştırmada homosistein uygulamasının dişi ratların damar morfolojisinde herhangi bir patolojik lezyona neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum östrojenin damar endotelinde lezyonların oluşmasına yol açan homosisteini baskılaması (40) ile izah edilebilir.

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

peroksidasyon ürünleri üzerine baskılayıcı bir etki gösterdiği ve antioksidan enzim aktivitesini artırdığı, ayrıca kalp damarlarında oluşabilecek dejeneratif değişiklikleri önleyebileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. James DF, John JM. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 385-389.
2. Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, et al. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 704-709.
3. Den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WBJ. Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis?. *Lancet* 1995; 345: 882-885.
4. Malinow M, Nieto F, Szklo M. Carotid artery intima medial wall thickening and plasma homocysteine in asymptomatic adults. *Circulation* 1993; 87: 1107-1113.
5. Brattstrom L, Israelson B, Tengborn L. Homocysteine, factor VII, and antithrombin III in subjects with difference gene damage for cystathionine β synthase. *J Inherit Metab Dis* 1989; 12: 475-482.
6. Freeman BA, Crapo ID. Biology of disease-free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412.
7. Lunec J, Blake D. Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes, P. 1990; 189- 212, Ed. R.D. Cojhen, Balliere Tindall, London.
8. 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.
9. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, 2. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
10. 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.
11. Arendt J, Deacon S, English J, et al. Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res.* 1995; 4: 74-79.
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. Estimation of product of lipid peroxidation (Malonly Dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
14. Sedlak J, Lindsay RHC. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphydryl 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. Sümbüllüoğlu K, Sümbüllüoğlu VD. *Bioistatistik*. 4. Baskı Özdemir Yayıncılık LTD. ŞTİ. Ankara, 1993.
21. 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.
22. Chen P, Poddar R, Tipa EV, et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: Implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Advan Enzyme Regul* 1999; 39: 93-109.
23. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
24. 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.
25. 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.
26. Van Der Mooren MJ, Wouters MG, et al. Hormone replacement therapy may reduce high serum homocysteine in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 733-736.

27. Dimitrova KR, Degroot KW, Pacquing AM, et al. Estradiol prevents homocysteine-induced endothelial injury in male rats. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 589-596.
28. Kim MH, Kim E, Passen EL. Cortisol and estradiol: non genetic factors for hyperhomocystinemia. *Metabolism* 1997; 46: 247-249.
29. Baydas G, Ercel E, Canatan H, et al. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell Biochem Funct* 2001; 19: 37-41.
30. 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.
31. Serafinowicz A, Kukula K, Cieciora T, et al. Homocysteine and lipid peroxidation products: Impotent atherosclerosis risk factors in renal allograft recipients?. *Transplant Proc* 2000; 32: 1367-1368.
32. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, et al. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem* 2001; 47 (5): 887-892.
33. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, et al. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sciences* 1997; 60(10): 169-174.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drozd M, et al. Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1995; 115: 217-224.
40. Farhat MY, Dinggaan 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.