T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

SAĞLIKLI KİŞİLERDE VE KORONER KALP HASTALARINDA BİTKİ STEROLLERİ, TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE (TAS), OKSİDE LDL (OX-LDL) VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Abdullah SİVRİKAYA

Danışman

Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU

KONYA-2007

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

SAĞLIKLI KİŞİLERDE VE KORONER KALP HASTALARINDA BİTKİ STEROLLERİ, TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE (TAS), OKSİDE LDL (OX-LDL) VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Abdullah SİVRİKAYA

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 17.10.2007 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:Jüri Başkanı (Danışman) Prof.Dr. İdris MEHMETOĞLU

Üye Prof. Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ

Üye Prof. Dr. Hüseyin VURAL

Üye Prof. Dr. Hakkı GÖKBEL

Üye Doç. Dr. Ali ÜNLÜ

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ……...…1

2.LİTERATÜR BİLGİ…….……..……..3

2.1.KORONER KALP HASTALIĞI (KKH)…….....3

2.1.1.Epidemiyolojik Risk Faktörleri…….…….....4

2.1.2.Ateroskleroz Oluşum Hipotezleri……..……..….5

2.2.OKSİDE LDL……..……..……9

2.2.1.LDL'nin Oksidasyon Mekanizması…….…….……..10

2.3.SERBEST RADİKALLER…….....12

2.3.1.Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)……..14

2.3.1.1.Süperoksit Radikali ($O_2.^-$)……....15

2.3.1.2.Hidrojen Peroksit…….15

2.3.1.3.Hidroksil Radikali……15

2.3.1.4.Singlet Oksijen…….....16

2.4.ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ……16

2.4.1.Enzim Yapısındaki Antioksidanlar…….17

2.4.1.1.Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)……...17

2.4.1.2.Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px,E.C.1.11.19)……..17

2.4.1.3.Glutatyon-S–Transferazlar (GST) (E.C.2.5.1.18)……18

2.4.1.4.Katalaz (E.C.1.11.1.6)……..……18

2.4.1.5.Mitokondrial Sitokrom Oksidaz……..……18

2.4.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar…….....19

2.4.2.1.C Vitamini (Askorbik Asit)……..19

2.4.2.2.E Vitamini (Tokoferoller)……....19

2.4.2.3.Karotenoidler……....20

2.4.2.4.Glutatyon (GSH, Gamma—Glutamil-Sisteinil-Glisin)……20

2.5.HOMOSİSTEİN……..…….21

2.5.1.Homosistein Metabolizması……..……..21

2.5.2.Homosisteinin İnvitro etkileri:……...….24

2.5.3.Homosistein ve Vitamin Durumu…….……..…25

2.5.4.Metiyonin Yüklenmesi……..…….25

2.5.5.Plazma Total Homosistein……..….26

2.5.6.Hiperhomosisteinemi ve KKH İle Bağlantısı……..28
2.5.7.Homosisteinemi ve Antioksidanlar…….....30
2.5.8.Klinik ve Farmakolojik Yaklaşımlar……...31
2.6.SİTOSTEROLEMİ (β-SİTOSTEROLEMİ)…...……...32
2.6.1.Sitosteroller'in Emilimi ve Biyokimyası…….....33
2.6.2.Sitosteroleminin Patofizyolojisi…….35
3. MATERYAL VE METOD……42
3.1. Materyal…….42
3.2. Metod…….44
3.2.1. Kullanılan Cihaz Ve Malzemeler……...44
3.2.2.Kullanılan çözeltiler…..……..45
3.2.3.Analizler……..46
3.2.3.1 Bitki Sterolleri Ölçümü ……...46
3.2.3.2. Ox-LDL Ölçümü ……48
3.2.3.3.Homosistein Ölçümü……...…….49
3.2.3.4. Total Antioksidan Aktivite(TAS) Ölçümü ……49
3.2.3.5. Kolesterol ölçümü……...50
3.2.4.İstatistiki Analiz……..50
4.BULGULAR……51
5.TARTIŞMA VE SONUÇ…….……..57
6.ÖZET…….……..66
7.SUMMARY…….....68
8.LİTERATÜR LİSTESİ……..70
9.ÖZGEÇMİŞ……..……..82
10.TEŞEKKÜR…….……....83

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Hasara yanıt hipotezinin şematik görünümü……6
Şekil 2.2: Retansiyona yanıt hipotezi…….……..7
Şekil 2.3: Oksidatif Modifikasyon Hipotezi……8
Şekil 2.4: Remetilasyon yolu……23
Şekil 2.5: Sitosterollerin kimyasal yapıları……..34
Şekil 2.6: Diyetle alınan bitki sterollerinin enterosit'e alınması……..36
Şekil 3.1 a): β-sitosterol ve stigmasterol 100µg/ml, kolesterol 5000µg/ml)……47
Şekil 3.1 b) β-sitosterol ve stigmasterol 25 µg/ml, kolesterol 1250µg/ml……..…..…47
Şekil 3.1 c) β-sitosterol ve stigmasterol 5 µg/ml, kolesterol 250µg/ml……...…48
Şekil 3.2 Homosistein 15µmol/L…….49
Şekil 4.1: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait kolesterol değerleri…….52
Şekil 4.2: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait stigmasterol değerleri……..52
Şekil 4.3: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait β-sitosterol değerleri……52
Şekil 4.4: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait Ox-LDL değerleri……53
Şekil 4.5: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait homosistein değerleri……..53
Şekil 4.6: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait TAS değerleri……..53

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Total plazma homosistein komponentleri ve yüzdeleri……..24
Tablo 2.2: Total plazma homosistein dağılımı…….27
Tablo 2.3: Açlık plazma homosistein seviyelerinin üst limit referans aralıkları……..27
Tablo 2.4: Plazma total homosistein seviyesini artıran faktörler…….28
Tablo 3.1: Hasta grubu ve kontrol grubunun özellikleri…….…….43
Tablo 3.2: Vakalarımıza ait rutin olarak ölçülen lipit parametreleri……43
Tablo 4.1: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait homosistein, Ox-LDL, TAS, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol parametrelerinin karşılaştırması ($\bar{X}$±SE)…….....51
Tablo 4.2: Beş grupluk sınıflandırmaya göre KKH'larına ait homosistein, Ox-LDL, TAS, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol parametrelerinin karşılaştırması ($\bar{X}$±SE)…….54
Tablo 4.3: Majör epikardiyal koroner arterlerdeki <%50 ve ≥%50 sitenozu olan kadın ve erkek hastalara ait homosistein, Ox-LDL, TAS, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol parametrelerinin karşılaştırması ($\bar{X}$±SE)……..55
Tablo 4.4: Hasta grubuna ait parametreler arasındaki korelasyonlar……55
Tablo 4.5: Kontrol grubuna ait parametreler arasındaki korelasyonlar…….56

KISALTMALAR

ABTS: 2',2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulphonate)

Apo B100: Apolipoprotein B-100

eNOS: Endoteliyal nitrik oksit sentaz

GSH: Redükte glutatyon

GST: Glutatyon - S – transferaz

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein

H_2O_2: Hidrojen peroksit

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

KKH: Koroner kalp hastalığı

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

M-CSF: Makrofaj koloni uyarıcı faktör

MCP-1: Monosit kemoatraktant protein-1

MDA: Malondialdehit

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NO: Nitrik oksit

ROS: Reaktif oksijen türleri

SOR: Serbest oksijen radikali

NOS: Nitrik oksit sentaz

$OH^{-\cdot}$: Hidroksil radikali

$O_2^{-\cdot}$: Süperoksit radikali

$ONOO^-$: Peroksinitrit

Ox-LDL: Okside LDL

SOD: Süperoksit dismutaz

GSSG: Okside glutatyon

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

PUFA: Poliansatüre yağ asitleri

tHcy: Total homosistein

MTHFR: Metilen tetra hidrofolat redüktaz

CBS: Sistatiyonin β-sentaz

MS: Metiyonin sentaz

CH_3THF: 5-metil tetra hidrofolat

BHMT: Betain-homosistein metil transferaz

SAM: S-adenozil metiyonin

SAH: S-adenozil homosistein

CYS: Gamma sistatiyonaz

THF: Tetrahidrofolat

CH2THF: 5,10,-metilen tetrahidrofolat

ADMA: Asimetrik Dimetilarjinin

ABCG8: ATP-bağlayıcı kaset G8 transport protein

ABCG5: ATP-bağlayıcı kaset G5 transport protein

TAS: Total antioksidan aktivite

ACAT : Açil-CoA-kolesterol açiltransferaz

LCAT: Lesitin:kolesterol açiltransferaz

AP: Angina pektoris

UAP: Anstabil angina pektoris

STEMI: ST elevasyonlu miyokard infarktüsü

1.GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar, özellikle sanayileşen ülkelerde, birleşik devletlerde ve çoğu batı ülkelerinde mortalitenin önde gelen nedenlerindendir (Jacobsen 1998, Wang ve ark 2004). Koroner kalp hastalığı (KKH) hemen hemen ateroskleroz sunucunda gelişmektedir. KKH'ın diğer nadir sebepleri; arterit embolizm, koroner mural kalınlaşma koroner lümen daralmasının diğer sebepleri ve konjenital KKH olarak sayılabilir (Gök 2002).

Ateroskleroz, miyokard enfarktüsü, anjina pektoris ve iskemik atağa yol açarak kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklara neden olmaktadır (Frei 1999). Ateroskleroz, kan damarlarının subendotelyal aralığında lipid, lipoprotein, mononükleer hücreler (monosit ve T hücreleri)'in birikimi, orta ve büyük çaplı arterlerin sertleşmeleri, arter duvarlarının elastikiyetinin kaybı ve arter lümeninin daralmasıyla oluşan inflamatuar kronik bir hastalıktır (Frei 1999, Leitinger 2005).

Lipoproteinlerin modifikasyonlara uğramasının ateroskleroz patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Kovacs ve ark 1997, Luoma ve ark 2005). Bu modifikasyonların aterosklerotik lezyon gelişimini hızlandırdığı, proinflamatuar sitokinlerin salınımını indüklediği, vazodilatasyonu azalttığı ve endotelyal hücrelerde toksisiteye neden olduğu bildirilmektedir (Shen ve Sevanian 2001).

Antioksidan savunma ile serbest radikaller arasındaki dengenin bozulması oksidan strese ve bunun sonucunda doku hasarına yol açmaktadır. Antioksidan sistem; serbest radikallerin zararlı etkisinden korunmada önemli role sahiptir (Taşkıran ve ark 2005). Artmış oksidatif stres ve süperoksit anyon oluşumu LDL-kolesterolün Ox-LDL'ye dönüşümünü arttırabilmektedir (Weinbrenner ve ark 2003). Ox-LDL de, aterosklerozda önemli rol oynamaktadır (Ndrepepa ve ark 2005).

Plazma homosistein yüksekliği de sigara ve hiperlipidemi gibi kardiyovasküler hastalık riskini arttırmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde kardiyovasküler hastalıkların %10'nun artmış total plazma homosistein düzeylerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Cesari ve ark 2005).

Gün geçtikçe kalp hastalığı riskini düşürücü diyetsel yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. Bunlardan biri de bitki sterolleridir. Sitosterollerin insan sağlığı açısından iki önemli etkileri vardır. Birincisi ve en önemli etkileri kolesterol emilimini yarışmalı olarak inhibe etmeleri ve böylece KKH açısından koruyucu etki yapmalarıdır (Jones ve ark 1999).

İkinci önemli etkileri ise genetik bozukluk sonucu fazla emilmeleri ve koruma yerine aksine risk oluşturmalarıdır. Sitosterolemi adı verilen bu genetik bozuklukta sitosteroller normalden fazla emilir ve ateroskleroz yaparlar (Salen ve ark 2004).

Sitosterolemi hastalarının kan ve çeşitli dokularında bitki sterolleri fazla miktarda biriktiği için, erken koroner ateroskleroza doğru bir eğilim gösterirler. Tedavi edilemeyen bu durum morbidite ve mortalitede önemli bir artışa sebep olmaktadır. Sitosterolemi otozomal genetik bir durum olduğu için cinsiyet ayırımı olmamakla birlikte erkeklerin sitosterolemi'nin ciddi komplikasyonlarına daha eğilimli olabileceği kaydedilmiştir (Salen ve ark 1992, Patel ve ark 1998).

Çalışmamızda, anjiografi ile damar tıkanıklığı tespit edilen koroner kalp hastalarında (KKH) serum Ox-LDL, homosistein, total antioksidan kapasite ve bitki sterol düzeylerini araştırarak bu parametrelerin, özellikle de bitki sterollerinin bölgemiz KKH'nda nasıl bir rol oynadıkları, araştırdığımız hastalarda genetik bir yatkınlık bulunup bulunmadığını araştırmayı amaçladık. Ayrıca, çalışmamızda, ölçümü son derece zor olan fakat klinik öneme sahip serum bitki sterollerinin HPLC yöntemi ile ölçümü gerçekleştirilerek bundan sonraki araştırmalar ve rutin uygulamalar için bir metodun optimize edilmesi amaçlanmıştır.

2.LİTERATÜR BİLGİ

2.1. KORONER KALP HASTALIĞI (KKH)

Gelişmiş batı ülkelerinde ölümlerin en az yarısı kardiyovasküler hastalıklar sebebiyle olmaktadır. Koroner arter hastalığı hemen hemen ateroskleroz sunucunda gelişmektedir. KKH'ın diğer nadir sebepleri; arterit, embolism, koroner mural kalınlaşma, koroner lümen daralmasının diğer sebepleri ve konjenital KKH olarak sayılabilir (Gök 2002).

Arteriyal intimada lipitlerin birikmesiyle ateroskleroz gelişmektedir (Quınn ve ark 1987). Aterosklerozun ilk adımı endotelyal disfonksiyonla sonuçlanan damar duvarlarındaki hasarla başlamaktadır. Bunu inflamatuar yanıt ve hücre proliferasyonu gibi aterosklerotik plak oluşumu izler. Sonuçta vasküler lezyon oluşumu, plak rupturü, tromboz ve doku infarktüsü meydana gelmektedir. Yaşlanma, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diyabet ve sigara içme de arterial endotelyal disfonksiyona yol açarlar (Vassalle ve ark 2004).

Arter duvarının en iç tabakası yağ depozitleri ve fibröz dokuyla kalınlaşmıştır. Aterosklerozun öncü lezyonları; yağ izleri (fatty streak) ve fibröz plaktır. Yağ izleri köpük hücre olarak bilinen kolesterol yüklü makrofajlardan oluşmaktadır. Yağ izleri, aterosklerozun en erken görülen bulgusudur. Bu durum üç yaşın altındaki çocuklarda bile görülmüştür (Gök 2002).

Batı tipi diyetle beslenen çoğu kişilerin arterlerinde 20 yaşında bir kısım yağ izleri görülür. İleri derecedeki yağ izleri arterin iç tabakasında sarı renkli olarak görülürler. Yağ izleri mikroskopik olarak bakıldığında; köpük görünümü veren intrasellüler lipitlerle dolu geniş hücrelerin (köpük hücreleri), subendotelyal bölgeye toplanmasıyla karakterizedir. Köpük hücrelerinin bir kısmı düz kas orijinli olsa da esas olarak lipidlerle yüklü makrofajlardır. "Fatty streak" komponentleri; makrofaj ve düz kas orijinli köpük hücreleri olarak bilinen geniş lipit yüklü hücrelerin, hasarlı veya disfonksiyonel endotel hücreleri altına toplanmasıdır. Fibröz plak, aterosklerozun en önemli patolojik lezyonudur ve hastalıkların kliniğinde önemli rol oynar. İlerleyen lezyon kalsifikasyon, yoğun ekstraselüler lipit birikimi ve nekrotik çekirdek gelişimine yol açmaktadır. Yağ izleri arteriyel damarlarda yaygın plak gelişmeyen bölgelerde bile oluşabilir. Fibröz plaklar soluk gri ve kabarık lezyonlardır. Mikroskopik

olarak, fibröz plaktaki değişikliklerin çoğu intimal tabakada meydana gelir ve burada monosit, lenfosit, köpük hücreleri ve konnektif doku toplanmıştır. Bazı lezyonlarda, hücre yıkıntılarının nekrotik çekirdeği, köpük hücreleri ve kolesterol kristalleri görülür. Bazılarında da konnektif matriks içinde düz kas hücrelerinden ibaret fibröz bir başlık bulunur. Yağ izlerinden farklı olarak, fibröz plak içindeki köpük hücrelerinin çoğu düz kas orjinlidir (Jıalal 1998, Gaut ve Heinecke 2001, Gök 2002).

2.1.1.Epidemiyolojik Risk Faktörleri

Tüm dünyada aterosklerozla ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Koroner arter hastalığının gelişmesini veya ilerlemesini önlemede ya da seyrini yavaşlatmada, özellikle reverzibl risk faktörleri çok önemlidir. Bunların en önemlileri; sigara içme, hipertansiyon ve hiperkolesterolemidir. Özellikle genç erişkinlerde bu risk faktörlerinin kontrolü koroner arter hastalığının yaygınlığını azaltmak için çok önemlidir. Risk faktörlerinin kontrolü hastalığı belirlenmiş olan kişilerin tedavisinde çok önemlidir (Gök 2002).

Koroner kalp hastalığı risk faktörleri:

a)Major risk faktörleri
Sigara içme
Hipertansiyon
Serum total kolesterol veya LDL kolesterol yüksekliği
HDL kolesterol düşüklüğü
Diabetes mellitus
Yaşlanma
b)Kondisyonel risk faktörleri
Trigliserid yüksekliği
Lipoprotein(a)
Homosistein
Pıhtılaşma faktörleri
Plazminojen aktivatör inhibitör-1
Fibrinojen
C-reaktif protein

c)Predispozan risk faktörleri

Obezite (özellikle abdominal obezite)

Fiziksel aktivite azlığı

Erkek cinsiyet

Ailede erken yaşta KKH bulunması

Sosyal ve ekonomik faktörler

Psikolojik faktörler

İnsülin direnci (Jıalal 1998, Durak ve Büyükkoçak 1998, Gök 2002).

2.1.2.Ateroskleroz Oluşum Hipotezleri

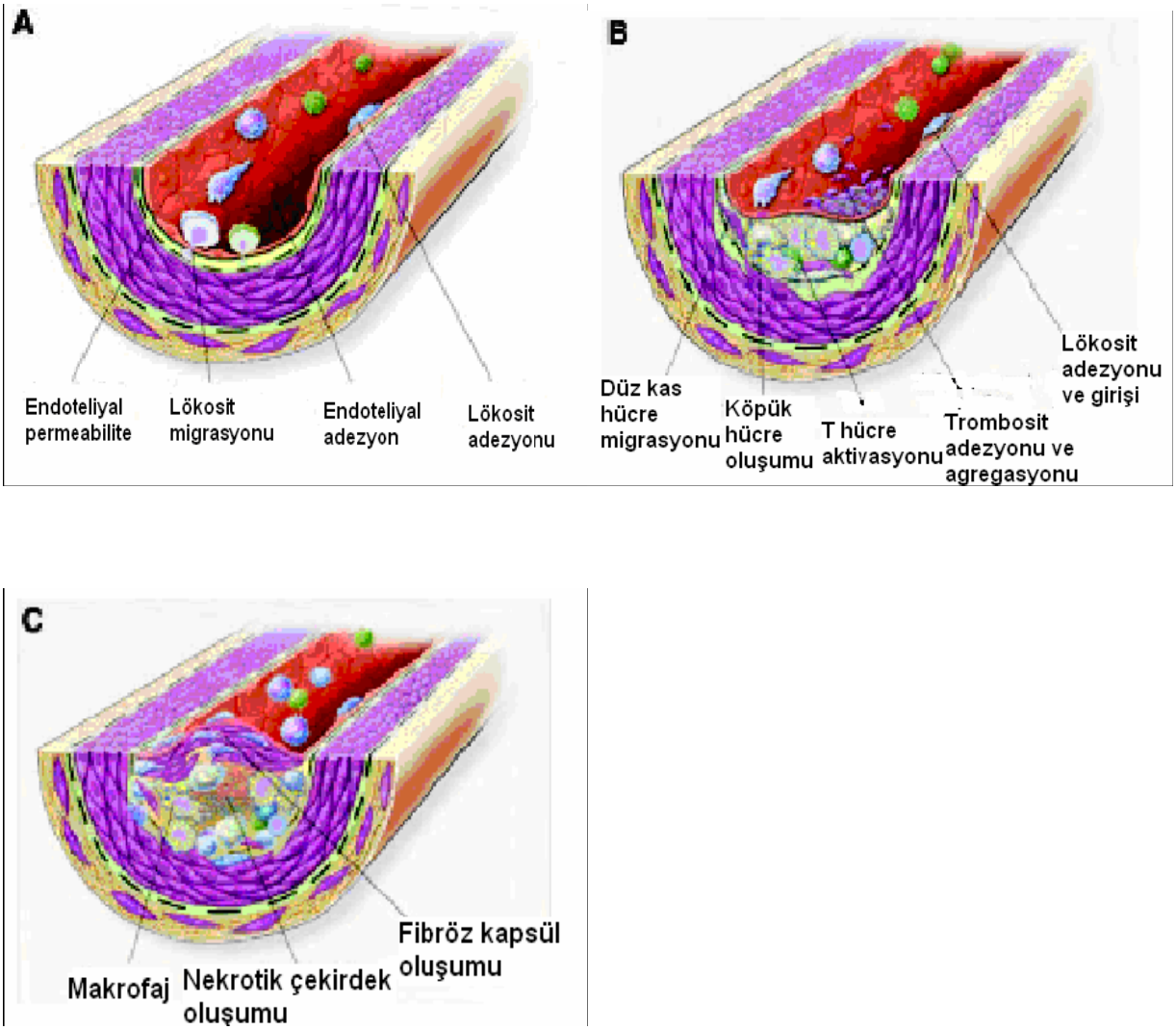
Ateroskleroz gelişimiyle ilişkili kompleks olayları açıklamak için üç farklı hipotez ortaya atılmıştır (Stocker ve Keaney 2004). Bunlar;

a) Hasara yanıt hipotezi

b) Tutulmaya (retention) yanıt hipotezi

c) Oksidatif modifikasyon hipotezidir.

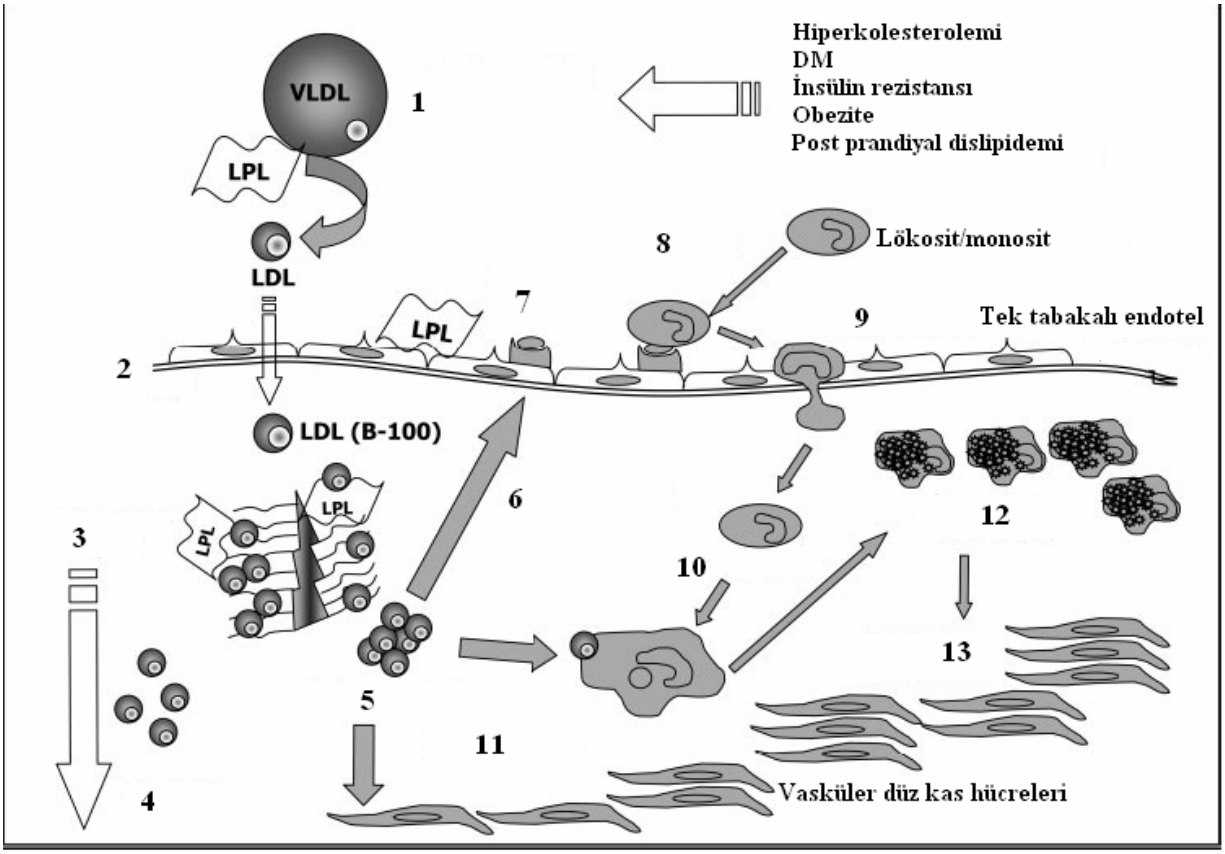
a) Hasara yanıt hipotezi: Endotel hasar, normal vasküler özellikleri değiştiren bir takım kompansatuvar cevaplara yol açar. Örneğin, hasar, lökosit ve trombositlerin endotele adezyonunu arttırır ve lokal vasküler antikoagulan çevreyi prokoagulan bir çevreye dönüştürür. Toplanan lökosit ve trombositler, sitokin, vazoaktif ajanlar ve büyüme faktörlerini salgılarlar ve intima içerisine düz kas hücre migrasyonunu ve onların proliferasyonu ile karakterize olan inflamatuar cevabı artırırlar (Stocker ve Keaney 2004). İnflamatuar cevabın diğer bir komponenti arter duvarı içerisine makrofajların toplanmasıdır. Bu makrofajlar düşük dansiteli lipoprotein (LDL) partiküllerini alarak içi lipid dolu köpük hücrelerini oluştururlar. Lipid birikimi ve köpük hücre oluşumu inflamatuvar cevapla devam eder. Devam eden inflamasyon olayını, sitokin, büyüme faktörleri ve proteolitik enzimlerin salınımı ile birlikte olan hücresel nekroz izler. Lezyonun otokatalitik olarak genişlemesiyle lezyon lümene doğru ilerler ve sonunda kan akımını bozar (Stocker ve Keaney 2004).



Şekil 2.1: Hasara yanıt hipotezi (Stocker ve Keaney 2004)

(A: Artmış endotel geçirgenliği ve subendotel aralığına LDL birikimi. Endotele lökosit adezyonu ve transmigrasyonu B: T hücre aktivasyonu, lökosit adezyonu, trombosit adezyon ve agregasyonu ile köpük hücre oluşumu C: Süregelen makrofaj birikimi, fibröz kapsül oluşumu ve lezyonun merkezinin nekrozu).

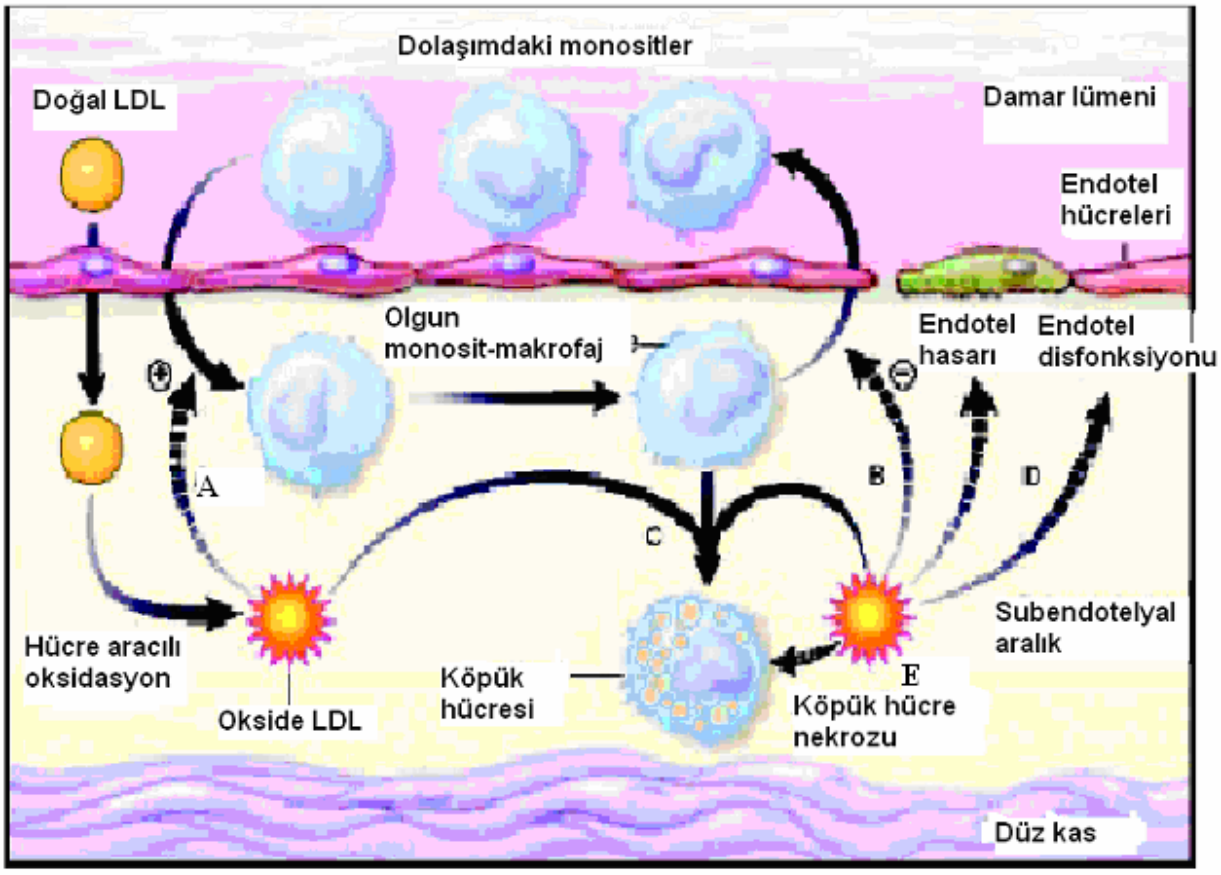
b) Retansiyona yanıt hipotezi: Bu hipoteze göre aterosklerozu başlatan olay lipoprotein retansiyonudur. Arter duvarına lipoprotein retansiyonu, ekstrasellüler matriks komponentleriyle bağlantılı gibi görünmektedir. Özellikle, apolipoprotein B-100 (Apo B-100) içeren lipoproteinlerin, damar duvarına birikiminin inflamatuvar kaskadı tetiklediği düşünülmektedir (Stocker ve Keaney 2004). Şekil 2.2'de retansiyona yanıt hipotezi özetlenmiştir.



Şekil 2.2: Retansiyona yanıt hipotezi (Stocker ve Keaney 2004)

1. Lipoprotein sekresyonu ve lipoliz 2. Artere geçiş 3.Bağlanma ve tutulma 4.Dışarı sızma (efflux) 5.Birikme 6.Kemotaksis 7. Adezyon moleküllerinin ekspresyonu 8. Eklenme 9.Damar dışına atılma 10.Farklılaşma 11.Modifiye LDL'nin içeri alınması 12.Köpük hücre oluşumu 13. Vasküler düz kas hücre proliferasyonu

c) Oksidatif modifikasyon hipotezi: Aterosklerozda oksidatif modifikasyon hipotezi, Goldstein ve arkadaşlarının kültüre makrofajların kimyasal olarak modifiye olmuş LDL (Ox-LDL) varlığında lipit yüklü hücrelere dönüştüğü sonucuyla ortaya çıkmıştır (Frei 1999). Modifiye LDL'nin in vitro düz kas hücresi ve endotel hücrelerinde monosit kemotaktik protein-1'in sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Ox-LDL, monosit ve lenfositler için kemotaktiktir ve Ox-LDL'nin düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Stocker ve Keaney 2004).



Şekil 2.3: Oksidatif Modifikasyon Hipotezi (Stocker ve Keaney 2004)

(A: Ox-LDL monosit kemotaksisini uyarır. B: Monosit gidişini engeller. C: Köpük hücre oluşumuna aracılık eder. D: Ox-LDL endotel disfonksiyonu ve hasarına yol açar. E: Ox-LDL birikiminden dolayı köpük hücre nekrozu oluşur).

2.2.OKSİDE LDL (Ox-LDL)

LDL, yoğunluğu 1.019-1.063 g/mL olan, her biri yaklaşık 1600 kolesterol esteri ve 170 trigliserit ihtiva eden bir lipoproteindir. Bu lipoproteinin etrafı 600 molekül kolesterol ve 700 fosfolipit molekülü (az miktarda sfingomiyelin ve lizolesitin, primer olarak lesitin içeren) ile sarılmıştır. Dış tabakasında gömülü halde 4536 amino asit içeren apo B-100 yer almaktadır. Bir LDL molekülünde yaklaşık olarak 2700 yağ asidi bulunmakta ve bunların yarısını poliansatüre yağ asitleri oluşturmaktadır. Bu yağ asitlerinden özellikle linolenik asit fazla miktarda bulunurken, araşidonik ve dokosaheksaenoik asitler daha azdır. İn vitro LDL, bakır ve demir gibi geçiş metallerinin varlığında oksidatif olarak modifiye olabilmektedir. LDL'nin yapısında bulunan poliansatüre yağ asitleri serbest radikal hasarı ve oksidasyona karşı çeşitli antioksidanlarla korunmaktadır. Bu antioksidanlar başlıca α-tokoferol olmak üzere (her LDL partikülü için altı molekül), az miktarda da karotenoidler, kriptoksantin, ubiquinol-10 ve Gamma-tokoferoldür (Mertens ve Holvoet 2001, Jıalal ve Devaraj 1996). Ox-LDL oluşumunun en erken safhası içeriğindeki poli ansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonudur (Weinbrenner ve ark 2003).

Lipoproteinlerin modifikasyonlara uğramasının ateroskleroz patogenezinde önemli bir rol oynadığı (Luoma ve ark 2005, Kovacs ve ark 1997), özellikle aterosklerotik lezyon gelişimini hızlandırdığı, proinflamatuar sitokinlerin salınımını indüklediği, vazodilatasyonu azalttığı ve endotelyal hücrelerde toksisiteye neden olduğu bildirilmektedir (Shen ve Sevanian 2001). LDL'nin oksidasyonu monositler, makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinde oluşabilmektedir (Young ve McEneny 2001).

Ox-LDL, normal arterlerde bulunmayıp sadece makrofajlarda aterosklerotik lezyonlarda bulunmaktadır (QIU ve ark 2006). Vasküler hücrelerde oksidatif stres ve süperoksit anyonunun artması LDL'nin Ox-LDL'ye dönüşümünü arttırmaktadır (Weinbrenner ve ark 2003).

LDL'nin oksidasyonu arterial intimanın ekstraselüler matriksinde meydana gelmektedir. Daha sonra makrofajlarda bulunan "scavenger reseptörleri" ile içeri alınırlar (Fredrikson ve ark 2003). Makrofajlar, düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) için reseptör taşırlar. Doğal LDL'ler makrofajlara genellikle bağlanamazken, özellikle Ox-LDL makrofaj

içine alınarak köpük hücrelerini oluşturur (Violi ve ark 2002). Bundan dolayı sadece modifiye LDL'ler makrofajlar tarafından doğal LDL'den 8-10 kat daha hızlı alınabilmektedir. Bu modifiye LDL'ler makrofajlarda LDL reseptörlerinden farklı olarak "asetil LDL reseptörleri" tarafından alınırlar (Baykal ve ark 1998). LDL'nin yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu malondialdehit (MDA) gibi reaktif ürünleri oluşturmaktadır. Bu ürünler daha sonra proteinlerin lizin kalıntılarıyla etkileşmektedir (Shaw ve ark 2001).

LDL partikülleri yapısında sadece kolesterol bulunmayıp, aynı zamanda kolestanol, kampesterol, sitosterol gibi kolesterol olmayan steroller de az miktarda bulunmaktadır (Miettinen ve ark).

Günümüzde LDL oksidasyonu ve ateroskleroz arasındaki ilişki, endotelyal hücrelere Ox-LDL aracılı hasar ispatlandığı zaman ilk olarak ortaya çıkmıştır. İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda karotis ve koroner arterlerden alınan aterosklerotik plak örneklerinde Ox-LDL'nin varlığı dikkat çekmiştir. Aterosklerotik lezyonlarda Ox-LDL'nin miktarı ile plazma Ox-LDL arasında da korelasyon olduğu bildirilmiştir (Ndrepepa ve ark 2005).

2.2.1.LDL'nin Oksidasyon Mekanizması

LDL metal iyonları (bakır ve demir gibi), lipoksijenaz, miyeloperoksidaz, ve reaktif nitrojen türleriyle okside olabilmektedir (Gaut ve Heinecke 2001, Mertens ve Holvoet 2001).

Metal iyonları

LDL'nin metal iyonlarıyla in vitro oksidasyonu üç safhada gerçekleşmektedir

a) Lag fazı: Bu safha endojen antioksidanların tükendiği safhadır (Mertens ve Holvoet 2001).

b) Propagasyon (ilerleme) fazı: Doymamış yağ asitlerinin lipit hidroperoksitlere oksidasyonunun olduğu safhadır (Mertens ve Holvoet 2001).

c) Dekompozisyon (parçalanma) fazı: Bu safhada hidroperoksitler 4-hidroksinonenal ve malondialdehit (MDA) gibi reaktif aldehitlere dönüşür. Bu aldehitler LDL'nin yapısında bulunan ApoB-100'ün lizin rezidüleriyle reaksiyona girerler (Young ve McEneny 2001, Mertens ve Holvoet 2001). Böylece modifiye ApoB immünojenik özellik kazanır (Weinbrenner 2003).

Lipoksijenaz

Lipoksijenaz poliansatüre yağ asitlerini (özellikle linoleat ve araşidonat) katalizleyen intraselüler bir enzimdir (Gaut ve Heinecke 2001). Aterosklerotik dokularda hem lipoksijenaz mRNA hem de lipoksijenaz protein tespit edilmiştir (Heinecke 1998). 15-lipoksijenaz, endotelyal hücreler ve monosit/makrofajlar tarafından üretilir. Poliansatüre yağ asitlerini lipit hidroperoksitlerine dönüştürür. Böylece Ox-LDL oluşur (Mertens ve Holvoet 2001).

Myeloperoksidaz

Miyeloperoksidaz, mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmalarının bir komponentidir. Nötrofil proteininin %5'ini, monosit proteininin %2'sini oluşturur (Gaut ve Heinecke 2001).

Aktif fagositler hipokloröz asit (HOCl), kloraminler, tirozil radikalleri ve nitrojen dioksit (NO_2) dahil reaktif maddeleri oluşturan myeloperoksidazı salgılarlar. Bu reaktif türleri antioksidanları, lipitleri ve LDL proteinini oksitler (Mertens ve Holvoet 2001).

Reaktif nitrojen türleri

Nitrik oksit (NO) çeşitli vasküler hücreler tarafından salgılanan bir serbest radikaldir. LDL'nin bakır aracılı ve hücre aracılı oksidasyonunu inhibe eder. NO aerobik koşullarda nitrite dönüşür. Nitritin düşük konsantrasyonları LDL'nin myeloperoksidaz aracılı oksidasyonunu inhibe etmektedir (Mertens ve Holvoet 2001). NO, serbest oksijen radikali ile reaksiyona girerek, güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit, LDL oksidasyonuna neden olur (Heinecke 1998).

Ox-LDL doğal LDL'den birçok yönden farklılık göstermektedir. Şöyleki:

-Ox-LDL immünojenik ve aterojeniktir (Young ve McEneny 2001, Tsimikas ve ark 2003, Nomura ve ark 2004).

-Sitotoksisiteyi indükler, tümör nekroz faktör salınımını inhibe eder, monosit/makrofajlardan interlökin-1β salınımını stimüle eder (Young ve McEneny 2001).

- Ox-LDL, monosit ve T lenfositler için kemoattraktandır.

-Arter duvarlarında makrofajların retansiyonunu artırarak makrofaj motilitesini inhibe eder.

-İlerlemiş lezyonlarda yağ çizgilerinin gelişimini ve endotelyal disfonksiyonu arttırır.

-Arter duvarında interlökin-1 ‘in salınımını stimüle ederek aterogenezi artırabilmektedir (Jıalal 1998).
-Dolaşımdaki monositler için kemotaktikdir (Luoma ve ark 2005).
-Endotel hücreleri ve makrofajları uyararak monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve makrofaj koloni-stimüle edici faktör (MCSF) sentezini indükler.
-Endotel hücrelerde adezyon moleküllerinin ekspresyonuna yol açar (Violi ve ark 2002).
-NO’nun endotelyal üretimini azaltarak, prostasiklin üretimini artırarak, prostaglandin ve prostaglandin prokürsörlerini sitimüle ederek platelet adezyonunu ve agregasyonunu stimüle eder (Mertens ve Holvoet 2001).
-Metalloproteinazların oluşumunu ve ROS oluşumunu arttırırken eNOS gen expresyonunu azaltmaktadır (Mehta 2006)

Lezyona eğilimli arter bölgelerini kaplayan vasküler endotelyum albümin dahil plazma proteinlerine, LDL ve fibrinojene geçirgenliğin arttığı tespit edilmiştir. LDL, subendotelyal aralıktaki kollajen ve glikozaminoglikanların ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanarak arter duvarında birikir (Frei 1999).

Aterosklerotik deney hayvanlarında α-tokoferol, probukol, bütil hidroksitoluen ve difenil fenilendiamin gibi antioksidanlar ile LDL oksidasyonunun azaldığı bildirilmektedir(Jıalal 1998). Lipit düşürücü etkisi ve antioksidan özelliği olan Probukol hiperlipidemik hayvanlarda aterosklerotik lezyon gelişimini önlediği bildirilmektedir (Violi ve ark 2002).

2.3.SERBEST RADİKALLER

Son yörüngesinde eşlenmemiş elektron bulunan moleküle serbest radikal denir. Örnek; süperoksit radikali (O_2^{-1}), hidroksil radikali (OH^-). Çok reaktif maddelerdir. Nitrik oksit ve nitrojen dioksit iki nitrojen serbest radikallerdir. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri H_2O_2, HOCl, hipobromöz asit (HOBr) ve peroksinitrit (ONOO) gibi radikal olmayan reaktif türlerine dönüştürülebilmektedir (Fang ve ark 2002).

Son on yıl boyunca insan hastalıklarının patofizyolojisinde serbest radikallerinin rolü üzerine çok araştırma yapılmıştır. Serbest radikallerin artmış renal vasküler tonuna,

vazokonstriktörlere artan sensiviteye ve bozulmuş endotelyum bağımlı vazodilatasyona sebep olduğu kaydedilmiştir (Rodrigo ve ark 2003). İntraselüler ROS'un artan seviyeleri oksidadif strese işaret etmektedir. Bu durumda hücreler intraselüler oksidasyon-redüksiyon durumu değiştirerek ve antioksidan seviyelerini artırarak cevap vermektedir. Antioksidan durumlarda bir dengesizlik sonucunda süperoksit anyon radikali ve H_2O_2 oluşmaktadır. Süperoksit anyonu peroksinitrit anyonunun oluşmasıyla NO'yu baskılayabilmektedir (Rodrigo ve ark 2003).

Serbest radikallerin oluşumu antioksidan kapasiteyi aştığı zaman metabolik ve fonksiyonel birçok bozukluk ortaya çıkmaktadır (Aksoy 2002). Hücre ve dokularda meydana gelen bu zararlar şöyle sıralanabilir.

a) DNA'nın tahrip olması
b) Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı
c) Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamındaki tiyol/disülfit oranının değişmesi
d) Protein ve lipitlerle kovalan bağlar oluşturması
e) Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler
f) Mukopolisakkaritlerin yıkımı
g) Proteinlerin tahrip olması ve protein "turnover"ının artması
h) Lipit peroksidasyonunun oluşması, zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi
i) Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerde aterofibrotik değişikliklerin meydana gelmesi (Uysal 1998).

Serbest radikaller üç yolla oluşmaktadır:

1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.

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

2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi

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

3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi

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

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Akkuş 1995).

2.3.1.Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksid, hidrojen peroksid, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonuncusu meydana gelir (Akkuş 1995). ROS'nin çoğunun yarılanma ömrü çok kısa (10^{-9} ile 10^{-6} saniye arasında) olmasına rağmen, serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatarak doku hasarına sebep olmaktadır (Chapple 1996).

Reaktif oksijen türleri farklı mekanizmalarla aşağıdaki gibi doku hasarına neden olurlar (Chapple 1996).

- Lipit peroksidasyonu (lipoksijenaz ve sikloksijenazın aktivasyonu yoluyla)
- DNA hasarı (hidroksilasyonlar ve zincir kırılması)
- Protein hasarı
- Önemli enzimlerin oksidasyonu (antiproteaz α-1-antitripsin gibi)
- Makrofaj ve monositler yoluyla proinflamatuar sitokin salınımının stimülasyonu (Chapple 1996).

2.3.1.1.Süperoksit Radikali ($O_2.^-$)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksid radikal anyonu (O_2 .$^-$) meydana gelir.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2.^-$$

Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir (Akkuş 1995).

Lipofilik özelliği olan süperoksit radikali uzun yarı ömre sahiptir. Bu özelliğinden dolayı uzak bölgelere diffüze olabilmektedir. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (Ünal 1999).

2.3.1.2.Hidrojen peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) meydana getirir.

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Hidrojen peroksid bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Akkuş 1995).

2.3.1.3.Hidroksil radikali

Hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (fenton reaksiyonu ile) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısa olup, oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur.

Aşağıda gösterildiği gibi tioller ve yağ asidleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton koparark yeni radikallerin oluşmasına sebep olur (Akkuş 1995).

$$R\text{-}SH + {}^{\cdot}OH \rightarrow RS^{\cdot} + H_2O$$

$$-CH_2- + {}^{\cdot}OH \rightarrow -CH^{\cdot\cdot} + H_2O$$

2.3.1.4.Singlet Oksijen

Singlet oksijen ($^1O_2$), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($R^{\cdot}$), peroksil (peroksi) radikalleri ($ROO^{\cdot}$), alkoksil (alkoksi) radikalleri ($RO^{\cdot}$), thiyl radikalleri ($RS^{\cdot}$) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelirler. Bunlardan özellikle poliansatüre yağ asidlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Thiyl radikalleri ise oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil ($RSO^{\cdot}$) veya thiyl peroksil ($RSO2^{\cdot}$) gibi radikalleri meydana getirirler (Akkuş 1995).

2.4.ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (Akkuş 1995). Antioksidanların etki çeşitleri şunlardır:

1. Reaktif oksijen türlerinin antioksidan enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi
2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun engellenmesi
3. Radikal oluşum reaksiyonlarının metal iyonlarının bağlanması ile engellenmesi
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamir edilmesi veya temizlenmesi (Yalçın 1998).

Antioksidanların sınıflandırılması

1) Yapılarına göre

a) Enzimler

b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller

2) Kaynaklarına göre

a) Endojen antioksidanlar

b) Eksojen antioksidanlar

3) Çözünürlüklerine göre

a) Suda çözünenler

b) Lipitlerde çözünenler

4) Yerleşimlerine göre

a) Hücre içinde bulunanlar

b) Plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunanlar (Yalçın 1998).

2.4.1.Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

2.4.1.1.Süperoksit dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (Chapple 1996). SOD varlığında reaksiyonun hızı spontan reaksiyonun yaklaşık 4000 katıdır.

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} O_2 + H_2O_2$$

Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipit peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksid üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksid düzeyleri düşük tutulur. SOD'nin ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür (Akkuş 1995).

2.4.1.2.Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px,E.C.1.11.19)

Glutatyon peroksidaz, hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu olan dört selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler.

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{\text{GSH-Px}} GSSG + 2\,H_2O$$

Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür. GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de oksidan strese karşı en etkili antioksidan enzimdir (Akkuş 1995).

2.4.1.3.Glutatyon - S – Transferazlar (GST) (E.C.2.5.1.18)

Ksenobiotiklerin (yabancı maddeler) bio-transformasyonunda önemli rol alan, herbiri iki alt birimden oluşmuş (dimerik) bir enzim ailesidir. Başta araşidonik asit ve lineloat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlere karşı selenyumdan bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar (Akkuş 1995).

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{\text{GST}} GSSG + ROH + H_2O$$

2.4.1.4.Katalaz (E.C.1.11.1.6)

Peroksizomlarda lokalize olan hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan bir enzimdir.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} 2H_2O + O_2$$

Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, bu enzim hidrojen peroksit, metil hidroperoksit gibi küçük moleküllere etki eder. Lipit hidroperoksitlerine ise etki etmez (Yalçın 1998).

2.4.1.5.Mitokondrial sitokrom oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir (Akkuş 1995).

$$O_2^{\cdot -} + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$$

2.4.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.4.2.1.C vitamini (Askorbik asit)

C vitamini (askorbik asid) suda eriyebilir vitaminlerdendir. Organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksid ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Kollagen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Midede ferri demiri ferro demire indirgeyerek emiliminde görev alır. İmmunite ve yara iyileşmesinde etkilidir (Akkuş 1995).

C vitaminin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında oksidan etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini, ferri demiri ferro demire indirgeyen-süperoksid radikali dışındaki tek selüler ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksid ile etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksid üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir pro-oksidan olarak değerlendirilir (Akkuş 1995).

2.4.2.2.E vitamini (Tokoferoller)

E vitamini tokoferol yapısındadır ve doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli türevleri bulunmaktadır. D-α-tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol, α-tokoferoldür. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. α-tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asidlerini (PUFA) serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Bir molekül α-tokoferol 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, süperoksid ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger. E vitamini, zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları, lipid peroksi radikallerini

(LOO-) parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktır (Akkuş 1995).

2.4.2.3.Karotenoidler

β-karoten LDL yapısında yer alır ve LDL'yi oksidasyona karşı korur. Karotenoidler hücreleri oksidan strese karşı üç farklı şekilde korurlar. a) flavinler ve porfirinler gibi triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama b) singlet oksijeni baskılama, c) peroksil radikallerinin temizlenmesi (Yalçın 1998).

2.4.2.4.Glutatyon (GSH, Gamma—glutamil-sisteinil-glisin)

Hücrelerde en fazla bulunan, oksidatif strese karşı hücreleri koruyan önemli bir antioksidandır. GSH serbest radikalleri direkt olarak temizleyebilir veya elektrofilik bileşikler, lipit hidroperoksitleri ve H_2O_2'nin detoksifikasyonu sırasında GSHPx ve GST'nin substratı olarak görev alır (Shen ve Sevanian 2001). Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenmektedir. Diyetsel olarak alınan glutamatın hemen hemen tamamı ince barsak mukozasında katabolize olmaktadır. Böylece glutaminin glutaminaz enzimiyle glutamata hidrolizi ve α-ketoglutarattan glutamat sentezi GSH'ın sentezi için iki majör kaynaktır. Diyetle alınan GSH ince barsaklardan kısmen absorbe edilmektedir. Aynı zamanda de novo sentezlenmektedir. Bu yüzden hem endojen hem de eksojen bir antioksidandır. GSH, reaksiyon sonucu oksitlenerek okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Okside glutatyonun tekrar redükte hale gelmesi NADPH bağımlı glutatyon redüktazın kullanılması ile mümkündür (Fang ve ark 2002).

2.5.HOMOSİSTEİN

İlk kez 1969 yılında Mc Cully, plazma homosistein düzeyi ile aterosklerotik vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiye dikkat çekerek, hiperhomosisteineminin aterosklerotik hastalıklara yol açtığını bildirmiştir (Chen ve ark 2000).

Plazma homosistein yüksekliği sigara ve hiperlipidemi gibi kardiyovasküler hastalık riskini arttırmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde kardiyovasküler hastalıkların %10'nun artmış total plazma homosistein düzeylerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Cesari ve ark 2005).

Son 10 yılda total plazma homosistein tayininde metodolojik ilerlemeler olmuş ve mikronütrientlerin sağlık ve dengeli beslenmedeki rolleri daha fazla ilgi çekmiştir. Bazı prospektif çalışmalarda ise homosisteinin KKH'larda etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Alfthan ve ark 1994, Evans ve ark 1997, Folsom ve ark 1998).

Total homosistein (tHcy)'deki 5 µmol/L artışa karşılık KKH riskinin kadınlarda %80 ve erkeklerde %60 arttığı tespit edilmiştir (Folsom ve ark 1998). Yapılan bir metaanalizde tHcy deki 5 µmol/L'lik bir artış ile total kolesterol düzeylerinde 0,5mmol/L'lik artışın koroner arter hastalığı yönünden eşdeğer olduğu bildirilmektedir (Dunn ve ark 1998).

Homosisteinüri ile ilişkili olan hiperhomosisteinemi methiyonin sentaz ve vitamin B_{12} metabolizmasındaki defektler, sistatiyonin β-sentaz (CBS), metilen tetra hidrofolat redüktaz (MTHFR) eksikliği gibi nadir kalıtsal bozukluklar sebebiyle meydana gelmektedir (Eikelboom ve ark 1999). Homozigot sistatiyonin β-sentaz eksikliği yaklaşık 150.000 doğumda bir görülmekte ve bu hastalarda plazma homosistein düzeyleri 400 µmol/L'ye kadar yükselmektedir (Eikelboom ve ark 1999).

2.5.1.Homosistein metabolizması

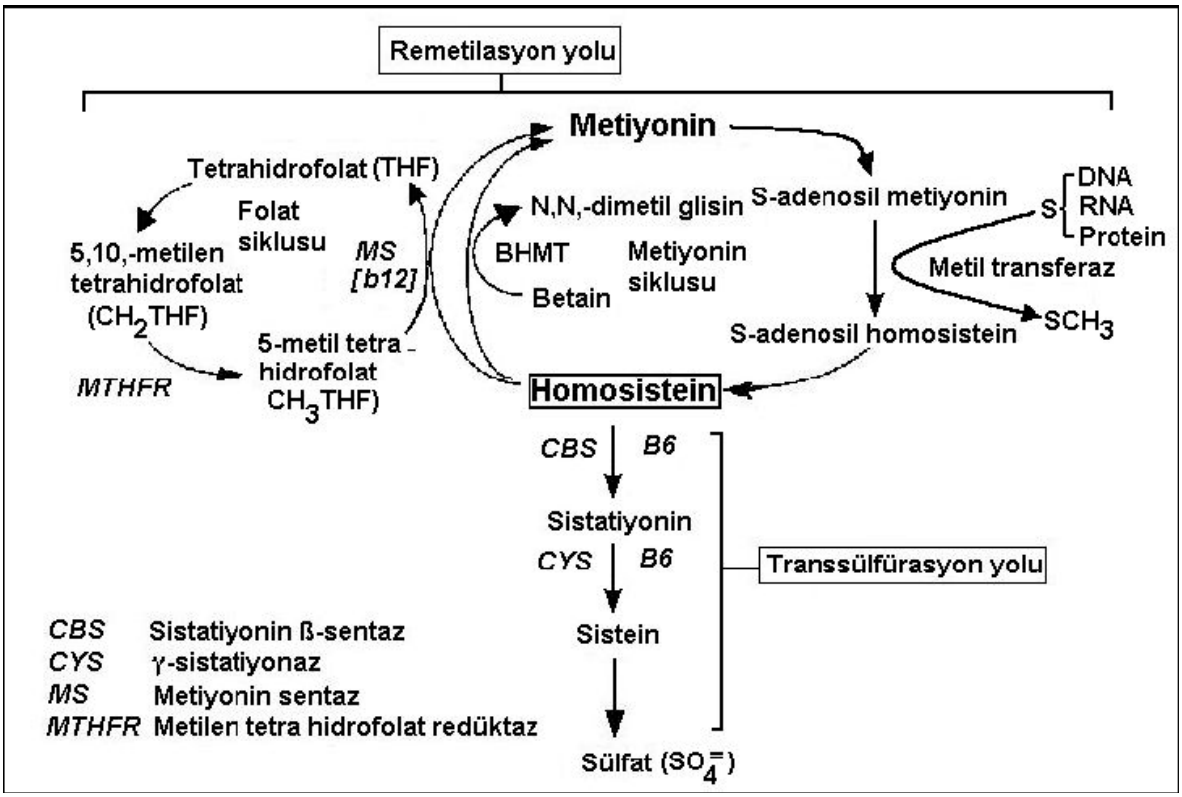
Homosistein, beslenme ile alınan metionin'in metabolizması sırasında ara ürün olarak oluşan thiol'lü esansiyel bir aminoasittir (Tawakol ve ark 1997, Eikelboom ve ark 1999). İnsan plazmasında, homosistein hem indirgenmiş (redükte) hem de okside formda serbest veya proteine bağlı formda bulunur. Homosisteinin okside formları insan plazmasındaki total

homosisteinin genellikle %98-99'unu oluşturur (Jacobsen 1998). Kimyasal tanımlamalar yaklaşık 65 yıl önce Butz ve du Vigneaud tarafından yapılmıştır. Sülfidrilli ya da redükte formu homosistein ve disülfidli ya da okside formu homosistin olarak adlandırılır. Disülfidli formlar, reaktif sistein kalıntıları içeren proteinlerle ve sisteinle de oluşur (proteine bağlı homosistein). Homosisteinin okside formları mikst disülfidler olarak da ifade edilir (Jacobsen 1998).

Diyetsel metiyoninden metabolize olan homosistein, kofaktör olarak vitamin B_{12} kullanılırsa remetilasyonla tekrar metiyonine veya vitamin B_6 kullanılırsa transsülfürasyonla sisteine metabolize olabilmektedir (şekil 2.4).

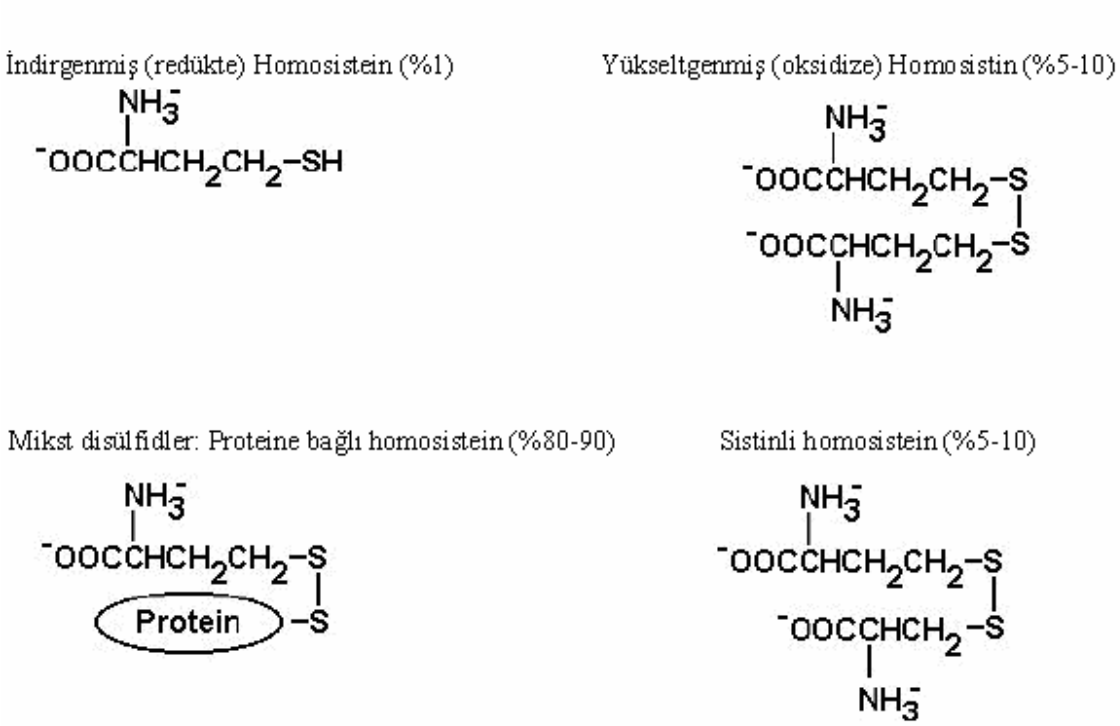
İnsan plazmasında, homosisteinin yaklaşık %70-80'i temel olarak albumin olmak üzere proteinlere disülfid bağları ile bağlıdır. Geri kalan homosistein oksitlenerek dimerler (homosistin) veya sisteinle birleşerek mikst disülfidler oluşturur (Tablo 2.1). Homosistein, çok küçük bir oranda (<%1) dolaşımda serbest olarak bulunur. Günümüzde, plazmadaki farklı homosistein formlarını topluca ölçebilen birçok teknik vardır. Bu metodlarla ölçüm sonuçları, total homosistein (tHcy) olarak verilir (Still ve McDowell 1998, Hankey ve Eikelboom 1999). Homosisteinin katabolizması, sistatiyonin sentezi dahil primer olarak ince barsak, karaciğer, böbrek ve pankreasta meydana gelen irreversibl bir yoldur (Rodrigo ve ark 2003).

Plazmadaki homosistein hücreler tarafından salınmaktadır. Farklı hücre tipleri değişik oranlarda homosistein salgılamaktadır. Hepatositler çok yüksek oranda homosistein salgılarken, fibroblastlar ve lenfositler çok daha yavaştırlar (Nakano ve ark 2005).



Şekil 2.4: Remetilasyon yolu (Still ve McDowell 1998, Jacobsen 1998).

Homosistein, 5-metil tetra hidrofolat varlığında B_{12}'ye bağımlı metiyonin sentaz (MS) tarafından metiyonine remetile olur. Metilasyon yolunda homosistein metil grubunu ya betainden (özellikle karaciğerde meydana gelen bir reaksiyon) ya da 5-metiltetrahidrofolattan (vitamin B_{12} bağımlı bütün dokularda meydana gelen bir reaksiyon) alır (Hankey ve ark 2004). Daha sonra, CH_2THF metilen tetra hidrofolat redüktaz (MTHFR) ile 5-metil tetra hidrofolata (CH_3THF) indirgenir. Karaciğer ve böbrekte homosistein remetilasyonu betain-homosistein metil transferaz (BHMT) aracılığıyla gerçekleşir. Metiyonin siklusunda, diyetle alınan metiyonin, metil transferaz için metil grubu vericisi olarak yardım eden S-adenozil metiyonin (SAM)'e dönüşür. Bu reaksiyonda oluşan diğer bir ürün, SAH hidrolaz tarafından homosistein ve adenozine hidrolizlenen S-adenozil homosistein (SAH)'dir. Homosistein, ayrıca, katabolik transsülfürasyon yoluna da girer. Bu yoldaki ilk enzim B_6'ya bağımlı sistatiyonin ß-sentaz (CBS)'dir. Sistatiyonin, B_6'ya bağımlı sistatiyonaz aracılığıyla sisteine dönüşür. Oluşan sistein daha sonra inorganik sülfata dönüşerek idrarla atılır. Transsülfürasyon yolu, sınırlı doku dağılımı gösterir (karaciğer, böbrek, pankreas ve beyin) (Still ve McDowell 1998, Jacobsen 1998, Rodrigo ve ark 2003).



Tablo 2.1. Total plazma homosistein komponentleri ve yüzdeleri (Jacobsen 1998).

2.5.2.Homosisteinin invitro etkileri:

Aterogenez

1- DNA hipometilasyonu, hücre büyüme ve differansiyonu aracılı genlerin ekspresyonunu indükler.
2- Oksidatif stresi indükler.
3- İndüklenebilir NO sentaz ve tümör nekroz faktör-α'nın ekspresyonunu değiştirerek vasküler inflamasyonu indükler.
4- Artan inflamasyon, artan ADMA, azalan nitrik oksitin biyokullanılabilirliği (artan oksidatif stres sebebiyle) ve artan oksidatif stresin bir sonucu olarak endotelyal disfonksiyonu indükler.
5- Modifiye LDL'nin alınımını kısmen artırarak hepatik ve makrofaj lipoprotein metabolizmasını değiştirir.
6- Hipertrofiyi indükler ve intima kalınlığını arttırır.

Trombogenez

1- Monositlerde doku faktör ekspresyonunu indükler
2- Lökosit-endotelyum interaksiyonlarını modüle eder.
3- Platelet agregasyonunu artırır.
4- Lipoprotein (a)'nın fibrine bağlanmasının artırır.
5- Çeşitli pıhtılaşma faktörleriyle interfere olur (Hankey ve ark 2004).

2.5.3.Homosistein ve vitamin durumu

Genel populasyonda besinsel suboptimal folat alınımı (400µg/gün'den daha az) hafif hiperhomosisteinemi için yaygın sebeptir. Ayrıca suboptimal folat alımıyla ilişkili olan nöral tüp defektinin homosistein ile de ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Folat eksikliğine bakılmaksızın suplemental folik asit ile plazma homosistein düzeylerinin %40'a kadar düşürülebileceği savunulmaktadır (Still ve McDowell 1998). Bu yüzden homosistein düzeyleri vejeteryanlarda B_{12} eksikliğinden dolayı omnivorlar (hem et hem ot yiyen)'dan daha yüksektir. Vitamin suplementasyonunun yüksek plazma homosistein düzeylerini azalttığı veya normalize ettiği bildirilmektedir (Rodrigo ve ark 2003).

Günlük diyete 0.4-0.5 mg folik asit eklenerek tHcy seviyeleri %25 azaltılabilmektedir (Doshi ve ark 2002). Vitamin B_{12} günlük 0,02-1 mg alınarak tHcy düzeylerini yaklaşık %7 azaltırken, Vitamin B_6 günlük 2-50 mg ve betain (metiyonin metabolizmasında yer alan metil grubu donorü)'in homosistein düzeylerini düşürmede daha az etkili olduğu bildirilmektedir (Hankey ve ark 2004).

2.5.4.Metiyonin yüklenmesi

Orijinal olarak oral metiyonin yüklenmesi, homosistein metabolizma yolunu zorlayarak heterozigot CBS eksikliğinin teşhis edilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Metiyonin yüklenmesiyle kan homosistein düzeyleri akut olarak artmaktadır. Metiyonin yükleme testinde, 0.1 gr/kg metiyonin verilmesinden 4 saat önce ve 6 saat sonra homosistein konsantrasyonları ölçülmektedir (Still ve McDowell 1998).

Sistatiyonin β-sentaz eksikliği klasik homosistinüri'li hastalarda genel enzim defektidir. (Yaklaşık insidans 1/200 000 populasyon) (Tsai ve ark 1994, Bellamy ve McDowell 1997, Bellamy ve ark 1998). Bu otozomal resesif olarak geçen kalıtsal bir hastalıktır (Still ve McDowell 1998).

Homosistinürili hastalar arterial hastalıkların yanında venöz tromboembolizm'den de muztariptirler. Dolaşımda koagülasyon faktör bozuklukları tanımlanmasına rağmen bu raporların çelişkili olduğu bildirilmektedir (Still ve McDowell 1998).

2.5.5.Plazma total homosistein

Plazmadaki homosisteinin multipl formlarının isimlendirilmesinde henüz fikir birliği olmamasına rağmen "total homosistein, indirgenmiş homosistein, proteine bağlı homosistein, serbest homosistein ve homosistein-sistein kompleksi" gibi kavramlar yaygın olarak kullanılmaktadır. "Total homosistein" plazma ve serumdaki tüm homosistein formlarını belirtmek için kullanılan kavramdır (Jacobsen 1998).

Plazma total homosistein tayinleri karmaşık olup demografik, genetik ve kazanılmış faktörlere bağımlıdır. Demografik olarak yaş cinsiyet, etnik orijin; genetik olarak metilentetrahidrofolat redüktaz, methionin sentaz, sistatiyonin β-sentaz; kazanılmış faktörler B-vitamin eksikliği (B_{12}, folat ve B_6), sağlık durumu, bozulmuş renal fonksiyon, son durum renal hastalık, kalp ve diğer organ transplantları, hipotiroidizm, hayat tarzı, az egzersiz, sigara, aşırı alkol ve kahve tüketimi olarak ifade edilebilir. Pek çok araştırmada, sağlıklı yetişkinlerde total homosistein konsantrasyonu plazmada 5-15 μmol/L olarak tespit edilmiştir. Ancak homosistein için 'normal sınırların' bildiriminde dikkatli olunmalıdır. Bazı çalışmalarda, total homosistein konsantrasyonunun 10-15 μmol/L arasında seyrederken koroner arter hastalık riskinin devam ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, bazı yazarlar normalin üst sınırını 10 μmol/L ya da daha düşük olarak bildirmektedir. Çünkü folik asid, B_{12} ve B_6 vitaminleri ile optimal beslenmeye rağmen istenen seviyeye ulaşmak mümkün olmayabilir. Nadir görülen "doğuştan homosistein metabolizması bozukluğu" olan homosisteinürili bireylerde, total homosistein konsantrasyonu 500 μmol/L'ye ulaşmakta ve bu bireylerdeki total homosisteinin %20'den fazlası (yaklaşık 100 μmol/L) redükte homosisteinden oluşmaktadır. Koroner, serebrovasküler ve periferal vasküler hastalıklı bireylerde genellikle

hafif bir homosisteinemi gözlenmektedir (12-25 μmol/L). Buna karşılık eğer renal fonksiyon bozulursa ya da birey renal hastalığın son safhasındaysa, total homosistein orta seviyedeki konsantrasyonlara erişebilir (25-50 μmol/L) (Jacobsen 1998).

Tablo 2.2: Total plazma homosistein dağılımı (Jacobsen 1998).

Normal oran	5-15 μmol/L
Arzulanan	<10 μmol/L
Hiperhomosisteinemi	
Hafif	15-25 μmol/L
Orta	25-50 μmol/L
Ağır	50-500 μmol/L

Tablo 2.3: Açlık plazma homosistein seviyelerinin üst limit referans aralıkları (Hankey ve ark 2004)

Populasyon	Folat suplementasonlu	Folat suplementasyonu olmayan
Çocuklar (<15 yaş)	8 μmol/L	10 μmol/L
Yetişkinler (15-65 yaş)	12μmol/L	15μmol/L
Yaşlılar (65 yaş üstü)	16μmol/L	20μmol/L
Gebe kadınlar	8μmol/L	10μmol/L

Tablo 2.4: Plazma total homosistein seviyesini artıran faktörler (Eikelboom ve ark 1999, Hankey ve Eikelboom 1999, Hankey ve ark 2004).

Genetik defektler	Yaşam tarzı faktörleri:	Hastalıklar	Medikasyonlar/toksinler	Fizyolojik faktörler:
CBS MTHFR MS	Vitamin kofaktörlerinde besinsel eksiklikler(Vitamin B_{12} (Kobalamin) Vitamin B_6 (Pridoksin), Folat) Sigara, kahve ve alkol tüketimi	Pernisiyöz anemi Böbrek yetmezliği Hipotiroidizm Diyabetes-mellitus Akut lenfoblastik lösemi, over, pankreas ve gögüs kanseri. Ağır psoriyazis Transplantasyon	Folat antagonistleri (metotreksat, fenitoin, karbamazepin) Vitamin B_6 antagonistleri (teofilin, azarabin, östrojen içeren oral kontraseptifler, sigara içme) Kolesterol düşürücüler(kolestiramin, kolestipol, nikotinik asit). Thiazid diüretikler Siklosporin	Yaş/cinsiyet Menapoz Yaşlılık Azalmış glomerüler filtrasyon oranı Artmış kas kitlesi Erkek cinsiyet

2.5.6.Hiperhomosisteinemi ve KKH ile bağlantısı

Hafif hiperhomosisteinemi arterial vasküler hastalıklar için majör bir risk faktörüdür. Son epidemiyolojik çalışmalar hiperhomosisteinemi, kardiyovasküler mortalite ve aterotrombotik olaylar arasında açık bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer taraftan hiperhomosisteinemi hipertansiyonla ilişkili olan glomeruler hasar gibi hedef organ hasarlarında önemli bir patojenik faktör olduğu bildirilmektedir (Rodrigo ve ark 2003).

Homosisteinin aterogenez, ateroskleroz ve trombozda oynadığı roller bilinmemesine rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalar hiperhomosisteineminin direkt olarak vasküler endotel hücrelerinde hasara neden olabildiği ve in vitro düz kas hücrelerinde mitogeneze, sitotoksik etkiye ve proliferasyona neden olabildiği, KKH için bağımsız bir risk faktörü olduğu kaydedilmiştir (Tsai ve ark 1994, Tang ve ark 1998, Bellamy ve ark 1998, Chen ve ark 2000, Fallon ve ark 2001, Ungvari ve ark 2003).

KKH için bağımsız bir risk faktörü olarak iddia edilen hiperhomosisteineminin, kardiyovasküler hastalıklara yol açma mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte konjenital hiperhomosisteinürili genç yetişkinlerin ateroskleroz ve tromboz sebebiyle erkenden öldükleri bildirilmektedir (Fallon ve ark 2001). Homosisteinin endotelyal disfonksiyona, oksidadif strese, koagulasyon ve trombositlere etkisi sonucu vasküler hasara neden olabileceği ileri sürülmektedir (Wang ve ark 2004).

Çeşitli çalışmalarda 15-30μmol/L değerleri aralığındaki homosistein düzeylerinin prematüre ateroskleroz için risk faktörü olduğu bildirilmektedir. Bu artan risk koroner, serebral, periferal vasküler hastalıklara yol açmaktadır (Bellamy ve McDowell1997, Still ve McDowell 1998).

Hiperhomosisteinemi ile normal endotelyal hücrelerde vazodilatör özelliklerin bozulması NO'nun biyokullanılabilirliğinin azalması sebebiyledir. Homosistein vasküler intimal kalınlığı artırır, endotelyal hücre deskuamasyonunu üretir ve damar duvarlarında monosit adezyonunu artırır. Homosistein hücrelerin redoks tiyol durumunu değiştirerek oksidatif stres meydana getirir. Aynı zamanda homosistein elastinin aldehit gruplarının reaksiyona girişini engellediği ve böylece stabilize elastinin çapraz bağlarını inhibe ettiği rapor edilmiştir. Sonuçta homosistein kollajen sentezini ve akümülasyonunu artırmaktadır (Rodrigo ve ark 2003).

Ungvari ve ark (2003) tarafından yapılan bir çalışmada hiperhomosisteineminin O_2 üretiminin artmasına, NAD(P)H oksidaz ve iNOS upregülasyonuna ve TNFα salınımının artmasına sebep olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada (Tawakol ve ark 1997), ailesinde ateroskleroz anamnezi ve klinik bulguları olmayan hiperhomosisteinemili (19.2 μmol/L) 26 tane yaşlı hastada da damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon ölçümlerinin azaldığı gösterilmiştir.

Normal sağlıklı kişilere standart metiyonin yükleme (0.1 g/kg) ile zamana bağlı olarak damar içi kan dolaşımına bağlı dilatasyonun bozulabildiği gösterilmiştir (Bellamy ve ark 1998).

Klasik homosisteinüriye göre koroner arter hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve periferik vasküler hastalıkların eşlik ettiği hafif hiperhomosisteinemide homosisteinin oynadığı rol daha azdır. Ancak, önceden miyokard infarktüsü geçiren yaşlı erkeklerde tHcy'in 10 μmol/L'den yüksek olduğu tespit edilmiş, akut koroner sendromlu hastalarda pıhtılaşma faktörleri ile homosistein arasında ilişki bulunmuş ve koroner yetmezlikli hastalara folik asit ve antioksidan vitaminler verilerek tHcy konsantrasyonu azaltılabilmiştir (Adunsky ve ark 2000, Al Obaidi ve ark 2000, Bunout ve ark 2000).

2.5.7.Homosisteinemi ve antioksidanlar

Homosistein artışı oksidatif stresin oluşumunu artırarak H_2O_2 oluşumunun artmasına, en önemli antioksidan enzimler olan; glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca oksidatif stres ve hiperhomosisteinemi arasındaki ilişki artmış lipit peroksidasyonuyla da doğrulanmıştır. Askorbik asit homosisteinin sebep olduğu endotelyal disfonksiyonun indüksiyonunu önlemektedir. Çünkü vitamin C reaktif oksijen türlerinin (ROS) potent antioksidan skavangeridir. Süperoksit anyonuyla nitrik oksitin direk inaktivasyonunu önleyebilmektedir. Vitamin E de insanlarda hiperhomosisteinemi ile meydana gelen endotelyal disfonksiyonu önlemektedir. Aynı zamanda antioksidan melatonin insan göbek arterinde homosisteinin kontraktil etkisini önemli düzeyde azaltmaktadır. Hiperhomosisteineminin oksidatif stresle ilişkili bir mekanizmayla endotelyum bağımlı vazodilitasyonu da bozduğu bildirilmektedir (Rodrigo ve ark 2003). Homosistein plazmaya geçtiği zaman H_2O_2 ve süperoksit dahil, reaktif oksijen türlerini oluşturarak hızlıca oksitlenir. Homosisteinin oksitlenmesi sadece H_2O_2'nin oluşumunu arttırmayıp, aynı zamanda intraselüler endotelyal antioksidan enzimleri bozarak H_2O_2'nin degradasyonunu azaltır. Okside homosisteinin lipit peroksidasyonunu da arttırdığı bildirilmektedir. Artan homosistein düzeylerinin düz kas ve endotelyal hücrelerinde peroksizom proliferatör-aktive reseptörlerini inaktive ederek vasküler konstrüksiyonu artırdığı bildirilmektedir. Böylece düz kas hücrelerinde proliferasyon artmaktadır (Schnyder ve ark 2002).

2.5.8.Klinik ve farmakolojik yaklaşımlar

Epidemiyolojik çalışma sonuçlarına göre genel populasyonda orta derecede artmış plazma homosistein düzeyleri yaygın olarak görülmektedir. Bu da klasik kardiyovasküler risk faktörlerinden bağımsız olarak fatal ve nonfatal kardiyovasküler hastalıklar için artan bir risk ile ilişkilidir (Eikelboom ve ark 1999). Dolaşımdaki homosistein çevresel faktörler, nütrisyonel yetersizlik, yaşam sitili faktörleri (tütün kullanımı gibi), fizyolojik durumlar (erkek cinsiyet gibi), ilaçlar (siklosiporin gibi) ve temel olarak folat, vitamin B_{12} ve vitamin B_6 eksikliğini indükleyen bazı hastalıklarla (malign neoplasma gibi) artmaktadır (Rodrigo ve ark. 2003. Bu yüzden ucuz basit ve nontoksik bir tedavi olan folat, vitamin B_{12} ve vitamin B_6 plazma homosistein düzeylerinin düşürülmesinde kullanılmalıdır (Eikelboom ve ark 1999).

Hiperhomosisteineminin endotelyum hasar mekanizması tam olarak anlaşılamamasına rağmen, lipit peroksidasyonunu başlatıcı hidroksil radikallerinin üretimini arttırdığı bildirilmektedir. Ayrıca tiyolakton oluşturmasıyla da serbest oksijen radikallerinin üretimini artırdığı ve böylece lipit peroksidasyonunu artırdığı rapor edilmiştir (Cavalca ve ark 2001). Plazmada homosistein indirgenmiş formda bulunmayıp, genellikle homosistein-tiyolakton, homosistein disülfit karışımı ve homosistine okside olmaktadır. Böylece oluşan kimyasal reaksiyonlar serbest radikal üretimine yol açabilmektedir.

$$R\text{-}SH + O_2 \longrightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + H_2O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + \bullet OH + OH^-$$

Homosisteinin sülfhidril grupları ferrik veya kuprik iyonlarla H_2O_2, hidroksil radikalleri ve homosisteinil radikaller oluşturmak için davranmaktadır. Bu ve diğer reaksiyonlar yoluyla üretilen serbest radikaller de patolojik hasara yol açmaktadır. Homosisteinin invitro yüksek seviyeleri otooksidasyon yoluyla H_2O_2 ve süperoksit anyonları ($O2^-$) oluşturabilmektedir (Bellamy ve McDowell 1997).

Geçiş metalleri gibi (Cu vb.) uygun katalizörlerin varlığında homosisteinin indirgenmiş formu, LDL'yi okside ederek makrofajlarda köpük hücre oluşumuna yol açmakta ve arteriyal

plakların meydana gelmesine sebep olmaktadır. Böylece homosistein serbest radikaller gibi etki göstermektedir (Nakano ve ark 2005).

Teorik olarak hiperhomosisteinemi endojen NO sentaz inhibitör asimetrik dimetilarjininin akümülasyonunu indükleyerek, endotelyal NO üretimini azaltarak veya oksidatif stresin indüksiyonu ile NO biyoaktivitesini düşürerek kan basıncını arttırabilir. Buna rağmen hiperhomosisteinemi ve arterial hipertansiyon arasında zayıf bir ilişki bulunmuştur (Cesari ve ark 2005).

2.6.SİTOSTEROLEMİ (β-SİTOSTEROLEMİ)

Sitosterolemi; fitosterolemi olarak da adlandırılan, artmış plazma ve doku sterol konsantrasyonuyla karakterize, çok nadir görülen otozomal resesif kalıtsal bir hastalıktır (Salen ve ark 2004).

Majör bitki sterolü sitosterol olduğu için bu hastalığa sitosterolemi adı verilmiştir. Sitosterollerden de en fazla artanı β-sitosterol olduğu için hastalığa β-sitosterolemi de denir (Lee ve ark 2001, Lee, Lu ve Patel 2001).

Sitosterolemi ilk olarak Bhattacharyya ve Connor (1974) tarafından bulunmuştur. Bu araştırmacılar, tendon ksantoması bulunan fakat plazma kolesterol düzeyleri normal olan iki kız kardeş üzerinde yaptıkları araştırmalarında, bu kardeşlerde fiziksel, mental ve biyokimyasal anomalilere de rastlamamışlardır. Kolesterol ölçümlerinde bu kardeşlerin ailesel hiperkolesterolemiye benzemediği sonucuna da varılmıştır. Daha sonra yapılan sitosterol ölçümlerinde kız kardeşlerin plazma β-sitosterol düzeyleri 27,1-17,7mg/100 ml, kampesterol düzeyleri 9,7-8,2mg/100 ml ve stigmasterol seviyeleri 0,5-0,5mg/100 ml olarak bulunmuştur. Bu düzey normal kişilere göre oldukça fazladır. Plazma β-sitosterol ve kampesterol'ünün yaklaşık %60'ının ester halde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan ileri tetkiklerde, sağlıklı kişilerde bitki sterollerinin normal absorpsiyonunun %5'ten az olduğu halde, bu hastalarda %24 ve %28 olduğu belirlenmiştir.

2.6.1.Sitosteroller'in Emilimi Ve Biyokimyası

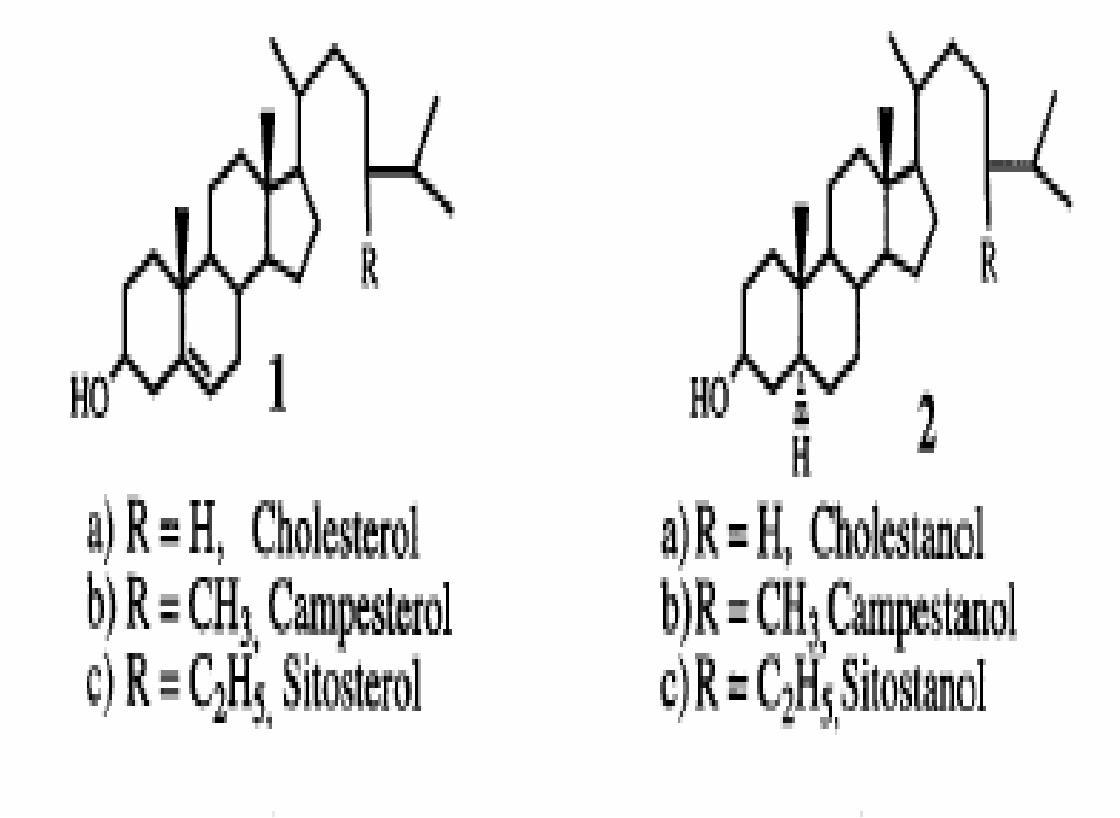
Sitosterollerin kimyasal yapıları kolesterole çok benzemektedir (şekil 2.5). Yan zincir grubu farklılığıyla kolesterolden ayrılırlar. 40'dan fazla bitki sterolü tanımlanmıştır. İnsan vücudunda en çok bulunan bitki sterolleri, kolesterolün 24-metil ve 24-etil analogları olan kampesterol ve sitosteroldür (Sudhop ve Bergmann 2004, Igel ve ark 2003).

Bitki sterolleri bitkisel yağ, tohum, fındık, ceviz ve bazı sebze ve meyvelerde bulunurlar (Moghadasian ve Frohlich 1999). Sitosterol ve kampesterolün bitki membranlarında membran akışı ve permeabilitesini regüle ettiği, stigmasterolün ise hücre proliferasyonunda gerekli olduğu gösterilmiştir (Schaller 2003).

Çeşitli populasyonlarda günlük olarak ortalama 167-437 mg bitki sterolleri alındığı bildirilmiştir. Daha fazla tüketildiği zaman kolesterolün misel oluşumunu engelleyerek absorpsiyonunu inhibe ederler. Özellikle sitostanol barsaktan kolesterol emiliminin etkili bir inhibitörüdür. Genelde plazma kolesterol seviyelerini düşürmede diğer bitki sterollerinden daha etkili olduğuna inanılmaktadır. Bitki sterollerinin ağızdan ve parenteral alınımının her ikisi de plazma kolesterolünün konsantrasyonlarında azalmaya yol açmaktadır. Bu düşüş sadece barsakta kolesterol emiliminin inhibisyonuna değil, aynı zamanda hepatik ve barsak kolesterol metabolizmasının üzerindeki diğer etkilere de bağlı olmaktadır. Bitki sterolleri ile barsak kolesterol absorpsiyonunun inhibisyonu, de novo hepatik kolesterol sentezini stimüle etmektedir (Moghadasian ve Frohlich 1999, Turley ve Dietschy 2003). Sağlıklı kişilerde total plazma bitki sterol konsantrasyonu 1mg/dL'den daha az olduğu halde, sitosterolemi hastalarında bu oran 12-40 mg/dL kadar yükselmektedir (Sudhop ve Bergmann 2004).

Diyet bitki sterollerinin intestinal hücreye girişinin pasif yolla olduğu bildirilmiştir (Kuksis 2001). Bitki sterolleri metabolize edilemediği için bunların plazma konsantrasyonları intestinal absorpsiyona bağlıdır (Sudhop ve Bergmann 2004). Diyetsel tüketim plazma fitosterollerinin tek kaynağıdır. İnsanlarda ve diğer memelilerde diyetle alınan kolesterol %40 oranında emilebilirken, bitki sterollerinin yaklaşık %5'i emilmektedir. Bu yüzden sağlıklı kişilerdeki bitki sterollerinin plazma seviyeleri çok düşüktür. Sitosterolemi'li hastalarda ise sterollerin emilim oranı çok artar. Absorbsiyon oranları bitki sterolleri arasında değişir. Emilmemiş fitosteroller koprostanol ve koprostanon gibi metabolitler oluşturmak için barsak

mikroflorası tarafından bakteriyal transformasyona uğrayabilirler (Lu ve ark 2001, Patel ve ark 1998, Moghadasian ve Frohlich 1999).



Şekil 2.5: Sitosterollerin kimyasal yapıları (Dayal ve ark 1997).

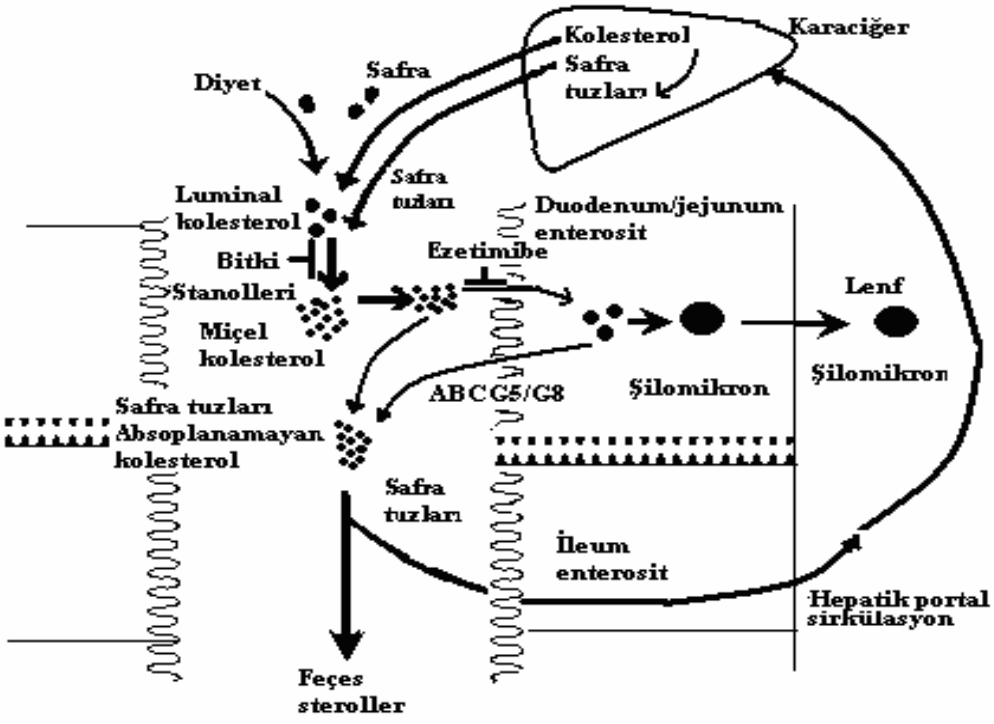
Bitki sterolleri hayvanların karaciğerinde adrenal bezinde, ovaryumunda ve testisinde birikebilirler. Bu gözlemler, fitosterollerin steroid hormonların prekürsörleri gibi kullanılabileceklerini düşündürmektedir (Moghadasian ve Frohlich 1999).

Son yıllarda doymuş bitki sterolleri, kolesterol absorpsiyonunu düşürücü olarak margarinler içerisine katılmaktadır. Avrupa'da sitostanol esteri ihtiva eden margarinler lipit düşürücü gıda olarak satılmaktadırlar (Jones ve ark 1998). Yapılan çalışmalarda bitki sterollerinin kolon kanseri gelişimini de engellediği gösterilmiştir (Ling ve Jones1995).

Sitesterolemi hastalarında laboratuvar bulgusu olarak artmış bitki sterol seviyelerinin yanı sıra, normal, hafif ve orta derecede artmış plazma kolesterol seviyeleri, trombositopeni, karaciğer fonksiyon bozukluğu ve bazı vakalarda kronik hemolitik anemi görüldüğü bildirilmektedir. β-sitosterol ve kampesterol ile zenginleştirilmiş diyetle beslenen ratlarda karaciğer mikrozomlarında artmış membran sertliği görülmüştür (Moghadasian ve Frohlich 1999, Sudhop ve Bergmann 2004).

2.6.2.Sitosteroleminin Patofizyolojisi

Sitosterolemili hastalardaki metabolik defekt gastrointestinal yoldan sitosterollerin hiper absorpsiyonuna neden olur ve kolesterol sentezi değiştirilir. Bitki sterolleri sitosterolemi'li hastalar dahil olmak üzere sağlıklı kişilerde de endojen olarak sentezlenmeyip sadece diyetle alınırlar. Karaciğer, bitki sterollerini safraya atmada kolesterole göre daha çok tercih eder. Son çalışmalarda diyet sterollerinin intestinal hücreye girişinin pasif yolla olduğu görülmüştür. Büyük bir miktarı sonradan ATP-bağlayıcı kaset (ABC) transport proteinler yoluyla barsak lümeni içine geri pompalanır (Kuksis 2001, Sudhop ve Bergmann 2004) (Şekil 2.6). ATP bağlayıcı kaset proteinler aminoasit, lipit, protein, inorganik iyon, peptit, sakkarid, metal ve ilaçların taşınmasında rol alırlar. ATP'nin hidroliziyle açığa çıkan enerji ile bu substratlar taşınırlar. ABC çeşitli prokaryotik ve ökaryotik zar proteinlerinde mevcuttur. İnsanda yaklaşık olarak 50 adet ABC transport protein olduğu bildirilmektedir. Sitosterolemi hastalığıyla ilişkili olanlar ABCG8 ve ABCG5 proteinleridirler (Stefkova ve ark 2004).



Şekil 2.6: Diyetle alınan bitki sterollerinin enterosit'e alınması

Sitosterolemik hastalardan akut miyokard infarktüsünden ölmüş bazı genç kişilerin otopsisinde, yaygın koroner ve aortik ateroskleroz bulunmuştur. En genç hasta 13 yaşında ölmüş bir erkek çocuğudur. Diğeri 17 yaşında angina pektoris gelişen ve egzersiz sırasında akut bir miyokard enfaktüsünün aniden gelişmesiyle ölen bir kişidir. Hastanın koroner arterlerinin histolojik araştırmasında sol ön inen koroner arterinde %60 oklüzyon olduğu tespit edilmiştir (Moghadasian ve Frohlich 1999).

Genetik olarak değerlendirildiğinde hastalığın otozomal resesif bir bozukluk olduğu dikkat çekmektedir. Bu hastalık iki genli insan 2p21 kromozomu üzerindeki özel bir gen lokusu (STSL) üzerinde gösterilmiştir. Daha sonra ise sitosterolemiye sepep olan ABCG8 ve ABCG5 transport proteinleri bulunmuştur. Bu iki protein birbirine komşu olarak 2p21 bandı üzerinde birbirine bitişik şekilde yer alırlar. ABCG5 ve ABCG8 transport proteinleri intestinal mukoza hücrelerinin apikal membranında ve hepatositlerin canalicular membranında ve safra kesesi epitel hücrelerinde bulunurlar. Bunlar barsakta esterifiye olmayan intraselüler sterolleri, kolesterol ve bitki sterollerini lümenin içine geri pompalar. Karaciğer de sterolleri safra içine pompalar. Safra kesesinde ise bu proteinler aracılığıyla safranın sterol içeriğinin düzenlenmesi

sağlanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sitosterolemi'nin ABCG8 ve ABCG5 proteinleri için genlerin herhangi birinde mutasyonlardan kaynaklandığı belirlenmiştir. Pasif olarak absorbe edilen bitki sterollerinin barsak içine geri pompalama aktivitesi bozulmuştur. Böylece, bu sterollerin birikmesiyle karaciğer sekresyonu azalır. Karaciğerin bitki sterollerini safraya boşaltma yeteneği bozulur (Berge ve ark 2000, Lee, Lu ve Patel 2001, Shulenin ve ark 2001, Yu ve ark 2002, Salen ve ark 2004, Sudhop ve Bergmann 2004, Patel ve ark 2004, Klett ve ark 2004).

Fareler üzerinde ABCG5 ve ABCG8 protein yapısı bozularak, ABCG5 ve ABCG8 proteinlerinin öneminin araştırıldığı bir çalışmada, bu farelerin diyetsel olarak bitki sterollerinin absorpsiyonunda 2-3 kat artış olurken, plazma sitosterol oranında da 30 katı bir artış görülmüştür (Yu ve ark 2002).

İnvitro olarak yüksek β-sitosterol seviyeleri (0,7 mmol/L'ye kadar) insan göbek bağı veni endotelyal hücrelerinde daralma meydana getirebilmektedir. Bu gözlemler β-sitosterolün çok yüksek plazma konsantrasyonlarının, muhtemel olarak sitotoksik etkilere sahip olabileceğini ve hücresel fonksiyonlara engel olabileceğini düşündürmektedir (Moghadasian ve Frohlich 1999).

Safra kesesi epitel hücrelerinde bulunan ABCG5/G8 proteinleri safra sekresyonunun düzenlenmesinde bu organda önemli bir rol oynar. Safra kesesi bu proteinler aracılığıyla safranın sterol içeriğinin düzenlenmesini sağlar. Köpek safra kesesi epitel hücre kültürlerinde yapılan bir çalışma ile de bu bilgiler doğrulanmıştır (Stefkova ve ark 2004).

Sitosterolemik hastalarda HMG-CoA redüktaz aktivitesi azalmış, hepatik LDL-reseptör sayısı da artmıştır. Safra asidi sentez enzimlerinin (sterol 27-hidroksilaz ve kolesterol-7α-hidroksilaz) aktiviteleri homozigot sitosterolemi hastalarında inhibe olmaktadır (Moghadasian ve Frohlich 1999).

Yapılan bir çalışmada, sitosterolemili iki kız kardeşin karaciğer biyopsileri ve ani ölüm sonucu ölen kişilerin karaciğer biyopsilerinden izole edilen mononükleer lökositlerde sitosterolemili kızlarda HMG-CoA redüktaz aktivitesinin diğer gruba göre 7 kat daha düşük olduğu bulunmuştur. Enzimdeki azalmanın bu kardeşlerdeki kolesterol sentezindeki azalmayla

ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bir başka deyişle, düşük kolesterol sentezinin sitosterolemik hücrelerde HMG-CoA redüktaz aktivitesindeki azalmadan kaynaklandığı belirlenmiştir (Nguyen ve ark 1990).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda sitosterollerin yüksek plazma konsantrasyonlarının üreme organlarında ters etkilere yol açabileceği belirtilmiştir. Sitosterollerin günde kg başına 0,5'den 5mg'a kadar subkutan uygulanmasının, ratlarda testis ağırlığında ve sperm sayısında önemli bir azalma oluşturduğu görülmüştür (Moghadasian ve Frohlich 1999). Ratlarda üreme sistemine bitki stanol esterlerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da, %4,4 stanol esteri ilave edilmiş bir diyetle beslenme sonucu testislerin ağırlıklarında önemli bir artış bulunmuştur. Aynı zamanda sperm sayımlarında değişiklikler ve tedavi edilmiş gruplarda dişi ve erkek fertilite indeksinde artış görülmüştür (Moghadasian ve Frohlich 1999).

Bitki sterollerinin ACAT ve LCAT ile yağ asidi esterifikasyonuna uğradığı ve sitosterolün C24 deki etil grubundan dolayı C24 safra asidine dönüşümünün engellendiği kaydedilmiştir. Bitki sterolleri karaciğer enzimleri ile karaciğerde C21 safra asitlerine metabolize edilebilmektedir (Ling ve Jones 1995).

Yapılan çalışmalarda zengin sitosterol diyeti verilen ratların plazma ve dokularında bitki sterol seviyeleri artmış ve felç eğiliminin yaşam süresini azalttığı bildirilmiştir. Pozitif aile öyküsü olan 26 sitosterolemili hasta ile aile öyküsü pozitif olmayan 27 hastanın plazma bitki sterol seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada, pozitif aile öyküsü olan hastalarda plazma kampesterol %30 ve sitosterol %29 oranında daha yüksek bulunmuştur (Sudhop ve Bergmann 2004).

Salen ve ark (2000), sitosterolemi'li homozigot bir hasta, bu hastanın heterozigot annesi ve sağlıklı 3 kişide kampestanolün absorpsiyonunu araştırmışlar. Bu amaçla, homozigot hastaya 2mg/gün kampestanol ihtiva eden bir diyet, heterozigot anneye ve sağlıklı kişilere de 540mg/gün kampestanol ve 1,9mg/gün sitostanol diyeti vermişlerdir. Plazma kampestanol düzeylerini gaz-sıvı kromatografisi ile ölçmüşler. Kampestanol seviyelerini homozigot'ta 0,72±0,03 mg/dl, heterozigot'ta 0,09±0,04mg/dl ve sağlıklı kişilerde 0,05±0,03mg/dl olarak bulmuşlardır.

Bitki sterollerinin doymuş formları özellikle de sitositanolün, kolesterol absorpsiyonunu sitosterolden daha fazla azalttığı belirtilmiştir. Hiperkolesterolemik insanlarda yapılan bir çalışmada, diyet yağı içerisinde günlük 3,4 gr sitostanol esteri alan insanlarda, almayanlara göre total kolesterol %7.5, LDL-kolesterol %10'luk bir düşme 6 hafta içerisinde gerçekleştiği görülmüştür (Vanhanen ve ark 1993).

Diyetsel bitki sterol esterlerinin, aterojenik bir markır olan aortik köpük hücre gelişimi, plazma ve karaciğer sterol konsantrasyonları üzerine etkisi fareler üzerinde araştırılmıştır. Yapılan çalışmada; her biri 20 adet olmak üzere 6 grup fare kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak kolesterolsüz beslenen grup dikkate alınmıştır. Diğer gruplar ise %0.24, %0.48, %0.96, %1.92, %2.84 bitki sterol esterleri (BSE) (%26.9 kampesterol, %18.3 stigmasterol, %46.7 β-sitosterol ve %2.7 brassikasterol, diğer steroller %1'den daha az.) içeren diyet verilmiştir. BSE temel yağ asitleri %62 linoleik asit, %23 oleik asitten oluşturulmuştur. 12 haftalık beslenme sonucunda yapılan ölçümlerde plazma total kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri önemli derecede düşük bulunmuştur. Plazma bitki sterol konsantrasyonları diyetsel olarak alınan BSE konsantrasyonuna göre artış göstermiş %1,92'lik grupta plato değerine ulaşılmıştır. Hepatik kampesterol ve sitosterol konsantrasyonları ise %0.24 BSE 'li grupta plato değerine ulaşmıştır. Kampesterol ve β-sitosterol karaciğer hücrelerinde iki majör sterol olarak bulunmuştur. Hepatik kampesterol konsantrasyonları BSE ile beslenen bütün gruplarda kontrollerle karşılaştırıldığında önemli derece yüksek bulunurken, β-sitosterol konsantrasyonları %0.24 ve %1.92 BSE 'li gruplarda önemli farklılık bulunmuştur. Köpük hücre değerlendirmelerinde ise %0.24, %0.48 ve %2.84 BSE ile beslenen gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla %70, %90 ve %100 daha küçük bulunmuştur (Fady ve ark 2003).

Hiperkolesterolemili 590 kişinin plazma kolesterol seviyelerini düşürmek için bitki sterolü verilmiş ve hastalarda total kolesterol düzeyinde ortalama %10' luk ve LDL kolesterol seviyelerinde %13'lük bir düşüş olduğu bulunmuştur (Moghadasian ve Frohlich 1999).

Gün geçtikçe kalp hastalığı riskini düşürücü diyetsel yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlardan biri de kolesterol düşürücü olarak yiyeceklere ilave edilen bitki sterolleridir. Hem sitositanolün hem de β-sitosterolün safra tuzu miçellerinden kolesterolün yerini değiştirerek,

safra tuz atılımını artırarak, intestinal mukozada kolesterol esterifikasyon oranını engelleyerek, intestinal lümenden kolesterol absorpsiyonunu kompetitif olarak engelleyip plazma kolesterol konsantrasyonlarını azalttığı bildirilmektedir. Hiperlipidemik erkeklere margarin içerisine sitostanol, kampesterol ve sitosterol içeren bitki sterollerinin suplementasyonu sonucu, lipoprotein-kolesterol konsantrasyonları ve sterol metabolizmasındaki değişiklikler araştırılmıştır. Yapılan çalışmada LDL-kolesterol konsantrasyonları 30 gün sonunda bitki sterollerince zengin grupta kontrol grubuna göre %24.4'lük bir düşme olduğu bildirilmiştir. HDL-kolesterol ve trigliserit seviyelerinde önemli bir değişiklik olmazken, total kolesterol düzeylerinde kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşme görülmüştür (Jones ve ark 1999).

Salen ve ark (1992) heterozigot anne, baba ve onların homozigot sitosterolemili kızları ve 5 kişilik kontrol grubu üzerinde yaptıkları araştırmalarında, bu kişilere günlük 500 mg kolesterol ve 100 mg sitosterol (24-etilkolesterol) alacak şekilde diyet uygulamışlar. Homozigot hastada plazma kolesterol ve apolipoprotein B konsantrasyonlarını hafif yüksek, sitosterol seviyelerini ise heterozigot anne ve baba'dan 25-58 kez daha yüksek bulmuşlardır. Kolesterol absorpsiyonu kontrol grubunda %48 olduğu halde, heterozigotlarda %59-%84, homozigotta ise %62 olarak tespit edilmiştir. Homozigot sitosterol absorpsiyonu (%34), heterozigot anne ve baba'dan 2-2.3 kat, normal kontrolden ise 6.8 kat daha yüksek olduğu, ayrıca homozigotta kolesterol sentezinin önemli ölçüde baskılandığı görülmüştür.

Gylling ve Miettinen (1999) postmenopozal hiperkolesterolemili 23 kadın üzerinde margarin ve tereyağı içerisine bitki sterollerinden belirli bir miktar ilave ederek kolesterol seviyelerinin nasıl etkilendiğini araştırmışlardır. Sitostanol esterce zengin margarin (kampestanol ile sitostanol oranı 1/11), kampestanol esterce zengin margarin (kampestanol ile sitostanol oranı 1/2), sitostanol esterce zengin tereyağı (kampestanol ile sitostanol oranı 1/13) ve normal tereyağını günlük 25 gr olarak hastalara vermişler. Margarin periyodu 6'şar hafta devam ettikten sonra 8 haftalık ara verilmiştir. Tereyağı periyodu ise 5'er hafta devam etmiştir. Sonuçta, serum trigliserit düzeylerinde normal ev diyeti ile margarin ve tereyağı uygulamasında önemli bir değişiklik görülmezken, serum kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri margarin periyodunda normal ev diyetine göre önemli düzeyde azalmış, HDL-kolesterol düzeyleri ise önemli ölçüde artmıştır. Sitostanol esterce zengin tereyağı

periyodunda serum kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri normal tereyağı periyoduna göre önemli olarak azalırken, HDL-kolesterol düzeylerinde önemli bir değişiklik bulunamamıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışma 28-87 (60,9 ± 11,8) yaşları arasında koroner arter hastalığı ön tanısıyla S.Ü.M.T.F. Kardiyoloji kliniğine başvuran ve koroner anjiografisi yapılan toplam 166 kişi (46 kadın, 120 erkek) üzerinde gerçekleştirildi. Vakalar anjiografi sonuçlarına göre aşağıdaki şekilde gruplandırıldı:

1. Kontrol grubu (KG) (n=60): Koroner anjiografisi tamamen normal olan (üç koroner arterinin herhangi birinde stenoz olmayan) ve üç majör epikardiyal koroner arterinde %50'den az stenozu olanlar.
2. Hasta grubu (HG) (n=106) : Üç majör koroner arterlerinin en az birinde ≥% 50 stenozu olanlar.

Ayrıca, tutulan damar sayısına göre gruplar, kendi içinde aşağıdaki gibi tekrar gruplandırıldı(Grup-1, 2,3,4,5).

Grup-1(n=37): Koroner anjiografisi tamamen normal olan (üç koroner arterinin herhangi birinde stenoz olmayan) kişiler. Yani tamamen sağlıklı olan kişiler.

Grup-2 (n=23): <%50 stenozu olanlar

Grup-3(n=42): Tek damar ≥% 50 stenozu olanlar

Grup-4(n=37): İki damar ≥%50 stenozu olanlar

Grup-5 (n=27): Üç damar ≥%50 stenozu olanlar.

Hastaların yaş, cinsiyet, kilo, boy, sigara ve alkol kullanımı, hipertansiyon (HT), diyabetes-mellitus (DM) ve aile öyküsü sorgulandı. Tablo 3.1'de hastalara ait yaş, cinsiyet, sigara, DM, HT, aile öyküsü ve damar tutulumu gibi özellikleri verilmiştir. Antihiperlipidemik ilaç kullanan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Gruplara ait kan lipid bulguları ise tablo 3.2'verilmiştir.

Tablo 3.1: Hasta grubu ve kontrol grubunun özellikleri

	HG (n=106)	KG(n=60)
Yaş (yıl)	62.8 ± 11.0	59.8±12.9
Sigara (+)	49	13
Sigara (-)	57	47
Aile Öyküsü (+)	15	7
Aile Öyküsü (-)	91	53
DM (+)	24	6
DM (-)	82	54
HT (+)	52	22
HT (-)	54	38
HT +DM	16	4
Stabil AP	18	19
UAP	39	37
STEMI	49	4

AP: Angina pektoris; UAP: Anstabil angina pektoris; STEMI: ST elevasyonlu miyokard infarktüsü

Tablo 3.2: Vakalarımıza ait rutin olarak ölçülen lipit parametreleri (X±SE)

	HG (n=106)	KG(n=60)	
Total kolesterol (mg/dl)	172.4±4.2	167.4±5.7	ÖD
Trigliserit (mg/dl)	135.3±8.3	124.5±12.5	ÖD
HDL-kolesterol (mg/dl)	36.5±1.0	39.0±1.3	ÖD
LDL-kolesterol (mg/dl)	109.1±3.4	102.6±4.5	ÖD

ÖD: Önemli değil

Tablo 3.2'de görüldüğü gibi hasta grubunun total kolesterol, trigliserit ve LDL-kolesterol düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek, HDL-kolesterol düzeyleri ise düşük bulunmuştur. Ancak parametreler arasındaki fark istatistiki açıdan önemli değildir.

3.2. Metod

Hastalardan 12-14 saat açlık sonrası sabah saatlerinde 8-10 ml antikoagülansız kan örnekleri alındı. Kan örnekleri pıhtılaştıktan hemen sonra bekletilmeden santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Serum örneklerinden TAS düzeyleri hemen çalışılırken, bitki sterolleri, Ox-LDL ve homosistein ölçümü için çalışma gününe kadar -85^{o}C'de saklandı.

3.2.1. Kullanılan Cihaz ve malzemeler

• Santrifüj (Hettich Rotofix 32)
• Vortex (Nüve)
• Ayarlanabilir otomatik pipetler
• Shaker (DPC marka)
• Otomatik Eliza okuyucusu ve yıkayıcısı (ELx 50 marka)
• Otoanalizör (Beckman Coulter)
• HPLC cihazı (Agilent 1100)
• HPLC cihazı (Thermo Finnigan, Spectra System)
• Su banyosu (Dedeoğlu)
• Nitrojen tüpü (Habaş)
• Glasiel Asetik asit (Merck K20990956 426)
• Sodyum asetat (Merck TA645765)
• H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) (Merck K3506500)
• Trolox (Sigma katalog no:53188-07-1)
• β-sitosterol (Sigma katalog no: S-1270)
• Stigmasterol (Sigma katalog no: S-2424)
• Cholesterol (Sigma katalog no: C-8667)
• 1,2-Dichloroetane (Sigma katalog no: 27,057-1)
• n-hexane (Sigma katalog no: 27,050-4)
• Benzoyl chloride (Sigma katalog no: 25,995-0)
• Pyridine (Sigma katalog no: 27,040-7)
• Acetonitrile (Sigma katalog no: 27,071-7)
• Ethanol (Sigma katalog no: 24,511-9)

• Potassium hydroxide (katalog no: Sigma 22,147-3)
• Hydrochloric acid (Sigma katalog no: H-1758)
• Acetic acid (Sigma katalog no: A-6283)
• Chloroform (Sigma katalog no: C-2432)
• HPLC kolonu (Sigma: 4.6x250 mm, ODS-2, C18, 5µm reverse-phase)

3.2.2.Kullanılan çözeltiler

a) Asetat tamponu (0,4 mol/L, pH 5,8): Bunun için, 32,8 g CH_3COONa 1000 ml deiyonize suda çözüldü ve 22,8 ml reagent-grade glasiyel asetik asit 1000 ml deiyonize suda dilüe edildi. Daha sonra 940 ml sodyum asetat solusyonu ile 60 ml asetik asit solüsyonu pH metre eşliğinde 5,8'e getirildi.

b) Asetat tamponu (30 mmol/l, pH 3,6): Bunun için 2,46 g CH_3COONa ve 1.705 ml reagent-grade glasiyel asetik asit 1000'er ml deiyonize suda ayrı ayrı çözüldü. Daha sonra 75 ml sodyum asetat solüsyonu ile 925 ml asetik asit solüsyonu karıştırılarak, pH'sı 3,4'e getirildi. 278 µl %35'lik H_2O_2 solüsyonu 1000 ml bu tampona ilave edildi. Bu hazırlanan çözelti içerisinde 0,549 g ABTS çözüldü. 1 saat oda ısısında bekletildi.

c) Etanolik KOH (1M): 56 gr KOH 1L'lik balonjojede %96'lık etanolle çözülerek hazırlandı.

d) β-sitosterol, stigmasterol ve kolesterol standart solusyonları: β-sitosterol ve stigmasterolün kloroformda 100, 50, 25, 10, 5 ve 1µg/ml'lik çözeltileri hazırlandı. Kolesterolün ise 5000, 2500, 1250, 500, 250 ve 50µg/ml'lik çözeltileri hazırlandı.

e) Mobil faz çözeltisi: 970ml asetonitril, 30 ml deiyonize su ve 2ml asetik asit karıştırılarak hazırlandı. Ultrasonik degaser (sonorex rk1040) ile 2 saat kadar degaze edildi.

3.2.3.Analizler

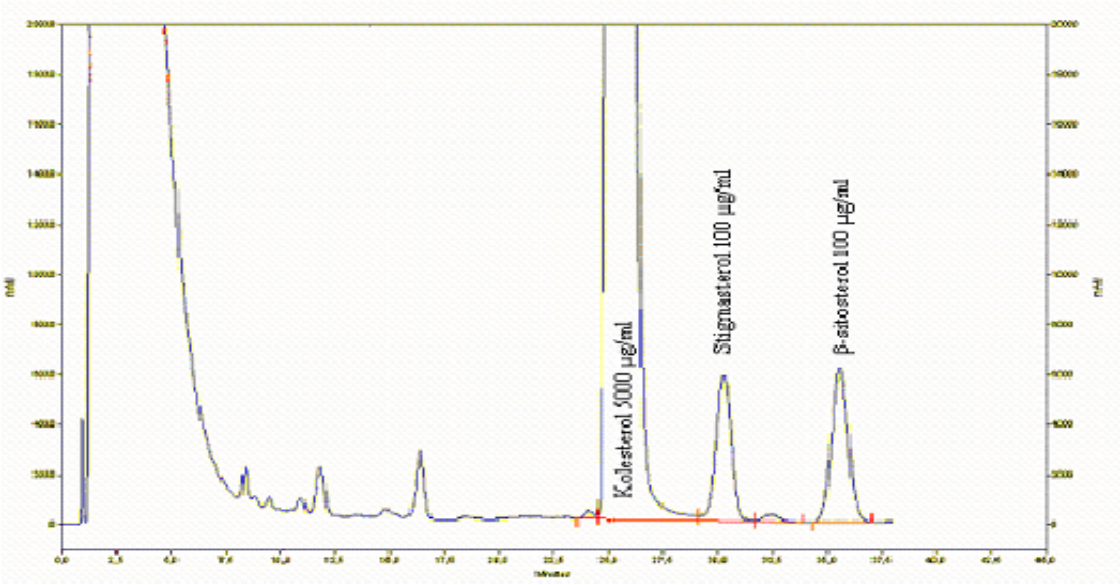
3.2.3.1 Bitki Sterolleri ölçümü

Bitki sterolleri HPLC (High performance Liquid Chromatography) yöntemiyle (Kasama ve ark 1987) ölçüldü.

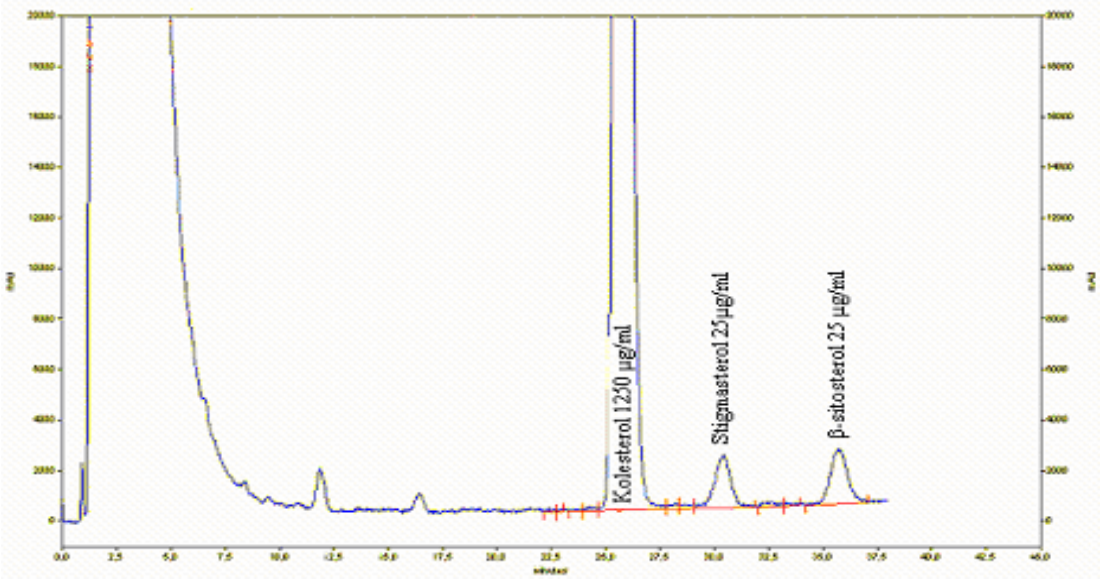
Prensip: Bitki sterollerinin benzoat türevlerinin oluşturulması ve bu türevlerin uygun bir HPLC kolonu (5µ ODS2) 4.6*250mm) ve mobil faz ile yürütülüp kromatogram elde edildikten sonra standart kromatogramlarla karşılaştırılarak değerlendirilmesi esasına dayanır.

0.1 ml serum, 1 ml 1M ethanolik KOH kapaklı bir cam tüp içerisinde iyice karıştırılıp 80 °C'de bir saat bekletildi. 0.5 ml deiyonize su ilave edilerek sabunlaşmayan kısım iki kez 2 ml hekzan ile ekstrakte edildi. Ekstraktlar bir başka tüpe aktarılarak buharlaştırıldı. Daha sonra bu tüplere her bir numune için taze hazırlanmış benzoil klorid reagent(0.6 ml benzoil klorid, 20 ml 1,2dikloretan 2ml piridin)'den 0.3 ml eklenip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Üzerine 2 ml 1,2 dikloretan ilave edildikten sonra bu karışım, 2 ml 0.1M hidroklorik asitle ve iki kez 2 ml deiyonize su ile yıkandı. Organik tabaka nitrojen altında buharlaştırılıp kurutuldu. Kalan kısım 0.5 ml asetonitril-1,2dikloretan (2:1, V/V) ile çözülüp ve HPLC sistemine 20µl enjekte edildi. Mobil faz asetonitril-deiyonize su-asetik asit (97:3:0.2, V/V), kolon sıcaklığı 50°C, akış hızı 2ml/dakika ve sterol benzoatları ölçüm absorbansı 228 nm'ye ayarlandı. Oluşan piklerin alanları standart piklerinin alanları ile kıyaslanıp sonuçlar hesaplandı.

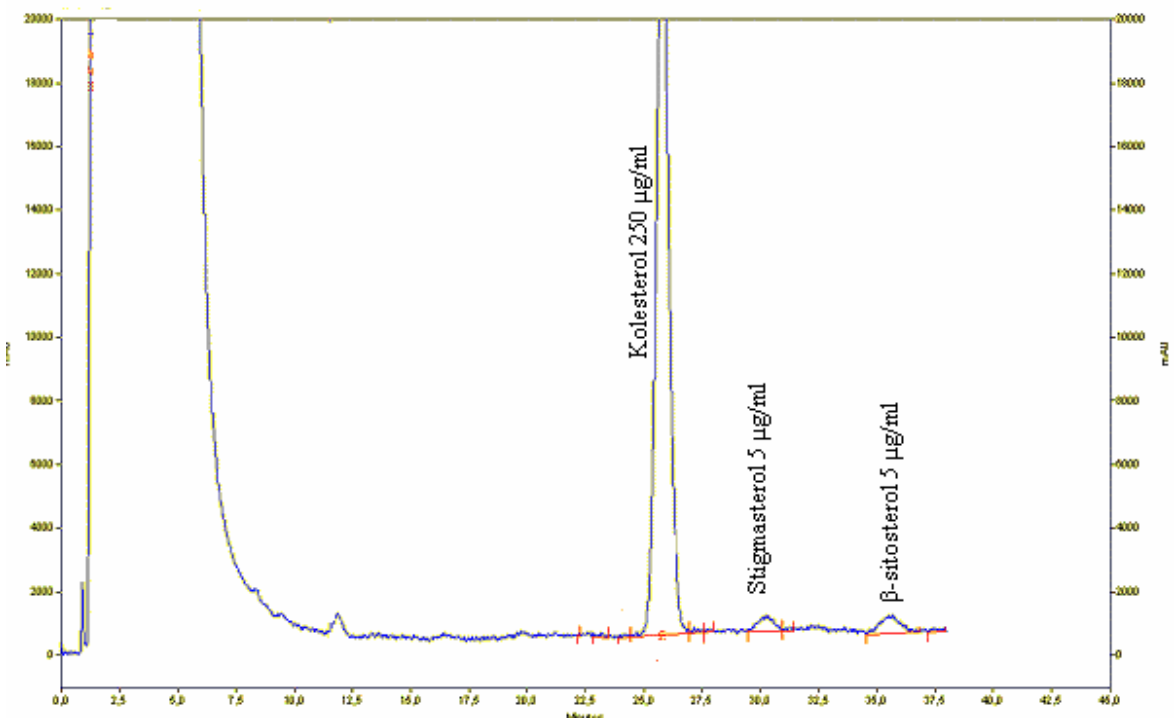
Çalışmamızda elde ettiğimiz kolesterol, β-sitosterol, stigmasterol'e ait standart kromatogramlarından bazıları şekil 3.1 de verilmiştir.



Şekil 3.1 a) β-sitosterol ve stigmasterol 100µg/ml, kolesterol 5000µg/ml



Şekil 3.1 b) β-sitosterol ve stigmasterol 25 µg/ml, kolesterol 1250µg/ml



Şekil 3.1 c) β-sitosterol ve stigmasterol 5 µg/ml, kolesterol 250µg/ml

3.2.3.2. Ox-LDL Ölçümü

Ox-LDL, eliza yöntemi ile çalışan Mercodia (kat no:13537) marka ticari kit kullanılarak ölçüldü. Testin prensibi, okside apolipoprotein-1'in antijenik determinantlarına karşı oluşmuş iki monoklonal antikor kullanılarak hazırlanmış sandviç ELİSA yöntemidir. ELİSA kuyucuklarına konulan serumdaki Ox-LDL, kuyucuklardaki katı fazda bulunan anti Ox-LDL antikoru (Ig-Ox-LDL) ile reaksiyona girer. İnkübasyondan sonra reaktif olmayan plazma komponentleri yıkama ile uzaklaştırılır. Sonra, kuyucuklara konulan Ox-LDL'yi tanıyan peroksidaz işaretli apolipoprotein B antikoru katı faza bağlı Ox-LDL ile reaksiyona girer.

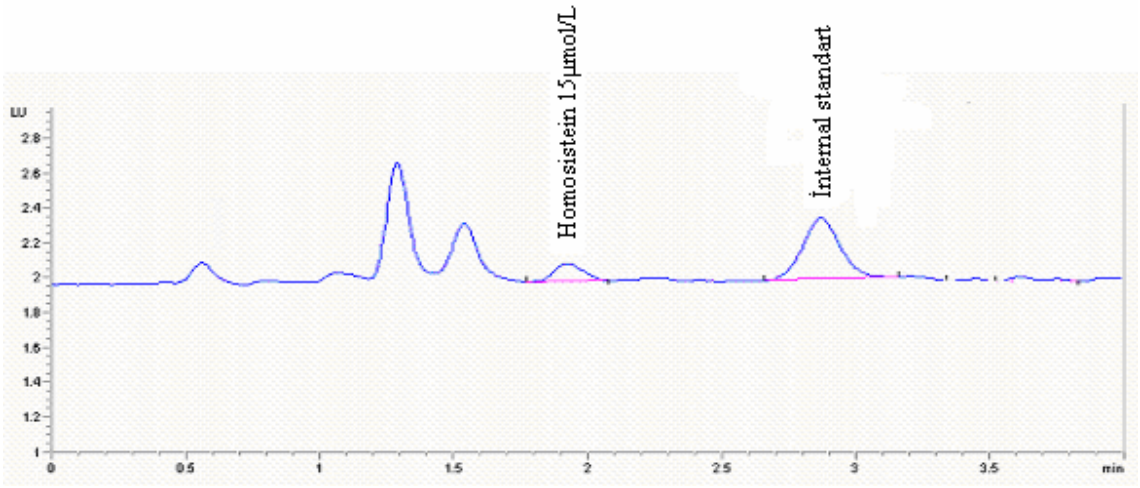
İkinci inkübasyondan sonra, yıkama ile bağlı olmayan enzim işaretli antikor uzaklaştırılır. Kuyucuklara katı fazda bağlı bulunan konjugat ile reaksiyona giren 3,3',5,5'-tetrametil benzidin (TMB) ilave edilir. Reaksiyon, asit ilavesi ile durdurulur ve oluşan renk ELİSA okuma cihazında 450 nm'de okunur. Sonuçlar standart grafiğinden faydalanarak hesaplanır.

3.2.3.3.Homosistein ölçümü

Homosistein ölçümü, Chromsystems marka ticari kit (Lot no:503) kullanılarak agilent 1100 marka HPLC cihazında firma tarafından verilen prospektüse göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

100µl serum, 25µl internal standart ve 25µl indirgeyici reaktif kahverengi bir eppendorf tüp içerisinde 2-3 sn kadar vortekste karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 100µl çöktürücü reaktif aynı eppendorfa ilave edilip 30 saniye karıştırıldı ve 9000 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan 50µl alınıp beyaz eppendorf tüpte 100µl derivatizasyon reaktif-1 ile 1-2 saniye karıştırılıp 50-55°C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra buz banyosunda soğutulup 20µl enjeksiyona ayarlanmış HPLC agilent 1100 cihazında ölçüm yapıldı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz homosistein ölçümüne ait standart kromatogram örneği şekil 3.2de verilmiştir.



Şekil 3.2 Homosistein 15µmol/L

3.2.3.4. Total Antioksidan Kapasite (TAS) ölçümü

TAS, Erel'in modifiye ettiği metoda göre ölçüldü (Erel 2004). Testin prensibi, ABTS+ radikalinin oluşturduğu mavi-yeşil rengin ortama ilave edilen numunedeki antioksidanlar ile azalması esasına dayanmaktadır. ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylebenzothiazoline-6-sulfonate), $ABTS^{+}$ radikalini oluşturmak üzere bir peroksidaz olan metmiyoglobin ($HX\text{-}Fe^{+}$) ve H_2O_2 ile inkübe edilir. Oluşan ferrilmiyoglobin ABTS ile $ABTS^{+}$ radikalini oluşturmak üzere reaksiyona girer.

$ABTS^{+}$ radikali kısmen stabil, mavi-yeşil renktedir. İlave edilen numunedeki antioksidanların oranına göre renk oluşumu inhibe olur. Bu renk değişimi 600 nm'lik dalga boyunda ölçülür. TAS hesaplanmasında bir E vitamini analoğu olan Trolox standart olarak kullanıldı. Hazırlanan reaktiflere numune ilave edildikten sonra okumalar Beckman Coulter otoanalizöründe tarafımızdan hazırlanan programa göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Reaktif ve numune ilavesi metotta belirtilen oranlara göre yapıldı.

3.2.3.5. Kolesterol ölçümü

Kolesterol ölçümü HPLC metoduyla (Kasama ve ark 1987) ester (E) kolesterol olarak analiz edildi.

3.2.4.İstatistiki Analiz

İstatistiki analiz SPSS programı kullanılarak değerlendirildi. Ox-LDL ve TAS testleri için t-testi, kolesterol, stigmasterol, homosistein ve β-sitosterol bulguları için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Çoklu gruplarda Ox-LDL ve TAS testleri için tek yönlü varyans (ANOVA) Tukey testi, diğer testler için Kruskall Wallis testi ve post hok Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bulgular arası ilişki Pearson korelasyon testi ile incelendi. Çalışmamızda gruplara ait sonuçlar $\bar{X} \pm SE$ olarak gösterildi. Değerlendirme sonucunda $p<0.05$ olan sonuçlar önemli olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

Vakalarımıza ait homosistein, Ox-LDL, TAS, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol bulguları tablo-4.1'de, beş grupluk sınıflandırmaya göre KKH'larına ait homosistein, Ox-LDL, TAS, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol parametrelerinin karşılaştırması tablo-4.2'de, majör epikardiyal koroner arterlerdeki <%50 ve ≥%50 stenozu olan kadın ve erkek hastalara ait homosistein, Ox-LDL, TAS, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol parametrelerinin karşılaştırması tablo-4.3'de, hasta grubuna ait parametreler arasındaki korelasyonlar tablo-4.4'de, kontrol grubuna ait parametreler arasındaki korelasyonlar tablo-4.5'te verilmiştir.

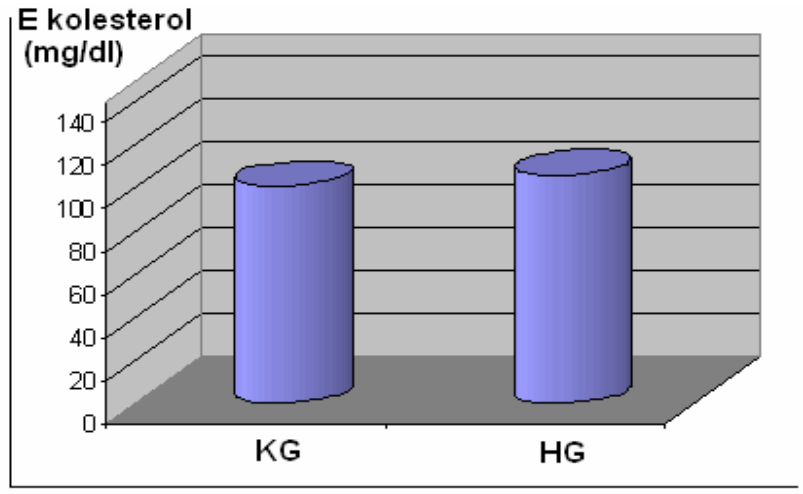
Tablo-4.1: Kontrol grubu (KG) ve hasta grubu (HG)'na ait homosistein, Ox-LDL, TAS, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol parametrelerinin karşılaştırması ($\bar{X}$ ± SE)

Gruplar	n	E-kolesterol (mg/dl)	stigmasterol (µg/ml)	β-sitosterol (µg/ml)	Ox-LDL (U/L)	homosistein (µmol/L)	TAS (mmol/L)
KG	60	101,2±4,3	2,86±0,48	3,22±0,37	114,5±4,1	16,61±0,60	1,16±0,01
HG	106	106,1±4,6	5,02±1,21	5,59±1,39	119,7±4,7	17,62±0,78	1,09±0,01
		ÖD	ÖD	ÖD	ÖD	ÖD	p<0.01

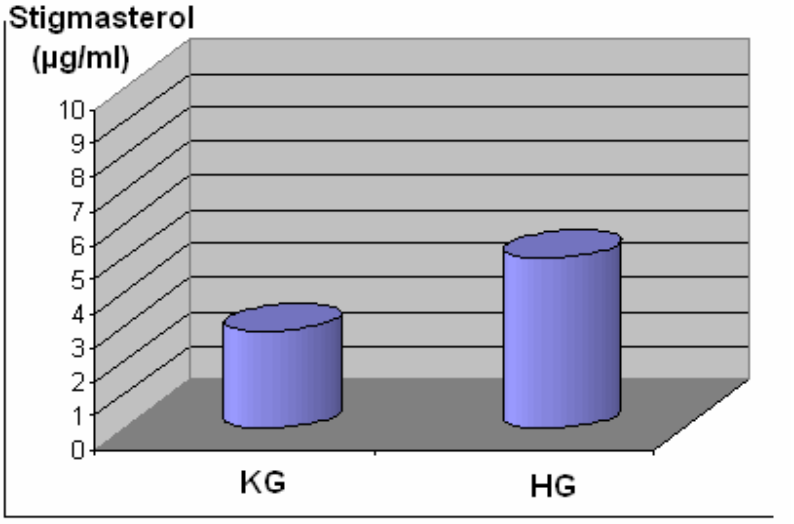
ÖD: Önemli değil

Tablo 4.1 de görüldüğü gibi hasta grubunun TAS düzeyleri kontrol grubuna göre önemli düzeyde (p<0.01) düşük, kolesterol, stigmasterol, β-sitosterol ve Ox-LDL düzeyleri ise yüksek olarak bulunmuştur. Ancak bu fark istatistiksel açıdan önemli değildir.

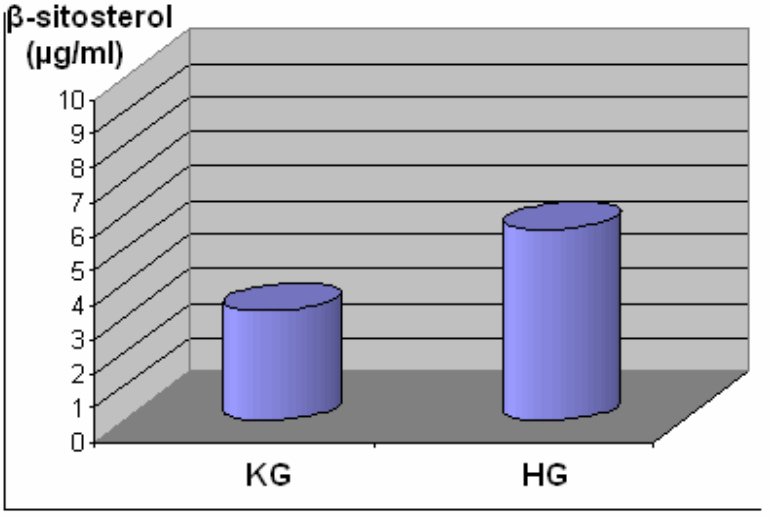
Kontrol grubu ve hasta grubuna ait kolesterol değerleri şekil 4.1'de, stigmasterol değerleri şekil 4.2'de, β-sitosterol değerleri şekil 4.3'de, Ox-LDL değerleri şekil 4.4'de, homosistein değerleri şekil 4.5'te ve TAS değerleri şekil 4.6'da gösterilmiştir.



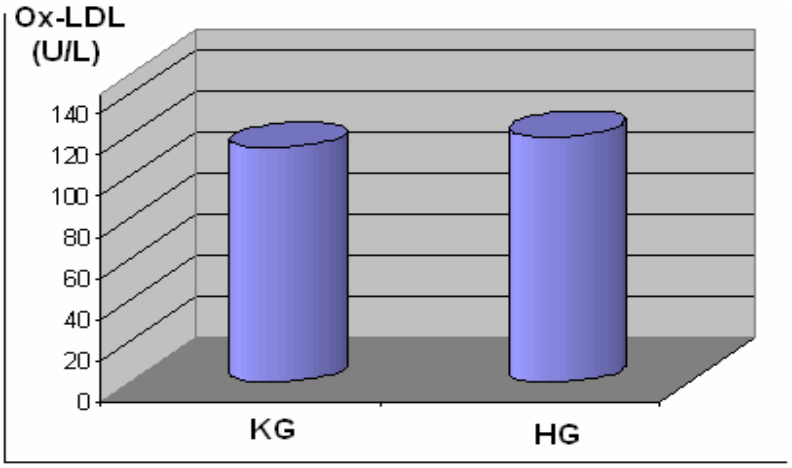
Şekil 4.1: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait kolesterol değerleri



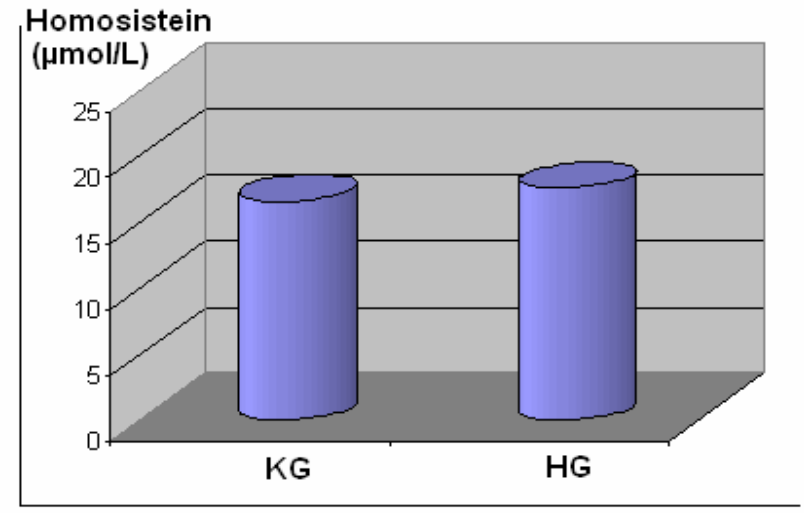
Şekil 4.2: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait stigmasterol değerleri



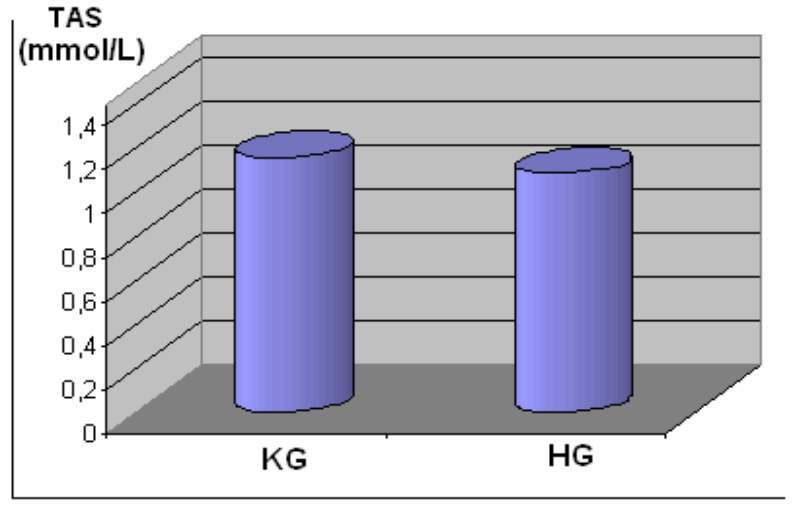
Şekil 4.3: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait β-sitosterol değerleri



Şekil 4.4: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait Ox-LDL değerleri



Şekil 4.5: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait homosistein değerleri



Şekil 4.6: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait TAS değerleri

Tablo-4.2: Beş grupluk sınıflandırmaya göre KKH'larına ait homosistein, Ox-LDL, TAS, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol parametrelerinin karşılaştırması ($\bar{X}$±SE)

Gruplar	n	E-kolesterol (mg/dl)	stigmasterol (µg/ml)	β-sitosterol (µg/ml)	Ox-LDL (U/L)	homosistein (µmol/L)	TAS (mmol/L)
Grup 1	37	103,1±4,8	2,22±0,59[a]	2,63±0,36	114,3±4,3	15,87±0,73	1,18±0,01[c]
Grup2	23	98,2±8,3	3,87±0,79[b]	4,15±0,74	117,5±8,5	17,90±1,00	1,13±0,02[a]
Grup3	42	103,4 ±7,6	6,96 ±2,90	6,79±3,31	118,3 ±7,2	17,08±1,07	1,06±0,01[bd]
Grup4	37	99,1 ±5,6	4,76±0,97	5,48±1,27	117,5±8,7	17,83±1,43	1,12±0,02[a]
Grup5	27	119,7±11,3	2,36±0,57	3,87±0,65	124,9±9,0	18,20±1,73	1,11±0,02

*a,b ölçülen parametrenin gruplar arasındaki farklılıklarını $p<0.05$, c,d ise $p<0.01$ önemlilik düzeyini göstermektedir.

Çalışmamızda ölçülen kolesterol düzeyleri HPLC tekniği ile ölçülen değerlerdir. Bu teknikte ölçülen kolesterol total kolesterol olmayıp ester kolesteroldür. Sitosterol ölçümü ile ilgili bütün çalışmalarda araştırmacılar bu kolesterolü ölçmüşlerdir (Kasama ve ark 1987, Kuriyama ve ark 1991). Bilindiği gibi serumda safra asitleri, serbest kolesterol, yağ asitleri, ester kolesterol ve steroid hormonlar bulunmaktadır. Yaptığımız çalışmada 1M KOH ile yağ asitleri ve safra asitleri sabunlaşma ile ortamdan uzaklaştırıldı. Sabunlaşmayan kısım ayrılarak sterollerin benzoat türevleri oluşturulup ölçüm yapıldı. Dolayısıyle enzimatik bir reaksiyon olmadığı için serumdaki kolesterolün tamamı ölçülememiş ve sonuçlar enzimatik ölçümlere göre düşük bulunmuştur. HPLC yöntemi ile yapılan bütün ölçümler bu şekilde yapılmaktadır.

Tablo-4.3: Majör epikardiyal koroner arterlerdeki <%50 ve ≥%50 stenozu olan kadın ve erkek hastalara ait homosistein, Ox-LDL, TAS, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol parametrelerinin karşılaştırması ($\bar{X}$±SE)

Gruplar	n	E-kolesterol (mg/dl)	stigmasterol (µg/ml)	β-sitosterol (µg/ml)	Ox-LDL (U/L)	homosistein (µmol/L)	TAS (mmol/L)
<%50(E)	38	98,5±5,5	2,87±0,64	3,32±0,48	121,1±5,5	17,94±1,27	1,15±0,02[a]
<%50(K)	22	106,5±7,0	2,84±0,71	3,03±0,58	113,1±7,3	21,06±1,82	1,05±0,03[b]
≥%50(E)	82	106,4±5,0	4,47±1,16	4,40±0,63	115,9±5,4	17,10±0,82	1,08±0,01[c]
≥%50(K)	24	104,9±11,3	6,99±3,71	9,87±5,99	134,3±9,3	19,51±2,03	1,16±0,03[d]

*a,b ve c,d ölçülen parametrenin gruplar arasındaki farklılıklarını p<0,05 önemlilik düzeyini göstermektedir.

Tablo 4.4 Hasta grubuna ait parametreler arasındaki korelasyonlar

Parametreler	**E-kolesterol**	**stigmasterol**	**B-sitosterol**	**Ox-LDL**	**Homosistein**	**TAS**
Gensini Skoru	0,064	-0,109	-0,060	0,032	-0,033	0,068
TAS	-0.006	-0,037	0,021	0,042	0,195	
Homosistein	0,017	0,008	-0,033	-0,096		
Ox-LDL	0,170	0,077	0,103			
β-sitosterol	**0,176***	**0,717****				
Stigmasterol	0,156					

*P<0.05 **P<0,01

Tablo-4.4 de görüldüğü gibi stigmasterol-β-sitosterol (p<0,01), kolesterol-β-sitosterol (p<0.05) arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulunurken, diğer parametreler arasında önemli bir korelasyon bulunamadı.

Tablo-4.5: Kontrol grubuna ait parametreler arasındaki korelasyonlar

Parametreler	E-kolesterol	stigmasterol	B-sitosterol	Ox-LDL	Homosistein
TAS	-0.050	-0,150	-0,023	0,151	0,075
Homosistein	-0,058	-0,038	0,038	-0,048	
Ox-LDL	0,194	0,010	-0,067		
B-sitosterol	0,174	**0,705****			
Stigmasterol	**0,317***				

*P<0.05 **P<0,01

Tablo-4.5 de görüldüğü gibi stigmasterol-β-sitosterol ve stigmasterol-kolesterol arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulunmuştur.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki sterollerinin kolesterol emilimini yarışmalı olarak inhibe ettikleri ve böylece ateroskleroza karşı koruma sağladıkları bilinmektedir (Jones ve ark 1999). Aksine, sitosterolemi adı verilen ve nadir görülen genetik bir hastalıkta ise bitki sterolleri fazla miktarda emilmekte ve ateroskleroz yapmaktadırlar. Bu hastalarda kolesterol düzeyi normal olduğu için kan sitosterol düzeyinin ölçülmesi hastalığın teşhisi ve tedavisi bakımından büyük bir önem arzeder. Aksi halde hasta teşhis edilemediğinden veya yanlış tedavi edileceğinden kaybedilmiş olacaktır.

Sitosterolemiye sebep olan sterollerin en önemlileri stigmasterol ve β-sitosteroldur. Biz bu çalışmamızda anjiografi ile teşhis edilmiş koroner kalp hastalarında bu bitki sterollerini diğer bazı önemli risk faktörleri ile birlikte ölçerek KKH patogenezinde bir rollerinin olup olmadığını ortaya koymayı amaçladık.

Sitosterolemi genetik bir hastalık olduğuna göre bunların emiliminde genetik faktörler, çevresel faktörler ve beslenme alışkanlıklarından kaynaklanan değişimler olabilir. Dolayısı ile bölgemiz insanlarında bu sterollerin ölçümü büyük önem arzetmektedir.

Çalışmamızda hasta grubuna ait sitosterol düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli olmamakla beraber, biraz yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak, bu yüksekliğin hastalığın sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu bilinmemektedir. Ayrıca, çalıştığımız hastalarda kan β-sitosterol düzeyleri ile kan kolesterol düzeyleri arasında önemli bir pozitif korelasyon, stigmasterol ile kolesterol düzeyleri arasında önemsiz bir pozitif korelasyon bulunması, sitosterollerin kolesterol emilimini azalttığı yönündeki bilgilere terstir. Bu bulgulardan, çalıştığımız hastalarda bitki sterollerinin de ateroskleroz üzerine az da olsa pozitif etki yaptığı söylenebilir. Ancak, bu pozitif korelasyonunun da nedeni bilinmemektedir. Aynı şekilde, kontrol grubunda kolesterol ile stigmasterol arasında görülen pozitif korelasyonu da izah edemedik.

Literatürde Rajaratnam ve ark (2000)'nın çalışması dışında çalışmamıza benzeyen herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bu araştırmacılar, koroner arterlerinde en az iki damarda %50 stenozu olan 48 post menapozal KKH kadın ve 61 sağlıklı kişi (kadın) üzerinde

yaptıkları bir araştırmada, serum sitosterol düzeylerini hasta grubunda 3,32 µg/ml, sağlıklılarda ise 2,71 µg/ml düzeyinde gruplar arasındaki farkı anlamlı olarak bulmuşlardır. Bu bulgu bizim bulgumuzu destekler mahiyettedir. Bu araştırmacılar, post menapozal kadınlarda sitosterol düzeylerinin KKH prevalansıyla ilişkili olduğu ve kolesterolün düşük sentezi ve yüksek absorpsiyonunun aterosklerozun gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca KKH olan veya olmayan post menapozal kadınlarda kolesterol metabolizmasındaki değişikliğin, sadece serum kolesterol düzeyleriyle değerlendirilmeyip, bitki sterol düzeylerinin de ölçülmesi gerektiğini savunmuşlardır.

Elektif arter koroner baypas grafti için teşhis konulan 53 KKH üzerinde yapılan bir araştırmada hastalar aile öyküsü pozitif ve negatif olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Aile öyküsü negatif olan grupta serum sitosterol düzeyi 3,1µg/ml iken, aile öyküsü pozitif olan grupta 4,0 µg/ml düzeyinde ve aradaki fark istatistiksel açıdan önemli (p=0,004) olarak bulunmuştur. Çalışmada, cinsiyet, yaş, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol ve trigliserit düzeylerinin hasta grupları arasında önemli olmadığı, fakat aile öyküsü pozitif olan hasta grubundaki artmış plazma bitki sterolerinin, bu hastalarda artmış sterol absorpsiyonuna bağlı olabileceği ve bitki sterollerinin KKH için ilave bir risk faktörü teşkil edebileceği ileri sürülmüştür (Sudhop ve ark 2002).

Glueck ve ark (1991) 595 hiperkolesterolemili hasta üzerinde yaptıkları araştırmalarında serum stigmasterol ve β-sitosterol düzeylerini sırasıyla ortalama 1.71, 2.98 µg/ml olarak bulmuşlardır.

Görüldüğü gibi bu her üç çalışmada ölçülen sitosterol bulguları bizim sonuçlarımıza genelde yakındır. Hasta değerleri arasındaki farklılıklar, bizim çalışmamızdaki bitki sterol düzeylerinin üç hastada aşırı yüksek çıkmasından kaynaklanabileceği kanaatindeyiz.

Sitosterol düzeyinin ölçüldüğü diğer bazı çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalarda, hasta gruplarında oldukça yüksek değerler elde edilmiştir. Örneğin;

Kuriyama ve ark (1991) serebrotendinöz ksantomlu 11 hasta ve 26 sağlıklı kişinin serum sitosterol düzeylerini hasta grubunda 8,95 µg/ml, sağlıklılarda 6,29 µg/ml olarak bulmuşlardır.

Bir çalışmada, sitosterolemili homozigot üç kardeşin plazma sitosterol düzeyleri ortalama 195.2, 189.8, 392.6 µg/ml olarak bulunmuştur. Heterozigot dört kardeşin sitosterol düzeyleri ise 11.8, 19.8, 11.6 ve 10 µg/ml olarak ölçülmüştür (Hidaka ve ark 1990).

Yaptığımız çalışmada üç hastanın bitki sterol seviyeleri diğerlerine göre çok yüksek bulunmuştur. Bu hastalara ait bulgular aşağıdaki şekildedir:

1. Hasta: Kolesterol 157.1 mg/dl, stigmasterol 83.3 µg/ml, β-sitosterol 140.5 µg/ml, Ox-LDL 159.6 U/L, homosistein 15.8 µmol/L, TAS 1,11 mmol/L , %50 tek damar stenozlu, UAP, hipertansiyon ve heredite pozitif.

2. Hasta: Kolesterol 92.8 mg/dl, stigmasterol 93.0 µg/ml, β-sitosterol 21.4 µg/ml, Ox-LDL 133.3 U/L, homosistein 20.7 µmol/L, TAS 0,98 mmol/L , >%50 tek damar stenozlu, stabil AP, hipertansiyon pozitif.

3. Hasta: Kolesterol 115.1mg/dl, stigmasterol 9.36 µg/ml, β-sitosterol 46.4 µg/ml, Ox-LDL 147.7 U/L, homosistein 9.5 µmol/L, TAS 1,08 mmol/L, >%50 iki damar stenozlu, geçmiş MI, UAP, hipertansiyon, sigara pozitif.

Görüldüğü gibi bu hastaların serum kolesterol düzeylerinin normal olduğu halde sitosterollerin yüksek olması, genetik sitosterolemi bulunabileceğini düşündürmektedir. Bu hastalardan kan alındıktan bir süre sonra hastalar taburcu olmuştu. Bu süre içinde sitosterol düzeyleri daha ölçülmemişti. Bizler bu hastalara ait sitosterol düzeylerini ölçtüğümüzde çok yüksek olduğunu gördükten sonra hastalara ulaşmaya çalıştık fakat her üçüne de ulaşamadık. Böylece, bu hastaları daha ileri değerlendirme ve aile fertlerinde de sitosterol düzeyini ölçerek bu kişilerde genetik sitosterolemi bulunup bulunmadığını ortaya koyma şansını elde edemedik. Araştırdığımız hastalığın öneminden dolayı bu kişilere ulaşabildiğimizde gerek kendilerinde gerekse ailelerinde daha ileri araştırma yapmayı ve ailelerinde de sitosterol düzeyini ölçmeyi düşünmekteyiz. Ayrıca, bu bulgu çalışmamızın bölgemiz için önemini göstermektedir. Çünkü, çalıştığımız hasta sayısı dikkate alındığında üç hastada yakaladığımız yüksek sitosterol düzeyi sitosteroleminin bölgemiz için ciddi bir risk olabileceğini dolayısı ile dikkate alınması gerektiğini ve bu konuda daha ileri araştırmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Yukarıda belirttiğimiz gibi, yaptığımız literatür taramasında çalışmamıza benzer şekilde anjiyografi ile tesbit edilmiş KKH hastalarında sitosterol düzeyini ölçen herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Dolayısı ile, bulgularımızı literatür bulguları ile karşılaştırma imkanı bulamadık.

Bu çalışmamızda amaçlanan ve gerçekleştirilen diğer önemli bir hedef de adı geçen bitki sterollerinin laboratuvarımızda ölçülebilmesini sağlamaktır. Böylece, bundan sonraki çalışmalara zemin hazırlandığı gibi nadir de olsa görülmesi muhtemel olan sitosterolemi hastalığının teşhisi mümkün olacaktır. Gerçekten, bu sterollerin ölçümleri HPLC tekniği ile gerçekleştirilmiş ve gerektiğinde diğer bilimsel araştırmalarda hatta rutinde kullanılabilir hale gelmesi sağlanmıştır.

Çalışmamızda, daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesi bakımından uzun denemeler sonucu ölçüm metodunda bazı modifikasyonlar da yapılmıştır. Şöyleki; mobil faz olarak değişik çalışmalarda metanol-su, metanol gibi farklı çözeltiler kullanılmıştır. Çalışmamızda bu mobil fazlar da denenmiş, ancak asetonitril-deiyonize su-asetik asit mobil fazıyla en belirgin kromatogramlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda KKH'larında Ox-LDL, TAS ve homosistein düzeyleri de ölçülmüştür. Bulgularımızda hasta grubuna ait Ox-LDL ve homosistein düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek (istatistiksel açıdan önemsiz) TAS düzeyleri ise önemli düzeyde ($p<0.01$) düşük bulunmuştur. Bu bulgumuz da literatür bulguları ile uyum halindedir.

Öte yandan, bu parametrelerle sitosterol düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır. Literatürde bu şekilde korelasyon arayan başka herhangi bir çalışma bulunamadığı için, bulgularımızı karşılaştıracak herhangi bir bulguya da rastlayamadık.

Serbest radikallerin ve peroksitlerin biyolojik etkileri, vücutta geniş bir antioksidan savunma mekanizması (vitamin E ve C, karotenoidler, glutatyon ve ürik asit gibi metabolitler ve antioksidan enzimler) tarafından kontrol edilmektedir (Guemouri ve ark 1991).

Antioksidan sistem; serbest radikallerin zararlı etkisinden korunmada önemli role sahiptir. Antioksidan savunma ile serbest radikaller arasındaki dengenin bozulması oksidan strese ve bunun sonucunda doku hasarına yol açmaktadır (Taşkıran ve ark 2005).

Genellikle artan ROS oluşumuyla ilişkili olan oksidatif stres tiyol gruplarının oksidasyonuna ve lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır (Kunt ve ark 2006).

Membran lipitlerinin peroksidasyonu membran permeabilite artışına ve intraselüler kalsiyum artışına yol açmaktadır. Deneysel çalışmalar, serbest radikal aracılı reaksiyonların endotel disfonksiyonu ve hasarını indüklediğini göstermektedir (Annuk 2002).

Vassalle ve ark (2004), oksidatif stres ile KKH ve farklı aterojenik risk faktörleri arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, 68 koroner hastasında TAS düzeylerini 30 sağlıklı kişiye kıyasla daha düşük bulmuşlardır. Yine, bu çalışmada etkilenmiş damar sayısı ile TAS düzeyleri arasında negatif ilişki bulunmuştur. Ayrıca, lipid peroksidasyon markırı olan 8-izoprostan (8-epiPGF2α) düzeyleri, koroner arter hastalarında kontrollere kıyasla yüksek bulunmuştur. Bu araştırmacılar, artan 8-izoprostan ve azalan TAS düzeylerinin KKH'nın şiddetiyle ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Nojiri ve ark (2001), koroner arterlerinden en az birinde %75 daralma olan 31 KKH ve 66 sağlıklı kişi üzerinde yaptıkları araştırmalarında, total antioksidan kapasite seviyesinin koroner arter hastalarında kontrollere göre önemli derecede düştüğünü, anjiografik KKH şiddeti ile TAS seviyesi arasında da negatif bir korelasyon bulunduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar, total antioksidan durum, karotenoidler, retinol, askorbik asit ve GSH-Px gibi antioksidanların seviyelerinin aterosklerozun gelişimi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Demirbag ve ark (2005), 53 koroner arter hastası ile anjiografisi normal olan 42 koroner arterli bireylerde, DNA hasarı ile total antioksidan kapasite düzeyini araştırmışlar. Çalışmada DNA hasarı hasta grubunda kontrollere göre belirgin düzeyde yüksek, TAS düzeyleri ise düşük bulunmuştur. Ayrıca hastalarda total antioksidan kapasite ile DNA hasarı arasında negatif bir korelasyon bulunduğunu ve damar tutulumu ile pozitif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Aterosklerozlu hastalarda yapılan bir çalışmada (Tamer ve ark 2002), sağlıklı kontrollere göre serum vitamin C, eritrosit-redükte glutatyon ve total antioksidan durumun azaldığı, serum malondialdehit seviyesinin ise arttığı bulunmuştur.

Koroner arterlerinde en az %50 daralma olan 50 KKH ve anjiografisi normal olan 17 kişi üzerinde yapılan bir araştırmada KKH'larında serum MDA ve total antioksidan kapasite düzeylerinde istatistiksel açıdan önemli olmayan bir yükseklik bulunmuştur (Abbasoğlu ve ark 1999).

Serdar ve ark (2006), koroner arter hastalığı olan 150 hastada antioksidan parametrelerini (SOD, GPx, serum paroksanaz, serum arilesteraz, plazma vitamin C, E ve karotenoid) anjiografisi normal olan KKH'larına göre belirgin olarak daha düşük, lipid peroksidasyon ürünü olan plazma MDA miktarını ise daha yüksek bulmuşlardır.

Aterosklerozun patogenezinde önemli bir rol oynayan Ox-LDL, KKH için çok önemli biyokimyasal bir markırdır (Miyazaki ve ark 2005, Anselmi ve ark 2006).

Koroner kalp hastalığı (KKH) insidansı ve mortalitesi doğu Avrupa ülkelerinde batı Avrupa ve ABD 'ye göre daha fazladır. Örneğin 1994 yılındaki bir araştırmada Litvanya'da KKH mortalitesi 50-54 yaş arası erkeklerde İsviçre'dekilere göre 4 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu farkın Lituanya'daki erkeklerin LDL-oksidasyonuna yatkınlığının daha yüksek ve antioksidan düzeylerinin daha düşük olduğundan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Zieden ve ark 1999).

Anjiografik olarak koroner stenozu olan (üç koroner arterden en az birinde %50 stenoz, MI öyküsü veya anstabil anjina pektorisi bulunan) 32 stabil KKH ve 32 sağlıklı kontroller üzerinde yapılan çalışmada plazma Ox-LDL düzeyleri KKH grubunda kontrollere göre önemli derecede yüksek bulunmuş ve OxLDL seviyeleri, total kolesterol düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Weinbrenner ve ark 2003). Bizim çalışmamızda da Ox-LDL ile kolesterol düzeyi arasında istatistiksel açıdan önemsiz bir pozitif korelasyon bulunmuştur.

Anselmi ve ark (2006), stabil ve anstabil anjinalı hastalar ile kontrol grubunda Ox-LDL düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında, Ox-LDL düzeylerini, stabil ve anstabil hastalarda kontrollere göre önemli derecede daha yüksek, stabil hastalarda anstabillere göre daha düşük olarak bulmuşlardır. Anjiyografik olarak tesbit edilen kompleks plak varlığı ile Ox-LDL düzeyleri arasında da korelasyon olduğunu göstermişlerdir.

Anstabil koroner arter hastalığı olan 490 kişi ve 431 sağlıklı grup üzerinde yapılan bir araştırmada Ox-LDL düzeyleri hasta grubunda önemli derecede yüksek bulunmuştur (Johnston ve ark 2006).

Başka bir çalışmada (Fredrikson ve ark 2003) akut miyokard infarktüsü geçiren vakalarda Ox-LDL/kolesterol oranının kontrol grubuna göre önemli derecede daha yüksek olduğu ve Ox-LDL/kolesterol oranının artan MI riski için olası bir indikatör olabileceği ileri sürülmüştür.

Suzuki ve ark (2002), koroner arterlerinde %50'den daha büyük stenozu olan 361 KKH ve 710 sağlıklı kişi üzerinde yaptıkları araştırmalarında, koroner arter hastalarında Ox-LDL ve LDL kolesterol düzeyleri kontrollere göre önemli derecede yüksek, HDL kolesterol düzeyleri ise daha düşük bulmuşlardır.

192 akut MI, 109 anstabil anjina ve 386 stabil anjinalı hasta üzerinde yapılan bir çalışmada (Ndrepepa ve ark 2005), Ox-LDL ölçümleri akut MI grupta 69.5 U/L, anstabil anjina'lı grupta 65.6U/L, stabil anjinalı grupta 67,6U/L olarak bulunmuştur. Aralarındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca aterosklerotik lezyonlarda Ox-LDL miktarıyla plazma Ox-LDL düzeyleri arasında bir korelasyonun olduğu ve özellikle anstabil aterosklerotik plakların Ox-LDL bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir.

Miyazaki ve ark (2005), koroner arter hastalarında yararlı bir indikatör olarak düşündükleri malondialdehid-modifiye LDL (MDA-LDL) düzeylerini KKH'larında sağlıklı kişilere göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır.

Toshima ve ark (2000), koroner arterlerinde >%75 stenoz bulunan 65 KKH ve 181 sağlıklı kişi üzerindeki araştırmalarında, plazma Ox-LDL düzeylerini hasta grubunda sağlıklı

kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yine bir başka çalışmada (Shimada ve ark 2004), koroner arterlerinin en az birinde >%50 stenoz olan KKH'larının plazma Ox-LDL düzeylerini kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda, hasta grubunun Ox-LDL düzeyleri kontrol grubuna göre biraz yüksek bulundu. Ancak aradaki fark istatistiki açıdan önemli değildi.

Ehara ve ark (2002), 70 akut MI, 70 UAP, 70 AP hastası ve 55 sağlıklı gönüllüler üzerinde yaptıkları çalışmalarında, plazma Ox-LDL seviyelerini MI grubunda, UAP, AP ve sağlıklılardan önemli derecede yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, Ox-LDL seviyesi yüksek olup akut MI'dan ölen hastaların otopsilerinde, aterosklerotik lezyonlarda immünohistokimyasal olarak makrofaj kökenli köpük hücrelerinin bol miktarda bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Koroner kalp hastalarında yapılan bir çalışmada; anstabil anjina pektorisli hastaların homosistein seviyelerinin stabil anjina pektorisli hasta grubu ve sağlıklı gruba göre önemli derecede yüksek bulunmuştur (Belaia ve Fedorova 2005). Yine bir başka çalışmada MI geçiren 271 erkek KKH'nın homosistein düzeyleri kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek bulunmuştur. Çalışmada orta derecede yüksek homosistein düzeylerinin MI riski ile ilişkili olduğu ve vitamin desteğiyle bunun tedavi edilebileceği bildirilmiştir (Stampfer ve ark 1992).

Banu ve ark (2005) 20 akut MI, 20 kronik iskemik kalp hastası ve 40 sağlıklı kişide yaptıkları araştırmalarında her iki hasta grubunun serum homosistein seviyelerini kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulmuşlardır. Ayrıca iskemik kalp hasta grubunun serum homosistein düzeyleri MI grubuna göre daha yüksek ölçülmüştür.

Faviou ve ark (2005) 41 anstabil anjina pektoris, 62 anjina pektoris'li koroner kalp hastası ve 170 sağlıklı kişide yaptıkları araştırmalarında, plazma Ox-LDL ve homosistein seviyelerini hasta gruplarında sağlıklılara göre önemli derecede yüksek bulmuşlardır. UAP'lı hasta grubunun Ox-LDL düzeyleri SAP'lı gruba göre belirgin olarak yüksek olduğu halde homosistein seviyelerinde bir farlılık olmadığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak bulgularımız, KKH'nda kan sitosterol düzeylerinin sağlıklı kişilerden istatistiksel açıdan farklı olmadığını göstermektedir. Ancak çalıştığımız hastaların üç tanesinin sitosterol düzeylerinin normal düzeylerin çok üzerinde olması bu hastalarda genetik sitosterolemi olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısı ile, bu bulgu KKH'nda kan sitosterol düzeylerinin ölçülmesinin bu hastalarda sitosteroleminin teşhis ve tedavisi bakımından faydalı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yukarıdaki literatür bilgileri ve bizim bulgularımız ışığında koroner kalp hastalarında çoğunlukla antioksidan kapasitenin azaldığı ve bu azalma sonucu oksidatif stres altında oldukları, dolayısı ile KKH'nın tedavisinde bu durumun da dikkate alınması gerektiği anlaşılmaktadır. Çalıştığımız her iki gruba ait Ox-LDL ve homosistein düzeyleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamasını ise izah edemedik.

6.ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
BİYOKİMYA (TIP) Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ / KONYA-2007
Abdullah SİVRİKAYA

Danışman
Prof.Dr. İdris MEHMETOĞLU

Sağlıklı Kişilerde ve Koroner Kalp Hastalarında (KKH) Bitki Sterolleri, Total Antioksidan Kapasite (TAS), Okside LDL (Ox-LDL) ve Homosistein Düzeylerinin Araştırılması

Bu çalışma 28-87 (60,9 ± 11,8) yaşları arasında KKH ön tanısıyla koroner anjiografisi yapılan toplam 166 kişi (46 kadın, 120 erkek) üzerinde gerçekleştirildi. Vakalar anjiografi sonuçlarına göre aşağıdaki şekilde gruplandırıldı.

1. Kontrol grubu (n=60): 59.8±12.9 yaşları arasında anjiografisi tamamen normal olan ve üç majör epikardiyal koroner arterinde %50'den az stenozu olanlar.
2. Hasta grubu (n=106): 62.8±11.0 yaşları arasında ve üç majör koroner arterlerinin en az birinde ≥% 50 stenozu olanlar.

Vakalardan, 12-14 saat açlıktan sonra sabah saatlerinde 8-10 ml antikoagülansız tam kan örnekleri alınarak bekletilmeden serumları ayrıldı ve bitki sterolleri (stigmasterol, β-sitosterol), kolesterol, TAS, Ox-LDL ve homosistein düzeyleri ölçüldü

Bitki sterolleri, kolesterol ve homosistein düzeyleri HPLC (High performance Liquid Chromatography) yöntemiyle, Ox-LDL düzeyleri ticari kit kullanılarak eliza yöntemiyle, TAS düzeyi ise spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

Kontrol grubuna ait stigmasterol, β-sitosterol, kolesterol, homosistein, Ox-LDL ve TAS düzeyleri sırasıyla 2.86±0.48 μg/ml, 3.22±0.37 μg/ml, 101,2±4,3 mg/dl, 16.61±0.60

µmol/L, 114.5±4.1 U/L, ve 1.16±0.01 mmol/L olarak, hasta grubuna ait aynı parametreler sırasıyla 5.02±1.21 µg/ml, 5.59±1.39 µg/ml, 106,1±4,6 mg/dl, 17.62±0.78 µmol/L, 119.7±4.7 U/L, ve 1.09±0.01mmol/L olarak bulundu.

Çalışmamızda her iki gruba ait sitosterol düzeyleri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmazken, hasta grubuna ait Ox-LDL ve homosistein düzeyleri kontrol grubuna göre biraz yüksek (istatistiksel açıdan önemsiz), TAS düzeyleri ise önemli düzeyde ($p<0.01$) düşük bulunmuştur.

Ayrıca, hastalarımızda kan sitosterol düzeyleri ile kolesterol düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulunması bu hastalarda bitki sterollerinin ateroskleroz oluşumuna pozitif katkı yaptığını göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada üç hastanın sterol seviyeleri diğerlerine göre çok yüksek bulunmuştur. Bu hastaların serum kolesterol düzeyleri normal olduğu halde sitosterol düzeylerinin yüksek olması, bu kişilerde genetik sitosterolemi bulunabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak bulgularımız, KKH'nda kan sitosterol düzeylerinin sağlıklı kişilerden istatistiksel açıdan farklı olmadığını göstermektedir. Ancak, çalıştığımız hastaların üç tanesinde normal sınırların çok üzerinde sitosterol düzeylerinin bulunmuş olması bu hastalarda genetik sitosterolemi olabileceğini, dolayısı ile KKH'nda kan sitosterol düzeylerinin ölçülmesinin bu tip hastalarda sitosteroleminin teşhis ve tedavisi bakımından önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hastalarımızda TAS düzeylerinin düşük olması da önemli bir bulgu olup, tedavide dikkate alınması gerektiği kanaatindeyiz.

7.SUMMARY

Investigation Of Plant Sterols, Total Antioxidant Status (TAS), Oxidized LDL (Ox-LDL) and Homocysteine Levels In Patients With Coronary Arthery Disease (CAD) and Healthy Controls

This study was performed on angiographicly documented 166 CAD patients (46 F, 120 M) aged 28-87 years. Subjects were classified according to coronary angiographic results as follows: angiographic documentation.

Control group: 60 subjects aged 59.8±12.9 years with normal coronary angiograms (no vessel disease) and with less than 50% stenosis in any of the three major coronary arteries.

Patients group: 106 subjects aged 62.8±11.0 years and with ≥50% stenosis in at least one of the three major coronary arteries

8-10 ml of non-anticoagulated whole blood samples were drawn after a 12-14 hours of fasting at morning. Sera of the samples were immediately seperated and plant sterols (stigmasterol, β-sitosterol), cholesterol, Ox-LDL, TAS and homocysteine levels were measured.

Plant sterols, cholesterol and homocysteine levels were determined by HPLC (High performance Liquid Chromatography), Ox-LDL levels were determined by using a commercially available elisa kit and TAS levels were determined spectrophotometrically.

Serum stigmasterol, β-sitosterol, cholesterol, homocysteine, Ox-LDL and TAS levels of the control group were found as 2.86±0.48µg/ml, 3.22±0.37µg/ml, 101,2±4,3mg/dl, 16.61±0.60µmol/L, 114.5±4.1U/L, and 1.16±0.01mmol/L respectively. The same parameters of the patients group were found as 5.02±1.21µg/ml, 5.59±1.39µg/ml, 106,1±4,6 mg/dl, 17.62±0.78µmol/L, 119.7±4.7U/L, and 1.09±0.01mmol/L respectively.

There was no significant difference between serum sitosterols levels of the groups. However, Ox-LDL and homocysteine levels of the patients group were slightly, but not

significantly, higher than those of the control group whereas TAS level of the patients group was significantly ($p<0.01$) lower than that of the control group.

We have found a significant positive correlation between cholesterol and sitosterol levels in the patients group. This shows that plant sterols contributes to the development and the progression of atherosclerosis in patients with CAD.

In our study, plant sterols levels of three patiens were found to be significantly higher while cholesterol levels were not different compaired to those of the other patients. That finding suggested that those three patients might have genetic sitosterolemia.

In conclusion, our results show that there was no significant difference between sitosterol levels of patients with CAD and controls. However, sitosterol levels of 3 patients were significantly higher than that of control subjects. This finding shows that these patients may have sitosterolemia disease. Therefore, we believe that it is important to measure blood sitosterol levels in these patients in respect to the diagnosis and treatment of sitosterolemia in patients with CAD. In addition, significantly low level of TAS in our patients is another important finding which might be considered in the treatment of these patients.

8.LİTERATÜR LİSTESİ

Adunsky A, Weitzman A, Fleissig Y, Levenkrohn L, Arad M, Dolman R et al (2000) *The relation of plasma total homocysteine levels to prevalent cardiovascular disease in older patients with ischemic stroke,* Aging (Milano),12,48-52.

Akkuş İ(1995) *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri,* Mimoza Yayıncılık, 1-11,42-43,49-50,54-56,61,63-64.

Aksoy Y (2002) *Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü,* T Klin J Med Sci, 22,442-448.

Al Obaidi MK, Philippou H, Stubbs PJ, Adami A, Amersey R, Noble MM et al (2000) *Relationships between homocysteine, factor VIIa, and thrombin generation in acute coronary syndromes,* Circulation, 101,372-377.

Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, et al (1994) *Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study,* Atherosclerosis, 106,9-19.

Annuk M (2002) *Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stres in chronic renal failure*, Acta Universtitatis Upsaliensis comprehensive summaries of uppsala dissertation from faculty of medicine 1122,1-56.

Anselmi M, Garbin V, Agostoni P, Fusaro M, Pasini A.F, Nava C et al (2006) *Plasma levels of oxidized-low-density lipoproteins are higher in patients with unstable angina and correlated with angioraphic coronary complex plaques,* Atherosclerosis, 185,114-120.

Banu S, Mollah FH, Alam MK, Rahman MA, Hamid MA, Wahab MA et al (2005) *Serum homocysteine concentration in patients with acute MI and chronic IHD,* Mymensingh Med J, 14(1):54-7.

Baykal Y, Tüzün A, Kocabalkan F(1998) *Aterosklerozun Patogenezi* T Klin J Med Sci, 18,360-368.

Belaia OL, Fedorova NV (2005). *Study of serum levels of homocystein, lipids and their peroxidation products in patients with coronary heart disease* Klin Med (Mosk),83(11):30-3.

Bellamy MF, McDowell IF (1997) *Putative mechanisms for vascular damage by homocysteine,* J Inherit Metab Dis, 20,307-15.

Bellamy MF, McDowell IFW, Ramsey MW, Brownlee M, Bones C, Newcombe RG et al (1998) *Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults,* Circulation, 98,1848-52.

Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH (2000) *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters,* Comment In Science, 290(5497), 1709-11.

Bhattacharyya AK, Connor WE (1974) *βSitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters,*J.Clın.Invest, 53(4), 1033-1043.

Bunout D, Garrido A, Suazo M, Kauffman R, Venegas P, Maza P et al (2000) *Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients,* Nutrition,16,107-110.

Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldı A, Bortone L, novembrino C et al (2001) *Oxidative stres and homocysteine in coronary artery disease,* Clinical Chemistry, 47(5):887-892.

Cesari M, Zanchetta M, Burlina A, Pedon L, Maiolino G, Sticchi D et al (2005) *Hyperhomocysteinemia Is Inversely Related With Left Ventricular Ejection Fraction and Predicts Cardiovascular Mortality in High-Risk Coronary Artery Disease Hypertensives,* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 25,115-121.

Chapple ILC (1996) *Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases,* J Clin Pathol: Mol Pathol, 49,247-255.

Chen C, Halkos ME, Surowiec SM, Conklin BS, Lin PH, Lumsden AB (2000) *Effects of Homocysteine on Smooth Muscle Cell Proliferation in Both Cell Culture and Artery Perfusion Culture Models*, Journal of Surgical Research, 88,26–33.

Dayal B, Ertel NH, Rapole KR, Asgaonkar A, Salen G (1997) *Rapid hydrogenation of unsaturated sterols and bile alcohols using microwaves,* Steroids. 62:451-454.

Demirbağ R, Yılmaz R, Koçyiğit A (2005) *Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease,* Mutat Res, 570(2):197-203.

Doğru-Abbasoğlu S, Kanbağlı O, Bulur H, Erhan Babalik, Ozturk S, Aykac-Toker G et al (1999) *Lipid peroxides and antioxidant status in serum of patients with angiographically defined coronary atherosclerosis,* Clinical Biochemistry, 32,671-672.

Doshi SN, McDowell IFW, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ et al (2002) *Folic Acid Improves Endothelial Function in Coronary Artery Disease via Mechanisms Largely Independent of Homocysteine Lowering,* Circulation,105,22-26.

Dunn J, Title LM, Bata I, Johnstone DE, Kırkland SA, O'neıll BJ et al (1998) *Relation of a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase to plasma homocysteine and early onset coronary artery disease,* Clin Biochem, 31,95-100.

Durak İ, Büyükkoçak S (1998) *Ateroskleroz oluşumunda serbest radikal hasarının rolü:Antioksidanların etkisi,* Klinik Gelişim, 11,365-368.

Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Matsuo T, Ogami M, et al (2002) *Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases,* Journal of Diabetes and Its Complications, 16,60–64.

Eikelboom JW, Lonn E, Genest JrJ, Hankey G, Yusuf S (1999) *Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence,* Ann Intern Med, 131,363-75.

Erel O (2004) *A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation,* Clinical Biochemistry, 37,277-285.

Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH (1997) *Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial,* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17,1947-53.

Fallon UB, Shlomo YB, Elwood P, Ubbink JB, Smith GD (2001) *Homocysteine and coronary heart disease in the Caerphilly cohort: a 10 year follow up,* Heart, 85,153–158.

Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) *Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition,* Nutrition, 18,872– 879.

Faviou E, Vourli G, Nounopoulos C, Zachari A, Dionyssiou-Asteriou A (2005) *Circulating oxidized low density lipoprotein, autoantibodies against them and homocysteine serum levels in diagnosis and estimation of severity of coronary artery disease,* Free Radic Res, 39(4):419-429.

Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH et al (1998) *Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study,* Circulation, 98,204-10

Fredrikson NG, Hedblad B, Berglund G, Nılsson J (2003) Plasma *oxidized LDL: a predictor for acute myocardial infarction?,* Journal of Internal Medicine, 253,425–429.

Frei B (1999) On *the role of vitamin C and other antioxidants in aterogenesis and vascular dysfunction,* Linus Pauling Institue, Oregon state university, Corvallis, Oregon, 222,196-204.

Gaut JP, Heinecke JW (2001) *Mechanisms for Oxidizing Low-Density Lipoprotein Insights from Patterns of Oxidation Products in the Artery Wall and from Mouse Models of Atherosclerosis,* Trends Cardiovasc Med, 11,103–112.

Glueck C, Speirs J, Tracy T, Streicher P, Illing E, Vandegrift J (1991) *Relationships of serum plant sterols (Phytosterols) and cholesterol in 595 hypercholesterolemic subjects, and familial aggregation of phytosterols, cholesterol, and premature coronary heart disease in hyperphytosterolemic probands and their first-degree relatives,* Metabolism, 40(8):842-848.

Gök H (2002) *Aterosklerotik hastalıklar içinde: Klinik Kardiyoloji,* Nobel tıp kitabevleri, 201-204.

Guemouri L, Artur Y, Herbert B, Jeandel C, Cuncy G, Siest G (1991) *Biological variability of superoxide dismutase, Glutathion peroxidase, and catalase in blood,* Clin Chem, 37(11):1932-1937.

Gylling H, Miettinen TA (1999) *Cholesterol Reduction by Different Plant Stanol Mixtures and With Variable Fat Intake, Metabolism,* 48(5), 575-580.

Hankey GJ, Eikelboom JW (1999) *Homocysteine and vascular disease,* Lancet, 354,407-13.

Hankey GJ, Eikelboom JW, Khoon HoW, van Bockxmeer FM (2004) *Clinical usefulness of plasma homocysteine in vascular disease,* MJA, 181(6),314–318.

Heinecke JW (1998) *Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis,* Atherosclerosis, 141,1–15.

Hidaka H, Nakamura T, Aoki T, Kojima H, Nakajima Y, Kosugi K et al (1990) *Increased plasma plant sterol levels in heterozygotes with sitosterolemia and xanthomatosis,* J Lipid Res, 31,881-888.

Igel M, Giesa U, Lutjohann D, von Bergmann K (2003) *Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice,* Journal Of LipidResearch,44(3),533-538.

Jacobsen DW (1998) *Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease,* Clinical Chemistry, 44:8(B), 1833–1843.

Jıalal I, Deveraj S (1996) L*ow-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective,* Clinical Chemistry, 42(4),498-506.

Jialal I (1998) Evolving *lipoprotein risk factors: Lipoprotein(a) and oxidized low-density lipoprotein,* Clinical Chemistry, 44(8)B,1827-1832.

Johnston N, Jernberg T, Lagerqvist B, Siegbahn A, Wallentin L (2006) *Improved Identification of Patients With Coronary Artery Disease by the Use of New Lipid and Lipoprotein Biomarkers,* Am J Cardiol, 97,640–645.

Jones PJH, Howell T, MacDougall DE, Feng JY, Parsons W (1998) *Short-Term Administration of Tall Oil Phytosterols Improves Plasma Lipid Profiles in Subjects With Different Cholesterol Levels, Metabolism,* 47, 751-756.

Jones PJH, Ntanios FY, Sarjaz MR, Vanstone CA (1999) *Cholesterol-lowering efficacy of a sitostanol-containing phytosterol mixture with a prudent diet in hyperlipidemic men,* Am J Clin Nutr, 69,1144-50.

Kasama T, Byun DS, Seyama Y (1987) *Quantitative analysis of sterols in serum by high-performance liquid chromatography Application to the biochemical diagnosis of cerebrotendinous xanthomatosis,* Journal of Chromatography, 400,241-246.

Klett EL, Lee MH, Adams DB, Chavin KD, Shailendra BP (20004) *Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine,* BMC Gastroenterol, 4, 21.

Kovacs IB, Jahangiri M, Rees GM, Görög P (1997) *Elevated plasma lipid hydroperoxides in patients with coronary artery disease,* Am Heart J, 134:572-576.

Kuksis A (2001) *Plasma non-cholesterol sterols,* Journal of Chromatography A. 935(1-2): 203-236.

Kunt AS, Selek S, Celik H, Demir D, Erel O, Andac MA (2006) *Decrease of total antioxidant capacity during coronary artery bypass surgery,* The mount Sinai journal of medicine, 73 (5):777-783.

Kuriyama M, Fujiyama J, Kasama T, Osame M (1991) *High levels of plant sterols and cholesterol procursor in cerebrotendinous xanthomatosis,* J lipid Res, 32,223-229.

Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H et al (2001) *Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption,* nature genetics 27:79-83.

Lee MH, Lu K, Patel SB (2001) *Genetic basis of sitosterolemia*, Current Opinion In Lipidology, 12(2), 141-149.

Leitinger N (2005) *Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis,* Mol. Nutr. Food Res, 49, 1063–1071.

Ling WH, Jones PJ (1995) *Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects,* Life Sci, 57(3),195-206.

Lu K, Lee MH, Hazard S, Brooks-Wilson A, Hidaka H, Kojima H et al (2001) *Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively,* American Journal Of Human Genetics, 69(2), 278-290.

Luoma JS, Kareinen A, Narvanen O, Viitanen L, Laakso M, Herttuala SY (2005) *Autoantibodies against oxidized LDL are associated with severe chest pain attacks in patients with coronary heart disease,* Free Radical Biology & Medicine 39 (2005) 1660 – 1665.

Mehta JL (2006) *Oxidized or native low density lipoprotein cholesterol. Which is more important in atherogenesis,* J Am Coll Card, 48(5):980-982.

Mertens A, Holvoet P (2001) *Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis,* FASEB J, 15,2073–2084.

Miettinen TA, Railo M, Lepantalo M, Gylling H (2005) *Plant sterols in serum and in atherosclerotic plaques of patients undergoing carotid endarterectomy,* Aterosclerosis, 45,1794-1801.

Miyazaki T, Shimada K, Sato O, Kotani K, Kume A, Sumiyoshi K et al (2005) *Circulating malondialdehyde-modified LDL and atherogenic lipoprotein profiles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy in patients with coronary artery disease,* Atherosclerosis, 179,139-145.

Moghadasian MH, Frohlich JJ (1999) *Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence*, The American Journal of Medicine. 107(6): 588-594.

Nakano E, Taiwo FA, Nugent D, Griffiths HR, Aldred S, Paisi M et al (2005) *Downstream effects on human low density lipoprotein of homocysteine exported from endothelial cells in an in vitro system,* Journal of Lipid Research, 46, 484-493.

Ndrepepa G, Braun S, Beckerath Nv, Mehilli J, Gorchakova O, Vogt W et al (2005) *Oxidized low density lipoproteins, statin therapy and severity of coronary artery disease,* Clinica Chimica Acta, 360,178-186.

Nguyen LB, Shefer S, Salen G, Ness GC, Tint GS, Zaki FG, Rani I (1990) *A Molecular Defect in Hepatic Cholesterol Biosynthesis in Sitosterolemia with Xanthomatosis,* J. Clin. Invest.86:923-931.

Nojiri S, Daida H, Mokuno H, Iwama Y, Mae K, Ushio F, Ueki T (2001) *Association of serum antioxidant capacity with coronary artery disease in middle-aged men,* Jpn Heart J,42(6):677-90.

Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T, Fukuhara S (2004) *Activated Platelet and Oxidized LDL Induce Endothelial Membrane Vesiculation: Clinical Significance of Endothelial Cell–Derived Microparticles in Patients With Type 2 Diabetes,* Clin Appl Thrombosis/Hemostasis, 10(3):205–215.

Ntanios FY, vandeKooij AJ, de Deckere EA, Duchateau GS, Trautwein EA (2003) *Effects of various amounts of dietary plant sterol esters on plasma and hepatic sterol concentration and aortic foam cell formation of cholesterol-fed hamsters,* Atherosclerosis, 169,41-50.

Patel SB, Klett EL, Anh GS, Yu H, Chen J, Pandit B, Lee MH, Salen G (2004) *Sitosterolemia; of mice and man,* International Conqress Series. 1262:300-304.

Patel SB, Salen G, Hidaka H, Kwiterovich PO, Stalenhoef AF, Miettinen TA et al (1998) *Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21,* The Journal Of Clinical Investigation, 102(5):1041-1044.

Qıu C, Phung TTT, Vadachkorıa1 S, Muy-Rıvera M, Sanchez SE, Wıllıams MA (2006) *Oxidized Low-Density Lipoprotein (Oxidized LDL) and the Risk of Preeclampsia,* Physiol Res, 55,491-500.

Quınn MT, Arthasarathy S, Fong LG, Steinberg D (1987) *Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential rolein recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis,* Proc. Natl. Acad. Sci, 84,2995-2998.

Rajaratnam RA, Gylling H, Miettinen T (2000) *Independent association of serum squalene and noncholesterol sterols with coronary artery disease in postmenopausal women,* J Am Coll Cardiol, 35,1185,1191.

Rodrigo R, Passalacqua W, Araya J, Orellna M, Rivera G (2003) *Implications of oxidative stres and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension,* J Cardiovasc Pharmacol, 42,453-461.

Salen G, von Bergmann K, Lütjohann D, Kwiterovich P, Kane J, Patel SB et al (2004) *Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia,* Circulation, 109(8):966-971.

Salen G, Xu G, Tint GS, Batta AK, Shefer S (2000) *Hyperabsorption and retention of campestanol in a sitosterolemic homozygote: comparison with her mother and three control subjects,* Journal Of Lipid Research, 41(11), 1883-1889.

Salen, G, Tint G S, Shefer S, Shore V, Nguyen L (1992) *Increased sitosterol absorption is offset by rapid elimination to prevent accumulation in heterozygotes with sitosterolemia,* Arteriosclerosis And Thrombosis: a Journal Of Vascular Biology / American Heart Association, 12(5):563-568.

Schaller H (2003) Prog. Lipid Res, 42,163-175.

Schnyder G, Flammer Y, Roffi M, Pin R, Hess OM (2002) *Plasma homocysteine levels and late outcome after coronary angioplasty,* J Am Coll Cardiol, 40,1769-1776.

Serdar Z, Yesilbursa D, Dirican M, Sarandol E, Serdar A (2006) *Sialic acid and oxidizability of lipid and proteins and antioxidant status in patients with coronary artery disease,* Cell Biochem Funct, in pres.

Shaw PX, Hörkkö S, Tsimikas S, Chang Mi-K, Palinski W, Silverman GJ et al (2001) *Human-Derived Anti–Oxidized LDL Autoantibody Blocks Uptake of Oxidized LDL by Macrophages and Localizes to Atherosclerotic Lesions In Vivo*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 21,1333-1339.

Shen L, Sevanian A (2001) *OxLDL induces macrophage delta-GCS-HS protein expression: a role for oxLDL-associated lipid hydroperoxide in GSH synthesis,* J. Lipid Res, 42,813–823.

Shimada K, Mokuno H, Masunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Miyauchi K et al (2004) *Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease,* Atherosclerosis, 174,343-347.

Shulenin S, Schriml LM, Remaley AT, Fojo S, Brewer B, Allikmets R, Dean M (2001) *An ATP-binding cassette gene (ABCG5) from the ABCG (White) gene subfamily maps to human chromosome 2p21 in the region of the Sitosterolemia locus,* Cytogenetics And Cell Genetics, 92(3-4), 204-208.

Stampfer MJ, **Malinow MR**, **Willett WC**, **Newcomer LM**, **Upson B**, **Ullmann D et al (1991)** *A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians,* JAMA, 268(7):877-881.

Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA (2004) *ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Human Metabolism and Diseases,* Physiol. Res, 53, 235-243.

Still RA, McDowell IF (1998) *Clinical implications of plasma homocysteine measurement in cardiovascular disease,* J Clin Pathol, 51,183-8.

Stocker R, Keaney JF Jr (2004) *Role of oxidative modifications in atherosclerosis,* Physiol Rev, 84,1381-1478.

Sudhop T, Gottwald BM, vonBergman K (2002) *Serum plant sterol as a potential risk factor coronary heart disease,* Metabolism, 51(12),1519-1521.

Sudhop T, Bergmann KV (2004) *Sitosterolemia – a rare disease Are elevated plant sterols an additional risk factor?***,** Z Kardiol 93:921–928.

Suzuki T, Kohno H, Hasegawa A, Toshima S, Amaki T, Kurabayashi M et al (2002) *Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease,* Clinical Biochemistry, 35,347-353.

Tamer L, Sucu N, Polat G, Ercan B, Aytaçoğlu B, Yücebilgiç 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.

Tang L, Mamotte CD, Van Bockxmeer FM, Taylor RR (1998) *The effect of homocysteine on DNA synthesis in cultured human vascular smooth muscle,* Atherosclerosis, 136,169-173.

Taşkıran A, Eskiocak S, Çıkırıkçıoğlu M, Ege T, Duran E (2005) *Koroner Arter Bypass Cerrahisi Öncesindeki Plazma Total Antioksidan Kapasite Düzeylerinin iskemi-Reperfüzyon Hasarı ile ilişkisi,* Trakya üniversitesi tıp fakültesi dergisi, 22(1):16-22.

Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA (1997) *Hyperhomocysteinemia Is Associated With Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans,* Circulation, 95,1119-1121.

Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe M, Takano T, Sugano J et al (2000) *Circulating Oxidized Low density lipoprotein levels a biochemical risk marker for coronary heart disease,* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20,2243-2247.

Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsıeh CM, Haber E, Schlegel R et al (1994) *Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis,* Proc Natl Acad Sci USA, 91,6369-6373.

Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, Patel R, Pattison J, Miller E et al (2003) *Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes,* Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Turley SD, Dietschy JM (2003) *Sterol absorption by the small intestine,* Lippincott Williams & Wilkins, 14(3), 233-240.

Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G et al (2003) *Increased Superoxide Production in Coronary Arteries in Hyperhomocysteinemia Role of Tumor Necrosis Factor-α, NAD(P)H Oxidase, and Inducible Nitric Oxide Synthase,* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 23,418-424.

Uysal M(1998) *Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar,* Klinik Gelişim, 11,336-341.

Ünal D (1999) *Serbest radikaller,* Sendrom, Mart,68-80.

Vanhanen HT, Blomqvist S, Ehnholm C, Hyvonen M, Jauhiainen M, Torstila I et al (1993) *Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with different apoE phenotypes during dietary sitostanol ester treatment,* J Lipid Res, 34(9):1535-1544.

Vassalle C, Petrozzi L, Botto N, Andreassi MG, Zucchelli GC (2004) *Oxidative stress and its association with coronary artery disease and different atherogenic risk factors*, Journal of Internal Medicine, 256,308-315.

Violi F, Micheletta F,Luliano L (2002) *Antioxidants and atherosclerosis,* Eur Heart J Supplements 4(B):17–21.

Wang G, Mao JM, Wang X, Zhang FC (2004) *Effect of homocysteine on plaque formation and oxidative stress in patients with acute coronary syndromes,* Chin Med J, 117(11):1650-1654.

Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, Fito M, Tomas M, Senti M et al (2003) *High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease,* Atherosclerosis, 168, 99-106.

Yalçın AS (1998) *Antioksidanlar,* Klinik Gelişim, 11,342-46.

Young IS, McEneny J (2001) *Lipoprotein oxidation and atherosclerosis,* Biochemical Society Transactions, 29(2),358-362.

Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH (2002) *Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion,* Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 99(25), 16237-16242.

Zieden B, Kaminskas A, Kristenson M, Kucinskiene Z, Vessby B, Olsson AG et al (1999) *Increased Plasma 7b-Hydroxycholesterol Concentrations in a Population With a High Risk for Cardiovascular Disease,* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 19,967-971.

9. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladı. 1995-1999 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde öğrenimini yaptı. 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamlayarak mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi ve Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında Uzman (Öğr.Yrd) olarak göreve başladı. Şu an Merkez Biyokimya Laboratuvarında Uzman olarak görevine devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.

10. TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Kurtuluş Özdemir, Uzm.Dr. Nazif Aygül, Dr. Murat Sizen ve Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof.Dr. Hüseyin Kara, Arş.Gör. Yasemin Öztekin, istatistiksel analizlerde yardımcı olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Said Bodur'a ve manevi desteklerinden dolayı eşime teşekkürlerimi sunarım.