



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA KISA DÖNEM
HİPERHOMOSİSTEİNEMİNİN YOL AÇTIĞI
ENDOTEL DİSFONKSİYONU ÜZERİNE
NEBİVOLOLÜN HİSTOPATOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MUSTAFA AHMET HUYUT

DANIŞMAN

YRD.DOÇ.DR. ÇAĞDAŞ AKGÜLLÜ

AYDIN 2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA KISA DÖNEM
HİPERHOMOSİSTEİNEMİNİN YOL AÇTIĞI
ENDOTEL DİSFONKSİYONU ÜZERİNE
NEBİVOLOLÜN HİSTOPATOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MUSTAFA AHMET HUYUT

DANIŞMAN

YRD.DOÇ.DR. ÇAĞDAŞ AKGÜLLÜ

AYDIN 2014

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-12010 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Kardiyoloji eğitimimin ve tezimin hazırlanmasında bilimsel desteğini daima hissettiğim değerli hocam ve saygıdeğer tez danışmanım Yrd.Doç.Dr.Çağdaş Akgüllü'ye, kardiyoloji eğitimimi sağlayan değerli hocalarım Prof.Dr.Tarkan Tekten'e, Prof.Dr.Osman Alper Onbaşılı'ya, Prof.Dr.Ceyhan Ceyhan'a, Yrd.Doç.Dr.Ufuk Eryılmaz'a, Yrd.Doç.Dr.Cemil Zencir'e, çalışmamın yapılmasında ratların temininde yardımını esirgemeyen sayın Yrd.Doç.Dr.Hasan Güngör'e, ratların teminininde yardımcı olan hastanemizin başhekimisi sayın Doç.Dr.Mustafa Oğurlu'ya, Kalp Damar Cerrahisi, Göğüs Hastalıkları ve Dahiliye ABD. öğretim üyelerine, çalışmamım gerçekleşmesini sağlayan veteriner hekim sayın Yrd.Doç.Dr.Murat Boyacıoğlu ve ekibine, biyokimya analizlerini gerçekleştiren sayın Prof.Dr.Aslıhan Karul ve ekibine, patolojik incelemeleri gerçekleştiren sayın Doç.Dr.İbrahim Meteoğlu ve ekibine, istatistiksel değerlendirmeleri yapan Prof.Dr.Mevlüt Türe ve ekibine; beni her zaman destekleyen ve sevgisini esirgemeyen sevgili eşim Uzm.Psk.Betül Çetintulum Huyut'a, yıllarını evlatlarını yetiştirmek için harcayan kıymetli annem Gülsevim Huyut'a ve değerli babam Cahit Huyut'a, desteklerini hep hissettiğim kardeşlerim Vet.Hek.Dilek Huyut Mengüllüoğlu'na ve Dr.Mehmet Murat Huyut'a (PhD), çalışmanın gerçekleştirilmesinde yardımcı olan anjiyografi teknisyenimiz sayın Biyolog Ümit Afyoncu'ya, anjiyografi ünitesinde beraber çalıştığım Mete Turan, tüm asistan ve hemşire arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Mustafa Ahmet Huyut

Aydın 2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
TABLO DİZİNİ.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ.....	xi
RESİM DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Homosistein	3
2.1.1. Homosisteinin metabolizması	3
2.1.2. Hiperhomosisteinemi.....	4
2.1.3. Plazma homosistein düzeyini artıran faktörler	5
2.1.4.Hiperhomosisteinemi ve kardiyovasküler hastalıklar ile bağlantısı.....	6
2.2 Asimetrik dimetilarjinin	8
2.3 Endotel fonksiyon bozukluğu	12
2.4 Nitrik oksit	14
2.5 Homosistein, nitrik oksit ve asimetrik dimetilarjinin birbirleri ile olan ilişkisi.....	16
2.6 Antioksidanlar	19
2.6.1 Malondialdehit	19
2.6.2 Glutasyon.....	20
2.6.3 Glutasyon peroksidaz	21
2.6.4 Glutasyon redüktaz.....	21

2.6.5 Süperoksit dismutaz	22
2.6.6 Katalaz.....	22
2.7 Nebivol	22
2.8 Transforming büyüme faktör beta ve Vasküler endotelial büyüme faktör	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Deney modeli.....	28
3.2. Biyokimyasal incelemeler.....	29
3.2.1. Rat serum asimetrik dimetilarjinin ve homosistein	29
3.2.2. Katalaz aktivitesi	29
3.2.3. Glutasyon redüktaz aktivitesi.....	29
3.2.4. Glutasyon peroksidaz aktivitesi.....	30
3.2.5. Glutasyon düzeyi.....	30
3.2.6. Süperoksit dismutaz aktivitesi.....	30
3.2.7. Malondialdehit tayini	30
3.2.8. Nitrik oksit tayini.....	30
3.3. Patolojik incelemeler	31
4. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME.....	32
5. BULGULAR	33
5.1. Biyokimyasal bulgular	40
5.1.1. Homosistein	40
5.1.2. Asimetrik dimetilarjinin	41
5.1.3. Katalaz	42
5.1.4. Glutasyon.....	43
5.1.5. Nitrik oksit	44
5.1.6. Glutayon peroksidaz	45
5.1.7. Malondialdehit.....	46

5.1.8. Glutasyon redüktaz.....	47
5.1.9. Süperoksit dismütaz	48
5.2. Patolojik bulgular	49
5.2.1. Kardiyomiyosit dejenerasyonu.....	53
5.2.2. Transforming büyüme faktör beta-1 aorta.....	57
6. TARTIŞMA.....	60
7. SONUÇ	71
8. ÖZET	72
9. SUMMARY	75
10. KAYNAKLAR.....	78

KISALTMALAR DİZİNİ

ADMA: Asimetrik dimetilarjinin
Ark.: Arkadaşları
BH4: Tetrahidrobiopterin
Ca: Kalsiyum
CaM: Kalmodulin
CAT: Katalaz
CBS: Sistatyonin beta sentaz
cGMP: Siklik guanozin monofosfat
COX-2: Siklooksijenaz-2
DDAH: Dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz
DPT: Dimetilarginin pirüvat aminotransferaz
eNOs: Endotelyal NOs
EDRF: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
FAD: Flavın adenin dinükleotid
FMN: Flavın mono nükleotid
GPx: Glutasyon peroksidaz
GR: Glutasyon redüktaz
GSH: Glutasyon
GTP: Guanozin trifosfat
H&E: Hematoksilen–eosin
Hcy: Homosistein
iNOs: İnduklenebilir NOs
KKY: Kronik kalp yetersizliğı
KOAİ: Kronik obstriktif akciğer hastalığı
mg: Miligram
ml: Mililitre
MDA: Malondialdehit
MS: Metiyonin sentaz
MTHFR: Metilentetrahidrofolat redüktaz

NO: Nitrik oksit
NOs: Nitrik oksid sentaz
nNOs: Nöronal NOs
O₂: Oksijen
p değeri: Olasılık değeri
PBS: Fosfat tampon çözeltisi
PRMT: Protein arjinin N-metiltransferaz
SAM: S-adenozilmetiyonin
SAH: S-adenozilhomosistein
SOD: Süperoksit dismutaz
TGF β -1: Transforming büyüme faktör beta-1
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

TABLO DİZİNİ

Tablo I: Hiperhomosisteinemi dereceleri

Tablo II: Endotel kaynaklı mediyatörler

Tablo III: Antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Tablo IV: Kontrol grubunun biyokimyasal verileri.

Tablo V: Nebivolol grubunun biyokimyasal verileri.

Tablo VI: Metiyonin grubunun biyokimyasal verileri.

Tablo VII: Metiyonin+nebivolol grubunun biyokimyasal verileri.

Tablo VIII: Kontrol grubunun patolojik verileri.

Tablo IX: Nebivolol grubunun patolojik verileri.

Tablo X: Metiyonin grubunun patolojik verileri.

Tablo XI: Metiyonin+nebivolol grubunun patolojik verileri.

Tablo XII: Normal dağılan nicel veri gruplarının biyokimyasal verilerinin tanımlayıcı istatistikleri.

Tablo XIII: Normal dağılmayan nicel veri gruplarının biyokimyasal verilerinin tanımlayıcı istatistikleri medyan persantil (25-75) olarak verildi.

Tablo XIV: Tüm grupların patolojik verilerinin ortalama ve standart sapmaları.

Tablo XV: Grupların homosistein ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XVI: Grupların asimetrik dimetilarjinin ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XVII: Grupların katalaz ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XVIII: Grupların glutatyan ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XIX: Grupların nitrik oksit ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XX: Grupların glutatyon peroksidaz ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XXI: Grupların malondialdehit ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XXII: Grupların glutatyon redüktaz ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri.İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XXIII: Grupların süperoksit dismütaz ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri.İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XXIV: Gruplara Kruskal-Wallis testi uygulandığında patolojik incelemelerin istatistiksel anlamlı olanları * ile işaretlenmiştir.

Tablo XXV: Grupların kardiyomiyosit dejenerasyon skoru ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Tablo XXVI: Grupların transforming büyüme faktör beta aorta boyanma derecesi ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Homosistein metabolizması, transsülfürasyon ve remetilasyon yolları.

Şekil 2: Asimetrik dimetiltarjinin sentezi ve yıkımı.

Şekil 3: Nitrik oksit sentaz enziminin inhibisyonu.

Şekil 4: Asimetrik dimetiltarjinin ve homosisteinin metabolik yollarının birbirleriyle etkileşimi.

Şekil 5: Endotel fonksiyon bozukluğu.

Şekil 6: Nitrik oksidin sentezi.

Şekil 7: Nitrik oksidin fizyolojisi.

Şekil 8: Nitrik oksidin gerçekleştirdiği (koyu ok) ve önlediği mekanizmalar.

Şekil 9: Homosistein, nitrik oksit ve asimetrik dimetiltarjinin birbirleri ile olan ilişkisi.

Şekil 10: Homosistein, nitrik oksit ve asimetrik dimetiltarjinin ve endotel disfonksiyonunun birbirleri ile olan ilişkisi.

Şekil 11: Glutasyon siklusu.

Şekil 12: Terapötik DL-nebivololün üç boyutlu yapısı.

Şekil 13: Homosistein ortalamaları

Şekil 14: Asimetrik dimetiltarjinin ortalamaları.

Şekil 15: Katalaz ortalamaları.

Şekil 16: Glutasyon ortalamaları.

Şekil 17: Nitrik oksit ortalamaları.

Şekil 18: Glutasyon peroksidaz ortalamaları.

Şekil 19: Malondialdehit ortalamaları.

Şekil 20: Kardiyomiyosit dejenerasyon skoru ortalamaları.

Şekil 21: Transforming büyüme faktör beta aorta boyanma skoru ortalamaları.

RESİM DİZİNİ

Resim 1: Kontrol grubuna ait torakal aorta H&E boyama ile x100 lük görünümü (normal).

Resim 2: Nebivolol grubuna ait torakal aorta H&E boyama ile x200 lük görünümü (normal).

Resim 3: Metiyonin grubuna ait torakal aorta H&E boyama ile x200 lük görünümü, ok: endotel hücrelerinde dökülmeyi gösteriyor (+2 dejenerasyon).

Resim 4: Metiyonin+nebivolol grubuna ait torakal aorta H&E boyama ile x100 lük görünümü, damar duvarında kalınlaşma, medial tabakada liflerde dejenerasyon bulguları (+1 dejenerasyon).

Resim 5: Kontrol grubuna ait torakal aorta dokusunun Vasküler endotelial büyüme faktörü ile boyanması x40 lık görünümü (boyanma skoru 0).

Resim 6: Kontrol grubuna ait torakal aorta dokusunun Verhoeff'un elastik boyası ile boyanması x40 lık görünümü (normal boyanma).

Resim 7: Kontrol grubuna ait kalp dokusunun H&E boyama ile x200 lük görünümü (normal).

Resim 8: Nebivolol grubuna ait kalp dokusunun H&E boyası ile boyanması x100 lük görünümü (normal).

Resim 9: Metiyonin grubuna ait kalp dokusunun H&E boyası ile boyanması x100 lük görünümü, ok: nükleus kaybını, üçgen: kas liflerindeki dejenerasyonu göstermektedir (+3 dejenerasyon).

Resim 10: Metiyonin grubuna ait kalp dokusunun H&E boyası ile boyanması x200 lük görünümü, ok: nükleus kaybını, üçgen: kas liflerindeki dejenerasyonu göstermektedir (+3 dejenerasyon).

Resim 11: Metiyonin+nebivolol grubuna ait kalp dokusunun H&E boyası ile boyanması x100 lük görünümü, ok: nükleus kaybını, üçgen: kas liflerindeki dejenerasyonu göstermektedir (+2 dejenerasyon).

Resim 12: Kontrol grubuna ait torakal aorta dokusunun transforming büyüme faktör beta ile boyanması x40 lık görünümü (boyanma skoru 0).

Resim 13: Nebivolol grubuna ait torakal aorta dokusunun transforming büyüme faktör beta ile boyanması x200 lük görünümü (boyanma skoru +2).

Resim 14: Metiyonin grubuna ait torakal aorta dokusunun transforming büyüme faktör beta ile boyanması x100 lük görünümü (boyanma skoru +1).

Resim 15: Metiyonin+nebivolol grubuna ait torakal aorta dokusunun transforming büyüme faktör beta ile boyanması x100 lük görünümü (boyanma skoru +2).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Homosistein [Hcy; HSCH₂CH₂CH(NH₂)CO₂H, 2-amino-4-merkapto butirik asit] serbest sülfhidril grubu taşıyan 135.2 dalton ağırlığında kükürtlü bir amino asittir. Hcy diyetle alınmaz ve vücuttaki tek kaynağını esansiyel bir aminoasit olan metiyonin aminoasidinin demetilasyonudur. Hiperhomosisteinemide genetik bozukluklar yanında kazanılmış patolojiler de yer almaktadır. Toksikite ve beslenme yetersizliğinden kaynaklanan hiperhomosisteinemi dikkati çekmektedir. Hcy'nin plazma seviyesinin yükseldiği durumlarda; arteriyel tromboz, miyokard infarktüsü, inme, venöz tromboz ve kronik renal yetersizlik olduğu bildirilmiştir (45,46). Hcy vasküler düz kas hücreleri için aynı zamanda güçlü mitojenik etkiye sahiptir. Ayrıca Hcy, endotelden nitrik oksit sentaz (NOs) salınımını ve nitrik oksit oluşumunu (NO) azaltır (17). NO'nin endotelial üretimini bozulması sonucu endotel, oksidatif hasara maruz kalır ve endotel fonksiyon bozukluğu oluşur. Ayrıca Hcy lipid peroksidasyonunu artırır (64).

Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) NO sentezini sağlayan NOs enziminin endojen yarışmalı inhibitörüdür. Yükselmiş ADMA seviyesi endotel fonksiyon bozukluğunun bir göstergesidir. Ayrıca kardiyovasküler mortalite ve morbiditeyi tahmin etmede de kullanılabilir. Endotel fonksiyon bozukluğu aterosklerozun erken evresini göstermektedir. ADMA ve Hcy'in metabolizmaları arasında ortak yollar mevcuttur. ADMA'nın sentezinde protein arjinin N-metiltransferaz (PRMT) tip 1 enzimi görev almaktadır (34). PRMT tip 1 enzimi metil donörü olarak S-adenozilmetiyonini (SAM) kullanarak reaksiyonu gerçekleştirmektedir. ADMA iki metil grubu içerir. ADMA sentezi sırasında Hcy oluşur. Metiyoninden Hcy oluşumu sırasında S-Adenozil metiyonin (SAM) metil grubu vericisi olarak kullanılır. ADMA'nın metil gruplarının Hcy döngüsünden gelmektedir (38,39). Bu sayede her iki tepkime birbirini tetikler (35).

Hcy proteinlerin yapılarını bozar. Oksidatif stresi artırarak protein parçalanmasını artırır. Hcy metillenmiş proteinlerden serbest ADMA'nın salınımını artırır. Dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz (DDAH) enzimi ADMA'yı metabolize eder. Hcy bu enzim aktivitesini de inhibe ederek ADMA konsantrasyonlarının artmasına neden olur (38).

Üçüncü jenerasyon yüksek selektiviteye sahip β 1-böker olan nebivolol etkisini L-arjinin / NO yolu üzerinden vazodilatasyon yaparak göstermektedir (78,81). Yapılan deneysel

Çalışmalarda endotel kaynaklı NO'nun nebivololün uyardığı vazodilatasyonda önemli rol oynadığını ortaya konmuştur. Nebivolol hücre proliferasyonunu azaltır. Nebivololün intima hasarını önlediği gösterilmiştir. Endotel hasarı sonrası oluşan intimal hiperplaziyi ve darlığın yeniden oluşumu ihtimalini de azalttığı bildirilmiştir (56).

Bu alışma, ratlarda kısa dönem hiperhomosisteineminin yol açtığı endotel fonksiyon bozukluğunun nebivolol tarafından önlenip önlenemeyeceğini ortaya çıkarmak amacıyla tasarlandı. Bu amaçla ratların kalp ve torakal aort dokularından alınan patolojik kesitler ve serumlarından elde edilen biyokimyasal veriler kullanıldı.

Anahtar Kelimeler: Hiperhomosisteinemi, nebivolol, asimetrik dimetilarjinin, nitrik oksit, antioksidan, endotel disfonksiyonu, kardiyomyosit dejenerasyonu, histopatoloji, malondialdehit, glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz, katalaz, transforming büyüme faktör beta-1, vasküler endotelial büyüme faktörü.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Homosistein

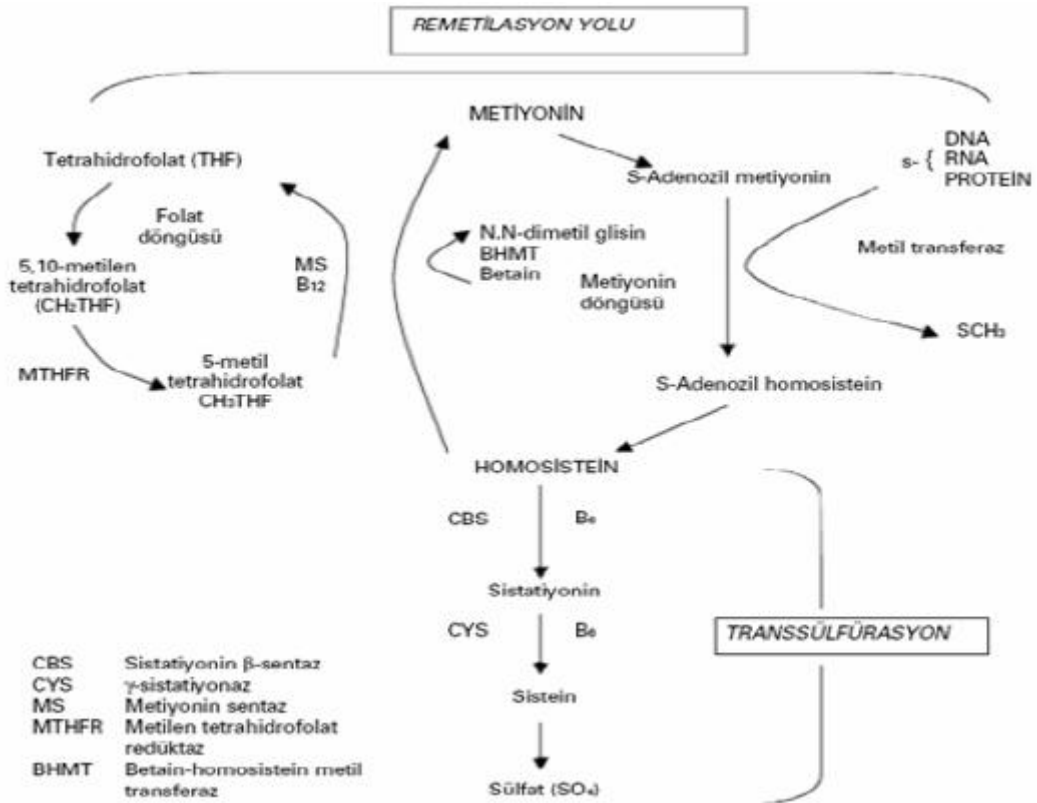
Homosistein [Hcy; HSCH₂CH₂CH(NH₂)CO₂H, 2-amino-4-merkaptobutirik asit] serbest sülfhidril grubu taşıyan 135.2 dalton ağırlığında kükürtlü bir amino asittir. Tarihte ilk defa 1932 yılında de Vigneaud tarafından tanımlanmıştır (1). Hcy diyetle alınmaz ve vücuttaki tek kaynağını esansiyel bir aminoasit olan metiyonin amino asidinin demetilasyonu oluşturur (2).

2.1.1. Homosistein Metabolizması

Hcy remetilasyon ve transsülfürasyon yolları ile metabolize edilmektedir. B12, B6 vitamini ve folik asit bu reaksiyonlarda yer alan önemli ajanlardır (şekil 1). Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi remetilasyon yolunda görevli enzimlerden bir tanesidir. MTHFR enzimi 5,10-metilen tetrahidrofolatın 5-metil tetrahidrofolata dönüşümünü sağlar. MTHFR enziminin kofaktörü olarak folik asit kullanılır. 5-metil tetrahidrofolattan metionin sentaz (MS) enzimi ile tetrahidrofolat oluşumu sağlanır. MS enziminin kofaktörü olarak B12 vitamini görev alır. Transsülfürasyon yolunda ise Hcy'den sistatyonin oluşurken sistatyonin beta sentaz (CBS) enzimi kullanılır. CBS enziminin kofaktörü olarak B6 vitamini görev alır (şekil 1) (4).

Remetilasyon reaksiyonları doyuma ulaştığında veya organizmada sistein ihtiyacı ortaya çıktığında, transsülfürasyon yolları ile sistatyonin beta sentaz enzimi ile Hcy, sistatyonine çevrilir. Ardından da sisteine hidroliz olur ve sistein idrar ile atılır veya protein sentezinde kullanılır (3). Metiyonin ve sistein standart aminoasitler arasında sülfür atomu içeren özgül aminoasitlerdir. Metiyonin türevi S-adenozil metiyonin, enzimatik tepkimelerde metil grubu vericisidir. Metiyoninin vücutta fazla ve uygunsuz dönüşümü ateroskleroza yol açabilir. Sistein yapısında fonksiyonel bir tiol grubu bulundurulur. Tiol gruplarının okside olmasıyla iki sistein arasında disülfid bağı meydana gelir. Bu bağı oluşumu geri çevrilebilir bir tepkimedir. Disülfid bağlarını oluşturabilmesi sebebiyle sistein birçok proteinin üç boyutlu yapısının oluşturulmasında görev alır. Disülfid köprüsü adı verilen kovalent bağlar genelde aynı polipeptid zincirinde birbirinden uzakta bulunan veya iki farklı polipeptid zincirine ait

sisteinler arasında kurulur. Özellikle hücre dışında fazlaca fiziksel ve kimyasal etki altında kalan proteinlerin karmaşık yapılarını korumaları, bu disülfid köprüleri sayesinde olmaktadır (3,4). Ayrıca glutatyon sentezine de baktığımızda, γ -glutamil-sistein sentaz ve glutatyon sentaz enzimlerinin katalizledikleri ardışık reaksiyonlar ile glutatyonun, glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluştuğu görülür. Burada sistein hız sınırlayıcı substrattır (67). Bu fizyolojik yollar Hcy metabolizmasını açıklamaktadır.



Şekil 1: Homosistein metabolizması, transsülfürasyon ve remetilasyon yolları (4).

2.1.2. Hiperhomosisteinemi

Hiperhomosisteinemi plazmadaki Hcy seviyesinin 15 mmol/L den yüksek olmasına denir. Normal açlık plazma total Hcy konsantrasyonu 5-15 mmol/L olup, 15-30 mmol/L hafif derecede hiperhomosisteinemi, 30-100 mmol/L orta derecede hiperhomosisteinemi ve 100-500 mmol/L ağır derecede hiperhomosisteinemi olarak tanımlanır. (Tablo 1) (5,6).

Tablo I: Hiperhomosisteinemi dereceleri.

Hafif Derecede Hiperhomosisteinemi	15-30 mmol/L
Orta Derecede Hiperhomosisteinemi	30-100 mmol/L
Ağır Derecede Hiperhomosisteinemi	100-500 mmol/L

2.1.3. Plazma homosistein düzeyini artıran faktörler:

2.1.3.1. Genetik:

Vitamin B12 transport veya koenzim sentez bozukluğu

Metiyonin sentaz enzim eksikliği

MTHFR enzim defekti

Down sendromu

CBS enzim defekti

2.1.3.2. Yaşam Tarzı:

Kafein alımı

Sigara kullanımı

Sedanter yaşam

2.1.3.3. Fizyolojik:

Glomerüler filtrasyon hızında azalma

Erkek cinsiyet

Menapoz

Yaşlılık

2.1.3.4. İlaçlar:

Nitröz oksit (metiyonin sentaz inaktivatörü)

Dihidrofolat redüktaz inhibitörü (metotreksat)

Vitamin B12 antagonistleri

Antiepileptikler (fenitoin, karbamazepin, valproik asit, lamotrijin, primidon)

Folat antagonistleri (fenitoin, karbamazepin)

Vitamin B6 antagonistleri (metilksantin)

Diğerleri (L-dopa, kolestiramin, niasin)

2.1.3.5. Hastalıklar:

Kronik böbrek yetersizliği

Pernisiyöz anemi (vitamin B12 eksikliği)

Folat eksikliği

Vitamin B6 eksikliği

Hipotiroidi

Diyabetes mellitus

Akut lenfoblastik lösemi

Psöriazis (7-9)

2.1.4. Hiperhomosisteinemi ve Kardiyovasküler Hastalıklar İle Bağlantısı

Hiperhomosisteinemi ve kardiyovasküler hastalıklar ile bağlantısını ilk defa 1969 yılında McCully tarafından ortaya atılmıştır (10). Homosistinürisi olan ve plazma Hcy konsantrasyonu yüksek iki çocukta McCully'nin yaptığı otopsiler, çocuklardaki geniş arteriyel tromboz ve ateroskleroz belirtilerini ortaya koymuştur.(5,9) Yaptığı araştırmalar sonucunda McCully, artmış plazma Hcy inin aterosklerotik vasküler hastalıkların sebebi olabileceğini ileri sürmüştür (5,9,11,12).

McCully nin ardından bir çok çalışma yapılmıştır. 2010 yılında Page ve ark. kadın hasta grubunda yapmış oldukları prospektif bir çalışmada hiperhomosisteineminin myokard infarktüsü için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (13).

Hcy fizyolojik pH'da kolaylıkla disüfürlere yükseltgenir ve bu tepkime sırasında süperoksit radikal anyonları ve hidrojen peroksit üretilir. Bu serbest oksijen radikalleri de LDL oksidasyonuna neden olabilir (5,6,14). Ayrıca Hcy'in oksidasyonu sonucu oluşan Hcy-tiyolakton, intimal makrofajlar tarafından alınmakta ve ateromatoz plak içinde köpük hücreleriyle birleşmekte ve vasküler hasara neden olmaktadır (15).

Ronald ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada orta derecede hiperhomosistinemi oluşturulduktan sonra hayvanlarda mega arter sendromu adını verdikleri tablonun geliştiği

gösterilmiştir(16). Bu hayvanlarda aortun dilate görünümü, arterlerin genişlemiş reaktif hiperemisi ve hipertansiyon dikkati çekmektedir. Ayrıca arteriyel düz kas hücrelerinin hipertrofisi yanı sıra, arterlerde elastik lamina ayrışmaları da gözlenmiştir. Böylece yükselmiş Hcy'in vasküler düz kas hücre proliferasyonunu kolaylaştırabileceği öne sürülmüştür (16).

Lentz ve ark. yapmış olduğu bir başka çalışmada hiperhomosisteinemili hayvan ve insan endotel hücrelerinde yeterli NO üretiminin olmadığı gösterilmiştir. Hcy'in NO'sı inhibe ederek endotel bağımlı vazodilatasyonu önlediği varsayılmıştır (17).

Bellamy ve ark. yaptığı çalışmada oral metiyonin yüklemesi ile sağlıklı insanlarda oluşturulan hiperhomosisteineminin, kol arterinin akım bağımlı dilatasyonunu azalttığı gösterilmiştir (18).

Sağlıklı endotel hücrelerinin NO üretimi yaparak Hcy'i detoksifiye ettikleri belirtilmektedir. NO, oksijen varlığında Hcy ile birleşir ve S-nitrozohomosistein oluşturur. S-nitrozohomosistein ise güçlü bir trombosit inhibitörü ve vazodilatatördür. Hcy, NO'sı inhibe ederek NO düzeyini azaltıp S-nitrozohomosistein oluşumunu azaltacaktır. Böylece Hcy detoksifiye edilmeyecek ve toksik etkilerini gösterebilecektir (19).

Serumda yükselmiş Hcy düzeyleri, endotel hücresi yüzeyindeki trombin reseptörü olan trombomodilinin aktivitesinin azaltır. Böylece protein C aktivasyonunu inhibe ederek endotel tarafından heparan sülfatın ekspresyonunun baskılanmasına ve antitrombin III aktivitesinin azalmasına yol açar (20). Lentz ve ark. yapmış olduğu çalışmada hiperhomosisteinematik insan umbilikal kord endotel hücrelerinde von Willebrand faktör üretiminin azalmış olduğunu ortaya koymuşlardır (20).

Midorikawa ve ark. yapmış olduğu insan endotel hücre kültürü çalışmasında Hcy artışının endotel hücrelerinde doku faktörünün aktivitesini artırdığı, doku plazminojen aktivatörünün reseptörüne (annexin II) bağlanmasını azalttığı ve endotel hücrelerinde faktör V'in aktivitesini artırdığını göstermiştir. Annexin II bağlanmasının azalması ve plazminojen aktivatör inhibitörünün artması ile fibrinolitik aktivitesinin de azaldığı gösterilmiştir (21).

Harpel ve ark. yapmış olduğu laboratuvar çalışmasında Hcy'nin, lipoprotein a'nın fibrine olan affinitesinin artırdığını göstermiştir. Lipoprotein a, fibrin içeren moleküller ve hücrelerin bağlanma bölgeleri için plazminojenle yarışarak fibrinolizi azaltır. Bu bulgular, artmış Hcy'in pıhtılaşmaya meyilli durum oluşturması nedeniyle aterojenik olabileceğini ortaya koymuştur (22).

Durand ve ark. yapmış olduğu rat çalışmasında akut hiperhomosisteineminin makroanj kaynaklı doku farkörünün artışına ve trombosit kümeleşmesinin oluşmasına neden olduğunu göstermişlerdir (23). Ayrıca Harker ve ark. yapmış olduğu maymunlar üzerindeki çalışmada subendotelyal matriksin, Hcy bağımlı endotel hasarına maruz kaldığını ve bu durumun trombosit aktivasyonuna yol açtığını göstermişlerdir (24). Bu etkiler birleştiğinde trombin oluşumu kolaylaşmakta ve tromboza meyilli bir ortam oluşturmaktadır (25).

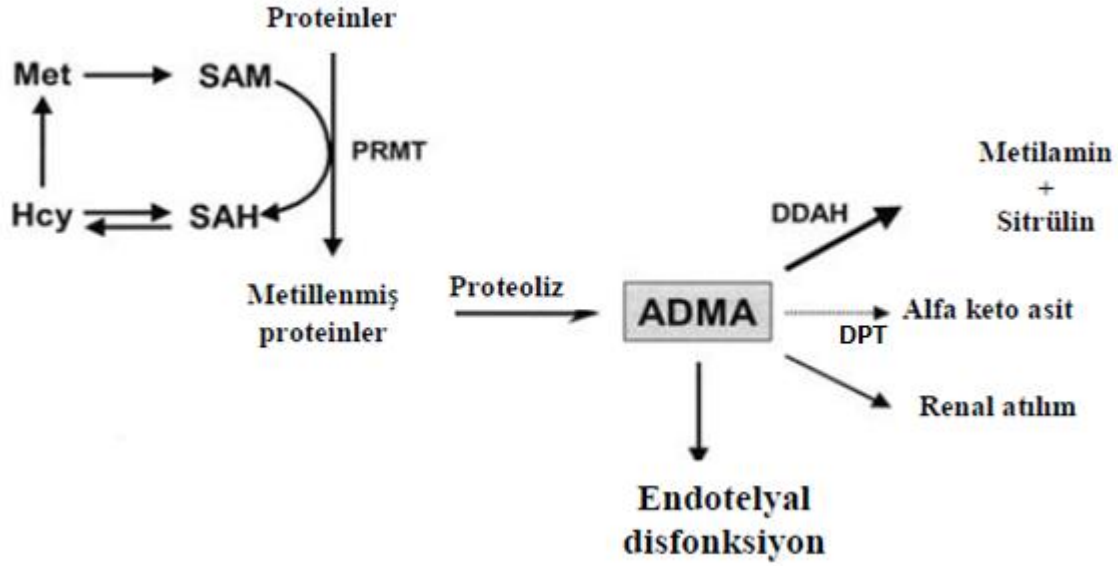
Hcy metabolizmasında, Hcy'nin adenosin ile birleşmesiyle S-Adenosil Hcy oluşurken ortamdaki adenosin konsantrasyonu azalmaktadır (26). Adenosin kalp damar sağığı için güçlü bir koruyucu madde olduğu için plazma konsantrasyonundaki azalma, koruyucu etkilerini ortadan kaldırarak vasküler hasara yol açacaktır (26-28). Adenosinin vasküler koruyucu etkilerine bakıldığında, adenosinin direkt olarak vazodilatasyon yaptığını görebiliriz. İndirek etkisi ise renin salınımını inhibe ederek anjiotensin II ve norepinefrin gibi güçlü vazokonstriktörlerin sentezini bloke etmektir (26). Adenosin ayrıca negatif inotropik, kronotropik ve dronotropik etki göstererek kalbi korur. Adenosin trombosit agregasyonunun güçlü inhibitörüdür (26). Adenosin nötrofillerin aktivasyonunu inhibe eden önemli bir antienflamatuvar ajandır (28). Nötrofiller nedeniyle oluşan hasara karşı endoteli korur. Nötrofillerde lökotriyen sentezini ve araşidonik asid sekresyonunu önler (29). Ayrıca makrofaj ve monositlerde TNF- α sekresyonunu inhibe eder (30).

Hiperhomosisteinemide azalmış plazma ve intersitisyel adenosin konsantrasyonu vasküler hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Son zamanlarda yapılmış çalışmalarda ortaya konmuş olan ve kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olan hiperhomosisteineminin etki mekanizmasının kompleks reaksiyonlar ile ortaya çıktığı görölmektedir.

2.2 Asimetrik Dimetilarjinin

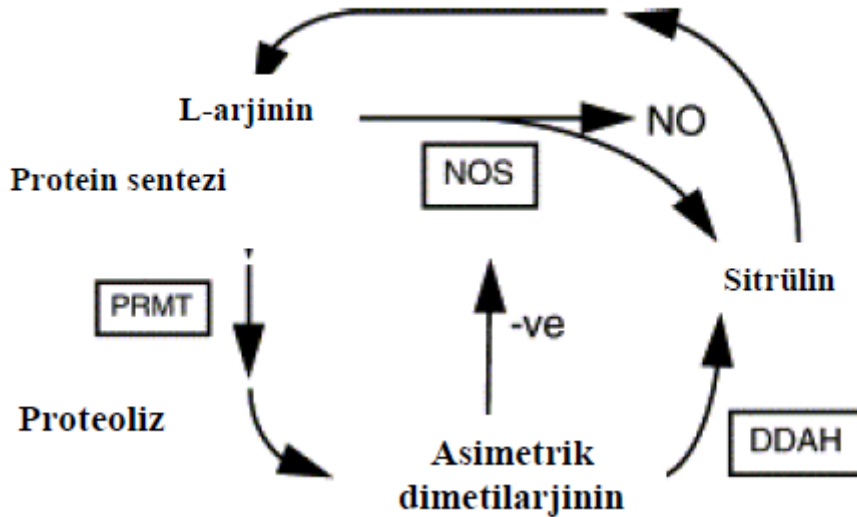
ADMA ilk olarak 1970 yılında tanımlanmıştır (31). Sağılıklı bireylerde plazma ADMA düzeyi 0.2-1.2 mmol/L arasında bulunmaktadır (33). Vallance ve ark. tarafından, ADMA'nın endotelyal nitrik oksid sentaz (eNOs) enziminin endojen inhibitörü olduğu gösterilmiştir (32,33). ADMA'nın sentezinde PRMT tip 1 enzimi görev almaktadır (34). PRMT tip 1 enzimi metil donörü olarak SAM kullanarak reaksiyonu gerçekleştirmektedir. ADMA üç yol ile vücuttan uzaklaştırılır . Birinci yol olarak dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından sitrölin ve dimetilamine metabolize

edilerek %90 bu yol ile metabolize olur. İkinci yol olarak renal yol ile değişmeden (%5 bu yol ile) atılır. Üçüncü yol olarak dimetilargininin pirüvat aminotransferaz (DPT) enzimi tarafından α -ketoasidlere dönüştürülerek (%5 bu yol ile) atılır (Şekil 2) (35,36).



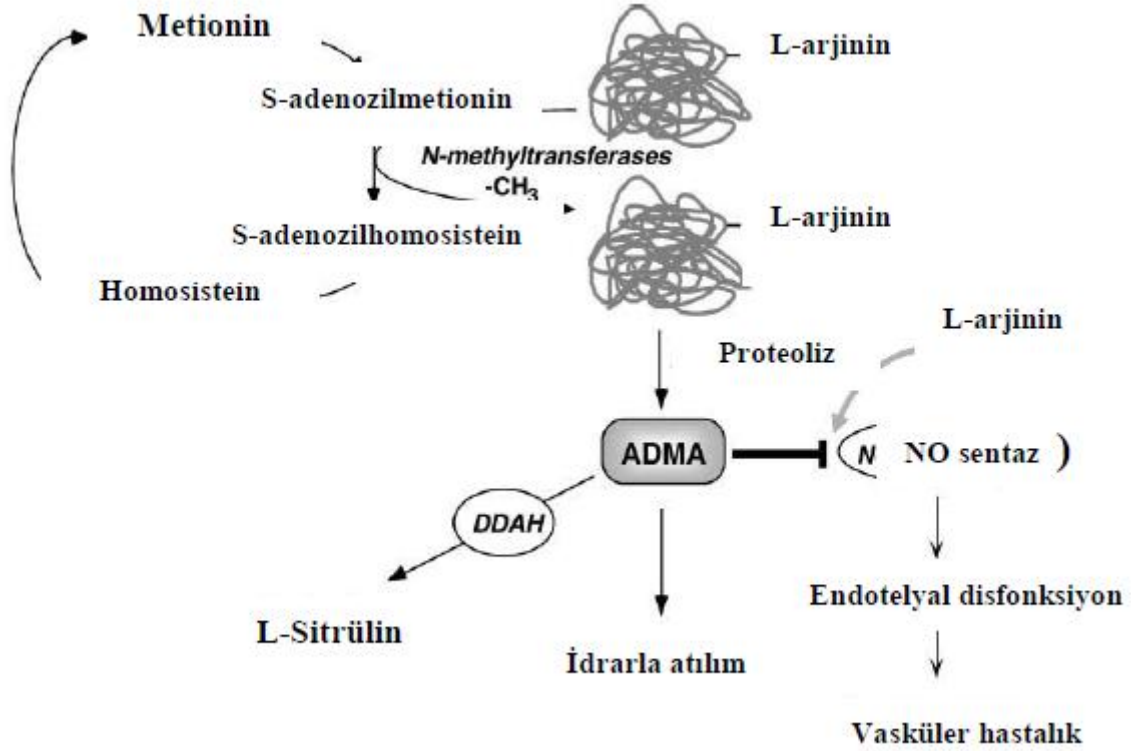
Şekil 2: ADMA sentezi ve yıkımı (35).

ADMA, nitrik oksit biyosentezinin major inhibitörüdür (Şekil 3) (37).



Şekil 3: NOs enziminin inhibisyonu (34).

ADMA düzeyi kronik böbrek yetmezlikli hastalarda atılımın azalması nedeniyle yükselmektedir (33,38,39). Ayrıca ADMA'nın düzeyini artıran en önemli faktör olarak hiperhomosisteinemi gösterilmiştir. ADMA ve Hcy'in metabolik yolları birbirleriyle etkileşmektedir. ADMA'nın metil gruplarının Hcy döngüsünden geldiği görülmektedir (Şekil 4) (38,39).



Şekil 4: ADMA ve homosisteinin metabolik yollarının birbirleriyle etkileşimi (38).

Bu nedenler ile hiperhomosisteinemi direk olarak endotel fonksiyon bozukluğu yaptığı gibi ADMA'nın artışına da katkıda bulunarak endotel disfonksiyonunu hızlandırmaktadır. ADMA, NOs inhibisyonu yoluyla endotel bağımlı gevşemeyi bozar ve kan basıncının yükselmesine neden olur. NOs inhibisyonu böbrekleri de etkileyerek sodyum atılımını azaltarak hipertansiyon oluşumunu kolaylaştırır. ADMA'ya uzun süreli maruziyet, hedef organlarda hipertansif hasar oluşturur ve aterogenezi artırır. ADMA nedeniyle ortaya çıkan hipertansiyon, sol ventrikül hipertrofisine yol açar. Ayrıca ADMA, kalp hızını ve kardiyak outputu azaltır (40).

ADMA kronik kalp yetersizliği hastalarında da yüksek bulunmuştur. Usui ve ark. yaptığı çalışmada plazma ADMA düzeylerinin, kronik kalp yetersizliği hastalarında yüksek bulunduğunu ve kalp yetmezliğinin şiddeti ile pozitif korelasyon gösterdiğini gözlemlemişlerdir (41). Saitoh ve ark. yaptığı çalışmada kronik kalp yetersizliği hastalarında akut alevlenme dönemlerinde, plazma ADMA düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır. Artmış oksidan stresin kronik kalp yetmezliğinin akut alevlenme dönemlerindeki ADMA artışına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (42).

Leong ve ark. yaptıkları çalışmada 24 yıl boyunca izledikleri kadınlarda ADMA yüksekliği ile ölüm, ölümcül olmayan kalp krizi ve inmede pozitif yönde bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada ADMA seviyesinde bazal değerdeki 0.15 µmol/L artışın 24 yıllık takipte kardiyovasküler riski ortalama %30 artırdığını ortaya koymuşlardır (43).

Valkoven ve ark. yaptığı 150 kişiden oluşan orta yaş insanların alındığı bir çalışmada yüksek ADMA düzeylerinin, akut koroner olay riskini 3.9 kat artırdığı gösterilmiştir (44).

Choa ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada atriyal fibrilasyonlu hastalarda ADMA seviyesi ile ortaya çıkan kardiyovasküler ölüm ya da inme gibi istenmeyen etkiler arasında pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur (45).

Zoccali ve ark. son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda yapmış olduğu çalışmada plazma ADMA düzeyindeki iki µmol/L lik artışın kardiyovasküler hastalık riskini %37 artırdığı gösterilmiştir (46).

Böger ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada metiyoninden zengin folatdan fakir hiperhomosisteinematik diyetle beslenen maymunlarda plazma ADMA ve Hcy düzeylerinin üç kat arttığı ortaya konmuştur (47). Bu maymunlarda ADMA düzeyleri Hcy düzeyleri ile pozitif yönde korelasyon olduğu görüldü (47). Ayrıca oral metiyonin yüklemesinden sekiz saat sonra bakılan plazma ADMA ve Hcy konsantrasyonlarının arttığı, kol atar damarından bakılan akım bağımlı dilatasyonun %80 oranında azaldığı tespit edilmiştir (48).

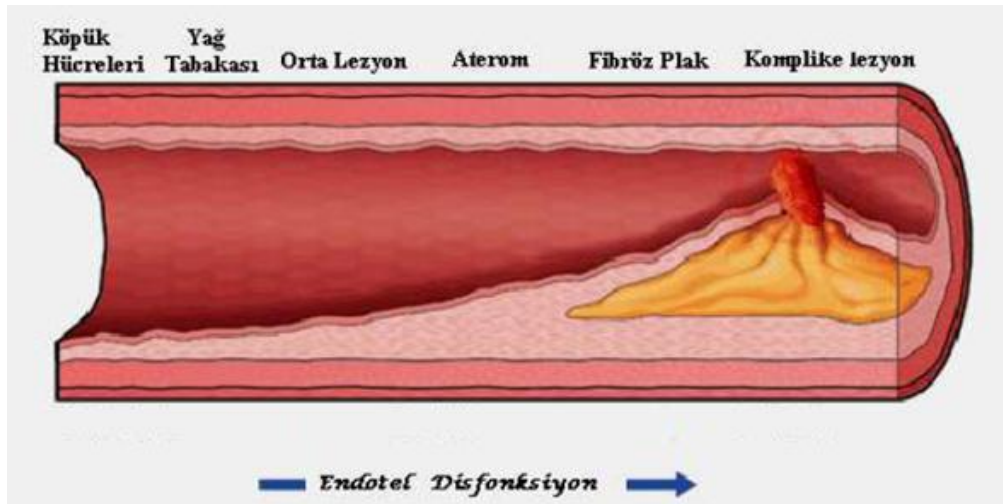
Yüksek plazma ADMA seviyeleri hiperkolesterolemi, hiperhomosisteinemi diyabetes mellitus, periferik arter hastalığı, hipertansiyon, kronik kalp yetersizliği, koroner kalp hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (39,41,49,50,51).

2.3 Endotel fonksiyon bozukluğu

Endotel tek katlı yassı epitel hücrelerin yan yana dizilmeleriyle bütün kardiyovasküler sistemi içten döşeyen, vasküler düz kas tabakası ile dolaşımdaki kan arasında bulunan endokrin bir organdır (52). Bir insandaki ortalama endotel miktarı 1800 g ağırlığına ve 4000-7000 m² yüzey alanına sahiptir. Endotel kan basıncı, pıhtılaşma ve inflamatuvar olaylarda rol alan ve homeostazı sağlayan aktif bir yapıdır. Endotelin önemi 1980’de Furchgott’un yaptığı çalışmada endotel kaynaklı bir vazodilatör faktör varlığını keşfetmesiyle anlaşıldı (53).

1986 yılında Louis Ignarro tarafından “Endotel kaynaklı gevsetici faktör (EDRF)” ismindeki bu faktörün, NO olduğu orataya konmuştur (53). Endotelin, dolaşımla çevre dokular arasında yalnızca bir bariyer değildir, aynı zamanda fizyolojik ve patolojik uyarılara yanıt olarak vasküler hemodinamiyi etkileyen mediyatörlerin de salgılandığı bir organdır (Tablo II). Endotel fonksiyon bozukluğu vazodilatatör maddelerin biyoyararlanımındaki azalma ile karakterizedir; en belirgin olanı ise NO’nin azalmasıdır (45).

Damar tonusu, inflamasyon, koagulasyon ve oksidasyonda uygun şekilde düzenlenmezse, damar yapısında bozulmaya, subklinik ateroskleroza ve sonuçta kardiyovasküler hastalıklara yol açar (54). Bu dengesizlik, endotel fonksiyon bozukluğunun karakteristiği olan endotel bağımlı vazodilatasyonda azalma ile sonuçlanır (55).



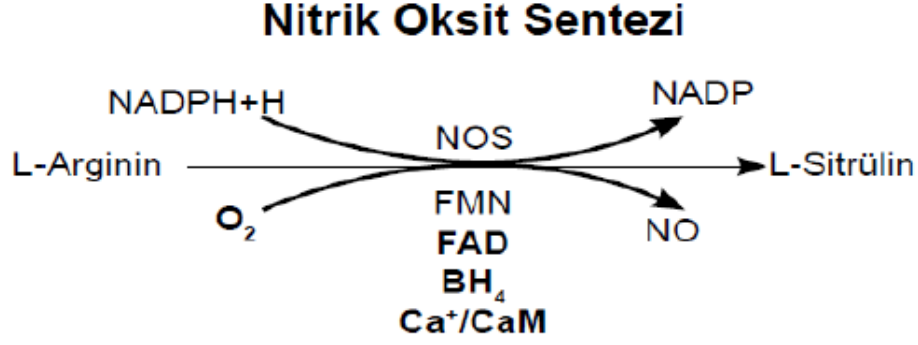
Şekil 5: Endotel fonksiyon bozukluğu.

Tablo II: Endotel kaynaklı mediyatörler.

➤ Proteinler
✓ Büyüme faktörleri (PDGF) ✓ Adhezyon moleküller; ▪ ICAM (intracelüler adhezyon molekül) ▪ VCAM (vasküler adhezyon molekül) ✓ PECAM (Platelet endotelial hücre adhezyon molekül) ▪ E-selektin ▪ P-selektin ✓ Matriks proteinleri; ▪ Heparan sülfat ✓ Pıhtılaşma faktörleri; ▪ TF (doku faktörü) ▪ t-PA (doku plazminojen aktivatörü) ▪ PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitörü-1) ▪ TM (doku faktörü) ▪ vWF (von Willebrand faktör) ✓ Antijenler; ▪ MHC-V (major histocompatibili antijeni-V) ✓ Enzimler; ▪ ACE ✓ Reseptörler
➤ Küçük moleküller
✓ Histamin ✓ Serbest radikaller ✓ EDRF = Nitrik Oksit ✓ Endotel kökenli konstrüktör faktör ✓ Endotelial kaynaklı hiperpolarizan faktör (EKHF) ✓ Adnodozin ✓ C tipi atriyal natriüretik faktör ✓ Anjiotensin II ✓ Endotelin-1
➤ Lipidler
✓ Prostaglandinler (PGI₂, prostasiklin, tromboksan-A₂) ✓ Lökotrienler ✓ PAF (Platelet activating factor)

2.4 Nitrik Oksit

NO ilk defa 1980’de Furchgott’un yaptığı çalışmada EDRF olarak saptanmış ardından 1986 yılında Louis Ignarro tarafından EDRF ismindeki bu faktörün, nitrik oksit olduğu orataya konmuştur. L-argininden nitrik oksit sentaz tarafından oluşturulmaktadır.



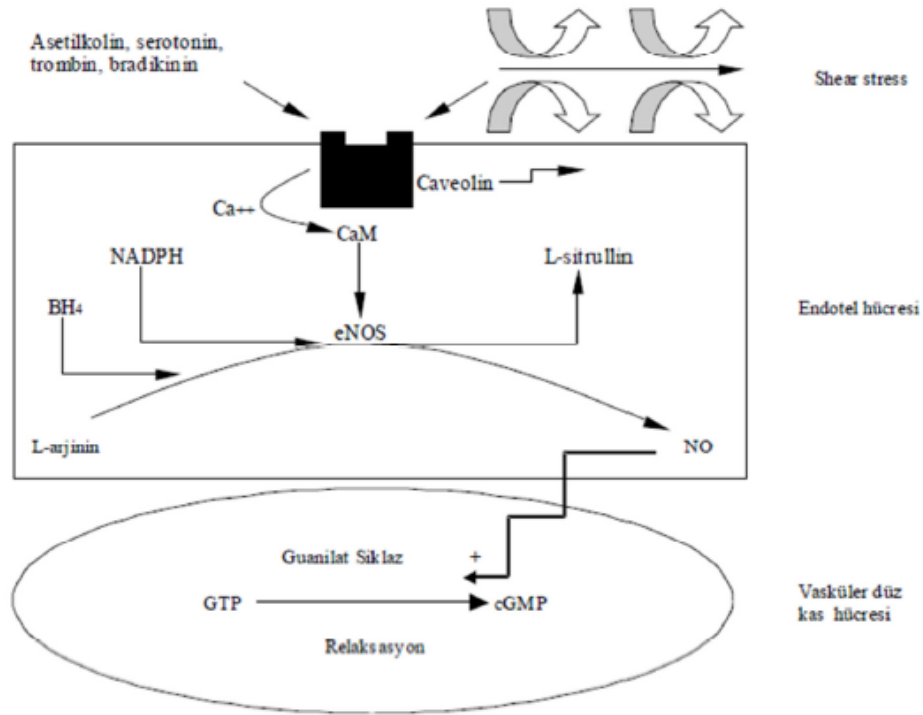
Şekil 6: NO’nın sentezi (FMN:flavin mono nükleotid, FAD:flavin adenindinükleotid, Ca:kalsiyum, CaM:kalmodulin, BH₄:tetrahidrobiopterin (57).

NO kısa yarı ömürlü bir gazdır. NO’nun dokuda, 10-60 saniyelik yarı ömrü vardır. NO, küçük bir molekül olması nedeniyle hücre zarlarından serbestçe difüze olabilir. Daha sonra nitrite parçalanır. NOs etkisiyle L-arjininden sentezlenir. İlk tanımlandığı doku tipine göre NOs’un üç izoformu bulunmaktadır (35).

- 1- Endotelyal NOs (eNOs)
- 2- İnduklenebilir NOs (iNOs)
- 3- Nöronal NOs (nNOs)

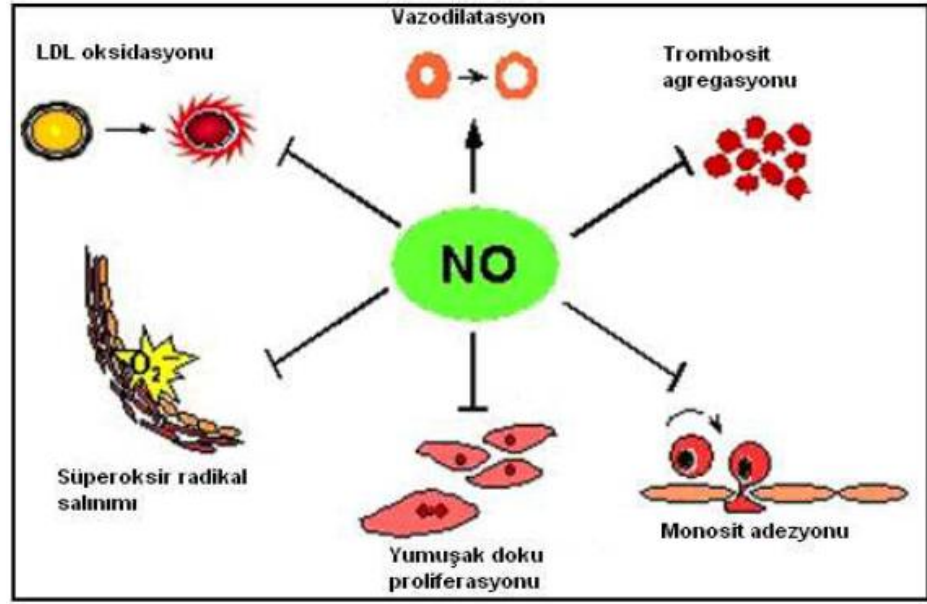
NOs izoformları birçok doku veya hücrede bulunabilir. Kanın akış hızının artması, endotel hücreleri üzerinde mekanik bir kuvvet (shear stres) oluşturarak NO’nun sentez ve salınımını artırmaktadır. Ayrıca epinefrin, norepinefrin, histamin, vazopressin, asetilkolin, bradikinin, adenozin difosfat, adenozin trifosfat, trombin, insülin, endotelin ve 5-hidroksitriptamin gibi moleküller, endotel hücre reseptörlerine bağlanıp fosfolipaz C enzimini aktive ederek, Ca aracılığıyla eNOs enzim aktivasyonuna yol açmaktadırlar. Nitrik oksit; endotel hücrelerinde “caveolae”da (hücre membranındaki invajinasyonlarda) lokalize endotelyal NOs’un enzimatik etkisiyle prekürsörü olan L-arjininden sentezlenir. “Caveolin-1”, kalmoduline bağlanır ve eNOs aktivitesini inhibe eder. Kalsiyumun kalmoduline

bağlanması , “Caveolin-1”i ayırır ve eNOS’u aktive ederek NO üretimi aktiflenmiş olur (58,59). eNOS tarafından sentezlenen NO, vasküler düz kas hücrelerinde çözünür guanil siklaza bağlanır ve guanilat siklaz enzimini aktive eder. Böylece hücre içi siklik guanozin monofosfat (cGMP) artar. cGMP düz kas hücresindeki cGMP bağımlı protein kinaz G’i aktive eder ve hücre içi kalsiyum miktarı azalarak vasodilatasyona neden olur (Şekil 7).



Şekil 7: NO in fizyolojisi. GTP: Guanozin trifosfat, cGMP: siklik guanozin monofosfat (58).

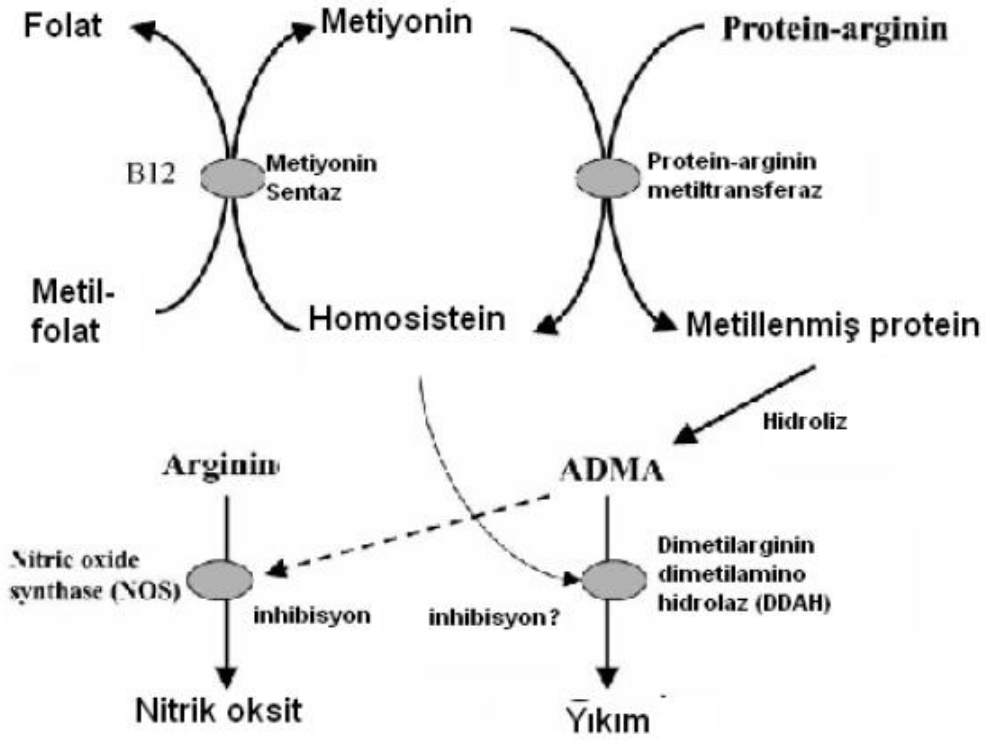
NO, kardiyovasküler sistemde, vasküler tonus, düz kas hücre proliferasyonunun inhibisyonu, trombosit adezyonunun ve agregasyonunun inhibisyonu, monosit adezyonunun inhibisyonu gibi düzenleyici mekanizmalardan sorumludur. Bu nedenle NO antiaterojenik molekül olarak nitelendirilmektedir (60).



Şekil 8: NO in gerçeletirdiği (koyu ok) ve önlediği mekanizmalar (61).

2.5 Homosistein, nitrik oksit ve asimetrik dimetilarjinin birbirleri ile olan ilişkisi

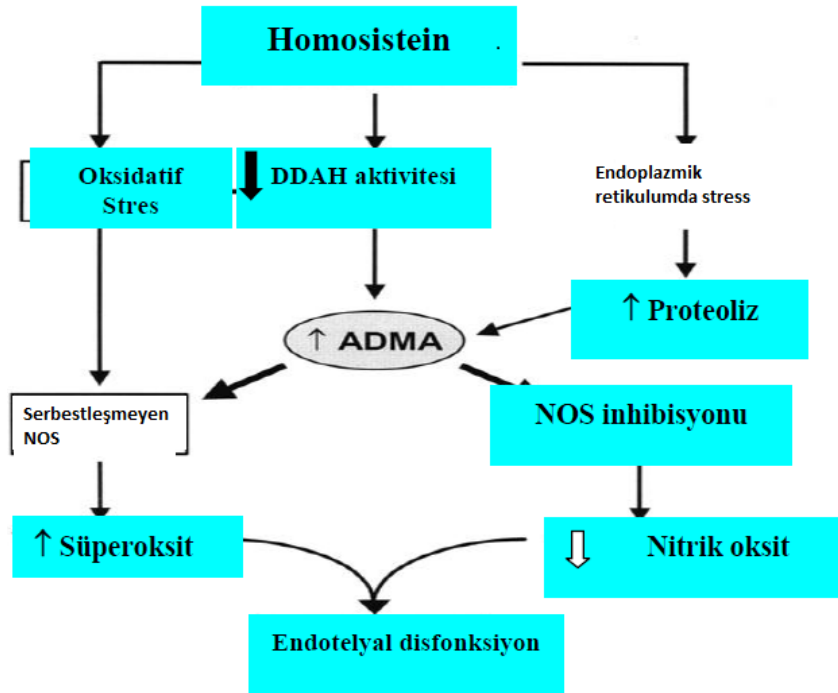
ADMA ve Hcy'in birbirleriyle metil transferaz reaksiyonları sırasında karşılaşmaktadır. ADMA oluşumu, PRMT 1 ve 2 enzimleri tarafından metillenmiş proteinlerin proteolizinden meydana gelmektedir. PRMT'ler ise bu metilasyon işlemlerini SAM'ın metil donörlüğünde yapmakta ve SAM'ın metil grubu vermesiyle SAH ve sonuçta Hcy ortaya çıkmaktadır. Ayrıca Hcy, dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz enzimi inhibisyonuna da neden olur. Hcy bu enzim aktivitesini inhibe ederek ADMA konsantrasyonlarının artmasına neden olur (Şekil 9).



Şekil 9: Homosistein, nitrik oksit ve asimetrik dimetilarjinin birbirleri ile olan ilişkisi (62).

Hcy'in ADMA'yı sitriline metabolize eden DDAH enzimini inhibe ederek veya endoplazmik retikulum üzerindeki stresi ve apoptozu artırarak metilarjinin rezidüleri olan proteinlerin artmış proteolizine neden olarak artırır. ADMA'nın endotel hücrelerindeki artışı, eNOs'u inhibe ederek NO'nun azalmasına ve dolayısı ile endotel fonksiyon bozukluğuna neden olur (Şekil 10).

ADMA veya peroksinitrit gibi diğer oksidanların neden olduğu eNOs'un yapısındaki değişiklikler, süperoksit oluşumunu ve NO'nun biyoyararlanımını daha da azaltmaktadır. ADMA yükselmesine sebep olan bir diğer mekanizma da ADMA'nın böbrekten azalmış atılımıdır.



Şekil 10: Homosistein, nitrik oksit ve asimetrik dimetilarjinin birbirleri ile olan ilişkisi (63).

Böger ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada metiyoninden zengin folatdan fakir hiperhomosisteinematik diyetle beslenen maymunlarda plazma ADMA ve Hcy düzeylerinin üç kat arttığı ortaya konmuştur. Bu maymunlarda ADMA düzeyleri Hcy düzeyleri ile pozitif yönde korelasyon olduğu görüldü (47). Ayrıca oral metiyonin yüklemesinden sekiz saat sonra bakılan plazma ADMA ve Hcy konsantrasyonlarının arttığı, kol atar damarından bakılan akım bağımlı dilatasyonun %80 oranında azaldığı tespit edilmiştir (48).

İn vitro koşullarda da Hcy ve ADMA arasındaki ilişki gösterilebilmiştir. Böger ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada insan endotel hücrelerinin L-metiyonin veya L- Hcy ile inkübasyonu neticesinde ADMA'nın kültür ortamında doz bağımlı bir artış gösterdiği ortaya konmuştur (61).

2.6 Antioksidanlar

Karbonhidrat, protein, lipid, ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin canlı hücrelerde oksidasyonunu önleyen maddelere antioksidan maddeler denir. Antioksidanlar ya da antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılan mekanizmalar, reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için organizma tarafından kullanılır. Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Membran lipidlerine etki ederek peroksit oluşturabilen serbest oksijeni (O_2) ortamdan temizleyebilirler. Okside substratın oksidasyonunu geciktirir veya inhibe ederler (64).

Tablo III: Antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD) Katalaz (KAT) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Fosfolipid hidroperoksit glutasyon Peroksidaz (PLGSH-Px) Glutasyon S-transferaz (GST) Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Glutasyon (GSH) A-Tokoferol (vit E) Askorbat (vit C) B-Karoten Flavonoidler Ürat Bilirubin	Albumin Seruloplazmin Transferin Ferritin Laktoferrin Melatonin Sistein

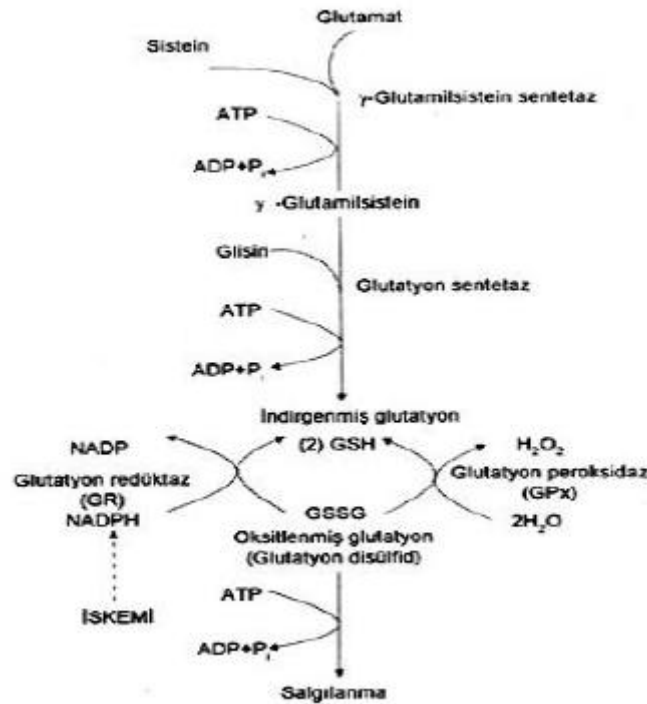
2.6.1. Malondialdehit

Lipid peroksidasyonu, karbon bağlarının kopması ile aldehid yapısındaki yıkım ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Oluşan bu yıkım ürünlerinden olan 4-hidroksinonenal ve malondialdehit (MDA) , hücrelere rahatça diffüze olabildiklerinden hasarın boyutunu atırabilirler (65). MDA protein tiyolleri ile reaksiyona girerek lipid ve proteinler arasında çapraz köprüler oluşturarak hasara neden olur (65,66). 4-hidroksinonenal ise trombosit agregasyonunu ve aktif adenilat siklazı inhibe eder. Bunun sonucunda hücrede iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özellikleri değişir. Bu etkiler MDA'nın genotoksik, karsinojenik ve mutajenik olabileceğine işaret emektedir. Malondialdehit miktarının artması hasarın göstergesi olarak kabul edilebilir (65,66)

2.6.2. Glutasyon

Karaciğerde sentezlenebilen düşük moleköl ağırlıklı bir tripeptid olan glutasyon (γ - Glutamil Sisteinil Glisin, GSH), hücre içi bir antioksidan olup hücre dışı mesafede düşük konsantasyonlarda bulunur. GSH bünyesindeki sisteine bağlı tiyol grubu ve yüksek konsantrasyonundan dolayı (0,1-10 mM) hücre içinde görev alan önemli bir antioksidandır. Hücreyi oksidatif hasara karşı, hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam oluşturarak korur (67). Glutasyon sentezinde, γ -glutamil-sistein sentaz ve glutasyon sentaz enzimlerinin katalizledikleri ardışık reaksiyonlar ile glutamat, sistein ve glisin aminoasitleri bir tripeptid oluşturur. Burada sistein hız sınırlayıcı substrattır (67).

Glutamatın tepkimeye girmesi için kullanılan sistein hücrelerde sınırlı miktarda bulunur. Sistein oluşumu, doku proteinlerinin yıkımıyla, bazı hücrelerde serin aminoasitinin metiyonin aracılığı ile olan transsülfürasyonu veya diyetle alınan proteinler yoluyla sağlanır. (Şekil 11)



Şekil 11: Glutasyon siklusu (67).

Glutasyon, hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil (OH), superoksit (O₂), alkoksil radikalleri ile direk etkileşime girerek proteinlerin sulfidril gruplarının redükte halde kalmasını sağlayarak protein ve enzimlerin inaktivasyonunu önler ve hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ateroskleroz, parkinson hastalığı, karaciğer hastalıkları, akciğer hastalıkları, kronik viral enfeksiyonlar, kanser gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde GSH eksikliği gösterilmiştir (67).

2.6.3. Glutasyon Peroksidaz

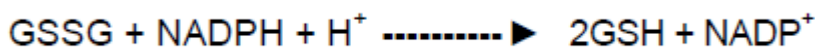
Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) 85 kD molekül ağırlığı olan tetramerik, dört selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir (68-70). Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur (68). Eritrosit ve karaciğer enzim aktivitesinin en yoğun olduğu dokulardır (69). Glutasyon peroksidaz aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan GSH-Px'dir. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur (68-70).

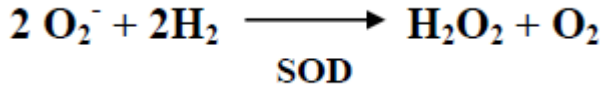
2.6.4. Glutasyon Redüktaz

Hidroperoksitlerin indirgenmesi ile oluşan okside glutasyonun (GSSG), redükte hale (GSH) dönüşmesini katalizleyen enzim glutasyon redüktazdır. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için ortamda pentoz fosfat yolundan elde edilen NADPH bulunmalıdır (71).



2.6.5.Süperoksit dismutaz

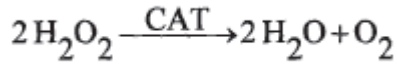
SOD enziminin üç türü bulunmaktadır; mangan, bakır-çinko ve bakır içeren 3 tür SOD enziminin varlığı tanımlanmıştır (72). Mangan içeren formu mitekondride bulunırken bakır-çinko içeren formu stoplazmada, bakır içeren formu ise plazmada bulunmaktadır (72). SOD, süperoksit radikalini (elektron ilavesiyle) hidrojen peroksit ve oksijen formuna indirger.



Bu sayede süperoksitin hücre içi konsantrasyonunu düşük tutarak süperoksit radikalinin zararlı etkilerine karşı hücreyi korur. Daha sonra katalaz enzimi devreye girer (72).

2.6.6.Katalaz

Katalazın görevi hidrojen peroksidi indirgeyerek, son ürün olarak su ve oksijen oluşturur (72). Katalaz aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



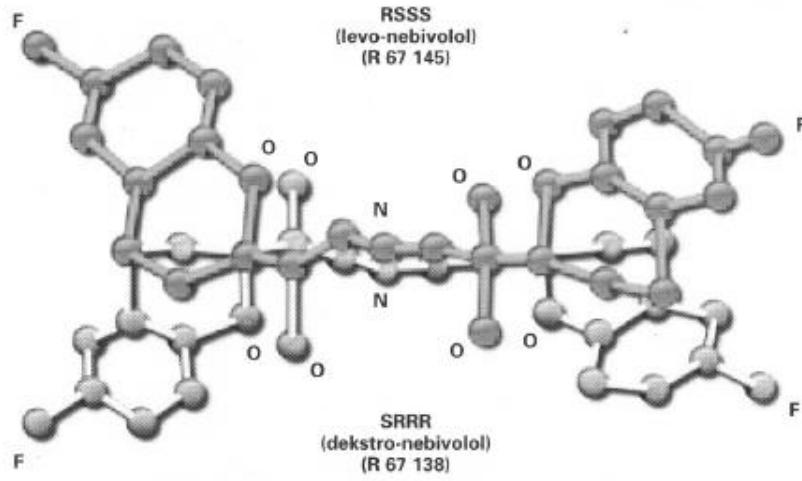
Katalaz dört adet hem grubu taşıyan bir hemoproteindir. Katalaz peroksizomlarda bulunmaktadır (64). Katalazın indirgeyici etkisi hidrojen peroksit ile metil ve etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı olabilmektedir (73). Lipit hidroperoksitleri gibi büyük moleküllere karşı etki edememektedir. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur (64,73)

2.7. Nebivolol

Nebivolol [(+)-[R*[S*[S*-(S*)]]]- α,α' -(iminobis-methylene)-bis-[6-fluoro-3,4-dihydro-2H-1-benzoxpyran-2-methanol]] dört asimetrik karbon atomu içeren üçüncü jenerasyon, yüksek selektiviteye sahip β_1 -bokerdir. Nebivolol hipertansiyon ve kalp yetersizliğinde kullanım açısından onay almıştır (74).

Yüksek β_1 selektivitesi sayesinde hafif-orta düzey kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) olan hastalarda kullanımına olanak sağlamaktadır. Cazzolaa ve ark yapmış oldukları çalışmada nebivololün hafif-orta düzey KOA hastalarında kullanımının güvenli olabileceğini ortaya koymuşlardır (75). Yine tavşanlar üzerine yapılan bir başka çalışmada D'Agostino ve ark. nebivololün diğer beta blokerlere nazaran hava yolu duyarlılığını daha az etkilediğini ortaya koymuşlardır (76).

Terapötik nebivolol, on farklı “stereoisomer” arasından D-nebivolol (SR3 Nebivolol) ve L-nebivololün (RS3 Nebivolol) eşit oranlardaki rasemik karışımından oluşmaktadır (Şekil 12).



Şekil 12: Terapötik DL-nebivololün üç boyutlu yapısı.

Nebivolol oral alındığında absorpsiyonu birlikte alınan gıdalardan etkilenmez ve absorpsiyonu çok iyidir (77). Oral uygulanmada zirve plazma konsantrasyonuna 0.5-2 saat sonra ulaşır. Bu plazma konsantrasyonları 1-2 saatlik yarılanma ömrü ile azalmaya başlayıp onu takip eden 10-44 saatlik terminal yarılanma ömrü ile azalmaya devam eder (77). Aktif hidroksi-metabolitin atılım yarılanma ömrü genellikle 17-32 saat (ortalama 20 saat) arasında değişmektedir. Nebivololün başlıca metabolizasyon yolu karaciğerde aromatik hidroksilasyon ile olmaktadır (77).

Nebivololün proteine bağlanması oldukça spesifiktir (d-nebivolol için % 98.1, l-nebivolol için % 98.0) ve öncelikle albümine bağlanır (77). Nebivolol uygulamadan bir hafta sonra dozun %38'i idrarla, %48'i feçesle atılır. Değişmeden idrar ile atılan nebivolol miktarı

%5 den azdır. Nebivololün nihai yarı ömrü güçlü metabolize edenlerde ortalama 10.3 saat, yavaş metabolize edenlerde 31.9 saattir (78). Ayrıca nebivololün intrensek semptomatik aktivite özelliği bulunmamakla birlikte alfa blokajı yapmadığı ortaya konulmuştur (79). Nebivololün kalp yetersizliği hastalarında negatif inotropik etkisi diğer beta blokerlere nazaran daha az bulunmaktadır (80).

Nebivolol etkisini L-arjinin/NO yolu üzerinden NO artışı ile vazodilatasyon yaparak göstermektedir (78,81-83). Ayrıca diğer beta blokerlerden farklı olarak Nebivolol β_3 reseptör agonistik etkisi ile eNOs aktivasyonu yaparak NO atışını sağlamaktadır (84).

2013 yılında Ceron ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada ratların renal arteri klipslenerek hipertansiyon modeli oluşturulmuştur. Operasyondan 6 hafta sonra ratlara 10/mg/kg/gün dozuyla nebivolol 4 hafta boyunca uygulanmış ve çalışmanın sonunda Nebivolol'un TGF- β , matriks metalloproteinaz 2 ve 9 azalması yaparak prooksidan ve profibrotik süreci önleyebildiği ilk defa gösterilmiştir (85).

Ayrıca nebivolol, NO inhibitörlerini de ortadan kaldırarak endotel bağımlı vazodilatasyona katkı sağlamaktadır (85-87).

Nebivolol hücre proliferasyonunu azaltır (56). Nebivololün intima hasarını önlediği gösterilmiştir. Endotel hasarı sonrası oluşan intimal hiperplaziyi ve stenozun yeniden oluşumu ihtimalini de azalttığı bildirilmiştir (56).

Gao ve ark. nebivololün koroner arter endotelinde gevşetici özelliğinin olup olmadığını in vitro saptamak amacıyla bir deney düzenlemiş, bu deneyde endotelyumlu ve endotelyumsuz izole köpek koroner arterlerinde, prostoglandin F₂ ile daraltıcı uyarı esnasında, izometrik gerilim ölçülmüştür (88). DI-nebivololün, endotelyum korunduğunda koroner arterlerde konsantrasyona bağlı daha iyi gevşemeyi sağladığını, bu gevşemenin de NOs inhibitörü nitro-L-arjinin ile inhibe olduğunu ortaya koymuşlardır. Gao ve ark. nebivolol verilmesi ile çalışmalarında NO'ya bağlı vazodilatasyonun harekete geçirilebildiğini göstermişlerdir (88). Bu çalışmaya dayanarak nebivololün diğer β -blokerlerden farklı olarak, koroner arterlerde endotelyuma bağlı gevşemeyi, NO sistemi yoluyla harekete geçirdiği düşünülmektedir. NO salınımı ise hücre içi iki farklı mekanizma ile uyarıldığı düşünülmektedir. Bunlardan ilki endotelyal NO sentaz enziminin ya Ca-kalmodulin kompleksi ile ilişkisi neticesinde (89) ya da kalsiyumdan bağımsız olarak kinaz yoluyla fosforilasyon tepkimesi ile gerçekleştiği düşünülmektedir (90).

Broeders ve ark. yapmış olduğu ratlardan alınan torakal aorta dokusunun organ banyosu çalışmasında nebivololün karaciğerde oluşan metabolitlerinin β 2-adrenerjik reseptörler vasıtasıyla NO üretimini artırdığı bulunmuştur (91). Cominacini ve ark. yaptığı hücre kültürü çalışmasında hem nebivolol hem de karaciğerde oluşan 4-keto metabolitlerinin oksidan ürünlerin yıkımını uyarmak yoluyla NO üretimini artırdıkları rapor edilmiştir (92).

Taddei ve ark. yaptığı bir çalışmada normotansif ve hipertansif bireylerde nebivolol verildiğinde kol atar damar kan akımını arttığı ve bu etkinin NG monometil- L- arginin (L-NMMA, yani NO inhibitörü) ile antagonize edildiği gösterilmiştir (93). Tzemos ve ark. yapmış olduğu çalışmada nebivolol esansiyel hipertansiyonu olan hastalarda bazal ve uyarılmış endotelial NO salınımını artırdığı gösterilmiştir (94).

Yapılan çalışmalar, nebivololün doğal yapısı nedeniyle poliamin metabolizması ile etkileşime girebildiğini göstermektedir. Karbon zincirinde en az iki amin grubu bulunan bir bileşik sınıfı olan poliaminlerin hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli moleküller olduğu ve hücre çoğalmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle nebivololün vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasını inhibe etme yeteneğinin de olduğu gösterilmiştir (83, 95, 96)

Sonuç olarak, nebivolol trombosit kümeleşmesini (97) ve vasküler düz kas hücre çoğalmasını engelleyerek, aynı zamanda da endotelin-1 salınımını azaltarak (96) yalnızca kalbi değil vasküler sistemi de NO aracılığı ile ateroskleroz ve tromboza karşı korur.

2.8. Transforming büyüme faktör beta ve Vasküler endotelial büyüme faktörü

Anjiojenik büyüme faktörleri olan TGF- β ve VEGF lokal olarak salınan proteinlerdir ve embriyogenez, tümör büyümesi, yara iyileşmesi, damar büyümesinin düzenlenmesinde kilit rol oynarlar.

TGF- β hücre döngüsünde kritik rol oynayan moleküllerden biridir. TGF beta1, TGF beta2 ve TGF beta3 olmak üzere üç formu bulunmaktadır. TGF- β , retinoblastoma proteinin fosforilasyonundan sorumlu olan siklin:siklin bağımlı kinaz kompleks proteinini bloke eden p15 ve p21 proteinlerinin sentezini sağlar. Böylece TGF- β hücre döngüsünün G1

fazında bloklar. Ayrıca TGF- β , G1 hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynayan c-myc geninin ekspresyonunu da bastırmaktadır (98). Tam fonksiyonu anlaşılamasada TGF- β endotel hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve mikro damar oluşumunu baskılar (99,100)

Tgf- β 'nın görevi büyümenin engellenmesidir. Tgf- β 'nın reseptörüne bağlanması ile siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin uyarılmasıyla hücrede büyüme önleyici gen ürünleri oluşturulur. Tgf- β reseptörlerinin inaktive ya da mutant olduklarında kolon ya da pankreatik tümörler izlenebilmektedir (101).

Tgf- β epitelyal, endotelyal ve hematopoetik hücelerde etkili bir çoğalma önleyicisidir (102).

Tgf- β aynı zamanda antiinflamatuvar bir sitokindir. Ayrıca Tgf- β kollajen, proteoglikan ve fibronektin üretiminin artışına neden olur (103). Bu özellikleri ile Tgf- β doku iyileşmesinde skar oluşumunda görev alır. Kronik enflamasyon sürecinde ise akciğer, karaciğer ve böbrek gibi organlarda fibrozis gelişiminden sorumludur (103).

2013 yılında Ceron ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada ratların renal arteri klipslenerek hipertansiyon modeli oluşturulmuştur. Operasyondan 6 hafta sonra ratlara 10/mg/kg/gün dozuyla nebivolol 4 hafta boyunca uygulanmış ve çalışmanın sonunda Nebivolol'un TGF- β , matriks metalloproteinaz 2 ve 9 azalması yaparak prooksidan ve profibrotik süreci önleyebildiği ilk defa gösterilmiştir (85).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü endotel hücrelerinin göçünü, çoğalmasını, ve farklılaşmasını sağlamaktadır (103-105).

Ayrıca, VEGF'e maruz kalan damarlarda, endotel hücrelerinde NO sentazı uyarma yoluyla fenestrasyonlar oluşturup transsellüler aralık oluşumuna neden olur (103). Böylece damar geçirgenliğini artırır ve hücre göçünü uyarır, apoptozisi önler. Hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazların, ürokinazın, doku tipi plasminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (103,106,107).

Bölgesel damar hasarı, iskemi, miyokard enfarktüsü ve yanık yaralanması endotel öncü hücrelerinin hareketlenmesi ve dolaşımdaki bu hücrelerin artışı için VEGF güçlü bir uyarandır. Park ve ark. yapmış olduğu insan hücre kültürü çalışmasında iskemik dokuda hücre artışına VEGF seviyelerindeki artışın eşlik ettiği gösterilmiştir (108).

Tsujii ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada in vitro kolon kanser hücre kültüründe siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin anjiogenezisi desteklediği gösterilmiştir. Kolon kanseri hücre kültüründe COX-2 nin aşırı salınımı; VEGF, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve temel fibroblast büyüme faktör yapımını indüklemiştir. Bu anjiogeneziz mediyatörleri ve bunların endotelyal hücrelerdeki reseptörleri, artmış vasküler geçirgenlik, endotel hücre çoğalması ve göçünün uyarılması ile ilişkili bulunmuştur. COX-2 aşırı ekspresyonu kolon kanser hücre kültüründe endotelyal hücrelerin yayılımını uyarmaktadır. Bu etki spesifik COX-2 inhibitörü olan NS-398 ve selektif olmayan aspirin ile durdurulmuştur (109).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan ratlar Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Çalışmada ortalama ağırlıkları 250-450 gr olan 28 adet erişkin erkek Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Ratlar rastgele ve eşit sayıda (n=7) olarak 4 gruba ayrıldı. Sıçanlar deney öncesi bir ay süre ile tel kafeslerde 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyan ritimde, ortam sıcaklığı 24-26°C olacak şekilde tutuldu. Sıçanların beslenmesinde tüm gruplarda standart rat besini ve şehir içme suyu ratların serbest erişimine açık olarak çalışma boyunca sınırlama olmadan kullanıldı. Çalışma protokolü ve deneysel metod Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 2011/076 numaralı etik kurul kararı ile onaylanmıştır.

3.1. Deney Modeli

Ratlar rastgele ve eşit sayıda (n=7) olarak 4 gruba ayrıldı.

1) Kontrol Grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 4 hafta süreyle herhangi bir medikasyon uygulanmadı. Aynı orogastrik gavaj stresini yaşamaları amacıyla ratlara orogastrik gavaj ile her gün, günde bir kez 1ml içme suyu verildi.

2) Nebivolol grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 4 hafta süreyle orogastrik gavaj ile her gün, günde bir kez 10 mg/kg/gün nebivolol verildi (110,111).

3) Metiyonin grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 4 hafta süreyle orogastrik gavaj ile her gün, günde bir kez 1gr/kg/gün metiyonin (M9625 Sigma-Aldrich L-Methionine reagent grade, $\geq 98\%$ (TLC)) verildi.

4) Metiyonin+nebivolol grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 4 hafta süreyle orogastrik gavaj ile her gün, günde bir kez 1gr/kg/gün metiyonin, ve aynı gün içinde iki saat sonra 4 hafta süre ile günde bir kez 10 mg/kg/gün nebivolol verildi.

Çalışma başlamadan önce ratların ağırlıkları ölçüldü. İlaç doz ayarlaması yapmak için her hafta ratların ağırlıkları ölçülerek her rat için verilecek ilaç miktarları belirlendi.

Hiperhomosisteinemi sağlamak için L-metiyonin (M9625 Sigma-Aldrich L-Methionine reagent grade, $\geq 98\%$ (TLC)) pH'ı 7,4 olan fosfat tampon çözeltisinde (PBS) çözünerek ratlara 4 hafta boyunca her gün 1g/kg doz oral gavaj yoluyla verildi.

Nebivolol ise Abdi İbrahim firmasının ürettiği Nexivol 5 mg hazır tabletler ezilerek %10 dimetilsülfoksit ile çözünerek 4 hafta boyunca her gün 10mg/kg doz oral gavaj yoluyla verildi.

Çalışmanın sonunda ratlar eter anestezi altında sakrifiye edilerek kan örnekleri EDTA'lı hemogram ve düz biyokimya tüplerine alındı. Ardından ratların aorta ve kalbi diseke edilerek histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler için %10 formaldehid solüsyonuna kondu.

3.2. Biyokimyasal İncelemeler

Ratların kanları düz biyokimya tüplerine alındıktan sonra + 4C de 4000 rpmde 10 dakika santrifüj edilerek serumlar, plazmalar ayrılarak daha sonra analiz edilmek üzere -80 °C'de saklandı.

ADMA, Hcy, MDA, NO, katalaz, SOD ve glutatyon analizleri için serum, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz analizleri için plazma kullanıldı.

3.2.1. Rat serum ADMA ve Hcy

ADMA (ng/ml) (USCN Life Science Inc. Katalog no: E91301Ge) ve Homosistein (mikromol/L) (Cusabio, Katalog No: CSB-E13376r) düzeyi ticari kit kullanılarak ELİSA yöntemi ile saptandı.

3.2.2. Katalaz aktivitesi

Katalaz (U/g) “Catalase Assay Kit” (Cayman; Item No: 7070002,USA) kullanılarak ELİSA yöntemi ile saptandı. (Yöntem katalazın H₂O₂'i indirgemesi esasına dayanmaktadır) (112).

3.2.3. Glutatyon redüktaz aktivitesi

Glutatyon redüktaz aktivitesi (U/g) “Glutathione Reductase Assay Kit” (Cayman; Item No: 703202, USA) kullanılarak ELİSA yöntemi ile saptandı. Bu yöntem NADPH oksidasyonunun ölçümü prensibine dayanmaktadır (113).

3.2.4. Glutasyon peroksidaz aktivitesi

Glutasyon peroksidaz aktivitesi (U/g) “Glutathione Peroxidase Assay Kit” (Cayman; Item No: 703102, USA) kullanılarak ELİSA yöntemi ile saptandı. Bu yöntem okside glutasyon ve glutasyon redüktazın da kullanıldığı iki basamaklı bir reaksiyonla, NADPH oksidasyonunun ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (114).

3.2.5. Glutasyon düzeyi

Glutasyon düzeyi, “Glutathione Assay Kit” (Cayman; Item No: 703002, USA) kullanılarak ELİSA yöntemi ile saptandı. Bu yöntem glutasyon redüktazın ve DTNB’in (5,5’-di tiyo-bis-2-(nitrobenzoik asit), Ellman reatifi) kullanıldığı döngüsel bir reaksiyonla, TNB konsantrasyonunun ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (115).

3.2.6. SOD Aktivitesi

Sun Y. ve ark. tarif ettiği yönteme göre belirlendi. Bu yöntem nitroblue tetrazolium’un süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır (116). Çalışmamızda SOD aktivitesi ünite/mg (U/mg) serum proteini olarak ifade edildi. Serum protein düzeyi biüret yöntemi ile Abbott firmasına ait otoanalizörde (Architect C 8000, Abbott, Abbott Park, IL, USA) saptandı.

3.2.7. MDA tayini

Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu uygulanarak yapıldı (117). Bu yöntemde Tiyoobarbutirik asit ile 90-95°C’de reaksiyona giren malondialdehit, pembe renkli kromojen oluşturmaktadır. On beş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorbanları 532 nm’de okunup sonuçlar nmol/ml olarak ifade edildi.

3.2.8. NO Tayini

Serum NO düzeyi (nitrit+nitrat) Navarro-Gonzalvez tarafından tarif edilen kadmiyum-indirgeme yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde, üretilen NO, sülfanilamidin diyazotizasyonundan sonra naftiletilendiaminle birleşmesi esasına dayanarak ölçüldü (118).

3.3. Patolojik İncelemeler

Torakal aorta ve kalp dokularından parafin bloklar hazırlandı. Bu bloklardan mikrotom ile 4µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinize edilerek cam slaytlara monte edilip hematoksilin–eosin, Verhoeff'un elastik boyası (Gül Biyoloji Labaratuvarı, hayvan bağ ve destek doku boyası, katalog no: 5089, İstanbul, Türkiye) ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi. Tüm örnekler deney gruplarından habersiz aynı patolog tarafından değerlendirildi. İncelemede damar intimal ve medial hasarlanma dereceleri semikantitatif olarak skorlanarak gruplar arasındaki farklılık değerlendirildi. Kalp dokusu değerlendirilmesinde miyosit hasarı, nekroz, miyosit hücre şişmesi, fibrozis saptanmasına göre aşağıdaki skalaya uygun olarak semikantitatif olarak skorlandı. Torakal aortada endotel hasarı ise, kesitlerde saptanan lümende daralma, duvar kalınlaşması, lümende endotelden yoksun alanlar ve lamina elastika kıvrımına göre aşağıdaki skalaya uygun olarak semikantitatif olarak skorlandı. Skorlama sistemi:

- (-) : Değişiklik yok
- (+) : Hafif değişiklikler
- (++) : Orta derecede değişiklikler
- (+++): Belirgin değişiklikler, olarak değerlendirildi.

Ayrıca pozitif yüklü lamlara alınan kesitlere immunhistokimyasal yöntemle “VEGF (VEGF (A-20) rabbit polyclonal IgG 200 µg/ml, sc-152, Lot: K1212 Santa Cruz Biotechnology Inc., SantaCruz, CA, USA)” ve “TGF β-1 (TGF β-1 (V) rabbit polyclonal IgG 200 µg/ml, sc-146, Lot: K2112 Santa Cruz Biotechnology Inc., SantaCruz, CA, USA)” boyaları uygulandı. Bu boyama da semikantitatif olarak skorlanarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. İmmunohistokimyasal boyanma uygulanan preparatlar ışık mikroskobunda değerlendirildi. VEGF için intimal hücrelerde stoplazmik ve membranöz , TGF β-1 için damar duvarlarındaki stoplazmik boyanma yoğunluğu yönünden:

- (0) : Boyanma yok
- (+): Zayıf boyanma
- (++) : Orta derecede boyanma
- (+++): Yoğun boyanma, skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi.

4. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerin analizi SPSS (Statistical Package for SocialScience) 14.0 programı kullanılarak yapıldı. Rat grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Normal dağılan nicel verilerin gruplar arası karşılaştırması için tek yönlü varyans analizi kullanıldı ve grupların çoklu karşılaştırmasında Levene homojenlik testi istatistiğine göre Tukey HSD ya da Dunnet T3 testi kullanıldı, tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma şeklinde gösterildi. Normal dağılmayan nicel verilerin gruplar arası karşılaştırması için Kruskal Wallis varyans analizi kullanıldı ve tanımlayıcı istatistikler medyan (25-75 persantil) şeklinde gösterildi. Sonuçlar $p<0,05$ olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Tablo IV: Kontrol grubunun biyokimyasal verileri.

Rat grup 1	Protein (g/dl)	ADMA (ng/ml)	Hcy (mikromol/L)	Katalaz (U/g)	Glutasyon Peroksidaz(U/g)	Glutasyon Redüktaz(U/g)	Glutasyon (mikromol/L)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/ml)	NO (μM/L)
Kontrol1	6,5	150,3	5,9	62,15	468,34	522,44	1,26	1,72	1,84	18,45
Kontrol2	7,5	163,2	6	52,33	389,76	339,59	1,44	1,85	1,79	17,01
Kontrol3	7,9	123,4	9,3	47,85	356,69	268,66	1,81	1,67	1,68	20,52
Kontrol4	6,8	105,5	7,3	63,9	453,67	249,70	1,11	1,89	1,88	19,62
Kontrol5	6,9	76,2	9,5	62,9	434,42	246,08	0,98	1,96	1,65	17,64
Kontrol6	6,2	127,3	8,1	72,02	437,75	273,86	1,59	1,79	1,87	20,79
Kontrol7	6,5	120,9	7,6	67,54	428,32	326,53	1,79	1,92	1,92	20,07

Tablo V: Nebivolol grubunun biyokimyasal verileri.

Rat grup 2	Protein (g/dl)	ADMA (ng/ml)	Hcy (mikromol/L)	Katalaz (U/g)	Glutasyon Peroksidaz(U/g)	Glutasyon Redüktaz(U/g)	Glutasyon (mikromol/L)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/ml)	NO (μM/L)
Nebivolol1	6,40	165,60	4,30	53,59	316,69	265,30	1,11	1,88	1,88	22,59
Nebivolol2	6,80	155,50	4,10	49,85	353,61	249,70	0,89	1,65	1,89	21,87
Nebivolol3	7,20	162,10	4,60	53,13	342,53	176,87	1,11	1,66	1,97	21,69
Nebivolol4	6,90	141,70	7,30	56,38	228,32	184,56	0,74	1,86	1,99	20,16
Nebivolol5	6,90	107,30	7,50	46,30	356,69	184,56	0,98	1,89	2,10	20,79
Nebivolo 6	8,10	160,30	5,80	42,16	253,64	209,62	1,32	1,65	2,23	21,87
Nebivolol7	8,20	151,90	5,00	42,01	234,32	155,30	1,27	1,79	1,89	23,13

Tablo VI: Metiyonin grubunun biyokimyasal verileri.

Rat grup 3	Protein (g/dl)	ADMA (ng/ml)	Hcy (mikromol/L)	Katalaz (U/g)	Glutasyon Peroksidaz(U/g)	Glutasyon Redüktaz(U/g)	Glutasyon (mikromol/L)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/ml)	NO (µM/L)
Metiyonin 1	8,50	174,90	38,40	32,54	102,63	65,31	0,55	1,12	2,55	17,01
Metiyonin 2	7,40	250,00	42,70	23,45	137,75	114,73	0,56	1,23	2,87	20,07
Metiyonin 3	7,80	161,70	45,90	26,03	128,32	62,42	0,65	1,34	2,92	21,33
Metiyonin 4	7,50	237,80	26,60	14,07	112,56	56,60	0,35	1,34	3,25	29,61
Metiyonin 5	6,40	278,90	28,20	26,95	127,72	132,65	0,51	1,36	3,32	26,01
Metiyonin 6	6,80	230,10	38,30	25,81	126,35	62,42	0,26	1,38	3,34	22,68
Metiyonin 7	7,30	246,50	29,30	17,74	122,45	58,15	0,33	1,33	2,89	32,04

Tablo VII: Metiyonin+nebivolol grubunun biyokimyasal verileri.

Rat grup 4	Protein (g/dl)	ADMA (ng/ml)	Hcy (mikromol/L)	Katalaz (U/g)	Glutasyon Peroksidaz(U/g)	Glutasyon Redüktaz(U/g)	Glutasyon (mikromol/L)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/ml)	NO (µM/L)
Metiyonin+nebivolol1	6,90	121,40	12,70	40,87	196,98	246,08	0,89	1,45	2,12	22,86
Metiyonin+nebivolol2	7,20	105,40	13,40	31,67	257,90	176,87	1,20	1,56	1,98	24,12
Metiyonin+nebivolol3	7,10	106,80	11,60	34,58	233,88	239,15	1,10	1,63	2,34	24,48
Metiyonin+nebivolol4	6,90	135,90	10,40	33,33	225,66	184,56	0,96	1,46	2,00	21,15
Metiyonin+nebivolol5	6,90	106,70	12,80	38,26	196,98	123,04	0,87	1,32	1,96	23,13
Metiyonin+nebivolol6	8,30	127,90	15,90	33,98	157,19	204,57	1,12	1,12	2,38	20,52
Metiyonin+nebivolol7	6,20	88,50	16,20	39,60	223,87	136,93	1,35	1,26	2,48	19,08

Tablo VIII: Kontrol grubunun patolojik verileri.

Rat grup 1	Kardiyomiyosit Dejenerasyonu	Endotel Dejenerasyonu Aorta	Tgf β -1 Kalp	Tgf β -1 Aorta	VEGF Kalp	VEGF Aorta	Verhoef Elastik Kalp	Verhoeff Elastik Aorta
Kontrol1	1	0	2	1	2	1	0	0
Kontrol2	0	0	2	0	2	0	0	0
Kontrol3	1	0	2	0	2	0	0	0
Kontrol4	0	0	2	0	1	0	0	0
Kontrol5	0	0	2	0	2	0	0	0
Kontrol6	0	1	2	1	1	1	0	0
Kontrol7	0	0	2	1	2	0	0	0

Tablo IX: Nebivolol grubunun patolojik verileri.

Rat grup 2	Kardiyomiyosit Dejenerasyonu	Endotel Dejenerasyonu Aorta	Tgf β -1 Kalp	Tgf β -1 Aorta	VEGF Kalp	VEGF Aorta	Verhoef Elastik Kalp	Verhoeff Elastik Aorta
Nebivolol1	0	0	2	2	1	1	0	0
Nebivolol2	1	0	2	1	1	1	0	0
Nebivolol3	0	0	2	2	2	1	0	0
Nebivolol4	1	0	1	1	1	1	0	0
Nebivolol5	1	0	2	1	2	1	0	0
Nebivolol6	0	0	2	1	1	1	0	0
Nebivolol7	1	0	2	1	1	1	0	0

Tablo X: Metiyonin grubunun patolojik verileri.

Rat grup 3	Kardiyomiyosit Dejenerasyonu	Endotel Dejenerasyonu Aorta	Tgf β -1 Kalp	Tgf β -1 Aorta	VEGF Kalp	VEGF Aorta	Verhoef Elastik Kalp	Verhoeff Elastik Aorta
Metiyonin1	3	2	1	1	2	0	0	0
Metiyonin2	3	0	1	1	2	1	0	0
Metiyonin3	3	1	2	2	1	1	0	0
Metiyonin4	1	0	2	0	1	0	0	0
Metiyonin5	1	2	2	1	2	2	0	0
Metiyonin6	1	0	2	0	2	0	0	0
Metiyonin7	1	2	1	1	2	1	0	0

Tablo XI: Metiyonin+Nebivolol grubunun patolojik verileri.

Rat grup 4	Kardiyomiyosit Dejenerasyonu	Endotel Dejenerasyonu Aorta	Tgf β -1 Kalp	Tgf β -1 Aorta	VEGF Kalp	VEGF Aorta	Verhoef Elastik Kalp	Verhoeff Elastik Aorta
Metiyonin+nebivolol1	1	2	2	2	2	0	0	0
Metiyonin+nebivolol2	1	0	2	1	2	1	0	0
Metiyonin+nebivolol3	2	0	2	1	0	0	0	0
Metiyonin+nebivolol4	1	0	1	1	1	1	0	0
Metiyonin+nebivolol5	2	0	1	1	1	0	0	0
Metiyonin+nebivolol6	1	0	2	1	1	0	0	0
Metiyonin+nebivolol7	2	1	1	1	2	2	0	0

Tablo XII: Normal dağılan nicel veri gruplarının biyokimyasal verilerinin tamınlayıcı istatistikleri.

Grup adı		Hcy (mikromol/L)	ADMA (ng/ml)	Protein (g/dl)	Katalaz (U/g)	Glutasyon Peroksidaz (U/g)	Glutasyon (mikromol/L)	MDA (nmol/ml)	NO (µM/L)
Kontrol Grubu	Ortalama	7,6714 ±1,42912	123,8286 ±28,50753	6,9000 ±,60277	61,2414 ±8,41861	424,1357 ±38,43941	1,4257 ±0,32490	1,8043 ±0,10342	19,1571 ±1,47101
Nebivolol Grubu	Ortalama	5,5143 ±1,40170	149,2000 ±20,07245	7,2143 ±,68173	49,0600 ±5,71872	297,9714 ±57,36938	1,0600 ±0,20591	1,9929 ±0,13048	21,7286 ±1,00738
Metiyonin Grubu	Ortalama	35,6286 ±7,60564	225,7000 ±42,22120	7,3857 ±,67683	23,7986 ±6,14874	122,5400 ±11,56228	0,4586 ±0,14473	3,0200 ±0,29314	24,1071 ±5,37354
Metiyonin+ nebivolol Grubu	Ortalama	13,2857 ±2,12480	113,2286 ±16,08703	7,0714 ±,62906	36,0414 ±3,50588	213,2086 ±32,55290	1,0700 ±0,17474	2,1800 ±0,21602	22,1914 ±1,99349

Tablo XIII: Normal dağılmayan nicel veri gruplarının biyokimyasal verilerinin tamınlayıcı istatistikleri medyan persantil (25-75) olarak verildi.

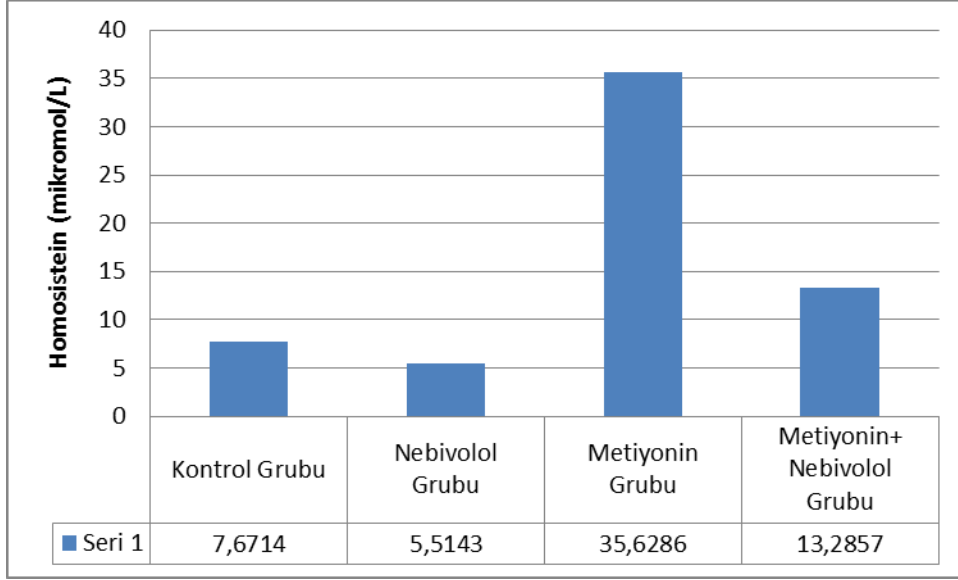
Grup adı	Glutasyon Redüktaz (U/g) Medyan Persantil (25-75)	SOD (U/mg protein) Medyan Persantil (25-75)
Kontrol Grubu	273,8600 (249,7000-339,5900)	1,8500 (1,7200-1,9200)
Nebivolol Grubu	184,5600 (176,8700-249,7000)	1,7900 (1,6500-1,8800)
Metiyonin Grubu	62,4200 (58,1500-114,7300)	1,3400 (1,2300-1,3600)
Metiyonin+ nebivolol Grubu	184,5600 (136,9300-239,1500)	1,4500 (1,2600-1,5600)

Tablo XIV: Tüm grupların patolojik verilerinin ortalama ve standart sapmaları.

Grup Adı		Kardiyomiyosit Dejenerasyonu	Endoteldejenerasyonu Aorta	Tgf β -1 Kalp	Tgf β -1 Aorta	VEGF Kalp	VEGF Aorta	Verhoeff elastik Kalp	Verhoeff elastik Aorta
Kontrol Grubu	Ortalama	0,29 $\pm 0,488$	0,14 $\pm 0,378$	2,00 $\pm 0,000$	0,43 $\pm 0,535$	1,71 $\pm 0,488$	0,29 $\pm 0,488$	0,00 $\pm 0,000$	0,00 $\pm 0,000$
Nebivolol Grubu	Ortalama	0,57 $\pm 0,535$	0,00 $\pm 0,000$	1,86 $\pm 0,378$	1,29 $\pm 0,488$	1,29 $\pm 0,488$	1,00 $\pm 0,000$	0,00 $\pm 0,000$	0,00 $\pm 0,000$
Metiyonin Grubu	Ortalama	1,86 $\pm 1,069$	1,00 $\pm 1,000$	1,57 $\pm 0,535$	0,86 $\pm 0,690$	1,71 $\pm 0,488$	0,71 $\pm 0,756$	0,00 $\pm 0,000$	0,00 $\pm 0,000$
Metiyonin+ nebivolol Grubu	Ortalama	1,43 $\pm 0,535$	0,43 $\pm 0,787$	1,57 $\pm 0,535$	1,14 $\pm 0,378$	1,29 $\pm 0,756$	0,57 $\pm 0,787$	0,00 $\pm 0,000$	0,00 $\pm 0,000$

5.1. Biyokimyasal Bulgular

5.1.1. Homosistein



Şekil 13: Homosistein ortalamaları.

Tablo XV: Grupların homosistein ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

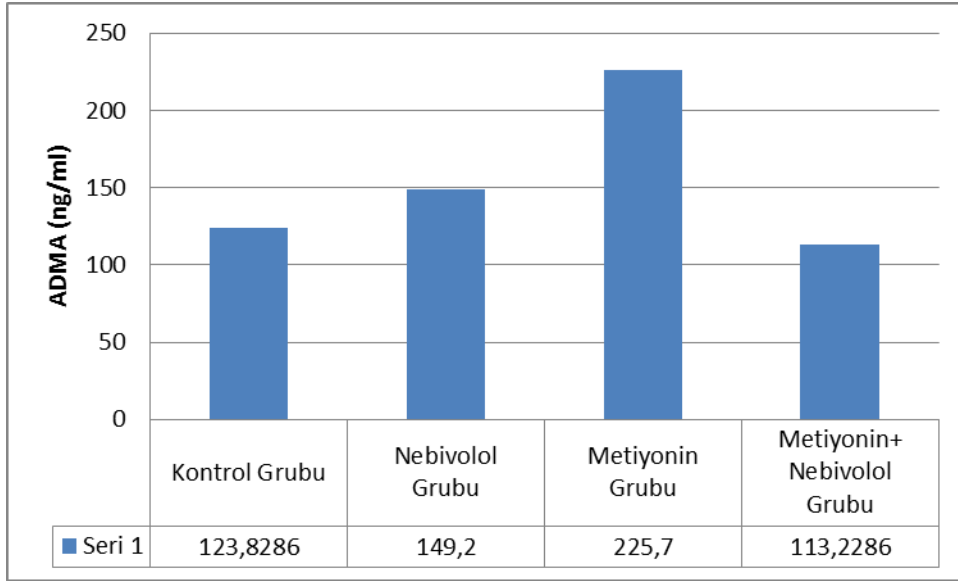
Hcy	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+ nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	0,077	0,000*	0,001*
Nebivolol Grubu	0,077	1	0,000*	0,000*
Metiyonin Grubu	0,000*	0,000*	1	0,001*
Metiyonin+ nebivolol Grubu	0,001*	0,000*	0,001*	1

* p<0.05

Hcy seviyeleri açısından kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,000*). Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p:0,001*). Nebivolol grubu ile metiyonin grupları arasında anlamlı fark saptandı

(p:0,000*). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p:0,000*). Metiyonin+nebivolol grubu ile metiyonin grubundaki ratlar karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı (p: 0,001*). Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,077).

5.1.2. Asimetrik Dimetilarjinin



Şekil 14: ADMA ortalamaları.

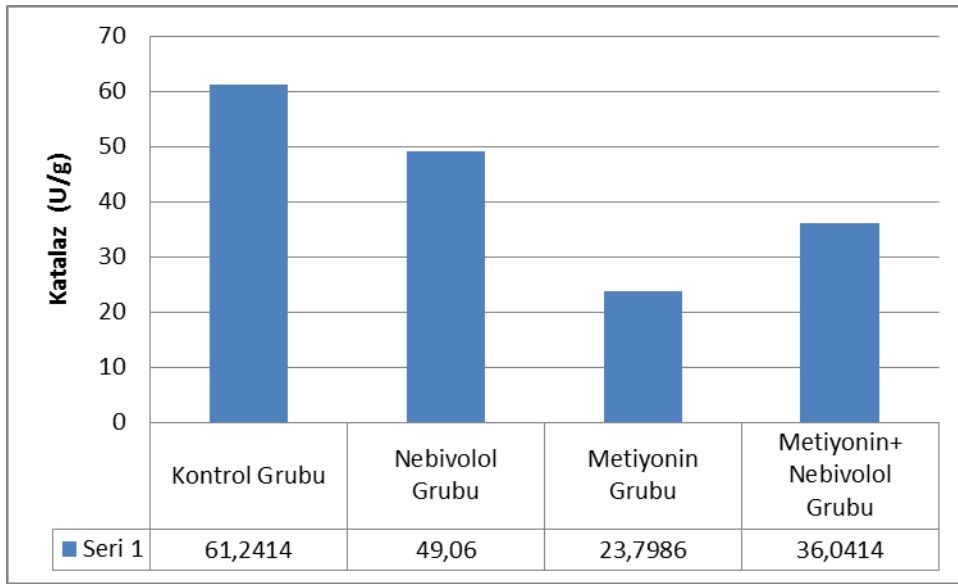
Tablo XVI: Grupların ADMA ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

ADMA	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+ nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	0,364	0,000*	0,898
Nebivolol Grubu	0,364	1	0,000*	0,113
Metiyonin Grubu	0,000*	0,000*	1	0,000*
Metiyonin+ nebivolol Grubu	0,898	0,113	0,000*	1

* p<0.05

Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p:0,000*) . Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p:0,000*). Metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,000*). Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,364). Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p:0,898). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,113).

5.1.3. Katalaz



Şekil 15: Katalaz ortalamaları.

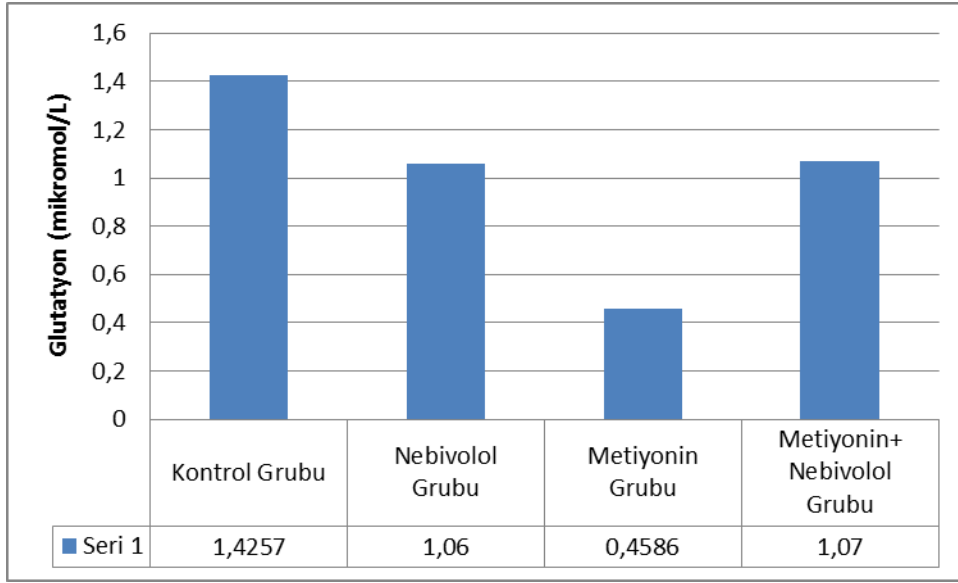
Tablo XVII: Grupların katalaz ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Katalaz	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+ nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	0,006*	0,000*	0,000*
Nebivolol Grubu	0,006*	1	0,000*	0,003*
Metiyonin Grubu	0,000*	0,000*	1	0,006*
Metiyonin+ nebivolol Grubu	0,000*	0,003*	0,006*	1

* p<0.05

Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,006*). Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p:0,000*) . Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,000*). Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p:0,000*). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptandı (p:0,003*). Metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,006*).

5.1.4. Glutasyon



Şekil 16: Glutasyon ortalamaları.

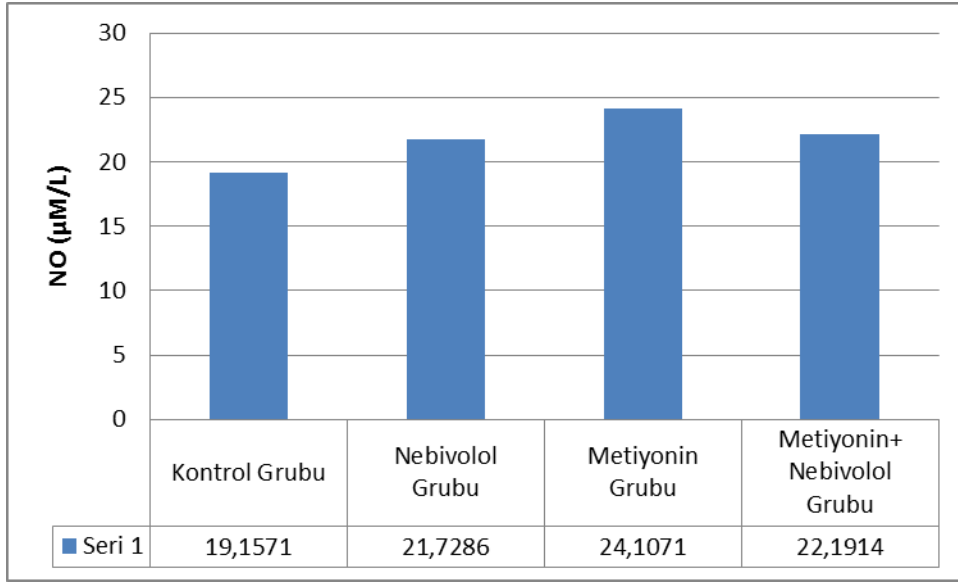
Tablo XVIII: Grupların glutatyan ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Glutasyon	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+ nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	0,026*	0,000*	0,031*
Nebivolol Grubu	0,026*	1	0,000*	1,000
Metiyonin Grubu	0,000*	0,000*	1	0,000*
Metiyonin+ nebivolol Grubu	0,031*	1,000	0,000*	1

* p<0.05

Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,026*). Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p:0,000*) . Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,031*). Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,000*). Metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,000*). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p:1,000).

5.1.5. Nitrik Oksit



Şekil 17: Nitrik oksit ortalamaları.

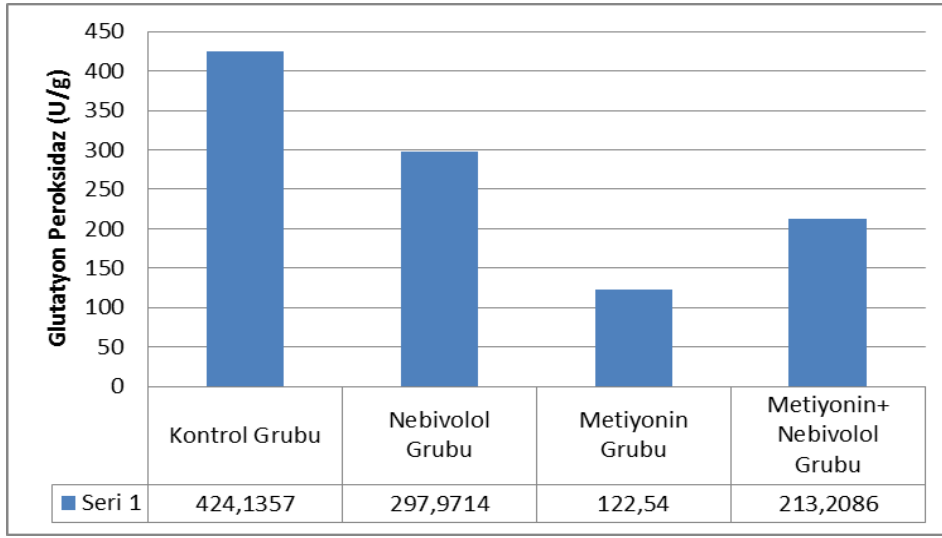
Tablo XIX: Grupların NO ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

NO	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+ nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	0,396	0,024*	0,258
Nebivolol Grubu	0,396	1	0,463	0,991
Metiyonin Grubu	0,024*	0,436	1	0,636
Metiyonin+ nebivolol Grubu	0,258	0,991	0,636	1

* p<0.05

Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı (p:0,024*). Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p: 0,396). Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,258). Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,463). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,991). Metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,636).

5.1.6. Glutayon Peroksidaz



Şekil 18: Glutayon peroksidaz ortalamaları.

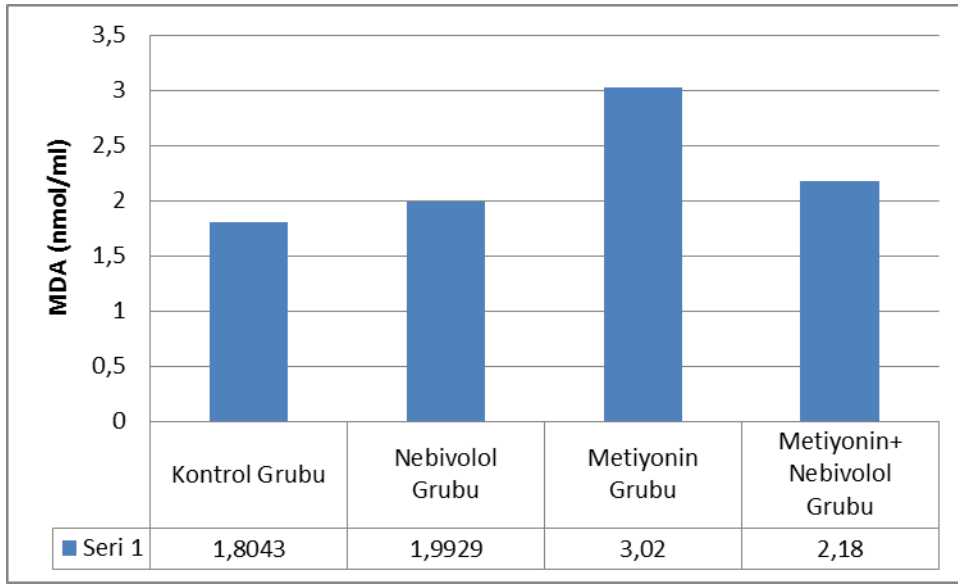
Tablo XX: Grupların glutayon peroksidaz ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Glutayon Peroksidaz	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+ nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	0,003*	0,000*	0,000*
Nebivolol Grubu	0,003*	1	0,001*	0,038*
Metiyonin Grubu	0,000*	0,001*	1	0,001*
Metiyonin+ nebivolol Grubu	0,000*	0,038*	0,001*	1

* p<0.05

Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,003*). Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p:0,000*) . Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,000*). Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,001*). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,038*). Metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,001*).

5.1.7. Malondialdehit



Şekil 19: MDA ortalamaları.

Tablo XXI: Grupların MDA ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

MDA	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+ nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	0,062	0,000*	0,015*
Nebivolol Grubu	0,062	1	0,000*	0,342
Metiyonin Grubu	0,000*	0,000*	1	0,000*
Metiyonin+ nebivolol Grubu	0,015*	0,342	0,000*	1

* p<0.05

Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p:0,000*) . Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,015*). Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,000*). Metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,000*). Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,062). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,342).

5.1.8. Glutasyon Redüktaz

Tablo XXII: Grupların glutasyon redüktaz ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Glutasyon redüktaz	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	0,306	0,000*	0,081
Nebivolol Grubu	0,306	1	0,046*	1,000
Metiyonin Grubu	0,000*	0,046*	1	0,191
Metiyonin+nebivolol Grubu	0,081	1,000	0,191	1

* p<0.05

Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p:0,000*) . Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,046*). Metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,191). Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,306). Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,081). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 1,000).

5.1.9. Süperoksit Dismütaz

Tablo XXIII: Grupların SOD ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

Süperoksit Dismütaz	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+neбиволol Grubu
Kontrol Grubu	1	1,000	0,001*	0,007*
Nebivolol Grubu	1,000	1	0,010*	0,053
Metiyonin Grubu	0,001*	0,010*	1	1,000
Metiyonin+neбиволol Grubu	0,007*	0,053	1,000	1

* p<0.05

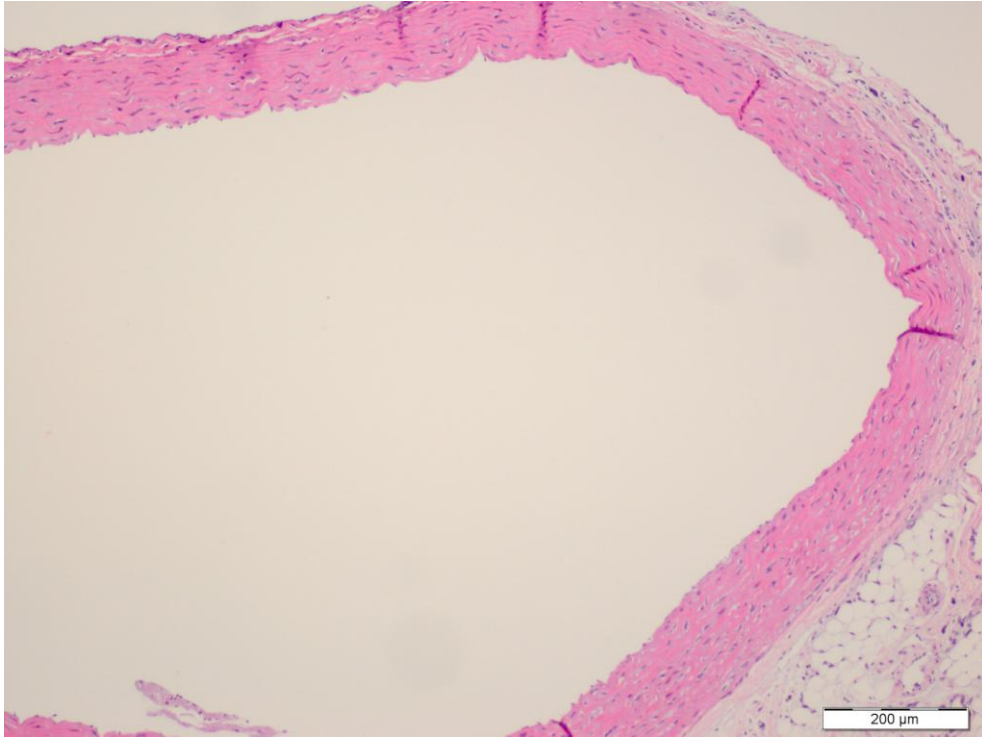
Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,001*) . Kontrol grubu ile metiyonin+neбиволol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,007*). Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,010*). Nebivolol grubu ile metiyonin+neбиволol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,053). Metiyonin grubu ile metiyonin+neбиволol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 1,000). Kontrol grubu ile neбиволol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 1,000).

5.2. Patolojik Bulgular

Tablo XXIV: Gruplara Kruskal-Wallis testi uygulandığında patolojik incelemelerin istatistiksel anlamlı olanları * ile işaretlenmiştir.

	Kardiyomiyosit Dejenerasyonu	Endotel Dejerasyonu Aorta	Tgf β -1 Kalp	Tgf β -1 Aorta	VEGF Kalp	VEGF Aorta
p	0,003*	0,070	0,175	0,038*	0,281	0,117

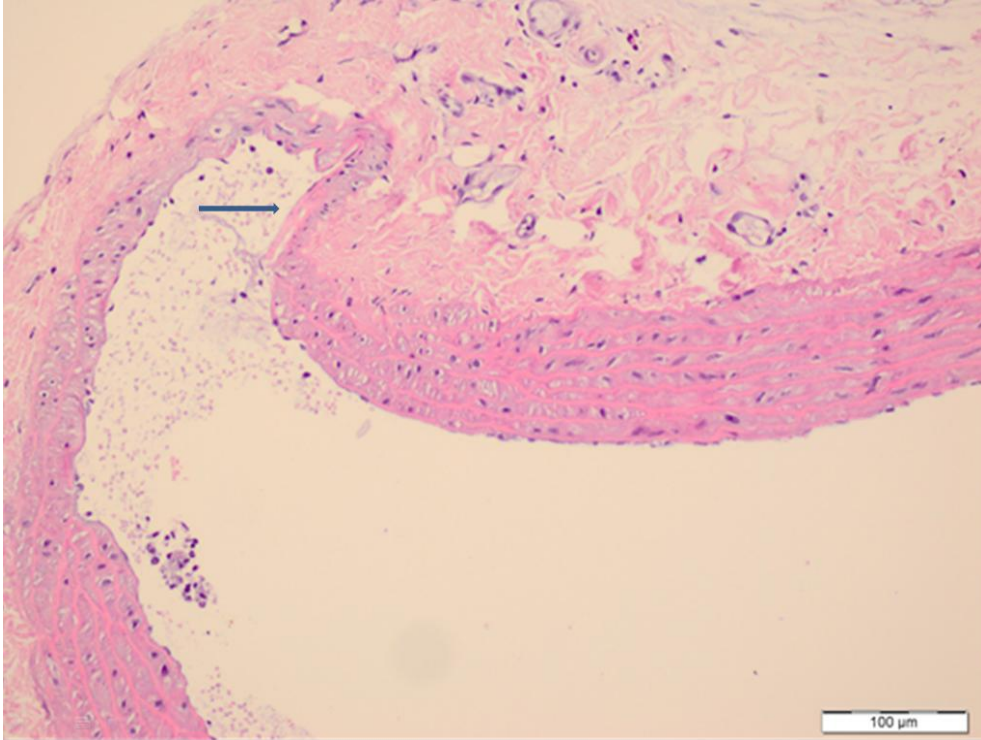
* $p < 0.05$



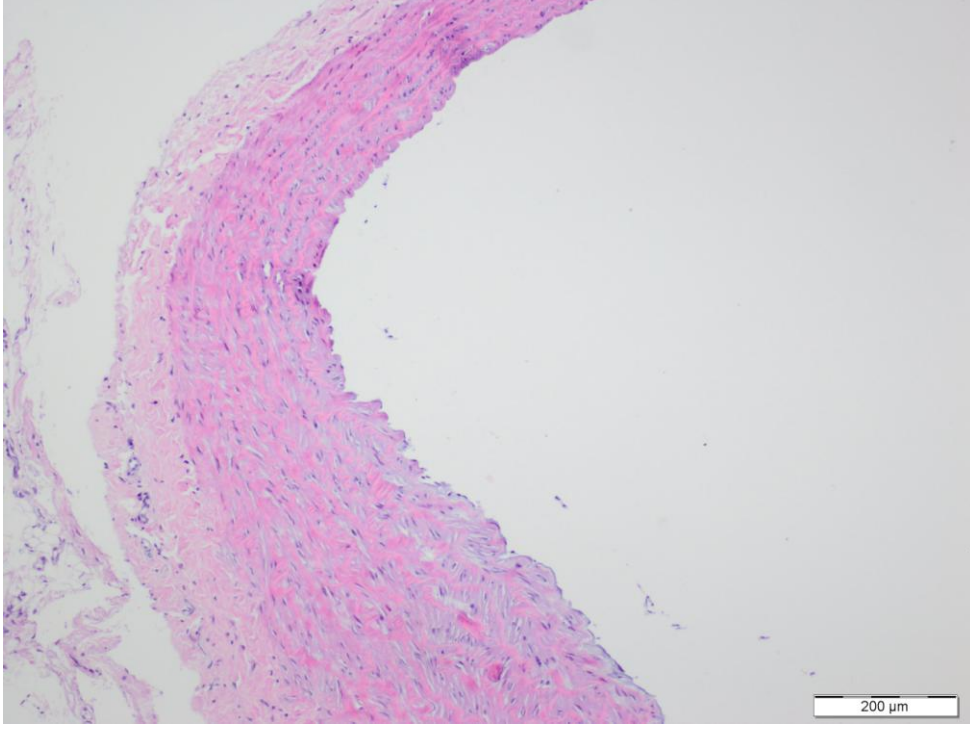
Resim 1: Kontrol grubuna ait torakal aorta H&E boyama ile x100 lük görünümü (normal)



Resim 2: Nebivolol grubuna ait torakal aorta H&E boyama ile x200 lük görünümü (normal).



Resim 3: Metiyonin grubuna ait torakal aorta H&E boyama ile x200 lük görünümü, ok: endotel hücrelerinde dökülmeyi gösteriyor (+2 dejenasyon).



Resim 4: Metiyonin+nebivolol grubuna ait torakal aorta H&E boyama ile x100 lük görünümü, damar duvarında kalınlaşma, medial tabakada liflerde dejenerasyon bulguları (+1 dejenerasyon).



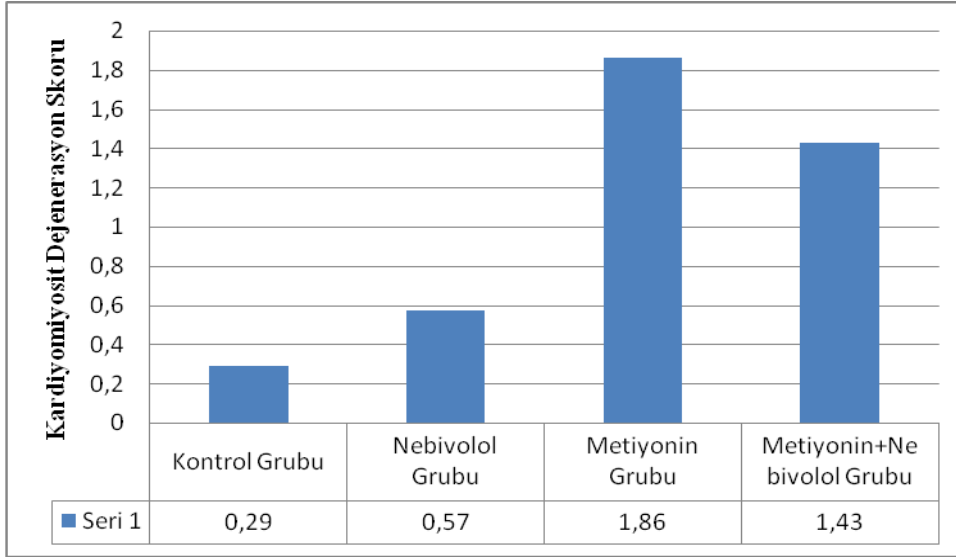
Resim 5: Kontrol grubuna ait torakal aorta dokusunun VEGF ile boyanması x40 lık görünümü (boyanma skoru 0).



Resim 6: Kontrol grubuna ait torakal aorta dokusunun Verhoeff'un elastik boyası ile boyanması x40 lık görünümü (normal boyanma).

Patolojik veriler incelendiğinde verilerden sadece kardiyomiyosit dejenerasyonu ve Tgf β -1 aorta gruplarının içinde istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlemlendi. İleri istatistiksel analizlerin yapılması bu gruplara planlandı. Verhoeff elastik boyası ile preperatlarda boyanmanın olmaması nedeniyle bu gruplar analize dahil edilmedi.

5.2.1. Kardiyomiyosit Dejenerasyonu



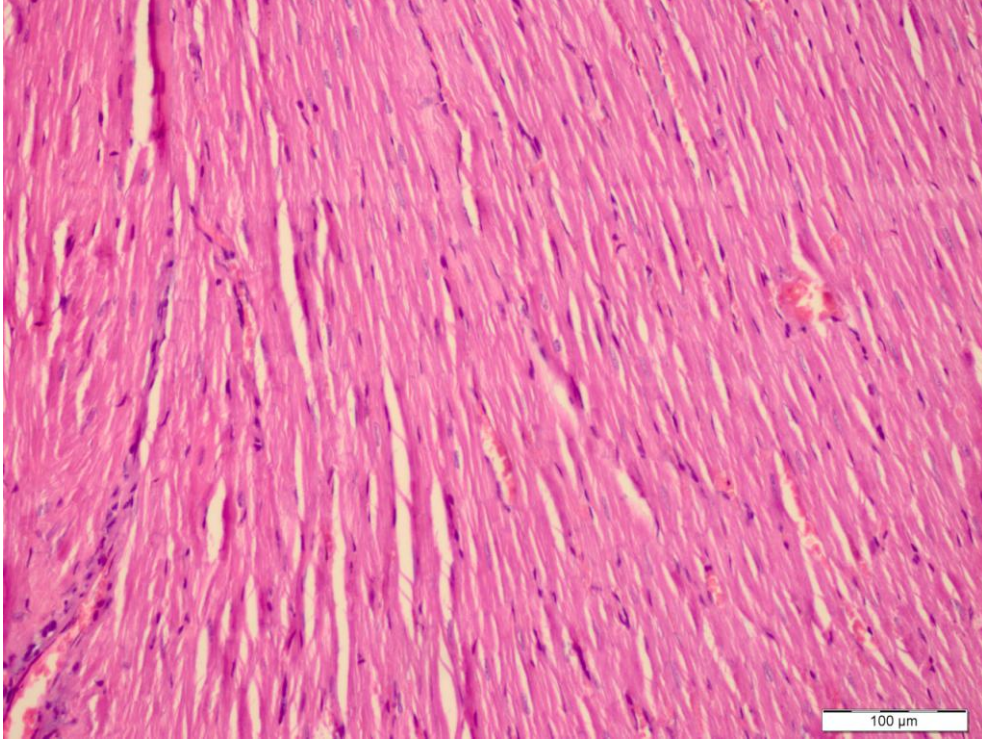
Şekil 20: Kardiyomiyosit dejenerasyon skoru ortalamaları.

Tablo XXV: Grupların kardiyomiyosit dejenerasyon skoru ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

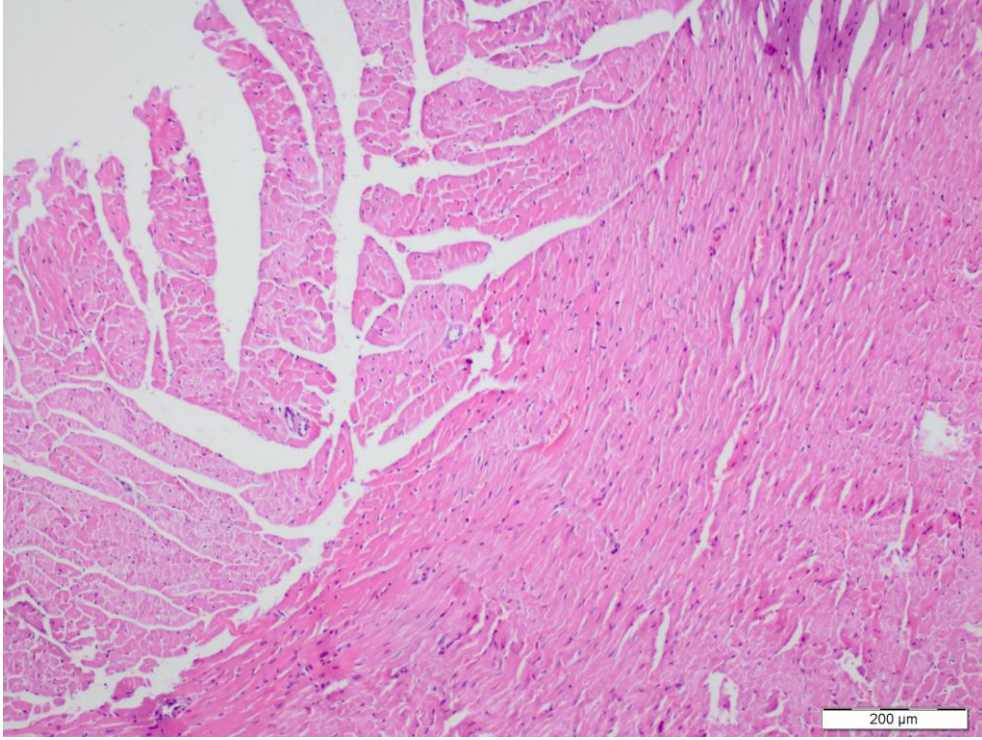
Kardiyomiyosit Dejenerasyonu	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	1,000	0,010*	0,027*
Nebivolol Grubu	1,000	1	0,104	0,236
Metiyonin Grubu	0,010*	0,104	1	1,000
Metiyonin+nebivolol Grubu	0,027*	0,236	1,000	1

* p<0.05

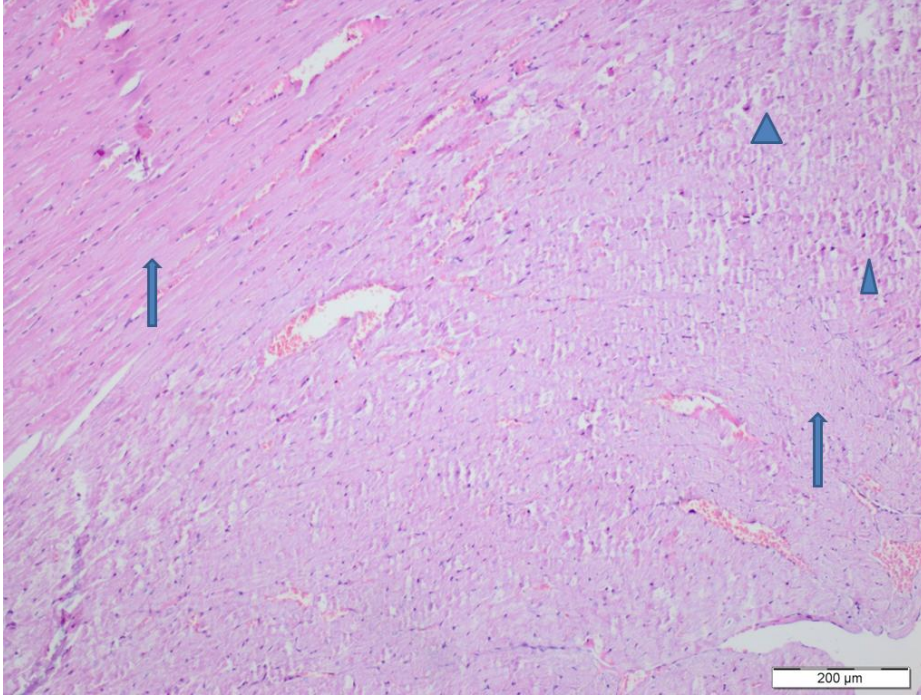
Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,010*) . Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,027*). Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,104). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,236). Metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 1,000). Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 1,000).



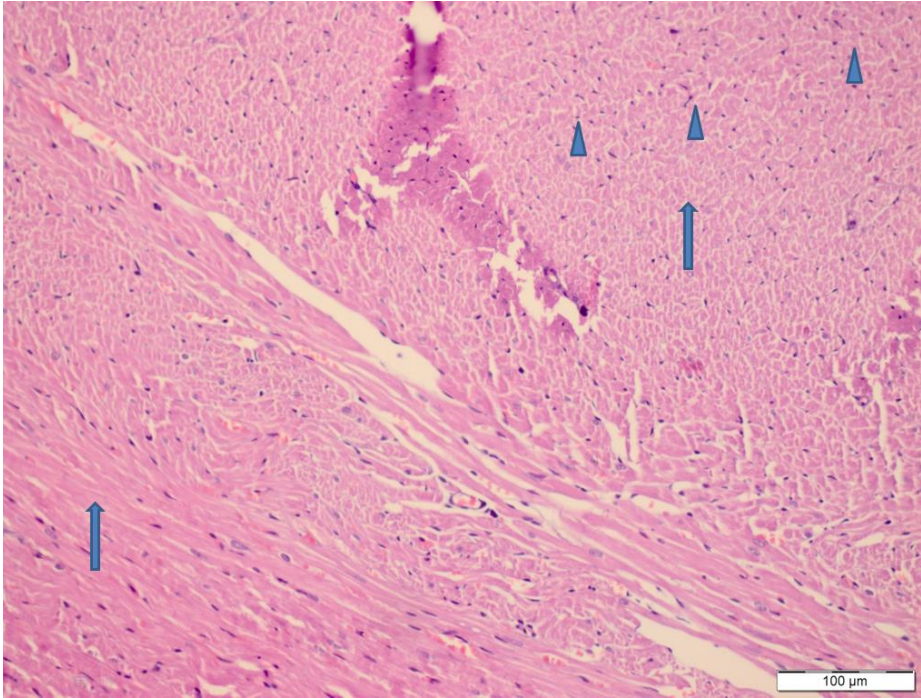
Resim 7: Kontrol grubuna ait kalp dokusunun H&E boyama ile x200 lük görünümü (normal).



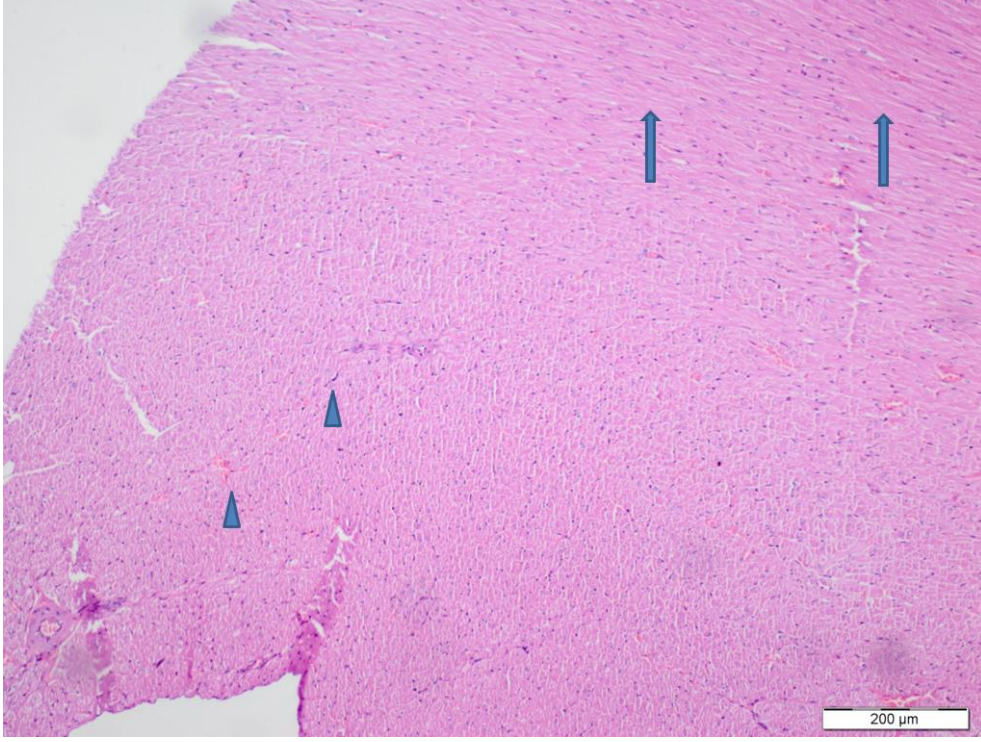
Resim 8: Nebivolol grubuna ait kalp dokusunun H&E boyası ile boyanması x100 lük görünümü (normal).



Resim 9: Metiyonin grubuna ait kalp dokusunun H&E boyası ile boyanması x100 lük görünümü, ok: nükleus kaybını, üçgen: kas liflerindeki dejenerasyonu göstermektedir (+3 dejenerasyon).

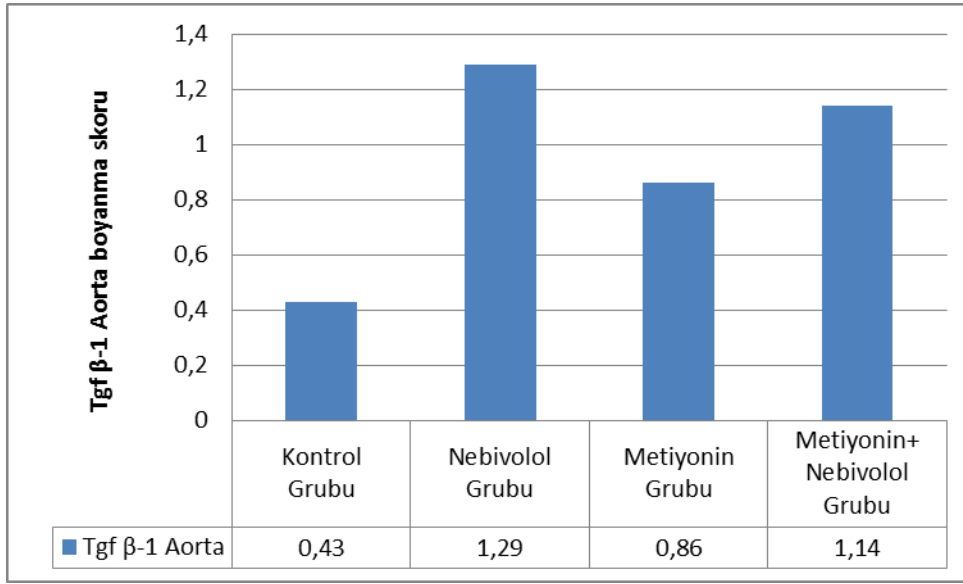


Resim 10: Metiyonin grubuna ait kalp dokusunun H&E boyası ile boyanması x200 lük görünümü, ok: nükleus kaybını, üçgen: kas liflerindeki dejenerasyonu göstermektedir (+3 dejenerasyon).



Resim 11: Metiyonin+nebivolol grubuna ait kalp dokusunun H&E boyası ile boyanması x100 lük görünümü, ok: nükleus kaybını, üçgen: kas liflerindeki dejenerasyonu göstermektedir (+2 dejenerasyon).

5.2.2. TGF β -1 Aorta



Şekil 21: Tgf β -1 aorta boyanma skoru ortalamaları.

Tablo XXVI: Grupların TGF β -1 aorta boyanma derecesi ortalamalarının kendi aralarında karşılaştırılmalarının p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar * ile işaretlenmiştir.

TGF β -1 Aorta	Kontrol Grubu	Nebivolol Grubu	Metiyonin Grubu	Metiyonin+ nebivolol Grubu
Kontrol Grubu	1	0,045*	1,000	0,145
Nebivolol Grubu	0,045*	1	1,000	1,000
Metiyonin Grubu	1,000	1,000	1	1,000
Metiyonin+ nebivolol Grubu	0,145	1,000	1,000	1

* p<0.05

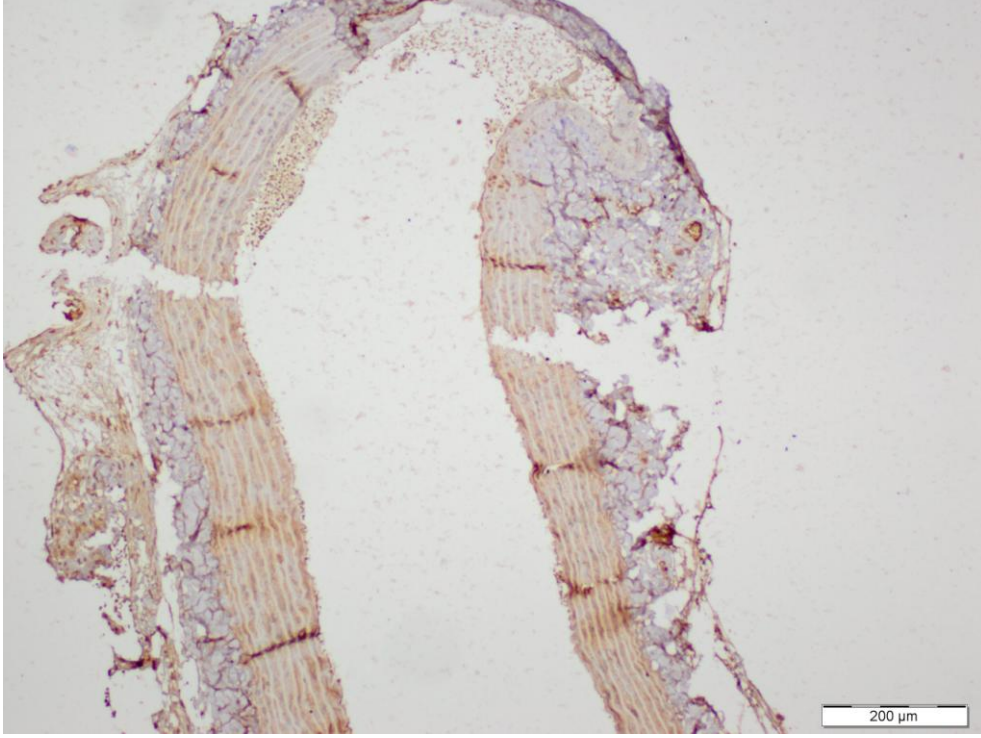
Kontrol grubu ile nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptandı (p: 0,045*). Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 1,000). Kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,145). Nebivolol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 1,000). Nebivolol grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 1,000). Metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 1,000).



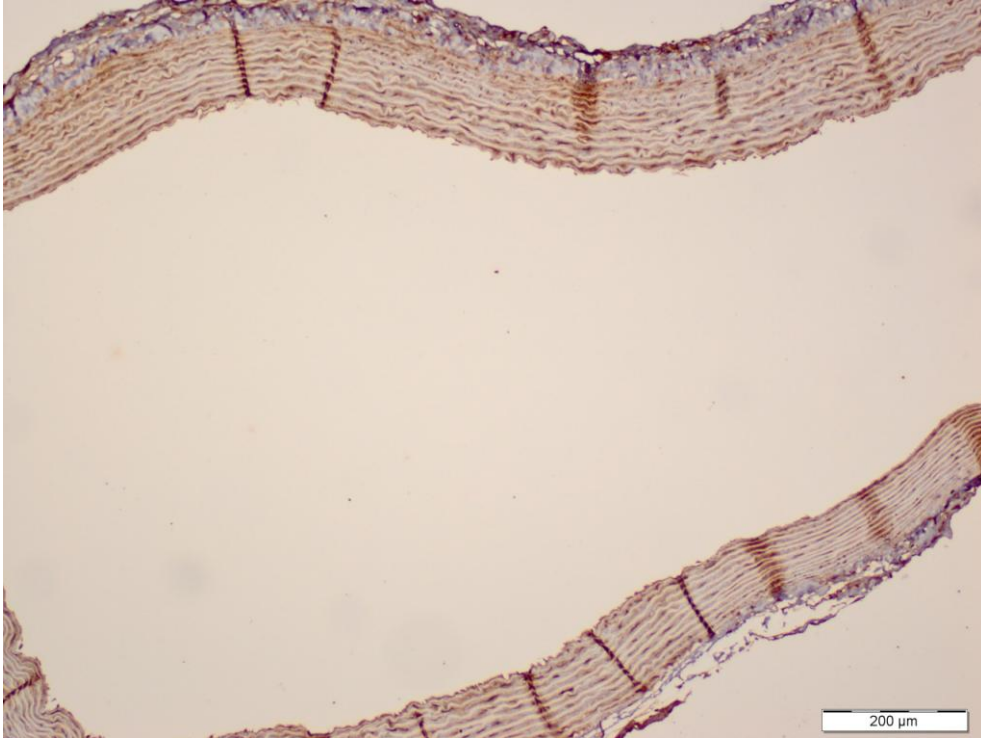
Resim 12: Kontrol grubuna ait torakal aorta dokusunun TGF β -1 ile boyanması x40 lık görünümü (boyanma skoru 0).



Resim 13: Nebivolol grubuna ait torakal aorta dokusunun TGF β -1 ile boyanması x200 lük görünümü (boyanma skoru +2).



Resim 14: Metiyonin grubuna ait torakal aorta dokusunun TGF β -1 ile boyanması x100 lük görünümü (boyanma skoru +1).



Resim 15: Metiyonin+nebivolol grubuna ait torakal aorta dokusunun TGF β -1 ile boyanması x100 lük görünümü (boyanma skoru +2).

6. TARTIŞMA

Ratlar üzerinde yaptığımız bu çalışmamızda literatürde ilk defa kısa dönem hiperhomosisteineminin yol açtığı endotel fonksiyon bozukluğunu nebivolol molekülü vererek önleyebileceğimizi biyokimyasal olarak gösterebildik. Ayrıca bildiğimiz kadarıyla ilk kez oral metiyoninden iki saat sonra aynı gün içinde bir defa verilen nebivololün Hcy seviyelerindeki yükselmeyi engelleyebileceğini gösterdik. Literatürde daha önce benzer bir çalışmanın yapılmamış olması çalışmamızı özgün kılmaktadır. Bulduğumuz biyokimyasal bulgular sonucunda kısa dönem hiperhomosisteineminin yol açtığı endotel fonksiyon bozukluğunu eş zamanlı başlanacak nebivolol molekülü ile önleyebileceğimizi düşünüyoruz.

Çalışmamızda histopatolojik bulgulara bakıldığında metiyonin verilen grupta daha fazla kardiyomiyosit dejenerasyonu saptandı. Fakat kısa dönemde metiyonin ile eş zamanlı nebivolol verilmesinin histopatolojik veriler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farka neden olmadığı görüldü.

Kükürtlü bir aminoasit olan Hcy diyetle alınmaz ve vücuttaki tek kaynağını esansiyel bir aminoasit olan metiyonin aminoasidinin demetilasyonu oluşturur (1,2). Hiperhomosisteinemde genetik bozukluklar yanında edinsel patolojiler de yer almaktadır. Ayrıca beslenme yetersizliğinden ve toksisiteden kaynaklanan hiperhomosisteinemi dikkati çekmektedir (7). Hiperhomosisteinemi plazmadaki Hcy seviyesinin 15 mmol/L den yüksek olmasına denir. Normal açlık plazma total Hcy konsantrasyonu 5-15 mmol/L olup, 15-30 mmol/L hafif derecede hiperhomosisteinemi, 30-100 mmol/L orta derecede hiperhomosisteinemi ve 100-500 mmol/L ağır derecede hiperhomosisteinemi olarak tanımlanır (5,6). Çalışmamızda metiyonin grubundaki ratlara literatürdeki benzer deney modellerinde kullanılan 1 g/kg/gün dozunda L-metiyonin 4 hafta süreyle her gün, günde bir kez orogastrik gavaj ile verildi (119,120). Çalışmamızda nebivolol grubundaki ratlara da literatürdeki çalışmalar taranarak güvenilirliği ve etkinliği denenmiş doz olan, 4 hafta süreyle orogastrik gavaj ile her gün, günde bir kez 10 mg/kg/gün nebivolol verildi (110,111). Cao ve ark. yapmış oldukları çalışmada 3 ay boyunca 1 g/kg/gün dozunda L-metiyonin intragastrik uygulama sonrasında hayvanlar sakrifiye edilmiş ve hiperhomosisteinemi grubunda 25.24 ± 7.23 mikromol/L Hcy düzeyleri elde edilmiş kontrol grubu ratlarda ise Hcy 4.04 ± 1.07 mikromol/L düzeyinde saptanmıştır. Gruplar arasında yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda $p < 0.001$ olarak anlamlı saptanmıştır (119). Çalışmamızda oral gavaj yolu ile

verdiğimiz 1 g/kg/gün L-metiyonin sonucunda ratlarda orta derecede hiperhomosisteinemi oluşturuldu. Metiyonin grubundaki ratların serumlarında $35,6286 \pm 7,60564$ mikromol/L düzeylerinde orta derecede hiperhomosisteinemi izlendi. Kontrol grubu ratlarda $7,6714 \pm 1,42912$ mikromol/L düzeylerinde Hcy seviyesi ölçüldü. Kontrol grubu ile metiyonin grubu karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı saptandı. 1 g/kg/gün dozunda metiyonin ile aynı gün içinde iki saat sonra 10mg/kg/gün dozunda nebivolol alan metiyonin+nebivolol grubunda $13,2857 \pm 2,12480$ mikromol/L düzeylerinde Hcy seviyesi ölçüldü. Bu grup metiyonin grubu ile karşılaştırıldığında Hcy seviyesi açısından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı. Bu sonuç metiyonin ile aynı gün içinde iki saat sonra nebivolol verildiğinde, nebivololün Hcy seviyesinin yükselmesini engelleyebileceğini düşündürmektedir. Bildiğimiz kadarıyla literatürde bu bulgumuzu destekleyecek daha önce yapılmış benzer bir çalışma yoktur.

Metiyonin ile aynı gün içinde verilen nebivololün Hcy düzeylerindeki artışı NO yolu ile engellemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Nebivolol etkisini L-arjinin/NO yolu üzerinden NO artışı ile vazodilatasyon yaparak göstermektedir (78,81-83). Ayrıca diğer beta blokerlerden farklı olarak Nebivolol β_3 reseptor agonistik etkisi ile eNOs aktivasyonu yaparak NO atışını sağlamaktadır (84). Bu sayede total antioksidan kapasiteyi artırmaktadır. Bizim çalışmamızda da Hcy seviyesi yüksek olan metiyonin grubu ratlarda en yüksek ADMA değerleri saptanmıştır. Kontrol grubu ratlarda $123,8286 \pm 28,50753$ ng/ml ADMA düzeyi saptanmıştır. Metiyonin grubundaki ratlarda $225,7000 \pm 42,22120$ ng/ml ADMA düzeyi saptanmıştır. Kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında ADMA düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmıştır. Burada metiyonin verilmesi ile oluşturduğumuz Hcy yükselmesinin endotel fonksiyon bozukluğu yaptığını ADMA üzerinden göstermiş olduk. NO'nın artışı ADMA'nın azalmasına neden olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca nebivolol, NO inhibitörlerini de ortadan kaldırarak endotel bağımlı vazodilatasyona katkı sağlamaktadır (85-87). ADMA'nın azalması, oksidatif stresin ve hücrel hasarının azalmasına neden olur. Bu sayede protein yıkımının artması engellenmiş olur ve organizmada protein sentezi devam eder. Protein sentezi sistine ihtiyaç duyar. Sistein yapısında fonksiyonel bir thiol grubu bulundurur. Tiyol gruplarının okside olmasıyla iki sistein arasında disülfid bağı meydana gelir. Disülfid bağlarını oluşturabilmesi sebebiyle sistein birçok proteinin üç boyutlu yapısının oluşturulmasında görev alır. Özellikle hücre dışında fazlaca fiziksel ve kimyasal etki altında kalan proteinlerin karmaşık yapılarını korumaları, bu disülfid köprüleri sayesinde olmaktadır (3,4). Organizmada

sistein ihtiyacı ortaya çıktığında sistein üretimi için Hcy transsülfürasyon yolu ile sistatyonin beta sentaz enzimi ile sistatyonine çevrilir. Ardından da sisteine hidroliz olur ve sistein idrar ile atılır veya protein sentezinde kullanılır (3). Ayrıca Hcy'nin metabolizmasına baktığımızda organizmada Hcy remetilasyon ve transsülfürasyon yolları ile metabolize edildiğini görmekteyiz (4). Remetilasyon reaksiyonları doyuma ulaştığında veya organizmada sistein ihtiyacı ortaya çıktığında transsülfürasyon yolları ile sisteine hidroliz olur (3). Ayrıca glutatyon sentezine de baktığımızda, γ -glutamil-sistein sentaz ve glutatyon sentaz enzimlerinin katalizledikleri ardışık reaksiyonlar ile glutatyonun, glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluştuğunu görmekteyiz. Burada sistein hız sınırlayıcı substrat olarak rol almaktadır (67). Yani sistein oluşumu için Hcy yıkılmakta ve serum düzeyinin artması engellenmektedir. Bu fizyolojik yollar Hcy metabolizmasını açıklamaktadır. Goel ve ark. yapmış olduğu fareler üzerindeki çalışmada nebivolol verilmesi ile doku glutatyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla yükselme olduğu saptanmıştır (142). Daha önceden de bahsettiğimiz gibi Hcy'nin transsülfürasyonu sonucu oluşan sistein glutatyon sentezinde kullanılmaktadır. Dolayısı ile bu fizyolojik yollar ve literatürde tam olarak ortaya konamamayan daha birçok yollar ile Hcy düzeylerindeki artışı nebivololün engellemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Bu alanda yeni hipotezlere ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Biz bu çalışmamızda endotel fonksiyon bozukluğu üzerine yoğunlaştık. Çünkü Hcy'in plazma seviyesinin yükseldiği durumlarda; endotel fonksiyon bozukluğu ile ilişkili arteriyel tromboz, miyokard infarktüsü, inme, venöz tromboz ve kronik renal yetersizlik oluşturduğu bilinmektedir. Endotel fonksiyon bozukluğunun bir göstergesi olarak ADMA'yı kullanmayı tercih ettik. Asimetrik dimetil arjinin, NO sentezini sağlayan NOs enziminin endojen yarışmalı inhibitörüdür. Yükselmiş ADMA seviyesi endotel disfonksiyonunun bir göstergesidir. Ayrıca kardiyovasküler mortalite ve morbiditeyi tahmin etmede de kullanılabilir. Endotel fonksiyon bozukluğu aterosklerozun erken evresini göstermektedir (33). Çalışmamızda ADMA sonuçlarının hiperhomosisteinemiye ikincil yükselmesinin endotel fonksiyon bozukluğu geliştiğine işaret etmektedir. Hcy vasküler düz kas hücreleri için aynı zamanda potent mitojenik etkiye sahiptir. Ayrıca Hcy, endotelden NOs salınımını ve NO oluşumunu azaltır. NO'nin endoteliyal üretiminin bozulması sonucu endotel, oksidatif hasara maruz kalır ve endotel fonksiyon bozukluğu oluşur. Ayrıca Hcy lipid peroksidasyonunu artırır. Böylece henüz endotel hasarı gelişmeden nebivolol vererek engellenen yüksek Hcy seviyeleri sayesinde yukarıda bahsettiğimiz patolojilere karşı teorik olarak nebivolol ile

primer koruma yapılabileceğini düşünmekteyiz. Literatürdeki çalışmalarda hiperhomosisteineminin ve bu patolojilerin önlenmesi için B12 vitamini, C vitamini, E vitamini ya da folik asit kullanılmış olup kısmi başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise nebivolol kullanılmıştır. Çalışmamız literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle diğer çalışmalardan ayrılmaktadır (121-125). Bu veriler ışığında hiperhomosisteinemiye ikincil endotel hasarı geliştikten sonra, nebivololün NO yolu üzerinden sağlayacağı olumlu etkiler ile sekonder korumada yeri olabileceğini düşünüyoruz. Zira üçüncü jenerasyon, yüksek selektiviteye sahip β 1-bloker olan nebivolol etkisini L-arjinin /NO yolu üzerinden vazodilatasyon yaparak göstermektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda endotel kaynaklı NO'nun nebivolol'un uyardığı vazodilatasyonda önemli rol oynadığını ortaya konmuştur (56). Nebivolol hücre proliferasyonunu azaltır. Nebivololün intima hasarını önlediği gösterilmiştir. Endotel hasarı sonrası oluşan intimal hiperplaziyi ve stenozun yeniden oluşumu ihtimalini de azalttığı bildirilmiştir (56).

ADMA ve Hcy'nin metabolizmaları arasında ortak yollar mevcuttur. Metiyoninden Hcy oluşumu sırasında S-Adenozil metiyonin metil grubu vericisi olarak kullanılır. Protein arjinin metil transferaz 1 ve 2 enzimleri ise SAM kullanır. ADMA iki metil grubu içerir. ADMA sentezi sırasında Hcy oluşur. Hcy protein yapıları destabilize eder. Oksidatif stresi artırarak protein parçalanmasını artırır. Hcy metillenmiş proteinlerden serbest ADMA'nın salınımını artırır. Dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz enzimi ADMA'yı metabolize eder. Hcy bu enzim aktivitesini de inhibe ederek ADMA konsantrasyonlarının artmasına neden olur. Choa ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada atrial fibrilasyonlu hastalarda baktıkları ADMA seviyesi ile ortaya çıkan kardiyovasküler ölüm ya da inme gibi istemeyen etkilerin ortaya çıkması arasında pozitif yönde bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (45).

Zoccali ve ark. insanlarda yapmış olduğu çalışmada plazma ADMA düzeylerindeki 2 mmol/L'lik artış kardiyovasküler hastalık riskini %37 artırdığı gösterilmiştir (46). Valkoven ve ark. yaptığı 150 kişiden oluşan orta yaş insanların alındığı bir çalışmada yüksek ADMA düzeylerinin, akut koroner olay riskini 3.9 kat artırdığı gösterilmiştir (44). Böger ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada metiyoninden zengin folatdan fakir hiperhomosisteinematik diyetle beslenen maymunlarda plazma ADMA ve Hcy düzeylerinin üç kat arttığı ortaya konmuştur (47). Ayrıca Böger ve ark. yapmış olduğu bir başka insan çalışmasında oral metiyonin yüklemesinden 8 saat sonra bakılan plazma ADMA ve Hcy konsantrasyonlarının arttığı, brakial arterden bakılan akım bağımlı dilatasyonun %80

oranında azaldığı tespit edilmiştir (48). Bütün bu çalışmalar, ADMA düzeyi ile endotel fonksiyon bozukluğu arasındaki yoğun ilişkiye ve ADMA'nın endotel fonksiyon bozukluğunun bir göstergesi olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda önemli bulgulardan birisi de kontrol grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında ADMA düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmamasıdır. Metiyonin+nebivolol grubu metiyonin almasına rağmen aynı gün içinde metiyoninden iki saat sonra nebivolol verilmesi ADMA seviyelerindeki artışı potansiyel olarak engellemiş olabilir. ADMA seviyelerinin artmaması, bu gruptaki Hcy'nin yükselmemesine bağlı olabilir. Çünkü Hcy ADMA'nın yıkılmasından sorumlu olan dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz enzimi inhibisyonuna neden olmaktadır. Hcy bu enzim aktivitesini inhibe ederek ADMA konsantrasyonlarının artmasına neden olur (62). DDAH enzimi inhibe olamayınca ADMA'nın yıkımını sağlayarak seviyesinin düşmesini sağladığını düşünmekteyiz. Ayrıca nebivololün, NO inhibitörlerini de ortadan kaldırarak endotel fonksiyonunun korunmasına ek katkı sağlamış olabilir (85-87).

ADMA düzeyleri açısından metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında saptanan anlamlı fark nebivololün, metiyoninin yol açabileceği ADMA seviyelerindeki artışı istatistiksel olarak anlamlı derecelerde yükselmesini engellenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızdaki bulgulara dayanarak Hcy seviyelerindeki artışının oksidatif stresi artırabileceğini düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışmada oksidatif stres ile katalaz seviyeleri arasında literatür ile uyumlu pozitif korelasyonda bulgular saptanmıştır. Literatüre baktığımızda Wyse ve ark. yapmış oldukları çalışmada Hcy uygulamasının ratlarda katalaz aktivitesinde azalmalara neden olmuştur (125). Çalışmamızda da metiyonin alan grupta katalaz aktivitesi anlamlı düzeyde azalmıştır. Katalaz düzeyleri açısından metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır. Metiyonin+nebivolol grubu metiyonin almasına rağmen, aynı gün içinde iki saat sonra nebivolol verildiğinde, katalaz seviyelerindeki azalmayı engelleyebileceğini göstermiş olduk. Bu bulgu metiyonin ile birlikte verilen nebivololün hiperhomosisteinemiye engellemesi ile veya nebivololün yol açtığı NO artışı nedeni ile gerçekleşmiş olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca hiperhomosisteineminin neden olacağı oksidatif stresin engellenmesinin de bu bulguya katkı sağlamış olabileceğini düşünüyoruz. Literatürde de Akçay ve ark. koroner yavaş akım hastalarında yaptıkları insan

deneyinde altı ay süreyle nebivolol tedavisi verilmesinin katalaz seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (141).

Dimitrova ve ark. yapmış olduğu çalışmada diyetlerinde Hcy bulunan ratların miyokardiyal glutatyon düzeyinin önemli derecede azaldığı gösterilmiştir (126). Çalışmamızda da metiyonin alan grupta literatür ile uyumlu bir şekilde glutatyon seviyesi diğer gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu fark metiyonin grubunda hiperhomosisteineminin oluşturduğu oksidatif stresin bir bulgusu olarak yorumlanabilir. Glutatyon düzeyleri açısından metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında saptanan anlamlı fark nebivololün, hiperhomosisteinemiye önlemesine bağlı gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca nebivololün total oksidan stresi azaltmasına da bağlı gerçekleşmiş olabilir. Goel ve ark. yapmış olduğu fareler üzerindeki çalışmada nebivolol verilmesi ile beyin doku glutatyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla yükselme olduğu saptanmıştır (142). Zira daha önceden de bahsettiğimiz gibi Hcy'nin transsülfürasyonu sonucu oluşan sistein glutatyon sentezinde kullanılmaktadır.

NO kısa yarı ömürlü bir gazdır. NO'nun dokuda, 10-60 saniyelik yarı ömrü vardır. NO, küçük bir molekül olması nedeniyle hücre zarlarından serbestçe difüze olabilir. Daha sonra nitrite parçalanır. NO seviyelerine baktığımızda çalışmamızda örneklerin toplanması ve çalışılmasında azami ilgi gösterilmiş olmasına rağmen NO verilerinde çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edemedik. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında Akçay ve ark. koroner yavaş akım hastalarında yaptıkları insan deneyinde altı ay süreyle nebivolol tedavisi verilmesinin NO seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (141) Tzemos ve ark. yapmış olduğu çalışmada nebivolol esansiyel hipertansiyonu olan hastalarda bazal ve uyarılmış endotelial NO salınımını artırdığı gösterilmiştir (94). Broeders ve ark. yapmış olduğu ratlardan alınan torakal aorta dokusunun organ banyosu çalışmasında nebivololün karaciğerde oluşan metabolitlerinin β 2-adrenerjik reseptörler vasıtasıyla NO üretimini artırdığı bulunmuştur (91). Cominacini ve ark. yaptığı hücre kültürü çalışmasında hem nebivolol hem de karaciğerde oluşan 4-keto metabolitlerinin oksidan ürünlerin yıkımını uyarmak yoluyla NO üretimini artırdıkları rapor edilmiştir (92). Ayrıca diğer beta blokerlerden farklı olarak Nebivolol β 3 reseptor agonistik etkisi ile eNOs aktivasyonu yaparak NO atışını sağlamaktadır (84).

Antioksidan moleküllerden biri olan glutatyon peroksidaz düzeyleri açısından literatüre baktığımızda Gilad ve ark. tarafından yapılan Hcy'in peroksinitritlere karşı

etkilerinin araştırıldığı çalışmalarında, Hcy'in hem glutatyon peroksidaz aktivitesini inhibe ettiği hem de glutatyon peroksidaz enziminin m-RNA'sını azalttığını ortaya koymuşlardır (127). Dayal ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada yüksek miktarda metiyonin içeren diyetle beslenen farelerde total plazma Hcy düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ve glutatyon peroksidaz enzim azalmasının oluştuğunu bildirmişlerdir (128). Glutayon peroksidaz seviyelerine baktığımızda kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark saptandı. Bu fark hiperhomosisteinemi nedeniyle oluşan oksidan stres nedeniyle glutatyon peroksidazın aşırı kullanılmasına bağlı gerçekleşmiş olabilir. Bir diğer önemli bulgu da metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında glutatyon peroksidaz seviyeleri açısından anlamlı fark bulunmasıdır. Bu fark iki grup arasındaki Hcy seviyelerindeki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği gibi nebivololün total antioksidan kapasite üzerine olan olumlu etkileri nedeniyle de gerçekleşmiş olabilir.

Malondialdehit miktarının artması, hücre hasarının ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilebilir (65,66). Literatüre baktığımızda Yüce ve ark. tarafından yapılan hiperhomosisteinematik ratlarda E vitaminin etkisinin araştırıldığı çalışmalarında, hiperhomosisteinematik ratlarda MDA seviyelerinin yükseldiğini ortaya koymuşlardır (129). Çalışmamızda da metiyonin alan grupta literatür ile uyumlu bir şekilde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyesi anlamlı düzeyde artmıştır. Bu fark yüksek Hcy düzeylerinin yol açmış olabileceği oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Ayrıca metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptadık. Metiyonin grubunda daha yüksek MDA seviyeleri saptandı. Literatürde de çalışmamızla uyumlu veriler bulunmaktadır. Akçay ve ark. koroner yavaş akım hastalarında yaptıkları insan deneyinde, altı ay süreyle nebivolol tedavisi verilmesinin MDA seviyelerini azalttığını göstermiştir (141). Çalışmamız metiyonin ile aynı gün verilecek nebivololün total antioksidan kapasiteyi artırarak MDA seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecelerde artmasını engelleyebileceğine işaret etmektedir. Bu etkide nebivolol ile Hcy seviyelerinin yükselmesinin engellenmesinin de rolü olabileceğini düşünüyoruz.

Antioksidan bir molekül olan glutayon redüktaz için literatüre baktığımızda Gubandru ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, alzheimer hastalarında ADMA ve Hcy seviyelerinin yükseldiğini ve glutatyon redüktaz ile total antioksidan kapasitenin azaldığını ortaya koymuşlardır (130). Çalışmamızda da metiyonin alan grupta literatür ile uyumlu bir şekilde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, glutayon redüktaz seviyesi anlamlı düzeyde

azalmıştır. Metiyonin grubunda GR seviyesi metiyonin+nebivolol grubuna göre düşük saptanmış olsa da bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır.

Antioksidan bir molekül olan süperoksit dismutaz açısından literatüre baktığımızda Yamamoto ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, Hcy'in SOD enziminin etkinliğini azalttığını ve SOD'nin endotel hücre yüzeyine bağlanmasını sağlayan endotelial heparan sülfat proteoglikanını bozduğunu dolayısıyla endotel hücre yüzeyine SOD'nin bağlanmasını engellediğini, fibroblastlarca salınan SOD ekspresyonunu azalttığını ve endotel hücrelerinin serbest radikallere karşı savunma yeteneğinin azalmış olduğunu ortaya koymuşlardır (131). Çalışmamızda da metiyonin alan grupta literatür ile uyumlu bir şekilde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, süperoksit dismutaz seviyesi anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu fark yüksek Hcy düzeylerine ikincil artan oksidatif stres nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca Akçay ve ark. koroner yavaş akım hastalarında yaptıkları insan deneyinde, altı ay süreyle nebivolol tedavisi verilmesinin SOD seviyelerini artırdığını göstermiştir (141). Çalışmamızda SOD düzeyleri açısından metiyonin grubunda, gruplar arasındaki en düşük seviyeler saptanmasına rağmen istatistiksel olarak metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

Histopatolojik bulgulardan sadece kardiyomiyosit dejenerasyonu ve Tgf β -1 aorta boyanma gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanabildi. Bunun nedeninin çalışmamızın dört hafta gibi doku çalışmaları için kısa sayılabilecek bir sürede yürütülmüş olması olabileceğini düşünüyoruz. İleri istatistiksel analizler bu gruplara uygulandı. Verhoeff'un elastik boyası ile tüm preparatlarda normal boyanmanın olması nedeniyle bu gruplar analize dahil edilmedi. Patolojik açıdan bakıldığında literatürdeki diğer çalışmalarda incelendiğinde dokularda histopatolojik değişikliklerin izlenmesi için daha uzun süre hiperhomosisteinemiye maruziyetin gerektiğini düşünüyoruz (132). Bu çalışmamızda tüm histopatolojik bulguların gruplarda daha açık ortaya konabilmesi için dört haftalık bir sürenin yetmeyeceğini göstermiş olduğumuzu düşünüyoruz.

Kardiyomiyosit dejenerasyonu açısından literatürü incelediğimizde Zivkovic ve ark. yapmış oldukları çalışmada ratların kalbini diseke ettiklerini ve organ banyosuna alarak bir deney modeli tasarladıklarını görmekteyiz. Deneylerinde rat kalbine uyguladıkları akut Hcy perfüzyon uygulaması ile sol ventrikül fonksiyonlarında bozulma (kardiyotoksik etki) elde ettiklerini göstermişlerdir (135). Bunun mekanizması olarak artan Hcy'nin NO biyoaktivitesini baskılaması ve endotel fonksiyon bozukluğu yapması ve total oksidan

kapasiteyi artırarak oluşturduğu toksik etki olarak yorumlamışlardır. Bizde bulgularımızın ortaya çıkmasında aynı mekanizmaların rol oynadığını düşünüyoruz. Kardiyomiyosit dejenerasyonu açısından kontrol grubu ile metiyonin grubu arasında anlamlı fark gözlemledik. Yaptığımız çalışma ile hiperhomosisteineminin dört haftada kardiyomiyosit hücrelerinde dejenerasyon meydana getirebileceğini gösterdiğimizi düşünüyoruz. Literatürde konuyla ilgili olarak Moshal ve ark. ratlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada hiperhomosisteineminin miyosit kasılmasını azalttığını metalloproteinazlar üzerinden ortaya koymuşlardır (133).

Chen ve ark. ratlar üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında 4 hafta süreyle ratlara 1 g/kg gün L-metiyonin uygulamışlar ve deney sonunda önce ratları ekokardiyografi ile değerlendirmişler ve hiperhomosisteinematik ratların sistolik fonksiyonlarında azalma saptamışlardır. Ardından ratların kalplerinde yaptıkları analizlerde kardiyomiyosit çaplarında artış ve hücreler arası mesafede fibrozis artışı olduğunu göstermişlerdir (134). Çalışmamızda kardiyomiyosit dejenerasyonu metiyonin grubunda en çok saptanmasına rağmen bu fark metiyonin+nebivolol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. Çalışmamızda bu etkiyi gösterme açısından nebivolol dozu düşük gelmiş veya denek sayısı yeterli olmamış olabilir.

Tgf- β ile ilgili bilgiler literatürde tam olarak aydınlatılamamıştır. Tgf- β 'nın görevi büyüme inhibisyonu olduğu düşünülmektedir. Tgf- β 'nın reseptörüne bağlanması ile siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin uyarılmasıyla hücrede büyüme önleyici gen ürünleri sentezlenir. Tgf- β reseptörlerinin inaktive ya da mutant olduklarında kolon ya da pankreatik tümörler izlenebilmektedir (101). Tgf- β epitelyal, endotelyal ve hematopoetik hücrelerde potent bir proliferasyon inhibitörüdür (102). Tgf- β aynı zamanda enflamasyon karşıtı bir sitokindir (103). Ayrıca Tgf- β kollajen, proteoglikan ve fibronektin üretiminin artışına neden olur. Bu özellikleri ile Tgf- β doku iyileşmesinde skar oluşumunda görev alır. Kronik enflamasyon sürecinde ise akciğer, karaciğer ve böbrek gibi organlarda fibrozis gelişiminden sorumludur (103). Görüldüğü gibi Tgf- β hem hücre proliferasyonunu önleyici bir sitokin hem de fibrotik süreçte rol alan bir sitokin olarak rol almaktadır. Literatürde nebivololün ve Hcy'nin Tgf- β üzerine olan etkisini inceleyen az sayıda çalışma olup çeşitli yorumlar yapılmıştır. Nebivololün antioksidan kapasiteyi artırması ve endotel fonksiyonunu koruması yoluyla fibrozisi önleyici etkisi olması nedeniyle Tgf β -1'i azalttığını rapor eden çalışmalar (85,136,137) ile nebivololün Tgf- β 'yı etkilemediğini rapor eden çalışmalar mevcuttur (138).

2013 yılında Ceron ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada ratların renal arteri klipslenerek hipertansiyon modeli oluşturulmuştur. Operasyondan 6 hafta sonra ratlara 10/mg/kg/gün dozuyla nebivolol 4 hafta boyunca uygulanmış ve çalışmanın sonunda Nebivolol'un TGF- β , matriks metalloproteinaz 2 ve 9 azalması yaparak prooksidan ve profibrotik süreci önleyebildiğini immunfloresan incelemelerle gösterebilmişlerdir (85).

Toblli ve ark. yaptığı çalışmalarda TGF β -1 profibrotik olarak değerlendirilmiş zucker diabetik yağlı ratlarda yaptıkları çalışmalarında nebivololün TGF β -1 azalttıklarını ve fibrozisi önlediğini göstermişlerdir (136,137).

Nebivolol'un hücre çoğalmasını önlediğini Brehm ve ark. yaptıkları hücre kültür çalışmalarında göstermiş bu etkisinin endotelin-1 sekresyonunun azalmasına bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir (97).

Peters ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada nebivololün veya metaprololün TGF- β üzerine bir etkisinin olmadığını enalaprilin TGF- β 'nın azalması üzerine etki ettiğini düşünmüşlerdir (138). Bizim yaptığımız çalışmada ise kontrol grubu ratlarda TGF β -1 aorta boyanma skoru ortalaması $0,43 \pm 0,535$ iken nebivolol grubu ratlarda $1,29 \pm 0,488$ olarak saptandı. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Tgf β -1'in proliferasyonu inhibe ettiği düşünüldüğünde nebivololün Tgf β -1'i artırması mantıklı görülebilir. Fakat nebivololün total antioksidan kapasite üzerine olan olumlu etkisinden dolayı fibrozisi önlemesi gerektiği düşünüldüğünde, fibrozis ile ilişkili olduğu öne sürülen Tgf β -1 düzeylerinde nebivolol alan grupta saptadığımız artışı yorumlamak güçleşmektedir. Sonuç olarak çalışmamızda bazı literatür verilerinden farklı olarak nebivololün Tgf β -1'i artırdığını gözlemledik.

Toborek ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada altı-dokuz ay süre boyunca diyetlerinde metiyonin verilen tavşanların aortlarında yapılan histolojik kesitlerinde intimal kalınlaşma, kolesterol depositleri, kalsifikasyonlar gibi tipik aterosklerotik değişikliklerin olduğunu saptamışlardır (132). Chen ve ark. yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise ratların karotis arterleri balon ile dilate edildikten sonra ratlara 14 gün boyunca pompa vasıtasıyla periton içi devamlı Hcy uygulamaları sonucu karotid arterlerde intimal hiperplaziye ve hücre proliferasyonuna sebep olduğunu ortaya koymuşlardır (139). Tsai ve ark. insanlarda yaptıkları bir çalışmada 55 yaş üstü insanlarda plasma Hcy seviyesi yüksekliği ile karotis arter duvar kalınlığı artışının pozitif yönde ilişkili olduğunu bunun da muhtemel sebebinin Hcy'in vasküler düz kas hücre büyümesini artırması olduğunu ortaya koymuşlardır (140).

Hiperhomosisteineminin oksidan hasar aracılığıyla endotel fonksiyonlarını bozarak fibrozisi tetiklediğini ve yüksek Hcy seviyelerinin Tgf β -1'i artırdığını rapor eden çalışmalar mevcuttur (143,144). Buna karşın, hiperhomosisteineminin Tgf β -1'i etkilemediğini rapor eden çalışmalar da mevcuttur (145).

Raaf ve ark. yaptıkları çalışmada ratlara metiyonin verilmesi ile sağlanan hiperhomosisteineminin miyosit hücrelerinde fibrozis yaptığını ve ventriküler kardiyomiyositlerde hipertrofiye neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca hiperhomosisteinematik ratlarda Tgf β -1'in yükseldiğini ortaya koymuşlardır (143).

Sen ve ark. yaptığı çalışmada in vitro koşullarda fare aortik endotel hücre kültürü kullanmışlar ve hiperhomosisteineminin Tgf β -1'in yükselttiğini ortaya koymuşlardır (144). Bu durumun yüksek Hcy düzeylerinin neden olduğu oksidatif stres kaynaklı enflamatuvar olayları takiben olan endotel hasarı ve fibrozisin neden olduğunu düşünmüşlerdir (144).

Solini ve ark. yaptıkları çalışmada sağlıklı insanlardan alınan deri örneklerinden elde edilen fibroblast kültürlerinde, hiperhomosisteineminin Tgf β -1'i etkilemediğini gözlemlemişlerdir (145).

Çalışmamızda grupların TGF β -1 aorta boyanma skoru ortalamaları kendi aralarında karşılaştırıldığında, metiyonin grubu ile metiyonin+nebivolol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Nebivolol verilmesi ile TGF β -1 aorta boyanma skorunun artmasını tek bir mekanizma ile açıklamak ise mümkün görünmemektedir. Literatürde de halen bu karışıklığın devam ettiği, bu alanda yeni hipotezlere ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Öte yandan çalışmamızdaki bulguların bu şekilde sonuçlanmasının denek sayısının az olması, verilerin normal dağılmaması, çalışma süresinin nispeten kısa olması veya uygulanan nebivolol dozunun belki de göreceli olarak az olması gibi nedenlerle ilgili olabileceği düşünülebilir. Patolojik anlamda değişikliklerin gerçekleşebilmesi için daha uzun süre ile hiperhomosisteinemiye maruziyetin gerekliliği söz konusu olabilir. Histopatolojik değişikliklerin daha sağlıklı değerlendirilebilmesi için daha büyük ölçekli ve uzun süreli çalışmaların yapılması gerekli olabilir.

7.SONUÇ

Hiperhomosisteinemi hayatımızda dış etkenlere maruziyet nedeniyle, ilaç kullanımı nedeniyle veya genetik nedenlerden dolayı oluşan ciddi bir kardiyovasküler risk faktörüdür. Hiperhomosisteineminin getireceği endotel fonksiyon bozukluğu ciddi bir mortalite ve morbidite nedenidir. Hiperhomosisteineminin neden olduğu endotel fonksiyon bozukluğunu önlemek amacıyla vitamin ve farmasotik ajanlar kullanılarak bir çok çalışma yapılmıştır. Endotel fonksiyon bozukluğunu önlemek halk sağlığı açısından önem arzirmektedir.

Ratlar üzerinde yaptığımız bu çalışmamızda literatürde ilk defa kısa dönem hiperhomosisteineminin yol açtığı endotel fonksiyon bozukluğunu nebivolol molekülü vererek önleyebileceğimizi biyokimyasal olarak gösterebildik. Ayrıca bildiğimiz kadarıyla ilk kez oral metiyonin ile aynı gün içinde iki saat sonra verilen nebivololün Hcy seviyelerindeki yükselmeyi engelleyebileceğini gösterdik. Literatürde daha önce benzer bir çalışmanın yapılmamış olması çalışmamızı özgün kılmaktadır. Bulduğumuz biyokimyasal bulgular sonucunda kısa dönem hiperhomosisteineminin yol açtığı endotel fonksiyon bozukluğunu eş zamanlı başlanacak nebivolol molekülü ile önleyebileceğimizi düşünüyoruz. Çalışmamızda histopatolojik bulgulara bakıldığında metiyonin verilen grupta daha fazla kardiyomiyosit dejenerasyonu saptandı. Fakat kısa dönemde nebivolol verilmesinin histopatolojik veriler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farka neden olmadığı görüldü. Bu sonuçların genellenebilmesi için ayrıca histopatolojik değişikliklerin daha açık ortaya konabilmesi için daha uzun süreli ve daha fazla sayıda hayvanın kullanılacağı klinik çalışmaların gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

8.ÖZET

Başlık: Ratlarda Kısa Dönem Hiperhomosisteineminin Yol Açtığı Endotel Disfonksiyonu Üzerine Nebivololün Histopatolojik ve Biyokimyasal Etkileri

Giriş Ve Amaç: Homosistein vasküler düz kas hücreleri için potent mitojenik etkiye sahiptir. Ayrıca homosistein, endotelial nitrik oksit sentaz salınımını ve nitrik oksit oluşumunu azaltır. Nitrik oksidin endotelial üretimini bozulması sonucu endotel, oksidatif hasara maruz kalır ve endotel disfonksiyon oluşur. Ayrıca homosistein lipid peroksidasyonunu artırır.

Üçüncü jenerasyon yüksek selektiviteye sahip β 1-bloker olan Nebivolol etkisini L-arjinin/NO yolu üzerinden vazodilatasyon yaparak göstermektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda endotel kaynaklı NO'nin, nebivolol'un uyardığı vazodilatasyonda önemli rol oynadığı ortaya konmuştur. Nebivolol hücre proliferasyonunu azaltır. Nebivolol intima hasarını önler. Endotel hasarı sonrası oluşan intimal hiperplaziyi ve stenozun yeniden oluşumu ihtimalini de azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, nebivololün endotel disfonksiyonunu önleyici etkisini, ratlardan alınan kalp ve torakal aortlarındaki patoloji kesitleri ile kan serumlarından yapılan biyokimyasal analizlerinden elde edilecek olan sonuçlar ile ortaya çıkarmayı amaçladık.

Gereç Ve Yöntem: Erkek wistar albino cinsi ratlar rastgele ve eşit sayıda (n=7) olarak 4 gruba ayrıldı.

1) Kontrol Grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 4 hafta süreyle herhangi bir medikasyon uygulanmadı. Aynı orogastrik gavaj stresini yaşamaları amacıyla ratlara orogastrik gavaj ile her gün, günde bir kez 1ml içme suyu verildi.

2) Nebivolol grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 4 hafta süreyle orogastrik gavaj ile her gün, günde bir kez 10 mg/kg/gün nebivolol verildi.

3) Metiyonin grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 4 hafta süreyle orogastrik gavaj ile her gün, günde bir kez 1gr/kg/gün metiyonin verildi.

4) Metiyonin+nebivolol grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 4 hafta süreyle orogastrik gavaj ile her gün, günde bir kez 1gr/kg/gün metiyonin, ve aynı gün içinde iki saat arayla 4 hafta süre ile günde bir kez 10 mg/kg/gün nebivolol verildi.

Çalışma başlamadan önce ratların ağırlıkları ölçüldü. Sıçanların beslenmesinde tüm gruplarda standart rat besini ve şehir içme suyu ratların serbest erişimine açık olarak çalışma boyunca sınırlama olmadan kullanıldı. İlaç doz ayarlaması yapmak için her hafta ratların ağırlıkları ölçülerek her rat için verilecek ilaç miktarları belirlendi. Hiperhomosisteinemi sağlamak için L-metiyonin (M9625 Sigma-Aldrich L-Methionine reagent grade, $\geq 98\%$ (TLC)) ph'ı 7,4 olan fosfat tampon (PBS)'da çözünerek ratlara 4 hafta boyunca her gün 1g/kg doz oral gavaj yoluyla verildi. Nebivolol ise Abdi İbrahim firmasının ürettiği Nexivol 5 mg hazır tabletler ezilerek %10 dimetilsülfoksit ile çözünerek 4 hafta boyunca her gün 10mg/kg doz oral gavaj yoluyla verildi. Çalışmanın sonunda ratlar eter anestezi altında sakrifiye edilerek kan örnekleri EDTA'lı hemogram ve düz biyokimya tüplerine alındı. Ardından ratların aorta ve kalbi diseke edilerek histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler için %10 formaldehid solüsyonuna kondu.

Bulgular: Çalışmamızda metiyonin verilen grupta anlamlı düzeyde hiperhomosisteinemi saptandı. Bu bulguya paralel olarak biyokimyasal analizlerde antioksidan moleküller olan katalaz, glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz seviyelerinde azalma ile oksidan moleküller olan ADMA, homosistein ve MDA seviyelerinde artış gözlemlendi. Metiyonin ile beraber nebivolol verilen grupta ise antioksidan moleküller olan katalaz, glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz seviyelerinde azalmanın önlemediği ve oksidan moleküller olan ADMA, homosistein ve MDA seviyelerinde artışın engellendiği gözlemlendi. Metiyonin ile beraber nebivolol verilen grup ile metiyonin alan grup istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında biyokimyasal olarak glutatyon redüktaz ve SOD sonuçlarının karşılaştırılmalarında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diğer tüm biyokimyasal verilerin karşılaştırılmalarında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Histopatolojik bulgulardan sadece kardiyomiyosit dejenerasyonu ve Tgf β -1 aorta boyanma gruplarında, istatistiksel olarak gruplar arası fark saptadı. Fakat metiyonin ile beraber nebivolol verilen grup ile Metiyonin alan grup istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç: Ratlar üzerinde yaptığımız bu çalışmamızda literatürde ilk defa kısa dönem hiperhomosisteineminin yol açtığı endotel fonksiyon bozukluğunu nebivolol molekülü vererek önleyebileceğimizi biyokimyasal olarak gösterebildik. Ayrıca bildiğimiz kadarıyla ilk

kez oral metiyonin ile aynı gün içinde iki saat sonra verilen nebivololün Hey seviyelerindeki yükselmeyi engelleyebileceğini gösterdik. Literatürde daha önce benzer bir çalışmanın yapılmamış olması çalışmamızı özgün kılmaktadır. Bulduğumuz biyokimyasal bulgular sonucunda kısa dönem hiperhomosisteineminin yol açtığı endotel fonksiyon bozukluğunu eş zamanlı başlanacak nebivolol molekülü ile önleyebileceğimizi düşünüyoruz. Çalışmamızda histopatolojik bulgulara bakıldığında metiyonin verilen grupta daha fazla kardiyomiyosit dejenerasyonu saptandı. Fakat kısa dönemde nebivolol verilmesinin histopatolojik veriler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farka neden olmadığı görüldü. Bu sonuçların genellenebilmesi için ayrıca histopatolojik değişikliklerin daha açık ortaya konabilmesi için daha uzun süreli ve daha fazla sayıda hayvanın kullanılacağı klinik çalışmaların gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Hiperhomosisteinemi, nebivolol, asimetrik dimetilarjinin, nitrik oksit, antioksidan, endotel disfonksiyonu, kardiyomyosit dejenerasyonu, histopatoloji, malondialdehit, glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz, katalaz, transforming büyüme faktör beta-1, vasküler endotelial büyüme faktörü.

İletişim adresi: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Merkez/Aydın, Tel:05352013420

9. SUMMARY

Title: Histopathological and Biochemical Effects of Nebivolol on Short Term Hyperhomocysteinemia Induced Endothelial Dysfunction in Rats.

Objective: Homocysteine has a potent mitogenic effect on vascular smooth muscle cells. Additionally homocysteine, decreases endothelial derived nitric oxide synthase and nitric oxide formation. As a result of degradation the endothelial production of nitric oxide, endothel is subjected to oxidative stress and endothelial dysfunction occurs. Also homocysteine increases lipid peroxidation.

Nebivolol which is highly selective third generation β_1 -boker, shows its effect by vasodilatation, through L-arginine/NO pathway. Endothelial derived NO plays an important role on nebivolol induced vasodilation, has been shown in the experimental studies. Nebivolol reduces cell proliferation. Nebivolol prevents intima against damages. Nebivolol reduces intimal hyperplasia and the possibility of restenosis which occurs after endothelial injury. In this study, we aimed to uncover the nebivolol's inhibitor effect on endothelial dysfunction, with pathology sections whichs are taken from rats' heart and thoracic aorta, and biochemical analysis results of blood serum.

Materiel And Method: Male wistar albino rats were divided into 4 groups randomly and equally (n=7).

1) Control Group (n=7): The animals in this group, did not receive any medication for 4 weeks. Every day, once a day we gave 1 ml drinking water by orogastric gavage.

2) Nebivolol Group (n=7): The animals in this group, 10 mg/kg/day nebivolol was given by orogastric gavage every day, once a day, for 4 weeks.

3) Methionine group (n=7): The animals in this group, 1gr/kg/day methionine was given by orogastric gavage every day, once a day, for 4 weeks.

4) Methionine+nebivolol group (n=7): The animals in this group, 1gr/kg/day methionine and 10 mg/kg/day nebivolol was given at the same day two hours later by orogastric gavage every day, once a day, for 4 weeks.

Before the study begins, weights of rats were measured. Throughout the study, in all groups of rats were fed by standard rat silage and urban drinking water without limitation. For drug dosage adjustment, weights of the rats were measured every week. And then the amount of drug was determined for each rat. L-methionine (M9625 Sigma-Aldrich L-Methionine reagent grade, $\geq 98\%$ (TLC)) which dissolved in pH 7.4 phosphate buffer solution, was given 1gr/kg/day dosage by orogastric gavage every day, once a day, for 4 weeks. Nebivolol was obtained from Nexivol ready tablets which was produced by Abdi Ibrahim Company. And then dissolved in 10% dimethylsulfoxide solution. Nebivolol was given 10mg/kg/day dosage by orogastric gavage every day, once a day, for 4 weeks. At the end of the study, rats were sacrificed under ether anesthesia, and then blood samples were taken in EDTA hemogram tubes and flat biochemistry tubes. Then the rat aorta and heart were dissected and placed in 10% formaldehyde solution for histochemical and immunohistochemical examination.

Results: In our study hyperhomocysteinemia was found to be significantly in the group which received methionine. In line with this finding in the biochemical analysis of antioxidants catalase, glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase levels were decreased and oxidants ADMA, homocysteine and MDA levels were increased. The animals in the group, which was given methionine and nebivolol at the same time, antioxidant catalase, glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase levels were observed decrease and oxidant ADMA, homocysteine and MDA levels were observed increase. When we make comparison of the animals in the group, which was given methionine and nebivolol at the same time and the animals in the group which was given methionine only, the difference of the Glutathione reductase and SOD results was not statistically significant. All other comparison of biochemical results were obtained statistically significant. From the histopathological findings, only in TGF β -1 aorta staining groups and the cardiomyocyte degeneration groups, were detected statistically significant differences between the groups. But when we make comparison of the animals in the group, which was given methionine and nebivolol at the same time and the animals in the group which was given methionine only, the difference of results was not statistically significant.

Conclusion: In this study which was done on the rats, we were able to shown biochemical results that we could avoid from short-term hyperhomocysteinemia induced endothelial dysfunction by giving nebivolol molecule, for the first time in the literature.

In addition, for the first time we showed nebivolol may prevent from increase in Hcy levels, if we gave oral methionine with nebivolol in two hours later on the same day. Previously in the literature to the absence of a similar study makes our work unique. We believed that we can avoid from short-term hyperhomocysteinemia induced endothelial dysfunction by giving nebivolol molecule based on our biochemical findings. When we compared histopathological findings in our study, cardiomyocyte degeneration was observed more in the methionine group. But in the short term administration of nebivolol, did not cause a statistically significant difference on histopathological findings. We believe that more clinical trials which will use more rats and long treatment periods are needed in order to generalize these results, also revealed histopathological changes clearly.

Keywords: Hyperhomocysteinemia, nebivolol, asymmetric dimethyl arginine, nitric oxide, antioxidant, endothelial dysfunction, cardiomyocyte degeneration, histopathology, malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase, transforming growth factor beta-1, vascular endothelial growth factor.

Contact address: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Merkez/Aydın, Phone:00905352013420

10. KAYNAKLAR

1. McRae MP. Betaine supplementation decreases plasma homocysteine in healthy adult participants: a meta-analysis. *J Chiropr Med*. 2013 Mar;12(1):20-5.
2. Obeid R. The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients*. 2013 Sep 9;5(9):3481-95.
3. Audelin MC, Genest J. Homocysteine and cardiovascular disease, in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2001 Dec;159(2) : 497-511.
4. Aydoğdu M, Erkan T, Uzun H, Aydın S, Doğan Y, Çokuğraş F, Kutlu T, Gülcan M, Erginöz E, şenyün O. Portal hipertansiyonda serum leptin ve homosistein düzeylerinin anlamı ve antropometrik değişkenler ile ilişkisi. *Türk Ped. Arş*. 2007; 42: 17-23.
5. Cook JW, Taylor LM, Orloff SL, Landry GJ, Moneta GL, Porter JM. Homocysteine and arterial disease-Experimental mechanisms. *Vascular Pharmacology* 2002; 38(5): 293-300.
6. Das UN. Folic acid says NO to vascular disease. *Nutrition* 2003; 19: 686-692.
7. Manavifar L, Nemati Karimooy H, Jamali J, Talebi Doluee M, Shirdel A, Nejat Shokohi A, Fatemi Nayyeri M. Homocysteine, Cobalamin and Folate Status and their Relations to Neurocognitive and Psychological Markers in Elderly in Northeasten of Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2013 Jun;16(6):772-80.
8. Dikmen M. Homosistein metabolizması ve hastalıklarla ilişkisi. *Türkiye Klinikleri* 2004; 24:645-652.
9. Temel İ, Özerol, E. Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. *İnönü Üniversitesi Dergisi* 2002; 9(2):149-157.
10. Joseph J, Loscalzo J. Methoxistasis: integrating the roles of homocysteine and folic acid in cardiovascular pathobiology. *Nutrients*. 2013 Aug 15;5(8):3235-56.
11. Bamashmoos SA, Al-Nuzaily MA, Al-Meerı AM, Ali FH. Relationship between total homocysteine, total cholesterol and creatinine levels in overt hypothyroid patients. *Springerplus*. 2013 Aug 30;2: 423.
12. Stamm EB, Reynolds RD. Plasma total homocyst(e)ine may not be the most appropriate index for cardiovascular disease risk. *J Nutr* 1999; 129(10): 1927-1930.

13. Page JH, Ma J, Chiuve SE, Stampfer MJ, Selhub J, Manson JE, Rimm EB. Plasma total cysteine and total homocysteine and risk of myocardial infarction in women: a prospective study. *Am Heart J*. 2010 Apr;159(4):599-604.
14. Mani M, Khaghani S, Gol Mohammadi T, Zamani Z, Azadmanesh K, Meshkani R, Pasalar P, Mostafavi E. Activation of Nrf2-Antioxidant Response Element Mediated Glutamate Cysteine Ligase Expression in Hepatoma Cell line by Homocysteine. *Hepat Mon*. 2013 Apr 20;13(5):e8394.
15. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 5-7.
16. Rolland PH, Friggi A, Barlatier A, Piquet P, Latrille V, Faye MM, Guillou J, Charpiot P, Bodard H, Ghiringhelli O, Calaf R, Luccioni R, Garçon D. Hyperhomocysteinemia induced vascular damage in the minipig. Captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation* 1995; 91: 1161-1174.
17. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 24-29.
18. Bellamy MB, McDowell IFW, Ramsey MW, Brownlee M, Bones C, Newcombe RG, Lewis MJ. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation* 1998; 98: 1848-1852.
19. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91: 308-318.
20. Lentz SR, Sadler JE. Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* 1993; 81: 683-689.
21. Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S, Watanabe T. Enhancement by homocysteine of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and secretion from vascular endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272:182-185.
22. Harpel PC, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein (a) to fibrin: a potential biochemical link

between thrombosis, atherogenesis and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10193-10197.

23. Durand P, Lussier-Cacan S, Blache D. Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *Faseb J*. 1997 Nov;11(13):1157-68.

24. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1974; 291(11): 537-543.

25. Rodgers GM, Cohn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990;75: 895-901.

26. Riksen NP, Rongen GA, Blom HJ, Russel FGM, Boers GH J, Smits P. Potential role for adenosine in the pathogenesis of the vascular complications of hyperhomocysteinemia. *Cardiovascular Research* 2003; 59:271-276.

27. Joseph J, Loscalzo J. Methoxistasis: integrating the roles of homocysteine and folic acid in cardiovascular pathobiology. *Nutrients*. 2013 Aug 15;5(8):3235-56.

28. Memişoğulları R, Akçay F. Biochemical Mechanisms in Hyperhomocysteinemia. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004; 2(1): 41-49.

29. Flamand N, Boudreault S, Picard S, Austin M, Surette ME, Plante H, Krump E, Vallée MJ, Gilbert C, Naccache P, Laviolette M, Borgeat P. Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 588-594.

30. Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, Firestein GS. Inhibition of TNF- α expression by adenosine: role of A₃ adenosine receptors. *J Immunol* 1996; 156: 3435-3442.

31. Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of NG, NG-, and NG, N'-G-G-dimethyl-arginine, N-mono, di, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl, and galactosyl- d-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970; 245: 5751-5758.

32. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: 60-62.

33. Satılmışoğlu H, Ozhan H, Albayrak S, Kaya A, Erden I, Yazıcı M. Relation of asymmetric dimethylarginine levels with conventional risk score systems in the healthy

subjects with positive family history for coronary artery disease. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2011 Mar;11(2):114-8.

34. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003;4(4):33-40.

35. Siekmeier R, Grammer T, März W. Role of Oxidants, Nitric Oxide and Asymmetric Dimethylarginine in Endothelial Function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008;13(4):279-97.

36. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Dimethylarginine: pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identify with alanine: glyoxylate aminotransferase 2. *J Biol Chem* 1990; 265:20938-45.

37. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-7.

38. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med* 2006;38(2):126-36.

39. Bouras G, Deftereos S, Tousoulis D, Giannopoulos G, Chatzis G, Tsounis D, Cleman MW, Stefanadis C. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem.* 2013;13(2):180-200.

40. Kielstein JT, Impraïm B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, Hoepfer MM, Haller H, Flisher D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109: 172-7.

41. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 1998; 62(26): 2425-30.

42. Saitoh M, Osanai T, Kamada T, Matsunaga T, Ishizaka H, Hanada H, Okumura K. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level. *Heart Vessels* 2003; 18(4): 177-82.

43. Leong T, Zylberstein D, Graham I, Lissner L, Ward D, Fogarty J, Bengtsson C, Björkelund C, Thelle D. Asymmetric dimethylarginine independently predicts fatal and nonfatal myocardial infarction and stroke in women: 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 May;28(5):961-7.

44. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358: 2127-8.
45. Chao TF, Lu TM, Lin YJ, Tsao HM, Chang SL, Lo LW, Hu YF, Tuan TC, Hsieh MH, Chen SA. Plasma asymmetric dimethylarginine and adverse events in patients with atrial fibrillation referred for coronary angiogram. *PLoS One*. 2013 Aug 7;8(8):e71675.
46. Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*. 2001; 358(9299): 2113-7.
47. Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1557-64.
48. Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetric dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Clin Sci* 2001; 100: 161-7.
49. Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997; 95: 2068-74.
50. Aldámiz-Echevarría L, Andrade F. Asymmetric dimethylarginine, endothelial dysfunction and renal disease. *Int J Mol Sci*. 2012;13(9):11288-311.
51. Işıklar Ö, Mutaf I. Asymmetric Dimethylarginine and it's Clinical Significance, *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2010; 8(2): 75-89.
52. Torun E, Bayram F. Endokrin Bir Organ Olarak Endotel Ve Endotelinin Hipertansiyondaki Rolü. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 2004; 26 (3): 126-131.
53. Palmer RMJ, Ferrige AG. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
54. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Oct 1;42(7):1149-60.

55. Ando R, Ueda S, Yamagishi S, Miyazaki H, Kaida Y, Kaifu K, Yokoro M, Nakayama Y, Obara N, Fukami K, Takeuchi M, Okuda S. Involvement of advanced glycation end product-induced asymmetric dimethylarginine generation in endothelial dysfunction. *Diab Vasc Dis Res*. 2013 Sep;10(5):436-41.
56. Akar İ, Rahman A, Burma O, Üstündağ B, Uysal A, Özeran İH, Balin M, İlkay E. Endotel hasarı sonrası oluşan intimal hiperplazi üzerine nebivololün etkisi: deneysel çalışma. *Damar Cer Derg* 2006; 15 (2): 23-31.
57. Gümüştas MK. Oksidatif ve Nitrozatif Stresin Psikiyatrik Bozukluklarla İlişkisi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Etkinlikleri Türkiye'de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi No:62 2008: 329-340.
58. Behrendt D, Ganz P Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; 90(1): 40-48.
59. Vieira AB, Coelho LP, Insuela DB, Carvalho VF, Dos Santos MH, Silva PM, Martins MA. Correction: Mangiferin Prevents Guinea Pig Tracheal Contraction via Activation of the Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway. *PLoS One*. 2013 Sep 10;8(9).
60. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium dependent vasodilation in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993; 88: 2510-6.
61. Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*. 2000 Jul 21;87(2):99-105.
62. Wanby P, Brattström L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. *Scand J Clin Lab Invest*. 2003;63(5):347-53.
63. Dayal S, Lentz SR. ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2005; 10(1): 27-33.
64. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 6(3-4): 92-95.
65. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. 1999 Mar 8;424(1-2):83-95.

66. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem.* 2002 Mar;50(3):341-51.
67. Ulakoğlu ZE, Gümüştas MK, Belce A, Altuğ T, Kökoğlu E. The relationship between endogenous glutathione depletion and energy metabolism in stress-induced gastric mucosal injury. *Cerrahpaşa J Med.*1998; 29 (3):127-131.
68. Andreoli SP. Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. *Pediatr Nephrol.* 1991 Nov;5(6):733-42.
69. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 1957 Nov;229(1):189-97.
70. Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem.* 1983 Jun 1;133(1):51-69.
71. Marty L, Siala W, Schwarzländer M, Fricker MD, Wirtz M, Sweetlove LJ, Meyer Y, Meyer AJ, Reichheld JP, Hell R. The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 2;106(22):9109-14.
72. Iqbal M, Cawthon D, Beers K, Wideman RF Jr, Bottje WG. Antioxidant enzyme activities and mitochondrial fatty acids in pulmonary hypertension syndrome in broilers *Poult Sci* 2002, 81:252-260.
73. Johnson P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002, 133:493-505.
74. Münzel T, Gori T. Nebivolol: the somewhat-different beta-adrenergic receptor blocker. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Oct 13;54(16):1491-9.
75. Cazzola M, Matera MG, Ruggeri P, Sanduzzi A, Spicuzza L, Vatrella A, Girbino G. Comparative effects of a two-week treatment with nebivolol and nifedipine in hypertensive patients suffering from COPD. *Respiration.* 2004 Mar-Apr;71(2):159-64.
76. D'Agostino B, Gallelli L, Falciani M, Fici F, Mangrella M, Rossi F, Filippelli A. Nebivolol and airway responsiveness in the rabbit. *Life Sci.* 2001 Mar 23;68(18):2159-68.
77. Lefebvre J, Poirier L, Poirier P, Turgeon J, Lacourciere Y. The influence of CYP2D6 phenotype on the clinical response of nebivolol in patients with essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol.* 2007 May;63(5):575-82.

78. Mangrella M, Rossi F, Fici F. Pharmacology of nebivolol. *Pharmacological Research*. 1998;38:419-431.
79. Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Nishimatsu H, Suzuki Y, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Omata M. Effects of vasodilatory beta-adrenoceptor antagonists on endothelium derived nitric oxide release in rat kidney. *Hypertension*. 1999 ;33(1 Pt 2): 467-71.
80. Bundkirchen A, Brixius K, Bölck B, Mehlhorn U, Bloch W, Schwinger RH. Nebivolol, carvedilol and metoprolol do not influence cardiac Ca(2+) sensitivity. *Eur J Pharmacol*. 2001 Jun 22;422(1-3):175-80.
81. Ignarro LJ, Byrns RE, Trinh K, Sisodia M, Buga GM. Nebivolol: a selective beta(1)adrenergic receptor antagonist relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide and cyclic GMP dependent mechanisms. *Nitric Oxide* 2002 Sep;7(2):75-82.
82. Cockcroft JR, Chowienyck PJ, Brett SE, Chen CP, Dupont AG, Van Nueten L, Wooding SJ, Ritter JM. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L arginine / NO dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1995 Sep;274(3):1067-71.
83. Dawes M, Brett SE, Chowienyck PJ, Mant TG, Ritter JM. The vasodilator action of nebivolol in forearm vasculature of subjects with essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 1999 Sep;48(3):460-3.
84. Khan MU, Zhao W, Zhao T, Al Darazi F, Ahokas RA, Sun Y, Bhattacharya SK, Gerling IC, Weber KT. Nebivolol, A Multifaceted Antioxidant And Cardioprotectant In Hypertensive Heart Disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013 Nov;62(5):445-51.
85. Ceron CS, Rizzi E, Guimarães DA, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Nebivolol attenuates prooxidant and profibrotic mechanisms involving TGF- β and MMPs, and decreases vascular remodeling in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:47-56.
86. Ritter JM. Nebivolol: endothelium-mediated vasodilating effect. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001 Dec;38 Suppl 3:S13-6.
87. Cosentino F, Bonetti S, Rehorik R, Eto M, Werner-Felmayer G, Volpe M, et al. Nitricoxide-mediated relaxations in saltinduced hypertension: effect of chronic beta1 selective receptor blockade. *J Hypertens* 2002 Mar;20(3):421-8.

88. Gao YS, Nagao T, Bond RA, Janssens WJ, Vanhoutte PM.. Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*; 1991 Jun;17(6):964-9.
89. Parenti A, Filippi S, Amerini S, Granger HJ, Fazzini A, Ledda F. Inositol phosphate metabolism and nitric oxide synthase activity in endothelial cell are involved in the vasorelaxant activity nebivolol. *J Pharmacol Exp Ther*: 2000 Feb;292(2):698-703.
90. Gosgnach W, Boixel C, Nevo N, Poiraud T, Michel JB: Nebivolol induces calciumindependent signaling in endothelial cells by a possible beta-adrenergic pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001 Aug;38(2):191-9.
91. Broeders MA, Doevendans PA, Bekkers BC, Bronsaer R, van Gorsel E, Heemskerk JW, Egbrink MG, van Breda E, Reneman RS, van Der Zee M: Nebivolol: a thirdgeneration beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation*; 2000 Aug 8;102(6):677-84.
92. Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Nava C, Davoli A, Criscuoli M, Crea A, Sawamura T, Lo Cascio V: Nebivolol and its 4-keto derivative increase nitric oxide in endothelial cells by reducing its oxidative inactivation. *J Am Coll Cardiol* 2003 Nov 19;42(10):1838-44.
93. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. *Drugs* 2002;62(2):265-84.
94. Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM. Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation* 2001 Jul 31;104(5):511-4.
95. Andre DE, Arnet U, Yang Z, Luscher TF. Nebivolol inhibits human aortic smooth muscle cell growth: effects on cell cycle regulatory proteins. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35(6):845-848.
96. Ignarro LJ, Sisodia M, Trinh K, Bedrood S, Wu G, Wei LH, Buga GM. Nebivolol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by mechanisms involving nitric oxide but not cyclic GMP. *Nitric Oxide*. 2002;7:83-90.
97. Brehm BR, Wolf SC, Bertsch D, Klaussner M, Wesselborg S, Schüler S, Schulze-Osthoff K. Effects of Nebivolol on proliferation and apoptosis of human coronary artery smooth muscle and endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2001;49:430-439.

98. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
99. Hu RL, Huang Q, Yang XW, Peng HP, DU J, Jiao XY. Transforming growth factor β 1 cooperates with stromal cell derived factor 1 to affect the proliferation of hepatic oval cells via β -catenin inactivation. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2013 May 1;51(5):442-446.
100. Hill JJ, Tremblay TL, Cantin C, O'Connor-McCourt M, Kelly JF, Lenferink AE. Glycoproteomic analysis of two mouse mammary cell lines during transforming growth factor (TGF)-beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Proteome Sci*. 2009 Jan 8;7:2.
101. Kuzey GM. Bölüm 7B. Temel patoloji. Ankara, Güneş Kitapevi, 2007: 152.
102. Vinay K, Abbas AK, Aster JC. Chapter 5, Halmarks of cancer. Robbins Basic Pathology, 9th edition Canada. Elsevier Saunders, 2013: 187.
103. Vinay K, Abbas AK, Aster JC. Chapter 2, Factors that influence tissue repair. Robbins Basic Pathology, 9th edition Canada. Elsevier Saunders, 2013: 67-69.
104. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-270.
105. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-1039.
106. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
107. Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg*, 2000 Apr;53(3):234-9.
108. Park S, Teper OM, Galiano RD, Capla JM, Baharestani S, Kleinman ME, Pelo CR, Levine JP, Gurtner GC. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissue with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg*, 2004 Jan; 113(1): 284-293.
109. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells . *Cell*. 1998 May 29;93(5):705-16.

110. Sorrentino SA, Doerries C, Manes C, Speer T, Dessy C, Lobysheva I, Mohmand W, Akbar R, Bahlmann F, Besler C, Schaefer A, Hilfiker Kleiner D, Lüscher TF, Balligand JL, Drexler H, Landmesser U. Nebivolol exerts beneficial effects on endothelial function, early endothelial progenitor cells, myocardial neovascularization, and left ventricular dysfunction early after myocardial infarction beyond conventional β 1-blockade. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Feb 1;57(5):601-11.
111. Cosentino F, Bonetti S, Rehorik R, Eto M, Werner-Felmayer G, Volpe M, Lüscher TF. Nitric-oxide-mediated relaxations in salt-induced hypertension: effect of chronic beta1 -selective receptor blockade. *J Hypertens*. 2002 Mar;20(3):421-8.
112. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. *Anal Biochem*. 1990 Feb 1;184(2):193-9.
113. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985;113:484-90.
114. Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab.Clin. Med*. 1967 Jul;70(1):158-69.
115. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of glutathione using enzymatic cycling and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969 Mar;27(3):502-22.
116. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988 Mar;34(3):497-500.
117. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421.
118. Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clinical Chemistry*, 1998 Mar;44(3): 679-81.
119. Cao L, Lou X, Zou Z, Mou N, Wu W, Huang X, Tan H. Folic acid attenuates hyperhomocysteinemia-induced glomerular damage in rats. *Microvasc Res*. 2013 Sep;89:146-52.

120. Xu Y, Tian Y, Wei HJ, Dong JF, Zhang JN. Methionine diet-induced hyperhomocysteinemia accelerates cerebral aneurysm formation in rats. *Neurosci Lett*. 2011 Apr 25;494(2):139-44.
121. Holst-Schumacher I, Monge-Rojas R, Combrone-Gutierrez P, Brenes G. Genetic, Dietary and other lifestyle determinants of serum homocysteine levels in young adults in Costa Rica. *Rev Panam Salud Publica*. 2005;17(4): 263-70.
122. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med*. 1994 Mar;96(3):239-46.
123. Fakhrzadeh H, Ghothbi S, Nouri M, Bandarian F, Shafaei AR, Larijani B. Total plasma Homocysteine, folate and vitamin B12 status in healthy Iranian adults: the Tehran Homocysteine survey. *BMC Public Health*. 2006;6:29.
124. Myles P, Chan MT, Forbes A, Leslie K, Paech M, Peyton P. Preoperative folate and Homocysteine status in undergoing major surgery. *Clinical Nutrition* 2006;25:736-745.
125. Wyse AT, Zugno AI, Streck EL, Matté C, Calcagnotto T, Wannmacher CM, Wajner M. Inhibition of Na(+), K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 2002; 27: 1685-1689.
126. Dimitrova KR, Degroot KW, Pacquing AM, Suyderhoud JP, Pirovic EA, Munro TJ, Wieneke JA, Myers AK, Kim YD. Estradiol prevents homocysteine-induced endothelial injury in male rats. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 589-596.
127. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabó C. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sciences* 1997; 60(10): 169-174.
128. Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1996-2002.
129. Yüce A, Aksakal M. Ratlarda homosisteinin oksidan ve antioksidan sistem ile koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine E vitamininin etkisi. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* 2006, 20(3), 189-197

130. Gubandru M, Margina D, Tsitsimpikou C, Goutzourelas N, Tsarouhas K, Ilie M, Tsatsakis AM, Kouretas D. Alzheimer's disease treated patients showed different patterns for oxidative stress and inflammation markers. *Food Chem Toxicol.* 2013 Jul 16. pii: S0278-6915(13)00468-7.
131. Yamamoto M, Hara H, Adachi T. Effects of homocystene on the binding of extracellularsuperoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* 2000; 486: 159-162.
132. Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drozd M, Wieczorek M. Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1995; 115: 217-224.
133. Moshal KS, Tipparaju SM, Vacek TP, Kumar M, Singh M, Frank IE, Patibandla PK, Tyagi N, Rai J, Metreveli N, Rodriguez WE, Tseng MT, Tyagi SC. Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Aug;295(2):H890-7.
134. Chen FY, Guo YH, Gao W, Feng XH, Chen L, Tang CS. [Effect of hyperhomocysteinemia on cardiac remodeling in rats]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2006 Apr 18;38(2):179-83.
135. Zivkovic V, Jakovljevic V, Djordjevic D, Vuletic M, Barudzic N, Djuric D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2012 Nov;370(1-2):59-67.
136. Toblli JE, Cao G, Giani JF, Muñoz MC, Angerosa M, Dominici FP. Long-term treatment with nebivolol attenuates renal damage in Zucker diabetic fatty rats. *J Hypertens.* 2011 Aug;29(8):1613-23.
137. Toblli J, Cao G, Rivas C, Munoz M, Giani J, Dominici F, Angerosa M. Cardiovascular protective effects of nebivolol in Zucker diabetic fatty rats. *J Hypertens.* 2010 May;28(5):1007-19.
138. Peters H, Rückert M, Gaedeke J, Liefeldt L, Ketteler M, Sharma AM, Neumayer HH. Angiotensin-converting enzyme inhibition but not beta-adrenergic blockade limits transforming growth factor-beta overexpression in acute normotensive anti-thy1 glomerulonephritis. *J Hypertens.* 2003 Apr;21(4):771-80.

139. Chen C, Surowiec SM, Morsy AH, Ma M. Intraperitoneal infusion of homocysteine increases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *Atherosclerosis* 2002; 160: 103-114.
140. Tsai MY, Arnett DK, Eckfeldt JH, Williams RR, Ellison RC. Plasma homocysteine and its association with carotid intimal-medial wall thickness and prevalent coronary heart disease: NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2000; 151: 519-524.
141. Akçay A, Acar G, Kurutaş E, Sökmen A, Atli Y, Nacar AB, Tuncer C. Beneficial effects of nebivolol treatment on oxidative stress parameters in patients with slow coronary flow. *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2010 Jun;38(4):244-9.
142. Goel R, Goel A, Manocha A, Pillai KK, Srivastava RS. Influence of nebivolol on anticonvulsant effect of lamotrigine. *Indian J Pharmacol.* 2009 Feb;41(1):41-6.
143. Raaf L, Noll C, Cherifi Mel H, Samuel JL, Delcayre C, Delabar JM, Benazzoug Y, Janel N. Myocardial fibrosis and TGF β expression in hyperhomocysteinemic rats. *Mol Cell Biochem.* 2011 Jan;347(1-2):63-70.
144. Sen U, Moshal KS, Tyagi N, Kartha GK, Tyagi SC. Homocysteine-induced myofibroblast differentiation in mouse aortic endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2006 Dec;209(3):767-74.
145. Solini A, Santini E, Nannipieri M, Ferrannini E. High glucose and homocysteine synergistically affect the metalloproteinases-tissue inhibitors of metalloproteinases pattern, but not TGF β expression, in human fibroblasts. *Diabetologia.* 2006 Oct;49(10):2499-506.