



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ŞİZOFRENİ HASTALARINDA
METİYONİN-HOMOSİSTEİN METABOLİZMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sibel KULAKSIZOĞLU

Antalya, 2011



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

ŞİZOFRENİ HASTALARINDA METİYONİN-HOMOSİSTEİN METABOLİZMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sibel KULAKSIZOĞLU

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Aşlı BAYKAL ATAMAN

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2011

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2007.04.0103.006).

TEŐEKKÖR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde katkı ve desteklerinden dolayı, başta tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Aslı Baykal Ataman olmak üzere, tezin proje aşamasındaki katkılarından dolayı Sayın Yrd.Doç.Dr. Buket Cinemre'ye, Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Göltekin Yücel'e, bölümümüzdeki tüm değerli hocalarıma, uzmanlık eğitim sürem boyunca birlikte çalıştığım tüm uzman ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, her zaman bana destek olan aileme, eşime teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler Ve Kısaltmalar Dizini	iii
Şekiller Dizini	v
Çizelgeler Dizini	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Homosistein	3
2.1.1. Homosisteinin Yapısı	3
2.1.2. Homosisteinin Plazmada Bulunan Formları	3
2.1.3. Homosistein-metiyonin Metabolizması	4
2.1.3.1. Remetilasyon Yolu	7
2.1.3.2. Transsülfürasyon Yolu	7
2.1.4. Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri	8
2.1.4.1. Hiperhomosisteinemi ve Metabolizmasındaki Genetik Bozukluklar	9
2.1.4.2. Hiperhomosisteinemi ve Kişisel Özelliklerin Etkileri	10
2.1.4.3. Hiperhomosisteinemi ve Kronik Hastalıkların Etkileri	13
2.1.4.4. Hiperhomosisteinemi ve İlaçların Etkileri	13
2.1.4.5. Hiperhomosisteinemi ve Vit. B ₁₂ , Folik Asidin Etkileri	14
2.1.5. Hiperhomosisteineminin Hasar Mekanizmaları	15
2.1.6. Hiperhomosisteineminin Komplikasyonları	17
2.2. Glutasyon	19
2.3. Şizofreni ve Şizofrenide Homosistein, Glutasyon	21
2.4. LC-MS/MS	23
2.4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	23
2.4.2. Kütle Spektrometresi	25
2.4.3. Kantitatif Analiz	27
2.4.4. Sıvı Kromatografisi – Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)	28
2.4.5. Kütle Spektrometresinin Tıp Alanında Kullanımı	29
2.4.6. LC-MS/MS Kullanımının Avantajları	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Hasta Seçimi	31
3.2. Materyallerin Toplanması	31

3.3. Çalışılan Parametreler	32
3.3.1. Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	32
3.3.2. Homosistein Ölçümü	33
3.3.2.1. Güniçi, Günlerarası Tekrarlanabilirlik ve Verim Çalışması	40
3.3.2.2. Saptanabilme Alt Sınır (LOD) ve Ölçülebilme Alt Sınır (LOQ) Değerlerinin Hesaplanması	41
3.3.3. Metiyonin Ölçümü	41
3.3.3.1. Metiyonin Güniçi, Günlerarası Tekrarlanabilirlik ve Verim Çalışması	47
3.3.3.2. Saptanabilme Alt Sınır (LOD) ve Ölçülebilme Alt Sınır (LOQ) Değerlerinin Hesaplanması	48
3.3.4. GSH Ölçümü	48
3.4. Kullanılan Laboratuar Malzemeleri	50
3.4.1. Gereçler	50
3.4.2. Kimyasal Malzemeler	51
3.5. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	52
4.1. Homosistein Düzeyleri	52
4.2. Metiyonin Düzeyleri	54
4.3. Vitamin B ₁₂ Düzeyleri	55
4.4. Folik Asit Düzeyleri	57
4.5. GSH Düzeyleri	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR	73
7. ÖZET	74
8. ABSTRACT	75
9. KAYNAKLAR	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%CV	Varyasyon Katsayısı
5,10-CH ₂ -THF	5,10-Metilentetrahidrofolat
ADMA	Asimetrik dimetil arjinin
ALT	Alanin Transaminaz
AST	Aspartat Transaminaz
ATP	Adenozin trifosfat
BHMT	Betain homosistein metiltransferaz
BMI	Vücut Kitle İndeksi
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BUN	Kan Üre Nitrojeni
Ca ⁺²	Kalsiyum
CE	Çarpışma Enerjisi
CH ₃ -THF	Metiltetrahidrofolat
CI	Kimyasal İyonizasyon
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSM- IV	Ruhsal Hastalıkların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı IV. Baskı
DTPA	Dietilenetriaminepentaasetik asit
DTT	Dithiothreitol
ECLIA	Elektrokemilüminesan İmmünölçüm
EDTA	Etilendiamintetraasetik asitdisodyum
EI	Elektron İyonizasyon
EIA	Enzim İmmunoassay
ELISA	Enzim Bağlı İmmün Sorbent Ölçüm
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
eV	Elektronvolt
FAB	Hızlı Atom Bombardmanı
GC-MS	Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
Hcy	Homosistein
HDL	Yüksek Dansiteli Kolesterol
HPLC	Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi
IS	İnternal Standart
L	Litre
LC-MS	Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometresi

LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi
LDL	Düşük Dansiteli Kolesterol
LOD	Saptanabilme Alt Sınır
LOQ	Ölçülebilme Alt Sınır
M	Molar
m/z	Kütle/Yük Oranı
MALDI	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu
MAT	Metiyonin S-adenozil transferaz
mg	Miligram
MRM	Multiple Reaksiyon Monitor
MS	Metiyonin Sentaz
MTHFR	Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
NaOH	Sodyum Hidroksid
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
NO	Nitrik Oksit
RNA	Ribonükleik Asit
RT	Alıkonma Zamanı
SAH	S-Adenozil Homosistein
SAM	S-Adenozil Metiyonin
SBS	Sistationin β -Sentaz
SLE	Sistemik Lupus Eritamatozis
SO ₄ ⁻²	Sülfat
SSS	Santral Sinir Sistemi
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride)
TFAA	Trifluoroasetik Asit
tHcy	Total Homosistein
THF	Tetra hidrofolat
TSH	Tiroid Stimüle Edici Hormon
Vit-B ₁₂	Vitamin B12
Vit-B ₆	Vitamin B6
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Kolesterol
μ mol	Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
2.1. Homosisteinin yapısı	3
2.2. Total plazma homosistein komponentleri ve yüzdeleri	4
2.3. Metiyoninin yapısı	4
2.4. SAM'ın yapısı	5
2.5. SAH'ın yapısı	5
2.6. Homosistein metabolizması	6
2.7. Homosisteineminin nörotoksisiteyi indüklemesi	15
2.8. Glutasyon (GSH) molekülü	19
2.9. Glutasyon biyosentezi	20
2.10. Antioksidan enzimlerin etkileri	20
3.1. Protein-disülfid bağının DTT ile indirgenmesi	36
3.2. Homosistein standart grafiği	37
3.3. Homosistein Kör Kromatogramı	38
3.4. Homosistein 20µmol/L Kontrol Kromatogramı	39
3.5. Hasta Homosistein Kromatogramı	39
3.6. Metiyonin standart grafiği	44
3.7. Metiyonin Kör Kromatogramı	45
3.8. Metiyonin 25µmol/L Kontrol Kromatogramı	46
3.9. Metiyonin Hasta Kromatogramı	46
3.10. GSH ölçüm prensibi	48
3.11. GSH Standart Grafiği	50
4.1. Homosisteinin hasta ve kontrol grubu karşılaştırılması ($p>0.05$)	53
4.2. Hasta ve kontrol grubunda homosistein dağılım grafiği	53
4.3. Metiyonin hasta ve kontrol grubu karşılaştırılması ($p<0.05$)	54
4.4. Hasta ve kontrol grubunda metiyonin dağılım grafiği	55
4.5. Vitamin B ₁₂ hasta ve kontrol grubu karşılaştırılması	55
4.6. Hasta Grubunda Homosistein ile vitamin B ₁₂ arasındaki ilişki	56
4.7. Kontrol Grubunda Homosistein ile vitamin B ₁₂ arasındaki ilişki	56
4.8. Hasta ve kontrol grubunda GSH (µmol/L) ilişkisi ($p<0.05$)	57
4.9. Hasta ve kontrol grubunda GSH dağılım grafiği	58
4.10. Kontrol grubunda GSH ile homosistein arasındaki ilişki	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Hiperhomosisteineminin nedenleri	9
3.1. Homosistein ölçümü için tutunma zamanı, m/z değeri ve parçalanma enerjisi	35
3.2. Homosistein ölçümü için kütle spektrometre şartları	35
3.3. Homosistein günüçi, günlerarası ve verim çalışması	40
3.4. Metiyonin ölçümü için tutunma zamanı, m/z değeri ve parçalanma enerjisi	43
3.5. Metiyonin ölçümü için kütle spektrometre şartları	43
3.6. Metiyonin günüçi, günlerarası ve verim çalışması	47
4.1. Hasta grubuyla kontrol grubunun cinsiyet ve yaş ortalamalarının karşılaştırılması	52
4.2. Hasta grubuyla kontrol grubunun homosistein, metiyonin, vitamin B ₁₂ , folat ve GSH değerlerinin karşılaştırılması	52

1. GİRİŞ

Metiyonin metilasyon reaksiyonlarında çok önemli rol oynayan sülfürlü bir aminoasittir. Metilasyon reaksiyonları protein, lipid ve DNA metabolizması, nörotransmitter sentezi ve detoksifikasyon süreçlerinde yer aldığı için hücrenin normal işlevlerini yerine getirebilmesinde hayati önem taşımaktadır (1,2). Diyetle alınan normal metiyonin miktarı sözü edilen metilasyon reaksiyonları için yeterli olmadığından homosistein - metiyonin döngüsüyle tekrar *invivo* metiyonin oluşmaktadır (3).

Homosistein; metiyonin demetilasyonu ile bir ara ürün olarak oluşmaktadır. Homosistein, metiyonin remetilasyonu ile metiyonine veya transsülfürasyon yolu ile antioksidan bir madde olan glutatyon'a dönüşmektedir (3). Transsülfürasyon yolu homosisteinin birikmesini engelleyen bir tür kompensatuvar mekanizma oluşturmasının yanı sıra, oluşan son ürünlerden sistein antioksidan olan glutatyonun da prekürsörü bir moleküldür (4).

Sinir sistemi ekstrasellüler homosistein düzeylerine özellikle hassastır. Homosistein şizofreni gibi nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkili olduğu ileri sürülen nörotoksik bir amino asittir. Bu hastalıklarda homosisteinin rolü oksidatif stres, yetersiz metilasyonla nörotransmitter metabolizmasının bozulması, DNA onarımı ve biyosentezinin bozulması sonucunda sinir hücrelerinde rejenerasyon, sinaptogenez süreçlerini olumsuz etkilemesiyle açıklanmaktadır (5,6). Homosistein ayrıca N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin ekspresyonuna aracılık ederek nöronlara yoğun Ca^{+2} akışına neden olarak eksitotoksiteye, nöronal DNA hasarı ve apoptozisin indüklenmesine yol açmaktadır (7).

Homosistein metabolizması, kofaktörleri olan folik asit ve vitamin B₁₂ ile yakından ilişkilidir. Folik asit ve vitamin B₁₂ eksikliğinin santral sinir sistemi üzerindeki zararlı etkileri uzun zamandır bilinmektedir (8) ve homosisteinin zararlı etkilerinden korunmak için folik asit ve vitamin B₁₂ önerilmektedir (9).

Hiperhomosisteinemisinin şizofreni ile ilişkili olduğu gösteren pek çok çalışma mevcuttur (10,11,12). Ancak, bu metabolik sorun ve şizofreni arasındaki patofizyolojik etkileşimin nedenine dair bir açıklama yapılamamıştır. Bu etkileşimi anlayan bir yolu olarak homosistein-metiyonin metabolizmasında

yeralan biyokimyasal süreçlerin ve sorumlu olabilecek moleküllerin araştırılması uygun olabilir.

Homosistein düzeyi beslenme alışkanlıkları gibi çevresel etkenlere ve genetik özelliklere bağlıdır (3). Özellikle çevresel etkenlerin hastaların içinde bulundukları sosyokültürel ve sosyoekonomik koşullara bağlı olduğu göz önüne alındığında, yapılan çalışmaların kendi koşulları içinde değerlendirilmesi gerektiği yazarlar tarafından da belirtilmektedir (3,13,14). Nitekim farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarda homosisteinemi-şizofreni ilişkisi farklı sonuçlarla ortaya çıkmaktadır (14).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı, kliniğe başvuran şizofreni hastalarını sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırarak varsa hiperhomosisteineminin biyokimyasal etyolojisini araştırmak, kan homosistein, metiyonin, vitamin B₁₂, folat ve glutatyon düzeylerine bakmaktır. Araştırmanın ayaktan takip edilen şizofreni hastalarında metiyonin - homosistein metabolizmasının patofizyolojisini aydınlatması ve yeni tedavilerin geliştirilmesine öncülük etmesi beklenmektedir.

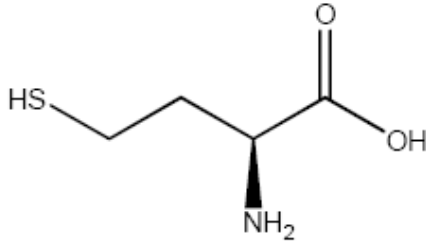
Ayrıca plazma homosistein ve metiyonin düzeylerinin ölçümünde sıvı kromatografisi - ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) cihazının kullanımı çalışmanın önemli bir diğer amacıdır. Literatür incelendiğinde plazma yada serum örneklerinde total homosistein ve metiyonin ölçümünde genel olarak yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC), enzim immunoassay (EIA), gaz kromatografisi - kütle spektrometresi (GC-MS) ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi sistemlerinin (LC-MS) kullanıldığı görülmektedir (15,16). Homosisteinin LC-MS/MS cihazında kantitatif ölçümü ile ilgili literatürde az sayıda yayın vardır. Metiyoninin LC-MS/MS cihazında kantitatif ölçümü ile ilgili literatürde sadece bir çalışma olduğu görülmüştür (16). Bu nedenle çalışmamızın literatüre katkıda bulunması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Homosistein

2.1.1. Homosisteinin yapısı

Homosistein, esansiyel bir amino asit olan metiyonin metabolizması sırasında oluşan, proteinlerin yapısına katılmayan kükürt içeren bir amino asittir. (Şekil 2.1). İlk olarak 1932 yılında Amerikalı biyokimyacı Du Vigneaud tarafından keşfedilmiştir. Homosistein normal yolla diyetle alınmaz, vücuttaki tek kaynağı metiyonindir (17,18).



Şekil 2.1. Homosisteinin yapısı (18)

2.1.2. Homosisteinin plazmada bulunan formları

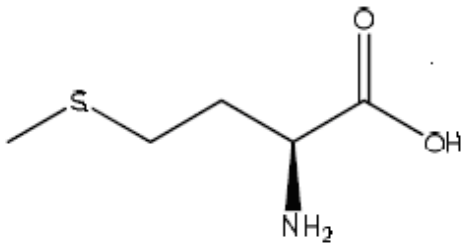
Plazmada serbest ve bağlı homosisteinlerin tamamı total homosistein olarak adlandırılır ve tHcy olarak gösterilir. Homosisteinin okside formları insan plazmasındaki tHcy'nin genellikle %98-99'unu oluşturur (19). Serbest homosistein (redükte form) konsantrasyonu normal bireylerin plazmasında çok az miktarda olup total homosisteinin ortalama %1'i kadardır. Homosistin ve homosistein-konsantrasyonu yaklaşık %10-15 olarak ifade edilir ve proteine bağlı homosistein normal plazmadaki total homosistein konsantrasyonunun yaklaşık %80'ninden fazladır (Şekil 2.2). Albumin en önemli taşıyıcısıdır (20,21,22). Redükte hcy redoks reaksiyonlarına katılabilen yüksek derecede reaktif serbest tiyol grubu içermektedir (20). Redükte form, hcy'nin vücutta birçok sistemde yaptığı hasardan sorumludur. Bu yüzden redükte form hcy molekülleri arasında disülfid bağlar oluşturularak okside form olan homosistin ve sistein-homosisteine çevrilir. Total homosistein vücutta plazma, serum, BOS ve nadiren idrarda ölçülür (22).

İndirgenmiş :		
Homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{SH} \end{array}$	% 1-2
Yükseltgenmiş :		
Homosistin	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	
Sistein-Homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2-\text{S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	% 10-20
Karışık disülfürler :		
Proteinlere bağlı homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\ \\ \text{Protein}-\text{S} \end{array}$	% 80-90

Şekil 2.2. Total plazma homosistein bileşenleri ve yüzdeleri (20)

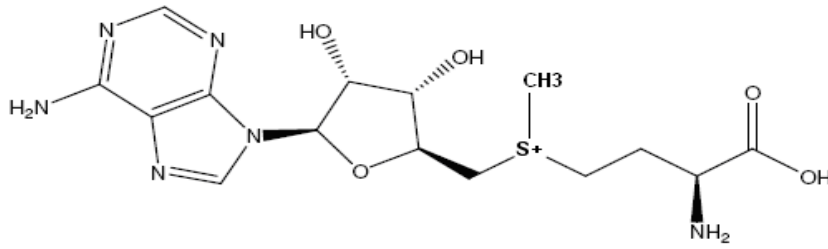
2.1.3. Homosistein - metiyonin metabolizması

Proteinlerin yapısına girmeyen homosistein vücutta oluşmasına rağmen, esansiyel bir amino asit olan metiyoninden sentezlenmektedir. Metiyonin metilasyon reaksiyonlarında çok önemli rol oynayan sülfürlü bir amino asittir (Şekil 2.3) (1,18).



Şekil 2.3. Metiyoninin yapısı (18).

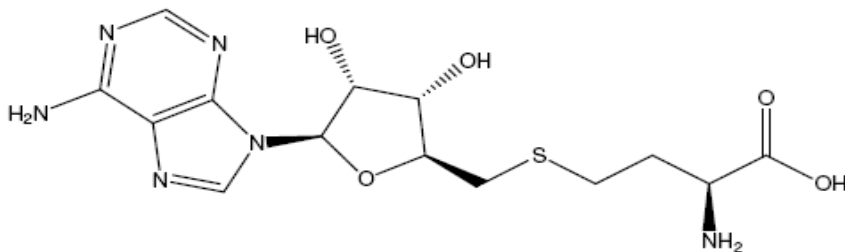
Besinsel kaynaklı veya proteinlerin degradasyonu sonucu oluşan metiyonin proteinlerin yapısına girebilmekte veya ATP kullanan bir reaksiyon ile metiyonin adenzil transferaz tarafından metabolize olduğuunda, çok yönlü metil vericisi olan S-adenozilmetiyonin (SAM) meydana gelmektedir. SAM transmetilasyon reaksiyonlarının ortak metil vericisi olarak çok sayıda akseptöre metil grubu vermektedir (Şekil 2.4) (18,19).



Şekil 2.4. SAM'ın yapısı (18)

SAM organizma için temel biyolojik metil vericisidir. Santral Sinir Sisteminde (SSS) ise tek metil vericidir. SAM'ın içerdđi metil grubu oldukça reaktiftir ve birçok metil transferaz reaksiyonunda görev alır (1,18). SAM'nin yer aldđı 100'ün üzerinde reaksiyon tanımlanmıştır. Bu metilasyon reaksiyonlarından bazıları nükleik asitler RNA (Ribonükleik asit) ve DNA (Deoksiribonükleik asit), proteinler, fosfolipidler, miyelin, polisakkaritler ve katekolamin sentezi sayılabilir. SAM'ın büyük bölümü kreatin sentezinde kullanılmaktadır (18).

SAM hücrenel alıcılara metil grubu transfer etmesiyle S-adenosilhomosistein (SAH) oluşmaktadır. SAH, SAM bağımlı transmetilasyon reaksiyonlarının feed back inhibitörü olarak işlev görür ve homosisteinin öncül maddesidir (23). SAH'ın S-adenosil homosistein hidrolaz tarafından katalize edilerek homosistein ve adenezine ayrılması homosistein oluşumuna öncülük ettiği bilinen tek metabolik yoldur (Şekil 2.5) (23,24).



Şekil 2.5. SAH'ın yapısı (18).

2.1.3.1. Remetilasyon yolu

Homosisteinin metiyonine dönüşümü metiyonin sentaz (MS) veya betain-homosistein metil transferaz (BHMT) enzimi tarafından katalizlenir. Metiyonin sentaz, metil vericisi olarak 5-metil tetrahidrofolata ve kofaktör olarak B₁₂ vitaminine gereksinim duyar. 5-metil tetrahidrofolat ise 5,10 metilen tetrahidrofolattan metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) aracılığı ile sağlanır (18). Bakteriyel enzimlerle yapılan çalışmalar metil vitamin B₁₂'nin homosisteini metillediğini ve 5-metil tetrahidrofolatın metil grubunun vitamin B₁₂'yi tekrar metillediğini göstermiştir. Bu reaksiyon da 5-metil tetrahidrofolatı, tetrahidrofolata dönüştürür (25,26).

Homosisteinin metiyonine remetilasyonunda diğer bir alternatif yolda metil vericisi olarak betaini kullanan BHMT enziminin arabuluculuk ettiği yoldur. Metiyonin sentaz enziminin aksine bu enzim sadece memeli karaciğeri ve böbreklerinde bulunur (25,27). Öncelikle böbrek ve karaciğerde sentezlenen BHMT, karaciğerdeki homosistein metabolizmasının %50'sinden sorumludur. Böbreklerde ise minör aktivitesi bulunmaktadır. Bu enzim metil verici olarak betaini kullanarak dimetilglisin ve metiyonin oluşturmaktadır. Homosisteinin remetilasyonunun azalması normal beyin fonksiyonu için gerekli metilasyon reaksiyonlarını bozar. (26,27)

2.1.3.2. Transsülfürasyon yolu

Transsülfürasyon yolunun ilk basamağı homosisteinin serinle birleştiği pridoksal fosfatın (vitamin B₆) katalize ettiği sistatyonin β sentaz (SBS) enzimiyle sistationin oluşumudur (27). Sistatyonin sentezinin fizyolojik önemi bu reaksiyonun geri dönüşümsüz olması nedeniyle homosisteinin daha fazla kullanılmasının engellemesidir. Oluşan sistationin, kofaktör olarak B₆ vitamini kullanan sistationaz enzimi tarafından sistein ve α -ketobütirata metabolize olmaktadır (27,28).

Sistein glutatyon yapısına katılır veya bir dizi reaksiyon sonucu sülfata oksitlenir. Sonuçta, karbon ve kükürt atomları metiyoninden sisteine daha sonra sülfat ve karbondioksit dönüşür. Böylece homosisteinin tamamı ya remetilasyon yolu ile metiyonine dönüşür veya transsülfürasyon yolu ile karbondioksit ve sülfata katabolize olur (27,28).

SAM konsantrasyonu arttığında transsülfürasyon yolu devreye girer. SAM'ın MTHFR'nin allosterik inhibitörü, SBS'nin ise aktivatörü olduğu gösterilmiştir (28) Hcy'in fazlası dokularda serin ile geri dönüşümsüz olarak birleşerek sistatyonin ve sisteini oluşturur (18,27).

Hücreseel seviyede metiyonin eksikliği homosistenin metiyonine dönüşümünün artmasına neden olur. SBS'nin homosisteine affinitesi düşük iken, metiyonin sentazın homosistein için affinitesi ise yüksektir (29). Yemeklerden sonra olduğu gibi aşırı metiyonin varlığında transsülfürasyon yolu aktive olmakta ve metiyoninden gelen karbon ve kükürt atomları katabolize olmaktadır. Metiyonin yetersiz olduğunda ise remetilasyon yolağı homosisteini metiyonine dönüştürmek üzere aktive olmaktadır (30).

2.1.4. Hiperhomosisteinemi ve nedenleri

Klinik çalışmalarda homosistein genel olarak tHcy “total plazma homosisteini” olarak ölçülür. Bu ölçüm serbest homosistein, disülfid bağı içeren homosistein ve proteine bağı homosisteini içermektedir. Toplam miktarın %70-80'i proteine bağı olan halidir (20,21).

Sağılıklı popülasyonda normal açlık total plazma homosistein düzeyi 5-15 $\mu\text{mol/L}$ aralığındadır (31). Kang ve arkadaşları kan homosistein düzeylerini 3 sınıfa ayırmışlardır (32).

- Hafif hiperhomosisteinemi (16-30 $\mu\text{mol/L}$),
- Orta hiperhomosisteinemi (31-100 $\mu\text{mol/L}$),
- Ağır hiperhomosisteinemi (>100 $\mu\text{mol/L}$).

Hcy düzeyi yaş, cinsiyet, sosyo-ekonomik durum, etnik özellikler gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Toplumların bu özellikler doğrultusunda kendi hcy referans aralıklarını belirlemeleri gerekmektedir (33,34,35). Türk toplumu için yapılan referans çalışmasında total plazma homosisteinin üst sınırı 12 $\mu\text{mol/L}$, ortalama değeri 8.91 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur (36, 37).

Ağır hiperhomosisteinemi durumları nadir görülürken (1/40.000-1/100.000), hafif hiperhomosisteineminin toplumda görülme sıklığı yaklaşık %5-7'dir. Hafif hiperhomosisteinemili hastalar, genellikle 30-40'lı yaşlarda, tekrarlayıcı arteriyel ve venöz tromboz veya prematüre koroner arter hastalığı oluşana kadar

asemptomatiktirler. Hiperhomosisteineminin derin ven trombozu, iskemik kalp hastalığı, pulmoner emboliden şizofreni, parkinson, demans ve kansere kadar birçok hastalıkla ilişkisi gösterilmiştir (5,38,39,40,41). Ağır hiperhomosisteinemi vakaları genellikle homozigot enzim bozukluklarından kaynaklanırken, hafif hiperhomosisteinemi vakaları ise genellikle heterozigot enzim bozukluklarından veya edinsel nedenlerden meydana gelmektedir (27,29).

Total plazma homosistein düzeyini etkileyen faktörler oldukça kompleks olup genetik ve edinsel faktörleri içerir. Homosistein metabolizmasını düzenleyen genlerinde bir veya daha fazla mutasyon bulunan bireylerde gen-besin ilişkisi büyük önem taşır. Dolayısı ile genetik hikaye, beslenme, sağlık durumu, yaşam tarzı, cinsiyet ve yaş homosistein homeostazını etkilemektedir (32,36,42). Hiperhomosisteinemi nedenleri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Hiperhomosisteineminin nedenleri (32).

<u>Metabolizmadaki Genetik Bozukluklar</u>	<u>Kişisel Özellikler</u>
SBS eksikliği	İleri yaş
MTHFR eksikliği	Erkek cinsiyet
MS eksikliği	Sigara kullanımı
<u>Kronik Hastalıklar</u>	Fiziksel inaktivite
Kronik böbrek yetmezliği	Menapoz
Akut lenfoblastik lösemi	<u>İlaçlar</u>
Diyabet	Metotreksat (dihidrofolat redüktaz inhibitörü)
<u>Vitamin Yetersizliği ve Beslenme Bozuklukları</u>	Fenitonin ve karbamezapin (folat antagonistleri)
Vitamin B ₁₂	Nitröz oksit (vitamin B ₁₂ antagonisti)
Folat	6-azouridin triasetat (vitamin B ₁₂ antagonisti)
Vitamin B ₆	

2.1.4.1. Hiperhomosisteinemi ve metabolizmasındaki genetik bozukluklar

Ağır genetik defektler içinde en yaygın görüleni homozigot SBS yetmezliği sayılmaktadır. Bu form konjenital homosistinüri’nin başlıca nedenidir. Hastaların plazma ve idrar homosistein düzeyleri çok fazla yükselmiştir. Homosistinüri doğuştan otozomal resesif bir metabolizma hastalığıdır. Heterozigot SBS formunda homosistein düzeyi daha az yükselme gösterir ve plazma homosistein konsantrasyonu 20-40 µmol/L arasındadır. Toplumda görülme sıklığı %0.3-1’dir (43).

MTHFR yetersizliği, SBS yetersizliğinden daha ender rastlanan bir durumdur. Otozomal resesif olarak taşınan ağır MTHFR yetersizliğine sahip bireylerin dokularında %20'den az MTHFR aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (44,45).

B₁₂ vitamininin kofaktörü olduğu MS enzimi, birçok hücre ve dokuda bulunmaktadır. B₁₂ vitamini absorpsiyonunu etkileyen doğuştan defektler, MS aktivitesinin kaybına ve hiperhomosisteinemiye neden olabilmektedir. Çok nadir görülen kalıtsal metabolik hastalıklardan B₁₂ vitamini hastalıklarında B₁₂ vitamini metabolizması veya taşınımındaki bir defekt sonucu B₁₂ vitamininin fonksiyonel yetersizliği görülmektedir (46).

BHMT enzimi de metiyonin sentazın yanı sıra homosisteinin metiyonine remetilasyonunu sağlamaktadır. BHMT proteininin içerdiği amino asitlerin yer değiştirmesi ile homosisteinin, mutasyona uğramış BHMT'ye bağlanmasıyla değişiş ve dolayısıyla homosistein birikimine neden olacağını göstermektedir (25).

Homosistein metabolizmasına katılan enzimleri kodlayan birçok genden birindeki mutasyonun, ırklar arasında görülen farkları açıklayabilmesi mümkündür. Vermaak ve arkadaşları en az iki yıldır aynı evre koşullarına ve batı tipi diyetle maruz kalmış bir grup siyah Güney Afrikalı'da (n=61), karşılaştırılabilir yaş grubu olan beyazlardan daha ciddi oranda %46 daha düşük homosistein konsantrasyonlarına sahip olduklarını göstermişlerdir (47). Bununla birlikte küçük bir çalışma da 12 genç siyah Afrikalı ve 18 beyazın açlık plazma homosistein düzeylerinde farklılık saptanmazken, metiyonin verilen siyahlarda beyazlara göre artış daha az grlmştir (48).

2.1.4.2. Hiperhomosisteinemi ve kişisel özelliklerin etkileri

Yapılan çalışmalara göre kan homosistein seviyesi, yaşla birlikte artmaktadır. Framingham'ın çalışmasında, 65 yaşın üzerindeki kişilerin homosistein düzeyi 45 yaş altındaki kişilerden %23 daha yüksek bildirilmiştir (49). Bu yükseklik renal fonksiyonun yaşla ilişkili azalmasına bağlı olabileceği gibi homosistein metabolizmasındaki SBS ve olası diğer enzimlerin yaşla ilişkili azalmasından da kaynaklanabilmektedir (50,51). Yine, yaşla birlikte azalan serum folat ve B₁₂ vitamini düzeyleri de homosistein yüksekliğine katkıda bulunabilir (52,53).

Ganji ve ark yaptıkları çalışmada erkeklerde kadınlara göre 1.9 µmol/L daha yüksek homosistein düzeyi bildirmişlerdir (54). Lussier-Cacan ve arkadaşları temel ve sıradan rahatsızlıkları olmayan, çok sayıda sağlıklı kadın ve erkek üzerinde çalışmış ve cinsiyetin homosistein seviyesini belirleyen esas belirteç olduğunu ve kadınların erkeklerden %21 oranında daha düşük homosistein seviyesine sahip olduğunu bildirmiştir (55).

Literatürde yer alan diğer çalışmalarda da benzer şekilde homosistein konsantrasyonunun erkek cinsiyette daha fazla olduğu gösterilmiştir (56,57). Bu fazlalığı açıklayan çeşitli nedenler ileri sürülmektedir. Genetik ve antropometrik farklılıklar (54,55), seks hormonlarının etkisi (34,55), meyve-sebze tüketimindeki ve sigara alışkanlığındaki farklılıklar (35) ile erkeklerde görülen daha düşük serum folat ve B₁₂ vitamini düzeyleri (54) bu nedenlerin başlıcalarıdır.

Cinsiyete bağlı farklılık aynı zamanda kas kitlesindeki farklarla da açıklanabilir, çünkü kreatin sentezi erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. Bu nedenle sağlıklı kişilerde plazma homosistein ve kreatin konsantrasyonu arasında önemli bir korelasyon mevcuttur (34,56). 2002’de Levin ve ark genç şizofreni hastalarında homosistein düzeyini yüksek bulmuş ve bunu vitamin eksikliği ve kas kitlesindeki artışa bağlamışlardır (56).

Seks hormonlarının plazma homosisteinleri üzerine etkisi belirsizdir. Menstruel siklusun luteal fazında steroid hormon seviyelerinin yüksek olması plazma total homosistein seviyesinde belirgin düşüşe neden olabilmektedir (58). Aynı hormon düzeyleri hamilelik sırasında da artmış olduğu için, total homosistein konsantrasyonu normal hamilelerde %30-50 düşer ve postpartum 2-4 günde normal seviyelerine ulaşır. Ancak tekrarlayan spontan düşüklükler gibi sorunlu hamilelerde yüksek total homosistein seviyeleri tespit edilmiştir (34,58). Folat yetersizliği, annenin plazmasında ve amniyotik sıvıda homosistein seviyelerinin çok artmasına, doğuştan nöral tüp defektine yol açmaktadır (31).

Kandaki homosistein konsantrasyonlarını etkileyen diğer faktörler B₁₂, B₆ ve folik asit vitaminlerinin diyetteki miktarları, emilim düzeyleri ve diyetteki proteinin metiyonin içeriğidir. Beslenme durumunun homosistein konsantrasyonunda önemli bir belirteç olduğu, geleneksel veya alternatif şekillerde düzenli vitamin alan kişilerde daha düşük homosistein konsantrasyonu

bulunmasıyla aydınlatılmıştır (31,59). Dolaşımdaki homosistein seviyeleri metiyonin alımı ile doğru, vitamin alımı ile ters orantılıdır (59,60). Hayvansal proteinlerce zengin diyet, bitkisel proteinlerce zengin diyetten daha yüksek seviyede metiyonin içermektedir. Ayrıca, taze sebze ve meyve tüketimi, vitamin alımı homosistein seviyesini düşürücü etkiye sahiptir (57,61).

Plazma homosistein konsantrasyonunun kahve tüketimi (vitamin B₆ antagonisti) ve sigara kullanımı ile arttığı gösterilmiştir. Ağır sigara içenlerin homosistein konsantrasyonu sigara içmeyenlere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (62,63). Sigara ile homosistein arasındaki ilişki daha önce yapılan çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Kato ve ark. günde 20 adedin üzerinde sigara içen kadınlarda homosistein düzeyinin % 18 daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (64). Yine, Nygard ve ark. her bir sigaranın homosistein konsantrasyonunu kadınlarda %1, erkeklerde %0.5 oranında artırdığını göstermişlerdir (65). Sigaranın homosistein düzeyini nasıl yükselttiği tam bilinmemekle birlikte esas olarak vitamin düzeyini olumsuz etkileyerek homosistein yüksekliğine yol açtığı düşünülmektedir. Çünkü sigara içenlerde bir taraftan meyve-sebze tüketimi, buna bağlı vitamin alımı azalırken diğer taraftan vitamin ihtiyacının arttığı gösterilmiştir (63).

Yapılan çalışmaların çoğunda alkol tüketimi ile homosistein arasında pozitif bir ilişki bildirilmiştir (54,66). Alkolikler muhtemelen yetersiz beslenme ve yetersiz absorpsiyon nedeni ile yüksek total homosistein düzeylerine sahiptir. Ayrıca alkolün yıkım ürünü olan asetaldehit metiyonin sentaz enzim aktivitesini azaltmaktadır. Alternatif yol olan BHMT yolağı ise belli bir süre sonra tükenen betain nedeniyle yeterli gelememektedir. Tam tersi hafif alkol kullanımının düşük homosistein konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gözlenmektedir. B₆ vitamininin özellikle bira ve kırmızı şarapta yüksek miktarlarda bulunduğu ve bu vitaminin ılımlı alkol tüketicilerinde homosistein düzeyini azaltabileceği bildirilmiştir (59).

Plazma homosistein düzeyinin obezlerde normal kilolu kişilere göre hafif derecede daha yüksek olduğu gözlenmiştir. BMI (vücut kitle indeksi) ile homosistein arasındaki ilişki Panagiotakos ve ark. tarafından da gösterilmiş ve BMI'daki her 5 kg/m² artışın homosistein konsantrasyonunu % 10 yükselttiği bildirilmiştir (67).

Fiziksel aktivite ile homosistein arasındaki ilişki ilk olarak Hordaland ve ark tarafından özellikle homosisteini izotonik egzersizlerin azalttığı gösterilmiştir (65), ancak daha sonra yapılan bazı çalışmalar bu sonucu desteklememiştir. (35,66).

2.1.4.3. Hiperhomosisteinemi ve kronik hastalıkların etkileri

Edinsel hiperhomosisteinemi nedenlerinden bir diğer grubu ise hastalık durumları oluşturmaktadır. Bunların içinde en önemlisi böbrek fonksiyon bozukluklarıdır. Yapılan çalışmalar, renal fonksiyonun plazma homosisteini üzerinde güçlü bir belirleyici etkisi olduğunu göstermiştir (50). İlerleyici böbrek yetmezliğinin seyrine paralel olarak plazma homosisteini 4 kat artabilir (22,50). Bununla birlikte renal yetmezlikle hiperhomosisteinemi arasındaki mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (50).

Akut lenfoblastik lösemi gibi hiperproliferatif hastalıklar ve ağır psöriazisde total homosistein seviyesi yüksektir. Bu durum proliferatif hücrelerden homosistein salınımının artmasıyla açıklanabilmektedir. Pernisiyöz anemi, göğüs kanseri, ovaryum kanseri ve pankreas kanseri gibi hastalıkların da hiperhomosistein ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (39,46).

Wollesen ve ark. yaptıkları bir çalışmada diyabet hastalarında glomerüler filtrasyon hızının azalması ile plazma homosistein düzeylerini yüksek bulmuştur. Hcy düzeyi yüksek diyabetik hastalarda, retinopati, nefropati ve kalp makrovasküler veya bacak damarlarındaki hastalıkların sıklığının daha fazla olduğu bildirilmektedir (68,69).

2.1.4.4. Hiperhomosisteinemi ve ilaçların etkileri

Dihidrofolat redüktaz inhibitörü olan metotreksat; metiyonin sentazı inhibe eden nitroz oksit; vitamin B₁₂ ve B₆ antagonistleri (metilksantin) ve antiepileptik ilaçlar ise folat absorpsiyonunu ve fonksiyonlarını bozarak hiperhomosisteinemi meydana getirirler (60,46).

2.1.4.5. Hiperhomosisteinemi ve Vit B₁₂, folik asidin etkileri

Vitamin B₁₂ ve folik asit, santral sinir sistemindeki birçok metabolik yol için esansiyel olup, metabolizmaları birbiriyle yakından ilişkilidir (70). Her ikisi de monoamin nörotransmitterlerin, fosfolipidlerin ve nükleotidlerin üretimi için gerekli olan tek karbon transferinde rol oynar. Folat, tek karbon döngüsünde 5-metiltetrahidrofolat formunda yer alır ve homosistein ile birleşerek beyinde metil gruplarının major kaynağı olan S-adenozilmetiyonini oluşturur. Vitamin B₁₂'den elde edilen metilkobalamin de bir koenzimdir ve tek karbon döngüsünde metil transferini düzenler (1,18). Her birinin eksikliği SSS'deki metilasyonun bozulmasına sebep olur ve uygun biçimde tedavi edilmediği takdirde geri dönüşümsüz olabilecek nörolojik ve/veya psikiyatrik bozukluklarla sonuçlanabilir (71,72,73). B₁₂ vitamini düşüklüğü ve şizofreni ilişkisi, vitaminlerin SSS'deki monoamin metabolizması üzerine olan direkt etkileri veya B₁₂ vitamini düşüklüğü sonucu gelişen hiperhomosisteinemi ile şizofreni ilişkisi konusunun aydınlatılması açısından çalışmamızda şizofreni hastalarında vitamin B₁₂ düzeyine bakılmıştır (74,75).

Serumdaki vitamin B₁₂ ve folat eksikliğinin, dokudaki eksikliğin tanısı için özgüllük ve duyarlılığının düşük olduğu bildirilmektedir. Son zamanlarda birçok çalışmada total plazma homosistein düzeylerinin hem folat hem de vitamin B₁₂'deki fonksiyonel eksiklik için hassas bir belirteç olduğu gösterilmiştir (76,77). Homosistein metionin ve sisteinin bir öncülüdür. Folat ve vitamin B₁₂, homosisteinin metionine dönüşümü için; vitamin B₆ da homosisteinin sisteine dönüşümü için gereklidir. Vitamin B₁₂, folat ve vitamin B₆ homosisteinin metabolik yollarının kofaktörüdür. Bunlardaki fonksiyonel eksiklikler sonucu homosistein seviyeleri artmaktadır. Homosistein kan düzeyindeki artışın da depresyon, şizofreni, alzheimer ve parkinson gibi psikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu bulunmuştur (5,6,18,40,78).

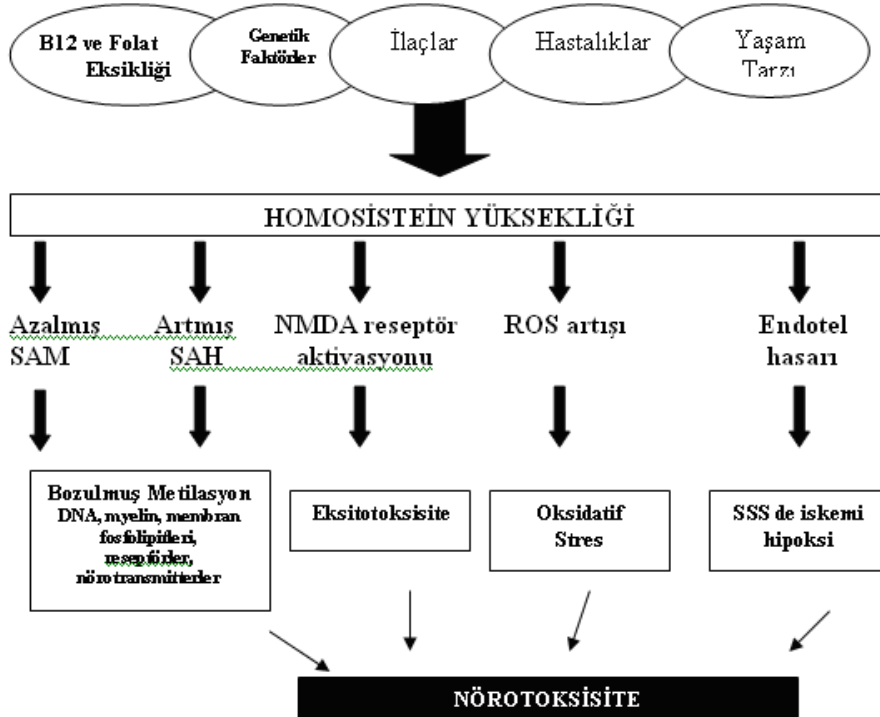
Vitamin B₁₂ eksikliği, megaloblastik makrositer anemi, hipersegmente nötrofiller ile buna eşlik eden nörolojik anormallikler şeklinde kendini gösterir (78). Klasik vitamin B₁₂ eksikliği olan geniş bir hasta popülasyonunda serum vitamin B₁₂ ve plazma homosistein konsantrasyonları hiperbolik bir ilişki gösterir. Serum B₁₂ seviyesinin normalin altındaki değerlerinde plazma homosistein

konsantrasyonu aniden yükselir (79). Vitamin B₁₂ veya folik asit tedavisi sonrası 14 gün içinde homosistein normale döndüğü gözlenmiştir (74,77).

Folat eksikliği sıklıkla beslenme kaynaklıdır ve genellikle alkolik, gebe kadınlar ve malabsorbsiyonlu hastalar gibi predispoze kişilerde gelişir. Plazma/serum homosisteini, folik asit eksikliği olan hastalarda homosisteinin remetilasyon yolağındaki inaktivasyona bağlı olarak artar (31,79). Normalin alt sınırındaki konsantrasyonlarda folat bulunan hastaların yarısında serum homosisteini düzeyinde artış görülür (80).

2.1.5. Hiperhomosisteinemi hasar mekanizmaları

Homosistein endojen bir bileşiktir ve fizyolojik düzeylerden daha yüksek serum düzeylerinde nörotoksiktir. Yüksek homosistein düzeylerinin tıkalıcı damar hastalıkları için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (81). Homosistein oksidatif stres, DNA hasarı, apoptozisin uyarılması ve eksitotoksite gibi nörodejenerasyonun bütün önemli mekanizmalarında rol oynar (82,83,84). Miyokard infarktüsü geçiren hastalar ile yapılan bir çalışmada plazma homosistein düzeylerinde artışın, artmış oksidatif hasarın yansıması olabileceği öne sürülmüştür (82).



Şekil 2.7. Homosisteineminin nörotoksisiteyi indüklemesi (82).

Hiperhomosisteineminin hasar mekanizmaları:

1. Homosistein endotelial nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek, peroksinitritlerin oluşumu endotelial disfonksiyona neden olur. Güçlü reaktif oksijen radikallerinden olan peroksinitritler inflamatuvar sürecin başlamasına neden olurlar (40,85).
2. NO bilinen en güçlü vazodilatatördür. Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) endojen bir NO inhibitörüdür ve hiperhomosisteinemi artırır. Asimetrik dimetil arjinin artışı endotelial bağımlı relaksasyonu bozar. Dolayısıyla hiperhomosisteinemi nedeniyle ortaya çıkan ADMA artışına bağlı olarak endotelial disfonksiyon gelişir (86).
3. Homosistein NMDA reseptörlerini stimüle eder. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu intrasellüler kalsiyum artışını ve sellüler proteaz salınımını arttırarak hücre ölümüne neden olur (87).
4. SAH seviyesinin yükselmesi, SAM düzeyinin düşmesine neden olarak metilasyon reaksiyonlarının inaktivasyonuna neden olur. SAM, beyin lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve glutatyon oluşumunu arttırarak indirekt antioksidan etki gösterir. Ayrıca SAM kognitif fonksiyonlarda düzelme sağlar ve antidepresan etkiye sahiptir. Ayrıca SAM seviyesinin düşmesiyle metilasyon reaksiyonunda sorunlar ortaya çıkar. Bunlardan biri de lipid transportu, metabolizması ve sinir sinyal iletiminde görevli olan kolin sentezinin etkilenmesidir (23,28).
5. Homosistein, Antitrombin III ve protein C seviyelerini düşürür, Faktör V'i aktive eder, antifosfolipid seviyelerini arttırır ve trombosit agregasyonunu uyarır, tromboksan seviyesini arttırıp, NO biyoyaralanımını azaltarak vazokonstriksiyon yapar ve tromboz riskini arttırır (88).
6. Homosistein özgül membran taşıyıcıları aracılığıyla hızla nörona alınır ve hücre içi homosistein düzeyi artırır. Beyinde özellikle mikrovasküler endotel hücresinde stoplazmik şişme, mitokondriyal dejenerasyon ve perivasküler amorf fibrozis tesbit edilmiştir (89).

2.1.6. Hiperhomosisteineminin komplikasyonları

Homosisteinin klinik önemi, ilk defa 1962'de Carson ve Neill tarafından bildirilmiştir. Carson ve Neill inceledikleri Kuzey İrlandalı 4 ve 6 yaşlarındaki mental retardasyonlu iki kardeşte homosistinüri tesbit etmiş (90), 1964'de Gerritsen ve Waisman tarafından konjenital anomalisi bululunan mental retardasyonlu bir bebeğin idrarında homosistein bulunduğunu bildirmiştir (24).

1969 yılında McCully otopsi sonucunu değerlendirirken, aşırı derecede arteriyel tromboz ve aterosklerozlu iki çocuğun plazma homosistein seviyelerinin yüksek olduğunu ve bu çocukların aynı zamanda homosistinüri olduklarını rapor etmiştir. Buna dayanarak homosistein ile vasküler hastalıklar arasında bir ilişki olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (91). Geniş çevreler tarafından kabul görmeyen bu görüşü destekleyen ilk klinik çalışma 1976'da, Wilcken tarafından yayınlanmıştır (92). Sonuç olarak plazma homosistein düzeylerindeki hafif artışın serebral, koroner veya periferik vasküler hastalıklara yönelik, vasküler lezyonların oluşumunu tetiklediği ve diğer risk faktörlerinin bulunmaması durumunda dahi tek başına risk faktörü olduğu öne sürülmüştür (32,60,57).

Son on yıl süresince homosistein ile ilgili çalışmalar plazma total homosistein ölçümünde hassas metodların gelişimiyle daha da artmıştır.

Hiperhomosisteineminin etkileri;

1-Tromboz riskini artırır. Bu sebeple neden olabileceği hastalık grupları;

- Pulmoner emboli (93),
- Derin ven trombozu (93)
- İskemik serebrovasküler hastalık (94),
- Serebral ven trombozu (94)
- Retinal damar okluzyonu (94),
- Mezenter arter trombozu (95),
- Hemodializ hastalarında arteriovenöz fistül trombozu (96)
- Behçet Hastalığında arteriyel ve venöz tromboz riskini artırır (97).

2-Kardiyovasküler hastalık risk faktörüdür (30,92). Nonvalvüler atrial fibrilasyonda homosistein metalloproteinazları aktive etmesi nedeniyle iskemik olaylar için risk faktörüdür (98).

3-Vasküler hasar için risk faktörüdür.

- Homosistein vasküler düz kas proliferasyonunu uyarır (98).

- Karotid arterlerde endotelial disfonksiyon ve hipertrofiye neden olur (86).

- Tip I ve II diabette vasküler komplikasyonların patogeneğinde önemli rol oynar (69,98).

4-Glomerulosklerozisde etkindir. Glomerüler ekstrasellüler matriksi artırır. Glomerüler hipersellülarite, kapiller kollaps, fibröz depolanma yaparak glomerulosklerozise neden olur (50,99).

5-Homosistein hipertansiyon için risk faktörü olarak netlik kazanmamıştır. Ancak arteriolar konstrüksiyonu indüklediği, renal disfonksiyona neden olabildiği (glomerulosklerozis), sodyum geri emilimini arttırdığı ve arteriyel sertliğe neden olduğu için hipertansiyon patofizyolojisinde yer aldığı öne sürülmektedir (100).

6-Polikistik Over Sendromunda insülin resistansı ile yüksek hcy düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (101)

7-SLE' de Raynaud fenomeni gelişiminde rol oynar (102).

8-Kanser gelişiminde risk faktörüdür. Hiperhomosisteinemi folat eksikliği, oksidatif stres, anormal DNA metilasyonu gibi nedenlerden dolayı risk faktörüdür. Homosistein karsinogeneğinde erken belirteçtir ve rekürrens araştırılmasında sensitif bir göstergedir (39).

9-Ani sensorinöral işitme kaybında risk faktörü olarak kabul edilmiştir. Son yıllarda ani sensorinöral işitme kaybı tanısı önemli derecede artmıştır. Tam olarak sebep bulunmamakla birlikte infeksiyon epizodu veya akustik nörinoma olmayan hastalarda koklear iskemi üzerinde durulmuştur. Edinsel veya trombofilik risk faktörleri araştırılmış, plazma tHcy seviyesi yüksekliği de bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir (103).

10-Beyin atrofi için risk faktörüdür. Homosistein NMDA reseptör stimülasyonu, oksidatif stres, DNA hasarı, endoplazmik retikulum ve mitokondri disfonksiyonu yaparak, apoptotik nörotoksisite patogeneğinde rol oynar. Nöron ölümüne neden olarak atrofi gelişimine neden olur (104).

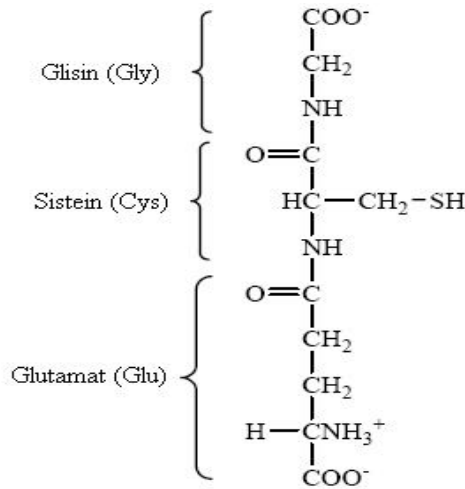
11-Kronik alkolizmde homosistein seviyeleri artar ve alkol çekilme nöbetlerinde önemli rol oynar. Ayrıca kronik alkolizmde beyin atrofi gelişiminde etkindir (105).

12-Parkinson hastalığı için risk faktörüdür. Total homosistein yükselmesi mitokondrial toksinlere karşı nigral hassasiyeti artırır (106).

13-Kognitif performansı kötüleştirir (40). Şizofreni, demans ve depresyonda risk faktörüdür (40,107).

2.2. Glutasyon

İlk kez 1890 yılında Yunancada sülfür seven anlamına gelen “philothion” olarak adlandırılan glutasyonun; glutamat ve sisteinden oluşmuş bir dipeptid olduğu ileri sürülmüştür. 1929 yılında ise Kendall ve arkadaşları tarafından bugünkü gamma – glutamil – sisteinil - glisin adıyla bilinen bir tripeptid olduğu bildirilmiştir (108). Glutasyon (GSH) hemen hemen tüm aerobik canlılarda en yaygın olarak bulunan, düşük molekül ağırlıklı intrasellüler tiyol bileşiği olup, plazmada mikromolar (μM) derişimlerde bulunur. Tripeptid yapısında olan GSH molekülü, gamma-glutamil köprüsü ve sülfidril grubu şeklinde iki kısımdan meydana gelmiştir (109,110).



Şekil 2.8. Glutasyon (GSH) molekülü (110).

Glutasyonun organizmada üstlendiği biyolojik görevler şunlardır;

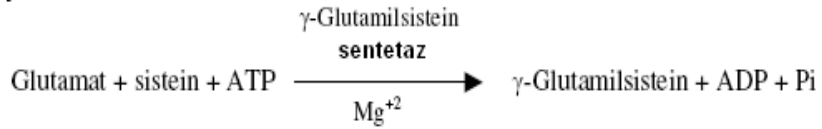
- Endojen peroksitler ve serbest radikallerin yıkımı
- Zararlı bazı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlaması
- Aminoasitlerin membran transportunda yer alması
- Bazı enzimler için koenzim görevi yapması
- Disülfid değişim reaksiyonlarına katılması

Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan GSH, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır (109).

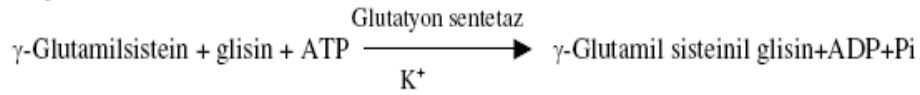
GSH birçok reaksiyonda koenzim olarak görev yaparken ilaçlar ve diğer yabancı maddeler, metabolik aktivite sırasında oluşan östrojen, prostoglandin ve lökositler gibi bileşiklerle konjugatlar oluşturarak metabolizma olaylarına katılmaktadır. Hücre dışına taşınabilen GSH membranda bulunan γ -glutamil transpeptidaz (GGT) enziminin etkisiyle aminoasitlerle birleşip bunların transportunda rol oynamaktadır. Taşınan GSH hücre membranı ve yakın çevrelerinde oluşan indirgenme tepkimelerine katılır, plazmaya ve diğer hücrelere geçebilir. Bu bakımdan glutatyonun, sisteinin depo ve transport formu olduğu düşünülmektedir (108,109).

Glutatyonun biyosentezi, sitozolde iki aşamada meydana gelmektedir.

I. Aşama

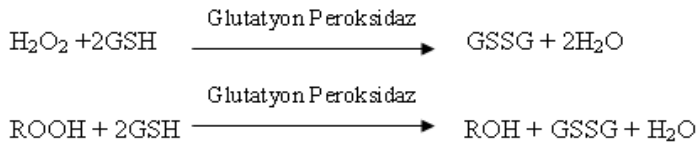


II. Aşama



Şekil 2.9. Glutatyon biyosentezi (108).

Glutatyon hücreleri koruyan en önemli antioksidan maddelerden birisidir. Glutatyon hücrelerde okside (GSSG) ve redükte (GSH) formda bulunur ve antioksidan etkisini bu iki form arasındaki döngüsü sırasında gerçekleştirir. GSH'un esas reaktif grubu SH grubu, serbest radikallerin ortaklanmamış elektronu ile bağlanarak radikal oluşumunu azalmaktadır (109).



Şekil 2.10. Antioksidan enzimlerin etkileri (111).

Lipit peroksidasyonunun oluşumu ile GSH konsantrasyonu azalırken, GSSG konsantrasyonu yükselir. Çevre, metabolizma ve bireye bağlı birçok faktörün etkisiyle organizmada oksidatif stres artabilir ve buna bağlı olarak serbest radikal oluşumu artar. Dolayısıyla hücreleri bu serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı korumakla görevli GSH düzeyleri değişmektedir. Hücrelerde oksidatif stres artarken genellikle GSH düzeyleri düşer, bununla birlikte GSSG seviyeleri yükselir. GSSG'yi tekrar GSH'a indirmek için glutatyon redüktaz enzimi devreye girer (109,110,111).

Hücre içinde oluşan homosistein transsülfürasyon yoluna girerek sisteine ve GSH'a dönüşmektedir. Bu metabolik yol homosisteinin birikmesini engelleyen bir tür kompensatuvar mekanizma oluşturmalarının yanı sıra, oluşan son ürünlerden sistein, antioksidan özelliği olan glutatyonun da prekürsörü olan bir moleküldür. Transsülfürasyon yolu böylelikle homosistein düzeyini azaltırken oksidatif strese karşı koruyucu bir amaca hizmet etmektedir (4).

2.3. Şizofreni ve Şizofrenide Homosistein, Glutatyon

Şizofreni, gerçeği değerlendirme yetisinde bozulma, apati, sosyal çekilme ve bilişsel yetmezlikle belirli bir ruh hastalığıdır. İş, insan ilişkileri, sosyal yaşam, öz bakım, bağımsız yaşama gibi işlevlerde yetersizlikle sonuçlanır. Tüm ruhsal hastalıklar arasında en fazla yeti yitimine yol açan ve ruh sağlığı birimlerini oldukça fazla meşgul eden bir hastalıktır (112). Şizofreni etyolojisi yapılan birçok çalışmaya rağmen tam olarak anlaşılamamıştır (113).

Şizofreni etyopatogenezi anlaşılabilmek amacıyla genetik ve çevresel risk faktörleri araştırılmış ve olguların çoğunun küçük etkili birçok risk geni ile istenmeyen çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu oluşabileceği öne sürülmüştür (114,115). Ancak şizofreni tek bir bozukluk değildir ve farklı bir takım patolojilerin ortak görünümü olabilir. Çeşitli elde edilen veriler şizofreninin nörodejeneratif olmaktan çok (etkilenmiş kişilerde ileri yaşlarda belirgin olan ve sıklıkla ilerleyici yıkım gösteren bir yapısı olmasına rağmen) nörogelişimsel bir bozukluk olduğu kuramını desteklemektedir. Minör fiziksel anormallikler, motor, bilişsel ve sosyal gelişimdeki minör sapmalar şizofreninin nörogelişimsel kuramına destek vermektedir (116).

Şizofrenide homosistein N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör ekspresyonuna aracılık ederek nöronlara yoğun Ca^{+2} akışına neden olarak eksitotoksisteye, nöronal DNA hasarına ve apoptozisin indüklenmesine yol açmaktadır (7,117).

Elli yıl kadar önce şizofrenide tek karbon metabolizmasında bir bozukluk olduğu bildirilmiş ve şizofrenide transmetilasyon kuramı öne sürülmüştür (1,118). Bu kuramda, metillenmiş toksik metabolitlerin üretiminden söz edilmiş ancak yeterince açıklanamamıştır. 1961-1971 yılları arasında paranoid şizofreni hastalarında metiyoninin etkileri araştırılmış ve metiyonin verilen hastaların %40'ında akut psikotik reaksiyon olduğu gözlenmiş ve kronik şizofrenik hastalar metiyonine duyarlı ve metiyonine duyarlı olmayan olarak iki gruba ayrılmışlardır. Ancak bu ilgi çekici sonuçlar uzun süre fazla araştırılmamıştır. Daha sonra yayınlanmış olgu bildirileri ile tekrar tek karbon döngüsü kuramı gündeme gelmiştir (1,10,118).

Sinir sistemi üzerine folik asitin etkileri bilinmektedir, özellikle nöral tüp defektleri ve folat eksikliği arasındaki ilişki net olarak ortaya koyulmuştur (5,8). Bazı çalışmalarda nöropsikiyatrik hastalıklarda (şizofreni, inme, demans, depresyon, alkol bağımlılığı, epilepsi, parkinson hastalığı) folat, homosistein, vitamin B₁₂ düzeyleri ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen polimorfizmi araştırılmıştır (3,17,18,41,80).

Psikotik bozukluğu olan hastaların serebrospinal sıvı metiyonin, homosistein ve sistatyonin düzeyleri araştırılmış ve tüm hasta altgruplarında artmış metiyonin ve sadece genç erkek hastalarda artmış BOS homosistein düzeyleri olduğu fakat sistatyonin düzeyinin normal olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle de şizofrenide remetilasyon yolağının etkilenmiş olabileceği öne sürülmüştür (119). Şizofreni hastaları normal popülasyonla karşılaştırıldığında serum homosistein düzeylerinin yüksek olduğunu bildiren çalışmalar vardır (3,5,10,56) ve şizofrenide homosistein yüksekliğinin rolünü destekleyen artan sayıda kanıt bulunmaktadır (9).

Doğum öncesi dönemde, Hollanda'da 1944-1945 kışında yaşanan açlığa maruz kalanlarla yapılan çalışmalar bu kişilerde yüksek mortalite ve düşük fertilitite oranı olduğunu ortaya koymuş ve döllenme öncesi dönemde bu duruma maruz kalanlarda iki kat ve anlamlı olarak artmış erişkin şizofreni riski, nöral tüp

defekti ve konjenital santral sinir sistemi defektleri bildirilmiş ve diyetle ilişkili faktörlerin ve özellikle de folik asit düzeylerinin etkisi üzerinde durulmuştur (120,121). Nöral tüp defektlerinin homosistein metabolizmasındaki genetik bir bozukluğa bağlı olduğu ve yeterli folik asit alımı ile bu riskin ortadan kalktığı bilinmektedir. Buradan yola çıkarak da şizofrenik kişilerde homosistein metabolizmasında yüksek miktarlarda folik asit alarak azaltılabilecek genetik bir bozukluk olabileceği öne sürülmüştür (9).

Son dönemde, şizofrenik hastalarla yapılan çalışmalar özellikle genç erkeklerde yükselmiş homosistein düzeyleri olduğunu ve adölesan erkek şizofren hastaların bir alt grubunda homosistein düzeylerinin arttığını göstermiştir (56,122). Ancak şizofrenide homosistein düzeylerinde yükselme bildirmeyen çalışmalarda vardır (123). Şizofrenide homosistein metabolizmasında genetik bir bozukluk olup olmadığı da araştırılmış ve kromozom 1p36.3'e yerleşmiş olan MTHFR geninin 677 T alleli ile şizofreni arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (45,124). Bunu desteklemeyen sonuçlar da bulunmaktadır (44). 2006 yılında yapılan bir metaanalizde homosistein düzeylerinde her 5 µmol/L artış şizofreni gelişme riskinde iki kat artışla ilişkilendirilmiş ve MTHFR 677C>T polimorfizminin şizofreniye yatkınlık oluşturduğu bildirilmiştir (124).

Beyin oksidatif strese daha duyarlıdır ve lipid peroksidasyonu zarar ve hücrenin işlevini bozar. Beyinde antioksidan savunma yollarından biri de glutatyon (GSH)'dur. Sinir sistemindeki bozukluklarda antioksidan enzimlerin aktivite ve düzeyleri araştırılmış, çoğunun normalden sapma gösterdiği bulunmuştur. Glutatyon metabolizmasındaki aksaklıkların artmış oksidatif strese neden olarak şizofreni, bipolar bozukluk, depresyon gibi major psikiyatrik bozukluklara neden olabileceği son zamanlarda yaygınlaşmış bir düşüncedir (82,109,111).

2.4. LC-MS/MS

2.4.1. Yüksek Basıncı Sıvı Kromatografisi

Kromatografi, bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok

yakın bileşenlerden oluşan karışımları tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır.

Kromatografide durgun faz, bir katı veya katı yüzeyine kaplanmış bir sıvı fazdır. Durgun fazın üzerinden akan hareketli faz ise bir gaz veya sıvı fazdır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüne sıvı kromatografi, hareketli fazın gaz olduğu kromatografi türüne ise gaz kromatografi denir. Gaz kromatografi, gaz, uçucu sıvı ve katı karışımlar için uygulanan bir tekniktir.

Sıvı kromatografi ise özellikle kararsız ve uçucu olmayan örnekler için uygulanır. Sıvı kromatografi bir ayırma tekniğidir. Bir sıvıda çözünmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığında yüksek akış hızına sahip olur. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir.

Kromatografik ayırmanın etkinliği, sabit fazdaki tanecik çapının ve kolon çapının küçültülmesi ile artmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle ayırma işleminde tanecik çapı 3-10 µm olan dolgu maddelerinin yaklaşık 5 mm çapındaki kolonlarda kullanılması mümkün olmuştur. Bu şartlar altında, kolon boyunca hareketli fazın ilerlemesini sağlamak için yüksek basınç gerekmektedir. Bu tür kolonlarda yüksek basınç altında (100-400 atm) gerçekleştirilen kromatografi türüne yüksek basınçlı veya performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilir.

Yüksek performans, yüksek hız ve yüksek ayırıcılığı ifade eder. HPLC, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri; duyarlılığı, doğruluğu, nicel analizlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar ve karbonhidratlar sayılabilir.

HPLC yönteminde sabit faz olarak kullanılan kolonun dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve kolonun verimi artar. İçerdiği pompalarla mobil faz akış hızı yüksektir. HPLC kolonu rejenerasyon gerekmez pek çok kez kullanılabilir, mekanik dayanıklılığı çok yüksektir. HPLC tekniği kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir. Analiz süresi kısadır, duyarlık yüksektir (125, 126).

2.4.2. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışan cihazlardır. Kütle spektrometreleri uzun yıllardır kullanılan analiz metodlarından birisidir. Günümüzde bilgisayar kontrollü son derece hassas kütle spektrometreleri üretilmiş, araştırma ve analiz laboratuvarlarında kullanılan önemli cihazlar haline gelmiştir. Kütle spektrometresinin tıp alanında kullanımı son yıllarda önemli oranda artmıştır. Özellikle metabolik hastalıkların tanısında ve yenidoğan dönemindeki tarama programlarında kütle spektrometresinin önemi son derece fazladır. Arthur J Dempster'in 1918 yılında elektron iyonizasyon ve termal iyonizasyon konusunda sağladığı ilerlemeler ve Francis Aston'un 1920'li yıllarda izotoplar ve onların kütleleri üzerindeki çalışmaları ile kütle spektrometresinde gelişmeler kaydedilmiştir. Kütle spektrometresi ticari amaçla ilk defa 1940'lı yıllarda petrol ve kimya endüstrisinde kullanıma sunulmuştur. Holmes ve Morrell isimli araştırmacılar 1957 yılında ilk defa gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) sistemini oluşturmuşlardır.

Kütle spektrometresinin biyokimyada kullanımı 1956 yılında steroidlerin analizi ile başlamış, 1960'lı yıllarda peptidlerin sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk defa 1966 yılında Tanaka ve ark.'nın GC-MS sistemi ile izovalerik asidemiye tanımlamalarıyla birlikte cihaz metabolik hastalıkların tanısında kullanılmaya başlamıştır. 1980'li yıllarda tandem kütle spektrometresi geliştirilmiş ve birçok alanda kullanıma sunulmuştur. Artık günümüzde yapılacak analizin özelliğine göre farklı tiplerde son derece hassas kütle spektrometreleri

geliştirilmiş, tıp, kimya ve fizik gibi bilim dalı laboratuvarlarının önemli cihazları haline gelmiştir.

Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil olmadıklarından başka moleküllerle veya bir yüzey ile çarpıştıklarında fragmentlerine parçalanırlar. Oluşan her bir iyon kendine özgü bir kütle/yük oranına sahiptir ve bu oranlarının yoğunluğa karşı gösterildiği bir spektrumla tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrum ile karşılaştırılarak bileşiğin kütlesi tanımlanır (127-129).

Numune sisteme girdikten sonra gerçekleşen ilk işlem iyonlaştırma olayıdır. İyon kaynağı incelenecek maddenin türüne ve çalışmada istenilen bilgilere göre değişmektedir. İyon kaynağı ne türde olursa olsun yüksek iyon verimi ve olabildiğince küçük enerji dağılımı sağlayacak özelliklerde olması istenir. İyonlaştırma işlemi çeşitli kaynaklarla sağlanabilir.

İyon kaynaklarını başlıca gaz faz iyon kaynakları ve desorpsiyon iyon kaynakları olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür. Gaz faz iyon kaynaklarında numune önce buharlaştırılır ve daha sonra iyonize edilir. Desorpsiyon kaynaklarında ise numune sıvı veya katı halden direkt gaz iyonlara dönüştürülür. Isıya dayanıksız ve uçucu olmayan bileşiklere kolaylıkla uygulanabilir olması desorpsiyon kaynaklarının avantajıdır. Gaz faz kaynaklar ise genellikle kaynama noktası 500°C'nin altındaki ısıya dayanıklı numunelere uygulanmaktadır (130).

Gaz faz iyon kaynaklarından elektron iyonizasyon (EI) ve kimyasal iyonizasyon (CI) teknikleri en sık kullanılanlardır. Desorpsiyon tipi iyon kaynaklarından; hızlı atom bombardımanı (FAB) polar ve çok yüksek moleküler ağırlıklı moleküllerin analizinde kullanılmaktadır. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ise polipeptitlerin, proteinlerin ve oligonükleotidlerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ise yeni bir iyonizasyon yöntemi olup özellikle peptitlerin analizinde kullanılmaktadır (131). Termosprey iyonlaştırma kaynağı ise HPLC sisteminden MS sistemine

gelen kapiler tüpün ucuna yüksek voltaj uygulanarak ısıtılır. Isıyı optimize etmek için de tüpün ucundan numune iyon kaynağına püskürtülerek gönderilir. Bu iş için kullanılan “Termosprey” ile sıvı halden gaz hale dönüştürülen iyon buharlaştırılır. Damlacıklar (+) ve (-) yüklü iyonlar ile çözücü içermektedirler. Ancak iyonlardan birinin polaritesi daha baskındır. Aradaki fark ise net yüküdür. Fazla yükün damlanın yüzeyinde biriktiği varsayılmaktadır. Çözücü buharlaştıkça damlacığın küçülen çapına bağlı olarak yüzeyindeki elektrik alanı artar. Damlacık yeterince buharlaştığında damlacığın yüzeyinde biriken iyonlar yüzeyden ayrılır. Termosprey genellikle yüksek vakum altında çalışır ve yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyar.

Kütle spektrometreleri iyon kaynağına giren bütün bileşikleri ayrıştırır ve iyonlaştırır. Organik bileşiklerin içerisinde çok fazla sayıda molekül mevcuttur ve hepsinin kütle fragmenti izlenir. Bu nedenle iyi bir spektrum elde etmek amacıyla belirli bir sürede sadece saf bir bileşiğin kütle spektrumunu almak gereklidir. Dolayısı ile kütle spektrometreleri gaz veya sıvı kromatografi gibi bir ayrıştırma işlemi ile birlikte kullanılması gerekir (132). Likit Kromatografi – Kütle Spektrometresi (LC-MS) uçucu olmayan ve ısıya karşı dayanıksız olan bileşiklerin ayrıştırılması için kullanılır. Sıvı faz kullanıldığı için yüksek ısı gerekmemektedir (133,134).

2.4.3. Kantitatif analiz

Kütle spektrometresinde kantitatif doğruluk analitik işlemin başlangıcında eklenen uygun internal standart (IS) ile sağlanır. Bilinen miktarda IS eklenmesi ekstraksiyon ve analiz sırasında herhangi bir aşamadaki madde kayıplarından gelen hataları elimine eder. Yöntemde internal standart kullanımı sistematik ve rastgele hataları giderir.

Seçilen IS’ın ilgilenilen bileşiğin kimyasal yapısına uygun olması gerekir. Böylece IS’ın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin bilinmeyen maddeninki ile uyumlu olması sağlanır. Bu sebeple döteryumla işaretlenmiş bileşiklerin IS olarak kullanımı yaygındır. Kimyasal farklılık olarak sadece izotopların kullanıldığı yöntemlere izotop dilüsyonu denir. Bir bileşiğin analizinde kullanılan döteryum ile zenginleştirilmiş IS’ın tek farkı bir veya bir kaç hidrojen atomu yerine döteryum atomlarının geçmiş olmasıdır. Döteryumlu IS yapısal benzerliğinden

dolayı analizlenen bileşiğinki ile aynı kromatografik alıkonma zamanına (RT) sahiptir. GC’de analiz edilen bileşikten kromatografik olarak ayrıştırılması mümkün olmadığından döteryumla işaretlenmiş IS kullanılamaz. Kütle spektrometresinde ise bu sorun değildir. Çünkü döteryumun atomik kütle birimi hidrojenden bir fazladır ve analizlenen numuneden kromatografik RT yerine kütesel olarak farklılık gösterir. Döteryum işaretlenmiş IS’ın m/z değeri daha yüksektir.

Kantitatif ölçümlerde, numunenin yoğunluğu veya alanı IS’nin alanı ile orantılanarak kalibrasyon eğrisinden konsantrasyonu belirlenir (129-131).

2.4.4. Sıvı Kromatografisi - Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Seçiciliği yükseltmek ve teşhis limitlerini artırmak için MS’den önce numunenin ekstraksiyon ve kromatografik ayrıştırmalar gibi bazı ön işlemlerden geçirilmesi gereklidir. Bunun için en uygun yöntemlerden birisi, iki veya daha fazla analitik tekniğin ardışık olarak bağlanmasıdır. Kullanılan kolonlar normal faz ve ters faz olarak ayrılır. Çalışmamızda HPLC ünitesi ve ters faz kolon C8 kullanılmıştır. Ters faz kolonda sabit faz sabit silika partiküllerine kovalent bağ ile bağlı nonpolar organik gruplardan oluşur. Mobil faz ise polar sıvıdır. Nonpolar analitler kolonu daha erken terk ederler. Normal faz kromatografide ise sabit faz polar moleküllerden mobil faz ise apolar çözücünden oluşur. Normal faz kromatografilerde mobil fazdaki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin değişikliklere neden olmaktadır. Normal fazın diğer dezavantajları polar maddelerin elüsyon hızının yavaş olması, buna bağlı piklerde yayvanlaşma olması ve apolar çözücülerin daha pahalı, nemden çabuk etkilenmeleridir.

Kolondan çıkan moleküller iyonlaştırma kaynağına gelir. İyonlaştırma kaynağı tarafından moleküller uyarılarak yüklü iyonize hale getirilirler. Çalışmamızda iyonlaştırma kaynağı olarak ESI kullanılmıştır. ESI özellikle büyük ve ısıya dayanıksız protein, polipeptid analizinde tercih edilir. İyonlaştırma kaynağında oluşan farklı m/z oranına sahip iyonlar kütle analizörü tarafından ayırt edilerek dedektöre gönderilir. Çalışmamızda kütle analizörü olarak üçlü kuadropol sistemi kullanılmıştır. İyon demeti yoluna paralel yerleştirilmiş ve 0.1-0.3 m uzunluğunda dört silindirik çubuktan ibaret bir kuadropol sistem kullanılır.

Bu dört silindirik çubuğa hem doğru akım hem de radyo frekansı gerilimi uygulanır. Ayırma borusuna küçük bir yarıktan giren iyonlar arasında ancak belli bir m/z değerinde olanlar, sabit bir doğru akımda veya radyo frekansı geriliminde çubuklar arasından geçerek dedektöre ulaşırlar. Spektrum doğru akım gerilimini veya radyo frekansı gerilimini değiştirerek kaydedilir. Ucuz ve kullanılması kolay cihazlardır.

Ardışık MS/MS’de karışım birinci MS’nin iyon kaynağına verilir. Burada karışımın iyonizasyonu bileşiğin kendine ait iyonlarının oluşmasını sağlar. Bunlara ana iyonlar denir. Bilinmeyen örneğin karakteristik ana iyonu böylelikle seçilir ve tanımlanır. Bu incelenecek olan bileşiği karışımın içindeki diğer bileşenlerinden ayırır. Birinci MS’de ayrılmış olan ana iyon iki MS arasındaki çarpışma odasında bir kez daha parçalanıp ikincil iyon fragmentlerine ayrılır. Bunlara ikincil iyon denir. İkincil iyon ikinci MS analizöründe ayırt edilerek dedektöre gönderilir. Bu şekilde ana iyon ile ikincil iyonun birlikte taranması bileşiğin yüksek seçicilikte tanımlanmasını ve karışımındaki diğer bileşenlerden tamamen ayrılmasını sağlar (131).

LC-MS/MS ile parçalanmış ana iyonun istenen parçası izlenebildiğinden girişim yapan etkenler elimine edilerek analizin seçiciliği de artırılmıştır. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasına karşın aynı parçalanmış iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10.000’dür. Bu nedenle LC-MS/MS tekniği neredeyse babalık testi kadar özgün bir test olmasının yanı sıra çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçların doğrulanmasına da gerek duyulmamaktadır.

GC-MS ile saatte 4-6 örnek analiz edilebilirken, tandem MS/MS ile saatte 60 örneğe kadar çıkılabilir. Böylece analiz hızı artırılmış ve örnek başına birim maliyet düşürülmüş olmaktadır. Örnek ekstraksiyonu ve türevlendirme aşamaları son derece azaltılmış ve hatta bazen gerekmemektedir (135-138).

2.4.5. Kütle Spektrometresinin Tıp Alanında Kullanımı

Kütle spektrometresinin tıp alanında kullanımı günümüzde gittikçe artan bir öneme sahiptir. Yüksek hassasiyeti ve güvenilirliği, analiz süresinin kısa olması ve bilgisayar kontrollü programlar sayesinde kütle spektrometreleri artık birçok

hastalığın tanısına yaklaşımda son derece kuvvetli bir analitik teknik haline gelmiştir.

Günümüzde ardışık MS/MS sisteminin en yaygın kullanım alanı metabolik hastalıkların tanısı olmakla birlikte artık proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve DNA analizi gibi birçok bileşiğin analizinde kullanılmakta ve bunlara sürekli yenileri eklenmektedir. Ardışık MS/MS ile yapılan açilkarnitin ve aminoasit analizi ile metabolik hastalıkların tanımlanması son zamanlarda oldukça yaygınlaşmıştır Ülkemizde ve dünyanın birçok ülkesinde ardışık MS/MS spektrometresi ile yenidoğan tarama programları yürütülmektedir (131).

2.4.6. LC-MS/MS Kullanımının Avantajları

1. Yaklaşık 2 dakika gibi kısa bir sürede analizin sonuçlanabilmesi
2. Türevlendirme aşamalarına gerek kalmadan karışım halindeki örneklerin analiz edilebilmesi
3. Son derece hassas ve güvenilir bir yöntem olması.
4. Otomasyona uygun olması ve kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi.
5. Testlerin çok az örnek miktarları ile çalışılabilmesi
6. Yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların oranının az olması.
7. Birçok metabolik hastalığın aynı analizde taranabilmesi
8. Maliyet açısından ekonomik olması (15,131,135,137,138)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı ve LC-MS/MS cihazının kullanıldığı özel laboratuvarında gerçekleştirildi. Araştırma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

3.1. Hasta Seçimi

Çalışma, önceden onayları alınan 62 şizofrenik bireyin oluşturduğu hasta grubunu ve onlarla yaş, cinsiyet, eğitim seviyesi açısından uyumlu olan 57 sağlıklı bireyin oluşturduğu kontrol grubunu içermektedir. Hasta grubu psikiyatri polikliniğine başvuran DSM-IV (Ruhsal Hastalıkların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı IV. Baskı) tanı ölçütlerine göre şizofreni ve şizoaffectif bozukluk tanısı almış , 18-65 yaşında , araştırmaya katılmak için onam veren gönüllü hastalardan oluşturulmuştur. Kontrol ve hasta grubundaki kişiler nörolojik, kardiyovasküler, böbrek, tiroid, karaciğer hastalığı olmayan homosistein, folat ve vitamin B₁₂ düzeyini etkileyecek ilaç kullanmayan, madde bağımlısı olmayan kişilerden seçilmiştir. Araştırma öncesi yapılan biyokimyasal taramada anormal tiroid, KC ve böbrek fonksiyonlarının olduğunu düşündüren biyokimyasal belirteçlerin olmamasına dikkat edildi.

3.2. Materyallerin Toplanması

Laboratuvar incelemeleri için çalışmaya alınan 62 hasta, 57 kontrol grubundaki kişilerden 12 saatlik açlık sonrası kan antekübital olarak alındı. Tüm kanlar 15 dk. içinde laboratuvara taşındı. Hemogram için kan 2 ml'lik K2 EDTA'lı (EtilenDiaminTetraAsetikasit) tüpe alındı ve hemen ölçüm yapıldı. Vitamin B₁₂, Folat, TSH, serbest T₄, total kolesterol, HDL, LDL, VLDL, trigliserid, glukoz, total protein, ALT, AST, BUN ve kreatinin parametreleri için 8,5 ml'lik jelli biyokimya tüpüne alınan kanlar 5 dk 4000 rpm'de santrifüj edildikten sonra serumda belirtilen parametreler hemen ölçüldü. GSH ölçümü için 1.8 ml'lik Sodyum Sitratlı'lı tüplere kan alındı ve ön hazırlık çalışmasından sonra

ayrılan süpernatant ependorfa konulup daha sonra çalışılmak üzere -80°C 'de saklandı. Homosistein, metiyonin parametreleri için 6 ml'lik K2 EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri buzlu kap içerisinde 15 dakikada taşınıp 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, plazması ayrıldı ve 4 ependorfa bölünüp daha sonra çalışılmak üzere -80°C 'de saklandı.

3.3. Çalışılan Parametreler

3.3.1. Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

- **Serum kreatinin tayini:** Jaffe yöntemi ile orjinal Roche kitleri kullanılarak, Moduler PPP otoanalizatöründe (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim) ölçüldü. Sonuçlar mg/dL olarak verildi.
- **Serum BUN tayini:** Kinetik enzimatik ölçüm yöntemi ile moduler PPP otoanalizatöründe ölçüldü. Sonuçlar mg/dL olarak verildi.
- **Serum lipidlerinin tayini:** Serumda total kolesterol, trigliserid, HDL kolesterol düzeyleri enzimatik yöntemler ile, orjinal Roche kitleri kullanılarak, Moduler PPP otoanalizatöründe (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim) belirlendi. Sonuçlar mg/dL olarak verildi. Serum VLDL ve LDL kolesterol düzeyleri ise Friedewald formülüne göre hesaplandı.
- **Serumda ALT ve AST tayini:** Spektrofotometrik yöntem ile orjinal Roche kitleri kullanılarak, Moduler PPP otoanalizatöründe (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim) yapıldı. Sonuçlar IU/L olarak verildi.
- **Serum total protein tayini:** Spektrofotometrik yöntem ile orijinal Roche kitleri kullanılarak, Moduler PPP otoanalizatöründe (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim) yapıldı. Sonuçlar g/dL olarak verildi.
- **Serumda Vitamin B₁₂, folat, serbest T4 ve TSH tayini:** Elektrokemiluminesans immün yöntemle (ECLIA) orjinal Roche kitleri kullanılarak, Moduler E170 otoanalizatöründe (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim) gerçekleştirildi. Birimler sırasıyla pg/ml, ng/ml, ng/dl ve IU/ml olarak verildi.
- **Hemogram tayini:** Otomatize hemogram analizöründe yapıldı (Advia 120, Siemens Diagnostics, Germany).

3.3.2. Homosistein Ölçümü

Homosistein ölçümü bir gecelik açlık sonrası 6 ml'lik K₂ EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinin buzlu kap içerisinde 15 dakikada laboratuvara taşınıp 4000 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası elde edilen, plazmada yapıldı. Çalışma zamanına kadar plazma örnekleri – 80°C'de saklandı.

Plazmada homosistein ölçümü LC-MS/MS yani likid kromatografi ardışık kütle spektrometresi (Waters Alliance HPLC; Quattro Micro Triple Quadrupole Tandem Mass spectrometer Waters, Milford, MA, USA) cihazında yapıldı (139).

Çözeltilerin Hazırlanması

- **İnternal Standart Çözeltisinin Hazırlanması:** 0.002 g internal standart DL-Homosistin-3,3,3',3',4,4,4',4'-D8 (Homosistin-D8) (Cambridge Isotope Laboratory/DLM-3619) tartıldı ve 10 ml LC-MS grade suda (Merck/1.15333.2500) ultrasonikatör kullanarak çözüldü. Hazırlanan çözeltinin derişimi 72×10^{-5} mol/L'dir. Bu çözeltiden 10 µl alınarak, 990 µl LC-MS grade su ilave edildi ve hazırlanan çözeltinin final derişimi 7.2 µmol/L homosistin- D8 olarak hesaplandı.
- **Standart Çözeltisinin Hazırlanması:** 0.00134 g DL-Homosistin standardı (Sigma Aldrich-53550) tartıldı ve 10 ml LC-MS grade suda ultrasonikatör kullanarak çözüldü. Hazırlanan çözeltinin derişimi 5×10^{-4} mol/L'dir. Bu çözeltiden 1 ml alınarak, 4 ml LC-MS grade su ilave edildi ve hazırlanan çözeltinin final derişimi 100 µmol/L olarak hesaplandı. Standart grafiği çizmek için hazırlanan 100 µmol/L çözeltiden dilüsyon yapılarak 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µmol/L konsantrasyonlarında homosistin standardı hazırlandı.
- **Dithiothreitol (DTT) Çözeltisinin Hazırlanması:** 0.385 g DL-1,4 Dithiothreitol (Merck/D9779) tartıldı ve 5 ml LC-MS grade suda ultrasonikatör kullanarak çözüldü. Hazırlanan çözeltinin derişimi 500 mM'dır.
- **Çöktürücü Çözeltisinin Hazırlanması:** 99.875 ml LC grade asetonitril (Merck/M1.00030), 100 µL formik asit LC grade (Merck/1.00264.1000) ve 25 µL TFAA (Triflouroasetikasit) (Merck/8.08260.0100) karıştırılarak hazırlandı.

- **Mobil Fazın Hazırlanması:** 300 ml LC grade (Merck/1.06008.2500) metanol, 699 ml LC-MS grade su ve 1 ml LC grade formik asit karıştırılarak hazırlandı. Akım hızı 250 µl/dk olarak ayarlandı.

Homosistein Çalışma Prosedürü

Her numune iki kez hazırlandı.

1. 1.5 ml'lik V dipli ependorfa 20 µl plazma (kontrol ya da standart) ve 20 µl 7.2 µmol/L internal standart (Homosistin-D8) konularak 10 sn vorteksde karıştırıldı.
2. 40 µl 500 mM DTT eklendi.
3. 30 sn vorteksde karıştırıldı ve 5 dk oda ısısında bekletildi.
4. 200 µl çöktürücü çözelti eklendi, 10 sn vorteksde karıştırıldı ve 5 dk 13.000 g'de santrüfuj edildi.
5. Oluşan süpernatant çalışılmak üzere 96 kuyucuklu kültür kapları içine 50 µl konarak LC-MS/MS cihazına verildi. Plazma, kontrol ve standart numuneleri aynı prosedürle ölçüldü (139).

Kör Çözeltilisinin Hazırlanması: Plazma homosistein sonucu 4,44 µmol/L olarak ölçülen numune 1/3 oranında dilüe edilip 20 µl'sine 200 µl çöktürücü çözelti eklendi, 10 sn vorteksde karıştırıldı. 60 µl su eklenip vorteksde karıştırıldı. 5 dk oda ısısında bekletildi ve 5 dk 13.000 g'de santrüfuj edildi, süpernatant kör olarak çalışıldı (140).

Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması: 10.02 µmol/L ve 20.02 µmol/L homosistein içeren iki adet kontrol çözeltisi hazırlandı. Bunun için öncelikle 20 adet plazma numunesinden hazırlanan plazma havuzunda homosistein miktarı 10.04 µmol/L olarak ölçüldü.

10.02 µmol/L kontrol çözeltisinin hazırlanması için 1.5 ml'lik V dipli ependorfa 10 µl 10.04 µmol/L plazma havuzu ve hazırlanan 10 µl 10 µmol/L homosistein standardı eklendi ve 10 sn vorteksde karıştırıldı. – 40°C'de saklandı.

20.02 µmol/L kontrol çözeltisinin hazırlanması için 1.5 ml'lik V dipli ependorfa 10 µl 10.04 µmol/L plazma havuzu ve hazırlanan 10 µl 30 µmol/L homosistein standardı eklendi ve 10 sn vorteksde karıştırıldı. – 40°C'de saklandı (140).

LC-MS/MS Cihazının Şartları

Plazmada homosistein ölçümü LC-MS/MS yani likid kromatografi ardışık kütle spektrometresi (Waters Alliance HPLC; Quattro Micro Triple Quadrupole Tandem Mass spectrometer Waters, Milford, MA, USA) cihazında yapıldı.

İyonizasyon yöntemi olarak pozitif elektrosprey iyonizasyon kullanıldı. Her analiz MRM (multiple reaktion monitoring) modunda değerlendirildi. Homosistein ve homosistein-D4 için belirlenen kütle/yük oranları ile parçalanma sonrası oluşan iyonlar ile kolonda tutunma zamanları, ana iyon, ikincil iyon ve parçalanma enerjileri (CE) sırasıyla Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Homosistein ölçümü için tutunma zamanı, m/z değeri ve parçalama enerjisi

	Tutunma Zamanı (dk)	Ana İyon [m/z]	İkincil İyon [m/z]	CE [eV]
Homosistein	1.27	136	90	10 eV
Homosistein-D4	1.27	140	94	10 eV

Ayırma işlemi için Waters Alliance HPLC ünitesi ve Waters Symmetry C8 ters faz kolonu (2.1 x 100mm, 3.5 µm) (Muskegon, Michigan, USA) kullanıldı. Mobil faz içeriği %30 metanol, %0.1 formik asit olup 250 µl/dk akım hızında çalışıldı. Kütle spektrometresi şartları ise Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Homosistein ölçümü için kütle spektrometre şartları

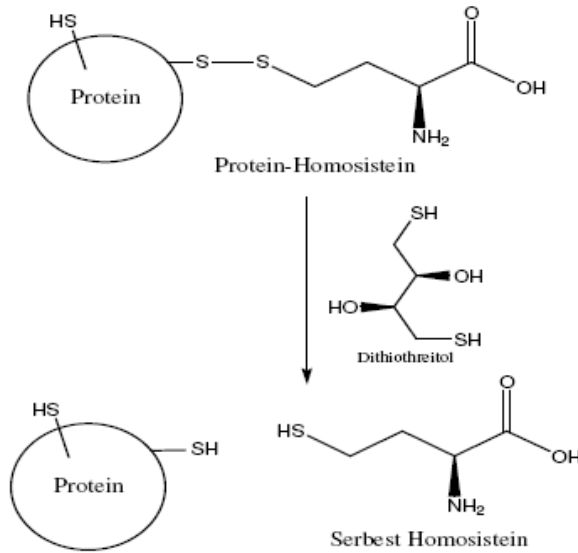
Enjeksiyon Hacmi	4 µL
İyonizasyon Modu	ESI Positive
Nebulizing Gaz Basıncı	55 psi
Kapiler Voltajı	40 v
Parçalayıcı Gaz Türü ve Basıncı	Ar, 5.0 x 10 ⁻³ mbar
Dedektör Voltajı	1600 v

Homosistein tayininde dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Öncelikle her analizde olduğu gibi, örnek alımına dikkat edilmesi gerekir. Hastalardan alınan kan örneklerinin, pıhtılaşmalarını engellemek için içersinde EDTA bulunan tüplere alınması gerekir. Tüp içersindeki örnek hemen

analizlenemiyorsa buz içinde 4 saat kararlılığını koruyabilir. Kan örneği 4000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmelidir. Bu şekilde elde edilen plazmadaki homosistein, oda sıcaklığında 4 gün, 0-2°C’de birkaç hafta, -20°C’de ise yıllarca kararlılığını koruyabilir (140).

Plazmada homosistein tayini yapılabilmesi için gerekli olan ilk işlem, yaklaşık olarak plazmadaki homosisteinin %90’dan fazlasını oluşturan disülfür (-S-S-) formunun ditiyotritol (DTT) ile serbest tiyol formuna indirgenmesidir. Böylece proteinlere veya birbirlerine disülfid bağı ile bağlanmış olan homosistein molekülleri serbest homosisteine indirgenir. Ardından metanol ve trifloroasetik asit gibi protein çöktürücü reaktifler kullanılarak proteinler ortamdaki uzaklaştırılır (131,135).

Çalışmamızda standart olarak kullanılan homosistin ve internal standart homosistin-D8; DTT ile muamele sonucunda sırasıyla iki kat homosistein ve iki kat homosistein-D4’e dönüşmektedir. Şekil 3.1’de protein molekülü ile disülfid bağı yapmış olan bir homosistein molekülünün DTT ile reaksiyonu sonucu disülfid bağının koparak serbest homosistein oluşumu gösterilmiştir (132).



Şekil 3.1. Proteinlerdeki disülfid bağının DTT ile indirgenmesi.

DTT ile muamele edilmesi sonucunda serbest hale gelen homosistein molekülleri kütle spektrometresinde pozitif elektrosprey modunda tarandığı zaman ana iyon olarak homosisteinin molekül ağırlığı olan 135’in 1 birim fazlası

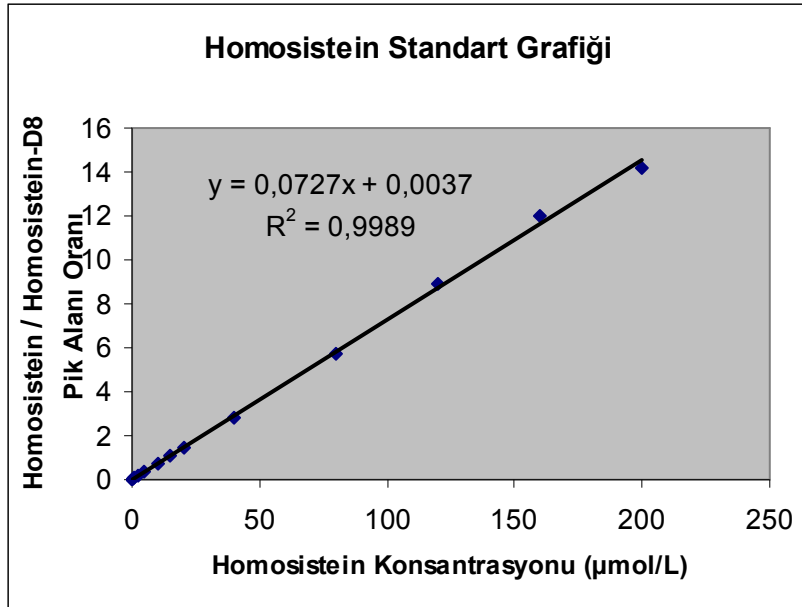
olan 136 elde edilmiştir. Bu ana iyon voltaj uygulanarak ikincil iyonu tarandığında ise 136 iyonunun 90,1'e parçalandığı gözlenmiştir. Bu durumda homosistein için $136 > 90,1$ iyonları tarama iyonları olarak seçilmiştir. Aynı şekilde internal standart olarak kullanılacak homosistein-D4 molekülü için de $140 > 94,1$ iyonları seçilmiştir (135,139).

Homosistein Standart Grafiği

Standart çalışması için 100 µmol/L homosistin standartından distile su ile dilüsyon yaparak 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µmol/L homosistin standartları hazırlandı.

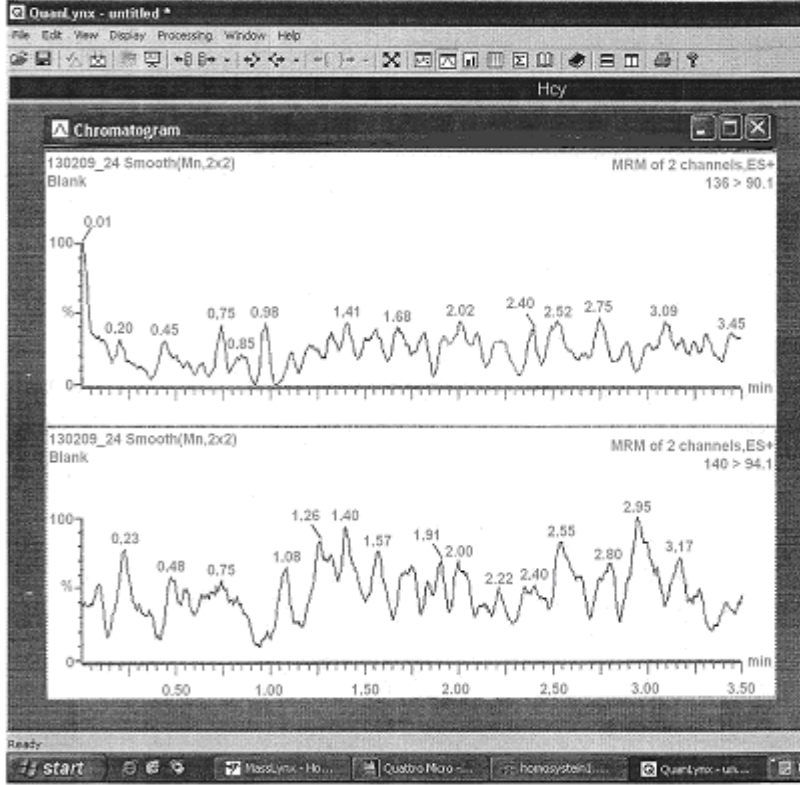
Homosistein çalışma prosedüründe yer alan DTT molekülü homosistin standardını iki homosistein molekülüne indirger. Final konsantrasyon 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 40, 80, 120, 160 ve 200 µmol/L homosistein olarak cihaza girildi ve standart grafiği bu değerlere göre çizildi.

Homosistein standart grafiği, homosistein konsantrasyonuna karşılık homosistein standart pik alanının homosistein-D4 internal standart pik alanına oranı baz alınarak çizildi. Grafiğin doğrusal olduğu gözlemlendi ($R^2 = 0,9989$) (Şekil 3.2).



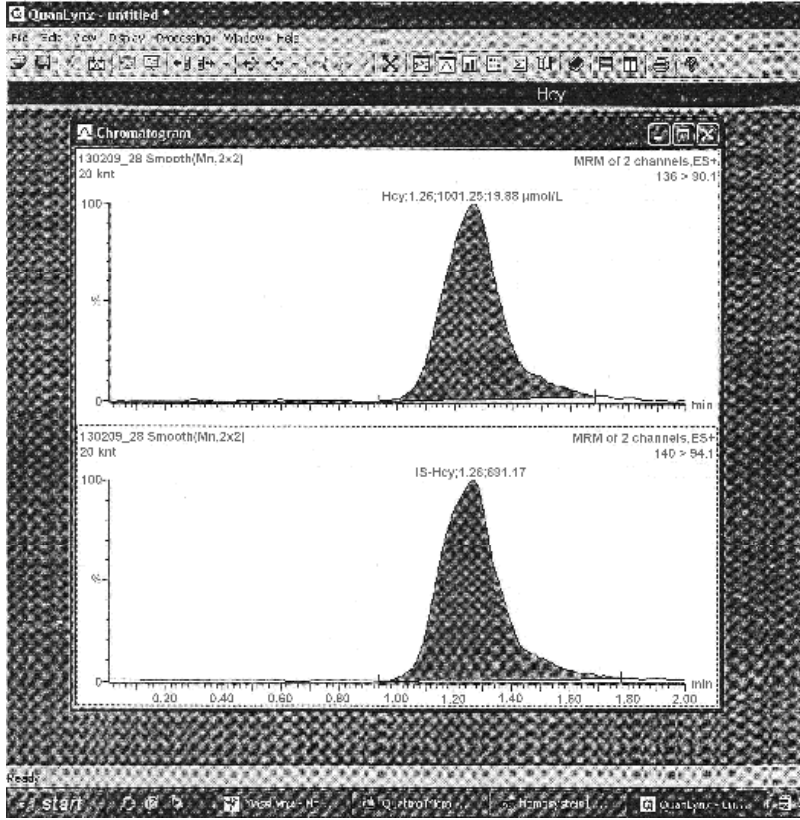
Şekil 3.2. Homosistein standart grafiği

Standart grafiği çizildikten sonra önce kör okutuldu (Şekil 3.3). Kör kromatogramında pik izlenmedi.

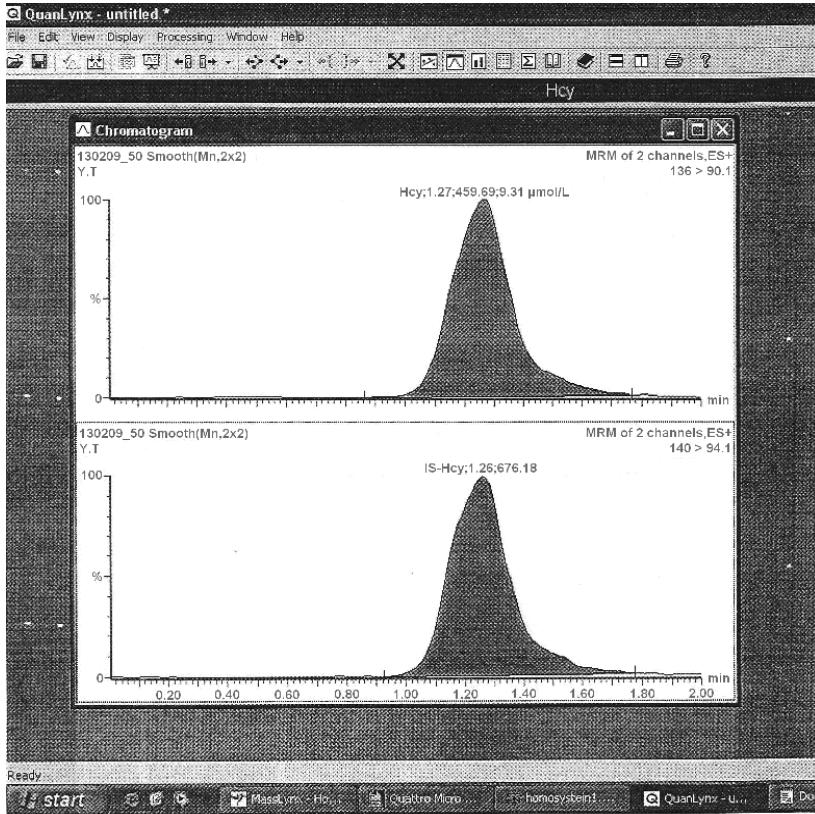


Şekil 3.3. Homosistein kör çalışması.

Daha sonra iki farklı dozda hazırlanan kontrol çözeltileri ölçüldü. 10.02 $\mu\text{mol/L}$ 'lik kontrol, ikişer kez ölçüldü ve ortalaması 10.05 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Şekil 3.4'de 10 $\mu\text{mol/L}$ 'lik kontrol kromatogramına bir örnek görülmektedir. 20.02 $\mu\text{mol/L}$ 'lik kontrol, ikişer kez ölçüldü ve ortalaması 20.01 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Şekil 3.4'de 20 $\mu\text{mol/L}$ 'lik homosistein kontrol kromatogramına bir örnek görülmektedir. Kontrol çalışmalarının ardından numuneler çalışıldı. Şekil 3.5'de hastaya ait homosistein kromatogramı izlenmektedir.



Şekil 3.4. Homosistein 20 µmol/L kontrol kromatogramı.



Şekil 3.5. Hasta homosistein kromatogramı.

3.3.2.1. Homosistein gün içi, günler arası tekrarlanabilirlik ve verim (geri kazanım) çalışması

20 adet plazma örneğinden plazma havuzu hazırlandı. Yaklaşık 10 ml hazırlanan plazma havuzu örneğinde homosistein miktarı 8.02 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. Plazma havuzu örneği 30 adet ependorfa herbirinde 10'ar μl olacak şekilde paylaştırıldı. 0, 20 ve 80 $\mu\text{mol/L}$ homosistein standart konsantrasyonları hazırlandı. 10 adet üçlü setin ilkinde 10 μl su 10 μl plazma havuzu, ikincisine 10 μl 20 $\mu\text{mol/L}$ standart ve 10 μl plazma havuzu, üçüncüsüne de 10 μl 80 $\mu\text{mol/L}$ standart ve 10 μl plazma havuzu eklenip vorteksde 10 sn karıştırılıp – 20°C'de saklandı.

Verim (geri kazanım) çalışması için hazırlanan bu üç farklı konsantrasyondaki numuneler ardışık 10 gün ölçüldü. Verim %95 - 107.1 arasında hesaplandı. Ortalama verim %100.5 ve %100.1 olarak hesaplandı.

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında gün içi 10 kez ölçülen numunelerin ortalamaları olan 4.03, 14.15 ve 44.78 $\mu\text{mol/L}$ 'dir. % varyasyon katsayısı (% CV) değerleri sırayla %2.21, %2.36 ve %3.66 olarak hesaplandı.

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için on farklı gün üç farklı konsantrasyondaki numuneler ölçüldü ve ortalamaları, standart sapmaları hesaplandı. Ortalamaları 4.09, 14.14 ve 44.16 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarındaki numunelerin sırayla elde edilen % CV sonuçları %2.77, 2.81 ve %3.76 olarak hesaplandı. Tekrarlanabilirlik ve verim çalışması sonucu elde edilen % CV değerleri sırasıyla Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Homosistein günüçi, günlerarası tekrarlanabilirlik ve verim çalışması

Test Sayısı	Homosistein $\mu\text{mol/L}$	Ölçülen $\mu\text{mol/L}$	Geri Kazanım	Günüçi	Günlerarası
N=10	0	4.09		%CV: 2.21	%CV:2.77
N=10	10	14.14	% 100.5	%CV:2.36	%CV:2.81
N=10	40	44.16	% 100.2	%CV:3.66	%CV:3.76

3.3.2.2. Homosistein saptanabilme alt sınır (LOD) ve ölçülebilirlik alt sınır değerlerinin (LOQ) hesaplanması

Bir analitik işlemin saptanabilen (teşhis) sınırı yani LOD, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer olmayıp sadece bir sınır değeridir. Homosistein içeriği 0,5 µmol/L olan numune 10 kez ölçüldü ve $LOD = 3 \times \text{Standart Sapma}$ formülünden 0.06 µmol/L olarak hesaplandı.

Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin tayin alt sınırı değeri yani LOQ ise numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir Homosistein içeriği 0,5 µmol/L olan numune 10 kez ölçüldü ve $LOQ = 10 \times \text{Standart Sapma}$ formülünden 0.2 µmol/L olarak hesaplandı (16).

3.3.3. Metiyonin Ölçümü

Ölçümler bir gecelik açlık sonrası 6 ml'lik K2 EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinin buzlu kap içerisinde 15 dk'da laboratuvara taşınıp 4000 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası elde edilen, plazmada, Waters Alliance HPLC ünitesi ve Waters Symmetry C8 ters faz kolonunda (2.1 x 100mm, 3.5 µm) (Muskegon, Michigan, USA) çalışıldı. Çalışma zamanına kadar plazma örnekleri – 80°C'de saklandı.

Çözeltilerin Hazırlanması

▪ **İnternal Standart Hazırlanması:** 0.0152 g internal standart L-Metionine- D3 (Cambridge Isotope Laboratory/DLM-431) tartıldı ve 10 ml LC-MS grade suda (Merck/1.15333.2500) ultrasonikasyon kullanarak çözüldü. Hazırlanan çözeltinin derişimi 10^{-2} mol/L'dir. Bu çözeltiden 10 µl alınarak 990 µl LC-MS grade su ilave edildi ve hazırlanan çözeltinin final derişimi 100 µmol/L metiyonin-D3 olarak hesaplandı.

▪ **Standart Hazırlanması:** 0.00745 g metiyonin standartı (Fluka FL-64340) tartıldı ve 100 ml LC-MS grade suda ultrasonikasyon cihazı kullanarak çözüldü. Hazırlanan çözeltinin derişimi 5×10^{-4} mol/L'dir. Bu çözeltiden 2 ml alınarak üzerine 3 ml LC-MS grade su ilave edildi ve hazırlanan çözeltinin final derişimi 200 µmol/L metiyonindir.

▪ **Dithiothreitol (DTT) Hazırlanması:** 0.385 g Dithiothreitol (DL-1.4 DTT) (Merck/D9779) tartıldı ve 5 ml LC-MS grade suda ultrasonikasyon kullanarak iyice çözüldü. Hazırlanan çözeltinin derişimi 500 mM'dır. ½ dilüsyon uygulanarak 250 mM elde edildi.

▪ **Çöktürücü Çözeltinin Hazırlanması:** 99.875 ml LC grade asetonitril (Labscan/C23C11X), 100 µL formik asit LC grade (Baker/9820) ve 25 µL TFAA (Triflouro asetik asit) (Across/29381) (99,875:0,1:0,025) karıştırılarak hazırlandı.

▪ **Mobil Fazın Hazırlanması:** 300 ml metanol LC grade (Baker:840), 699 ml LC-MS grade su ve 1 ml formik asit LC grade (Baker/9820) karıştırılarak hazırlandı. Akım hızı 250µl/dk olarak ayarlandı (139,16).

▪ **Kör Hazırlanması:** Plazma metiyonin sonucu 5,23 µmol/L ölçülen numune 1/3 oranında dilüe edilip 20 µl 'sine 200 µl çöktürücü çözelti eklendi, 10 sn vortekste karıştırıldı. 60 µl su eklenip ve 30 sn. vortekste karıştırıldı ve 5 dk oda ısısında bekletildi ve 5 dk 13.000 g'de santrüfuj edildi, cihaza verildi.

• **Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması:** 25.07 µmol/L ve 50.07 µmol/L metiyoninin iki kontrol çözeltisi olarak hazırlandı. Bunun için öncelikle 20 adet plazma numunesinden hazırlanan plazma havuzunda metiyonin miktarı 20.14 µmol/L olarak ölçüldü.

25.07 µmol/L kontrol çözeltisinin hazırlanması için 1.5 ml'lik V dipli ependorfa 10 µl 20.14 µmol/L plazma havuzu ve 10 µl 30 µmol/L metiyonin standardı eklendi ve 10 sn vortekste karıştırıldı. – 40°C'de saklandı.

50.07 µmol/L kontrol çözeltisinin hazırlanması için 1.5 ml'lik V dipli ependorfa 10 µl 20.14 µmol/L plazma havuzu ve 10 µl 80 µmol/L homosistein standardı eklendi ve 10 sn vortekste karıştırıldı. – 40°C'de saklandı.

Metiyonin Çalışma Prosedürü

Her numune iki kez hazırlandı.

1. 1.5 ml'lik V dipli ependorfa 20 µl plazma (kontol ya da standart) ve 20 µl 25 µmol/L internal standart (metiyonin-D3) konularak 10 sn vortekste karıştırıldı.
2. 40 µl 250 mM DTT eklendi.
3. 30 sn vortekste karıştırıldı ve 5 dk oda ısısında bekletildi.

4. 200 µl çöktürücü çözelti eklendi, 10 sn vortekste karıştırıldı ve 5 dk 13.000 g'de santrüfuj edildi.
5. Oluşan süpernatant okutulmak üzere 96 kuyucuklu kültür kabı içine 50 µl konarak cihaza verildi. Plazma, kontrol ve standart numuneleri aynı prosedürle ölçüldü.

LC-MS/MS Cihazının Şartları

Ölçüm LC-MS/MS yani likid kromatografi ardışık kütle spektrometresi (Waters Alliance HPLC; Quattro Micro Triple Quadrupole Tandem Mass spectrometer Waters, Milford, MA, USA) cihazında yapıldı.

İyonizasyon yöntemi olarak pozitif elektrosprey iyonizasyon yöntemi seçilmiştir. Metiyonin ve metiyonin-D3 için belirlenen kütle/yük oranları ile parçalanma sonrası oluşan iyonlar ile kolondan elüsyon zamanları, ana iyon (MH⁺), ikincil iyon (MS/MS) ve parçalanma enerjileri (CE) sırasıyla çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Metiyonin ölçümü için tutunma zamanı, m/z değeri ve parçalama enerjisi

	Tutunma Zamanı (dk)	Ana İyon [m/z]	İkincil İyon [m/z]	CE [eV]
Metiyonin	1.35	150	103.8	15 eV
Metiyonin-D3	1.35	153	107.1	15 eV

Kütle spektrometresi şartları ise Çizelge 3.5'de verilmiştir.

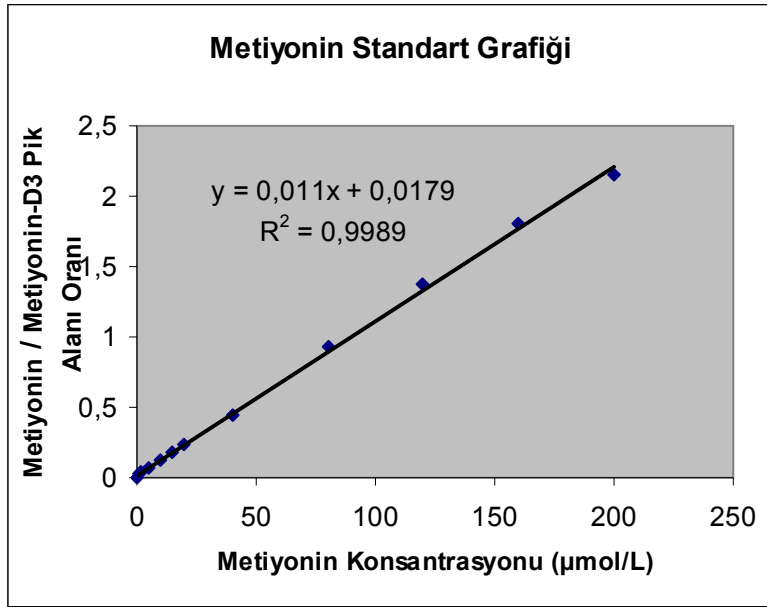
Çizelge 3.5. Metiyonin ölçümü için kütle spektrometresi şartları

Enjeksiyon Hacmi	4 µL
İyonizasyon Modu	ESI Positive
Nebulizing Gaz Basıncı	55 psi
Parçalayıcı Gaz Türü ve Basıncı	Ar, 5.0 x 10 ⁻³ mbar
Kapiler Voltajı	40 v
Dedektör Voltajı	1600 v

Metiyonin Standart Grafiği

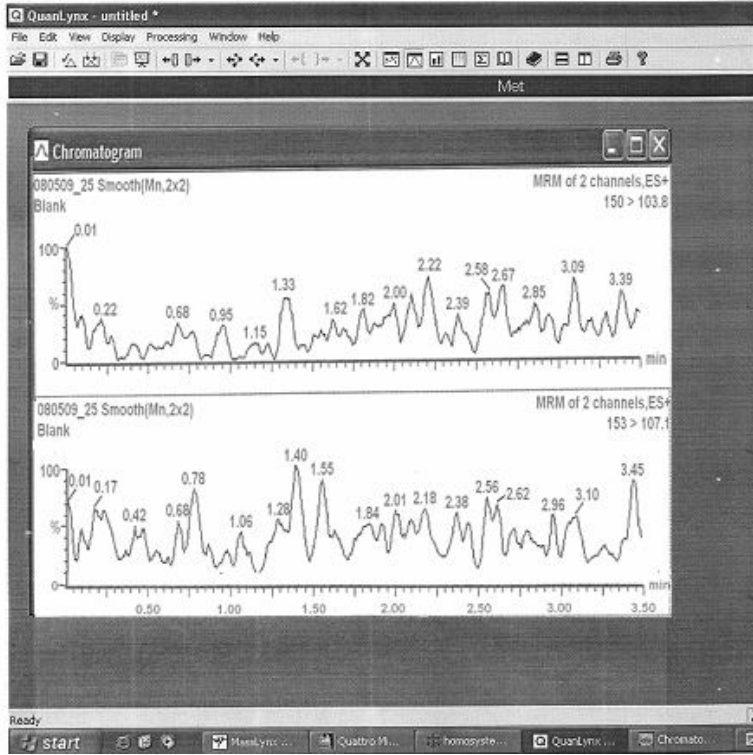
Standart grafiği çizmek için, hazırlanan 200 µmol/L metiyonin çözeltisinden dilüsyon yaparak 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 40, 80, 120, 160 ve 200 µmol/L konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı.

Yukarıda belirtilen prosedür uygulanarak ölçüm yapıldı. Her standart ikişer kez okutuldu. Numunelerin ve kontrol sıvılarının homosistein içeriği bu standart grafiği kullanılarak hesaplandı. Metiyonin standart grafiği; metiyonin standart pik alanının metiyonin-D3 internal standart pik alanına oranına karşılık metiyonin konsantrasyonu olarak çizildi. Grafiğin doğrusal olduğu gözlemlendi ($R^2 = 0.9989$) (Şekil 3.6).



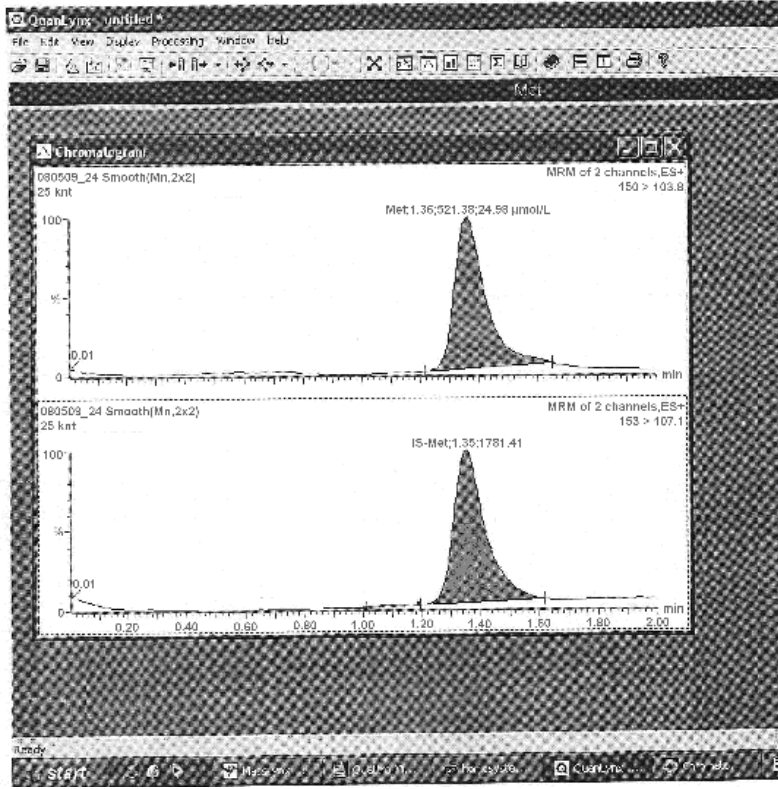
Şekil 3.6. Metiyoninin standart grafiği.

Standard grafiği çizildikten sonra önce kör çalışıldı (Şekil 3.7).

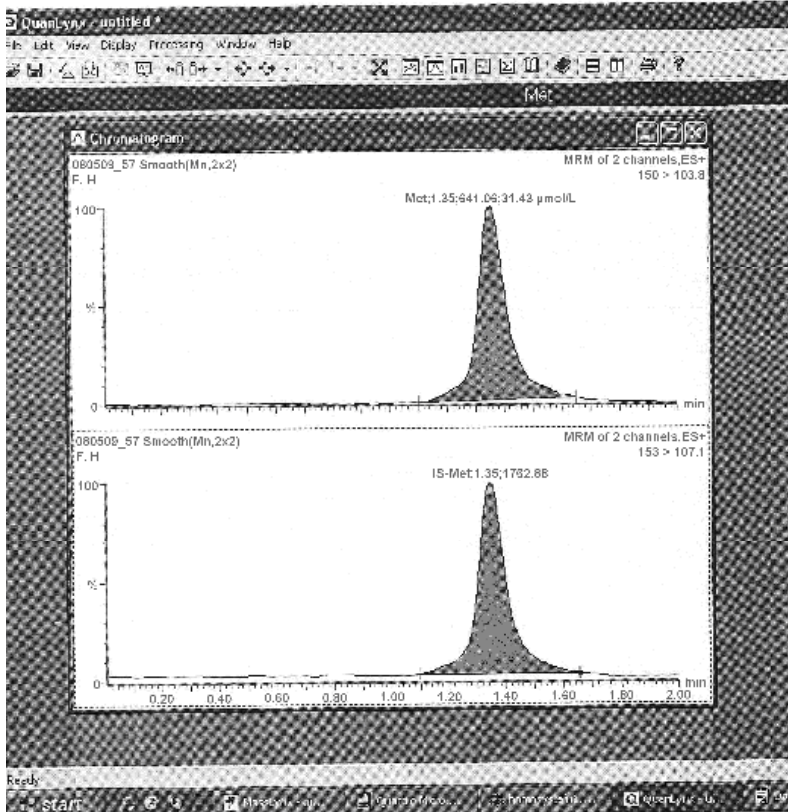


Şekil 3.7. Metiyonin kör çalışması

Metiyonin kör çalışmasında pik saptanmadı. Daha sonra iki farklı dozda hazırlanan kontrol çözeltileri ölçüldü. Kontrol çözeltileri prosedüre uygun şekilde hazırlanıp LC-MS/MS cihazında ikişer kez ölçülüp ortalaması alındı. 25.07 $\mu\text{mol/L}$ 'lık kontrol, ikişer kez ölçüldü ve ortalaması 25.05 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. 50.07 $\mu\text{mol/L}$ 'lık kontrol, ikişer kez ölçüldü ve ortalaması 49.66 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. Şekil 3.8'da 25 $\mu\text{mol/L}$ 'lık kontrol kromatogramına bir örnek görülmektedir. Kontrol çalışmalarının ardından numuneler ölçüldü. Hastaya ait metiyonin kromatogramı şekil 3.9'da izlenmektedir.



Şekil 3.8. Metiyonin 25 µmol/L kontrol kromatogramı.



Şekil 3.9. Hasta metiyonin kromatogramı.

3.3.3.1. Metiyonin gün içi, günler arası tekrarlanabilirlik ve verim (geri kazanım) çalışması

20 adet plazma örneğinden plazma havuzu hazırlandı. Yaklaşık 10 ml hazırlanan plazma havuzu örneğinde metiyonin miktarı 16.15 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. Plazma havuzu örneği 30 adet ependorfa herbirinde 10'ar μl olacak şekilde paylaştırıldı. 0, 40 ve 100 $\mu\text{mol/L}$ metiyonin konsantrasyonları hazırlandı. 10 adet üçlü set hazırlandı. Üçlü setin ilkinde 10 μl su ve 10 μl plazma havuzu, ikincisine 10 μl 40 $\mu\text{mol/L}$ standart ve 10 μl plazma havuzu, üçüncüsüne de 10 μl 100 $\mu\text{mol/L}$ standart ve 10 μl plazma havuzu eklenip vorteksde 10 sn karıştırılıp -20°C 'de saklandı.

Verim (geri kazanım) çalışması için hazırlanan bu üç farklı konsantrasyondaki numuneler 10 defa arka arkaya ölçüldü. Verim %94.4 - 106.9 arasında hesaplandı. Ortalama verim %101.7 ve %99.3 olarak hesaplandı.

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında gün içi 10 kez ölçülen numunelerin ortalamaları olan 8.07, 28.53 ve 57.49 $\mu\text{mol/L}$ 'dir. %CV değerleri sırayla %2.68, %3.1 ve %3.79 olarak hesaplandı.

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için on farklı gün üç farklı konsantrasyondaki numuneler ölçüldü ve ortalamaları, standart sapmaları hesaplandı. Ortalamaları 8.01, 28.36 ve 57.68 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarındaki numunelerin sırayla elde edilen %CV sonuçları %2.95, 3.19 ve %3.84 olarak hesaplandı. Tekrarlanabilirlik ve verim çalışması sonucu elde edilen %CV değerleri sırasıyla Çizelge 3.5'de verilmiştir (123,124).

Çizelge 3.6. Metiyonin günüiçi, günlerarası tekrarlanabilirlik ve verim çalışması.

Test Sayısı	Metiyonin $\mu\text{mol/L}$	Ölçülen $\mu\text{mol/L}$	Geri Kazanım	Gün içi	Günlerarası
N=10	0	8.01		%CV: 2.68	%CV:2.95
N=10	20	28.36	% 101.7	%CV:3.10	%CV:3.19
N=10	50	57.68	% 99.3	%CV:3.79	%CV:3.84

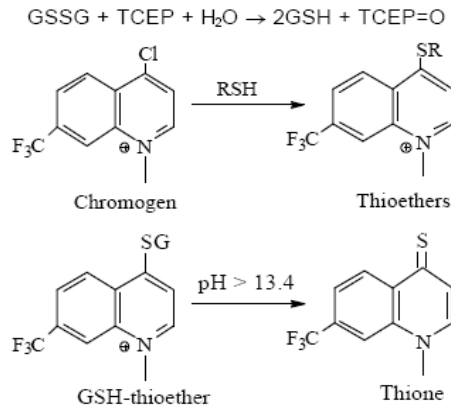
3.3.3.2. Metiyonin saptanabilme alt sınır (LOD) ve ölçülebilirlik alt sınır değerlerinin (LOQ) hesaplanması

Metiyonin içeriği 0,5 µmol/L olan numune 10 kez ölçüldü ve LOD = 3 x Standart Sapma formülünden LOD=0.04 µmol olarak hesaplandı.

LOQ = 10 x Standart Sapma formülünden 0.1 µmol olarak hesaplandı (16).

3.3.4. GSH Ölçümü

GSH, ELİSA (enzyme-linked immuno sorbent assay) (enzim ilintili immün test) yöntemi ile (Bioxytech GSH-420/21023) tam kanda ölçüldü (144).



Şekil 3.10. GSH ölçüm prensibi

Renklendirme prensibine göre çalışan yöntemimizde gerçekleşen reaksiyonlar şu şekildedir:

- 1- Okside glutatyon (GSSG), redükte edici ajan olan TCEP (tris 2-karboksietil fosfin) ile redükte glutatyon (GSH)'a dönüşmektedir.
- 2- Ortama kromojen (4-kloro-1-metil-7-trifluorometilkuinolinium metilsülfat) eklenmesiyle, örnekte bulunan tiyol grupları tioeterlere dönüşür.
- 3- Ortamın pH>13 olması için eklenen NaOH; GSH-tioeterin kromoforik tiyon'a dönüşümünü sağladılar. Bu bileşiğin 420 nm'de verdiği absorbans, GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (144).

Tam kan örnekleri alınırken, interferans yüzdesi daha az olan sodyum sitratlı tüpler tercih edildi.

Ön Hazırlık Çalışması

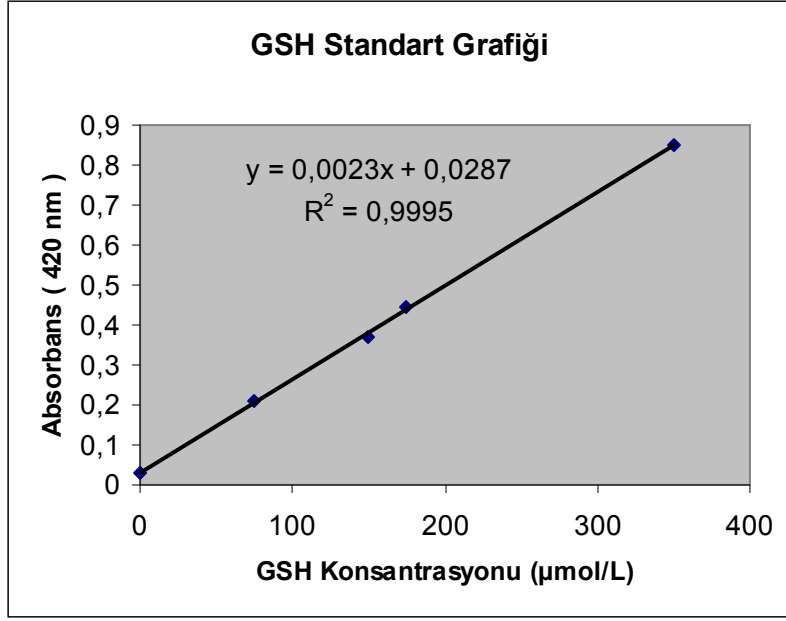
- 1- Ependorfa sodyum sitratlı tüpde bulunan tam kandan 100 µl konuldu.
- 2- 300 µl presipitan madde (Trikloroasetik asid (TCA)) eklendi.
- 3- 15 sn vortekste karıştırıldı.
- 4- Oda ısısında 5 dk 10.000 g'de santrifüj edildi.
- 5- Süpernatant ependorfa ayrılıp – 80°C'de saklandı.

Çalışma Prosedürü

1. -80°C'den alınan süpernatantlar oda ısısına geldikten sonra 50 µl ependorfa konuldu. 10 sn vortekste karıştırıldı.
2. 50 µl tampon [Potasyum fosfat, Dietilenetriaminepentaasetik asit (DTPA), Lubrol] ekleyip vortekste karıştırıldı.
3. 50 µl redükte edici ajan olan TCEP [tris(2-karboksiethyl)fosfine] ekleyip vortekste karıştırıldı.
4. 50 µl NaOH ekleyip vortekste karıştırıldı.
5. 30 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.
6. 420 nm'de plate okuyucuda okutuldu. Her numune 2'şer kez ölçülüp ortalamaları alındı.

GSH Standart Grafiği

Kit içinde hazır olarak verilen düşük (150 µM GSH) ve yüksek (350 µM GSH) olmak üzere iki farklı konsantrasyondaki kalibrasyon sıvıları dilüe edilerek 0, 75, 150, 175 ve 350 µM konsantrasyonlarında GSH standartları hazırlandı ve her standart ikişer kez ölçüldü, absorbansların ortalamaları alındı ve standart grafiği çizildi (Şekil 3.11). Numuneler ikişer kez ölçülüp absorbans ortalamaları alınıp GSH içeriği bu standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.11. GSH standart grafiği.

3.4. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

3.4.1. Gereçler

- Waters Alliance HPLC; Quattro Micro Triple Quadrupole Tandem Mass spectrometer
- Kolon: Waters Symmetry C8 ters faz kolonunda (2.1 x 100 mm, 3.5 µm) (Muskegon, Michigan, USA)
- Plate okuyucu
- Santrifüj (Heraeus Sepatech Biofuge 15R)
- Hassas terazi (Sartorius 2472)
- Derin dondurucu (Sanyo ve Uğur)
- Buzdolabı (Ariston No-frost)
- Ultrasonikatör (Cole Parmer)
- Santrifüj tüpleri
- Deney tüpleri
- Ependorf tüpler (1.5 ve 2 ml'lik)
- Otomatik pipetler (Gilson marka, 0-20, 20-200 ve 100-1000 µl kapasiteli)
- Cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml'lik)
- Cam balonjojeler, mezürler, erlenmayerler ve beherler.

3.4.2. Kimyasal Maddeler

Kimyasal maddeler Sigma, Merck, Cambridge İsopte, Bioxytech firmalarından temin edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Homosistein, metiyonin, vitamin B₁₂, folat düzeyleri ve yaş değerleri ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verildi. İstatistiksel değerlendirme, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 13.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tüm grupların sonuçlarının birbirleri ile karşılaştırılması için Student's T testi ve Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği'nde izlenmekte olan ve çalışmaya alınma ölçütlerini karşılayan 18-65 yaş arası ($\bar{X} \pm SD$) 33.79 ± 8.23 yıl; 36'sı erkek (%58), 26'sı kadın (%42) olmak üzere 62 hasta dahil edildi. 34'ü erkek (% 60), 23'ü kadın (%40) olmak üzere 57 sağlıklı bireyin oluşturduğu kontrol grubunun yaş ortalaması ($\bar{X} \pm SD$) 33.66 ± 8.67 yıl olup hasta grubunun değeri ile uyumludur. Hasta ve kontrol grubu cinsiyet farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Çizelge 4.1) ($p > 0.05$). Çizelge 4.1 ve 4.2'de hasta ve kontrol grubu sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Hasta grubu ile kontrol grubunun cinsiyet ve yaş ortalamalarının karşılaştırılması.

Özellikler	Şizofreni Grubu(n=62)	Kontrol Grubu(n=57)	p
Kadın/Erkek	26/36	23/34	
Yaş Ortalaması ($\bar{X} \pm SD$) yıl	$33,79 \pm 8.23$	$33,66 \pm 8.67$	0,488

Çizelge 4.2. Hasta grubuyla kontrol grubunun homosistein, metiyonin, vitamin B₁₂, folat ve GSH ($\bar{X} \pm SD$) değerlerinin karşılaştırılması.

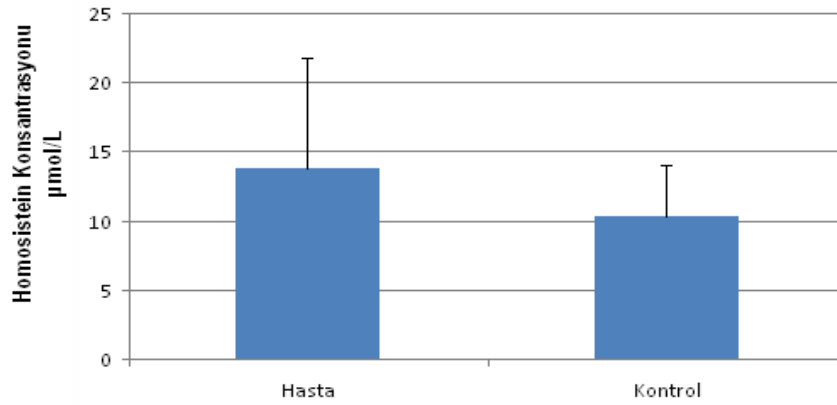
Değişkenler	Şizofreni Grubu (n=62) $\bar{X} \pm SD$	Kontrol Grubu (n=57) $\bar{X} \pm SD$	p
Homosistein ($\mu\text{mol/L}$)	13.48 ± 8.11	10.65 ± 3.95	0.136
Metiyonin ($\mu\text{mol/L}$)	22.21 ± 6.86	20.15 ± 7.86	0.033
Vitamin B ₁₂ (pg/ml)	274.25 ± 143.51	308.56 ± 123.09	0.014
Folat (ng/ml)	9.40 ± 3.55	9.65 ± 3.31	0.569
GSH ($\mu\text{mol/L}$)	1036.23 ± 165	1127.44 ± 167.36	0.003

4.1. Homosistein Düzeyleri

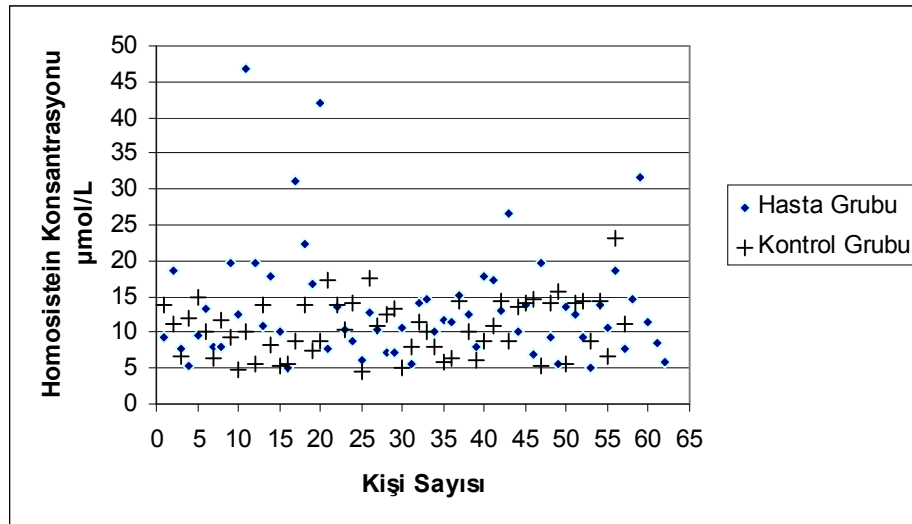
Hastaların homosisten düzeyleri $5.08 \mu\text{mol/L}$ ile $46.86 \mu\text{mol/L}$ aralığında bulundu. Ortalama $13.48 \pm 8.11 \mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi. Erkeklerde ortalama $13.88 \pm 8.06 \mu\text{mol/L}$, kadınlarda ortalama $12.92 \pm 8.20 \mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi

ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Çizelge 4.2) ($p>0.05$).

Kontrol grubunun homosisten düzeyleri 4.44 $\mu\text{mol/L}$ ile 23.19 $\mu\text{mol/L}$ aralığında bulundu. Ortalama 10.65 ± 3.95 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi. Erkeklerde 10.80 ± 3.64 $\mu\text{mol/L}$, kadınlarda 9.66 ± 3.64 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi ve kontrol grubunda da erkeklerle kadınlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (Çizelge 4.2) ($p>0.05$). Kontrol grubu ile hasta grubu arasında homosistein düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Ayrıca hasta ve kontrol grubunda homosistein ile yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).



Şekil 4.1. Homosisteinin hasta ve kontrol grubu karşılaştırılması.



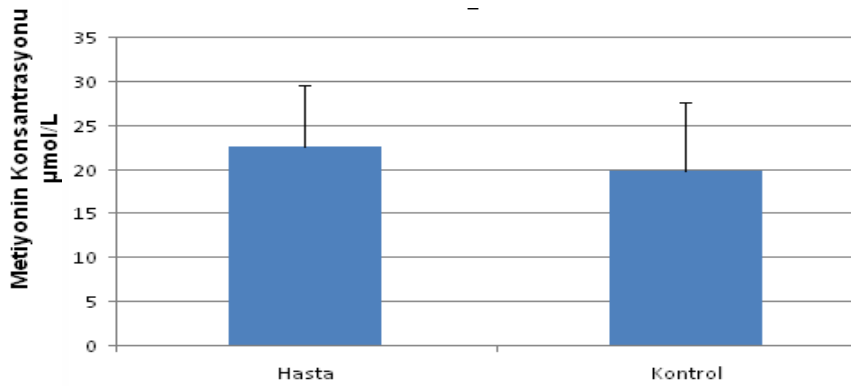
Şekil 4.2. Hasta ve kontrol grubunda homosistein dağılım grafiği.

Hasta grubunda 16 kişide, kontrol grubunda 4 kişide homosistein düzeyleri hiperhomosisteinemi sınır değeri olan 15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde bulundu. Bu kişilerde homosistein ile yaş ve cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki görülmedi. Hasta ve kontrol grubunda homosistein ile rutin parametreler arasında anlamlı bir ilişki görülmedi ($p>0.05$).

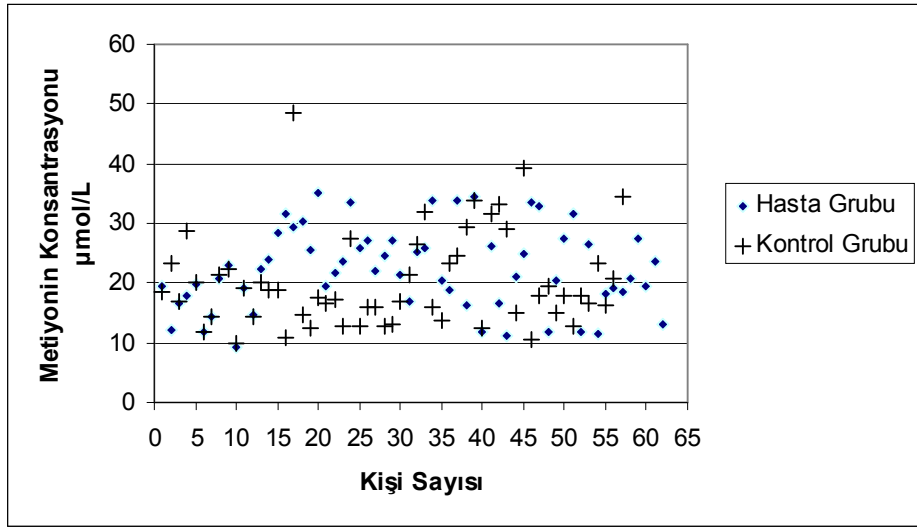
4.2. Metiyonin Düzeyleri

Hasta grubunda metiyonin değerlerinin ortalaması $22.20 \pm 6.86 \mu\text{mol/L}$, kontrol grubunun metiyonin değerlerinin ortalaması $20.15 \pm 7.86 \mu\text{mol/L}$ olarak bulundu (Şekil 4.3). Bu değerler referans değerine göre (10-42 $\mu\text{mol/L}$) normal sınırlardadır. Hasta grubunun metiyonin düzeyleri 20.5 $\mu\text{mol/L}$ ile 23.9 $\mu\text{mol/L}$; kontrol grubunun metiyonin değerleri ise 18 $\mu\text{mol/L}$ ile 22.2 $\mu\text{mol/L}$ aralığında bulundu (Şekil 4.4).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda metiyonin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$).



Şekil 4.3. Metiyonin hasta ve kontrol grubu karşılaştırılması.

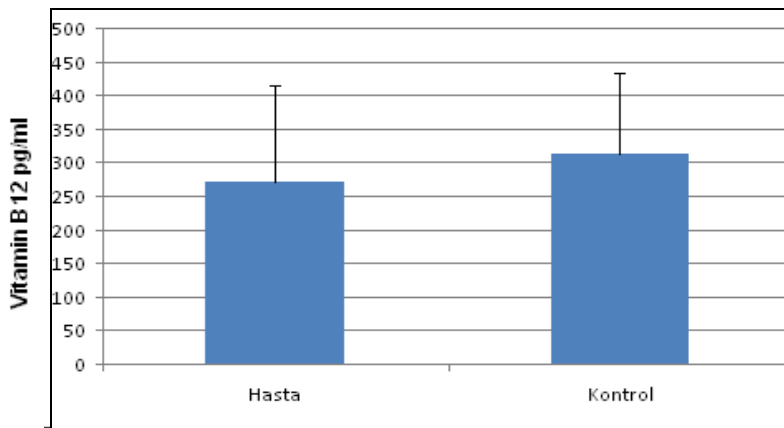


Şekil 4.4. Hasta ve kontrol grubunda metiyoninin dağılım grafiği.

Hasta ve kontrol grubunda metiyonin ile yaş, cinsiyet ve homosistein arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. Hasta ve kontrol grubunda metiyonin ile rutin parametreler arasında anlamlı bir ilişki görülmedi.

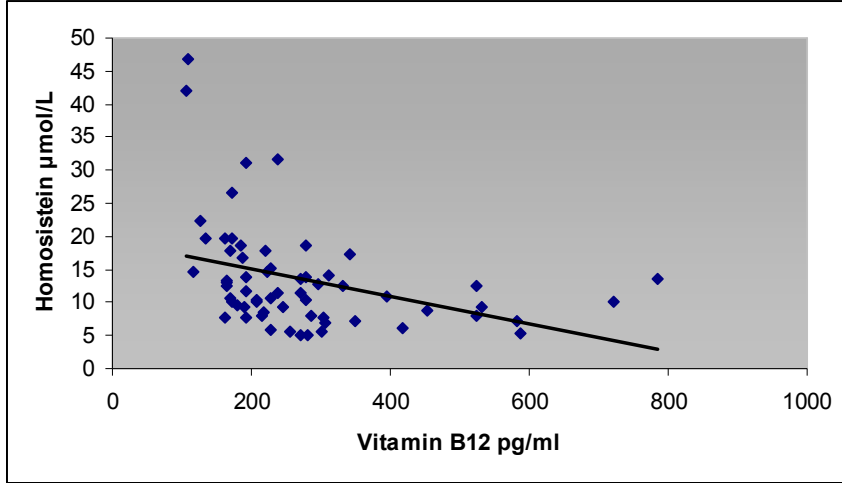
4.3. Vitamin B₁₂ Düzeyleri

Hasta grubunda vitamin B₁₂ değerlerinin ortalaması 274.25 ± 143.45 pg/ml , kontrol grubunun vitamin B₁₂ ortalaması 308.56 ± 121.79 pg/ml olarak bulundu (Şekil 4.5). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda serum vitamin B₁₂ düzeyleri anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).



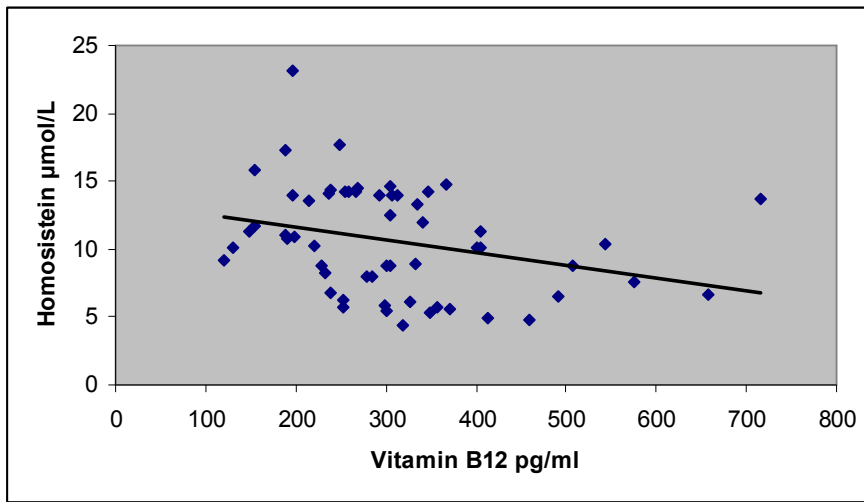
Şekil 4.5. Vitamin B₁₂ değerlerinin hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması.

Şekil 4.6’da görüldüğü gibi hasta grubunda homosistein düzeyleri ile vitamin B₁₂ arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.005$), negatif yönlü bir ilişki saptanmıştır ($r = -0.48$).



Şekil 4.6. Hasta grubunda homosistein ile vitamin B₁₂ arasındaki ilişki.

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi kontrol grubunun homosistein düzeyleri ile vitamin B₁₂ arasında anlamlı ($p<0.01$), negatif yönlü bir ilişki saptanmıştır ($r = -0.30$).



Şekil 4.7. Kontrol grubunda homosistein ile vitamin B₁₂ arasındaki ilişki.

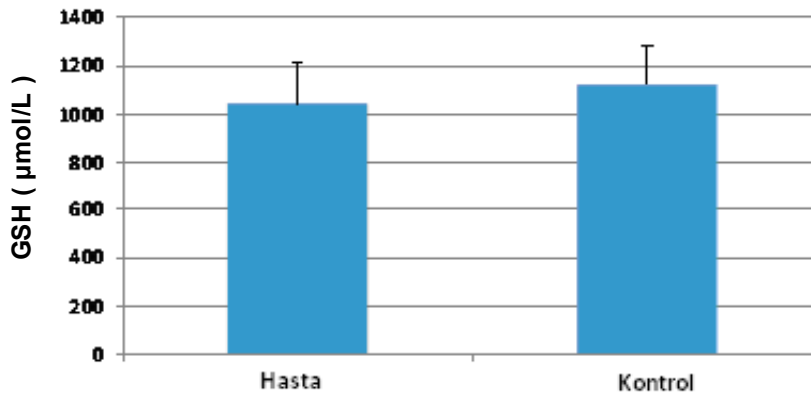
Hasta ve kontrol grubunda vitamin B₁₂ ile yaş, cinsiyet ve metiyonin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

4.4. Folat Düzeyleri

Hasta grubunda folat değerlerinin ortalaması hasta grubunda 9.40 ± 3.55 ng/ml, kontrol grubunun folat ortalaması 9.65 ± 3.31 ng/ml'dır. Hasta ile kontrol grubunda folat düzeyleri arasında, her iki grupta folat düzeyleri ile yaş, cinsiyet, homosistein, metiyonin, vitamin B₁₂ arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

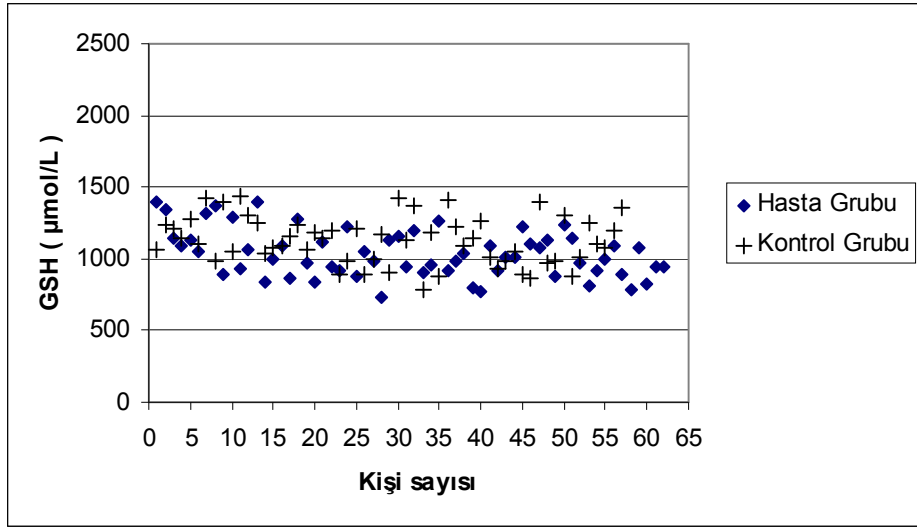
4.5. GSH Düzeyleri

Hasta grubunda GSH değerlerinin ortalaması 1036.23 ± 165 μ mol/L, kontrol grubunda ise GSH değerlerinin ortalaması 1127.44 ± 167.36 μ mol/L olarak bulundu (Şekil 4.8).



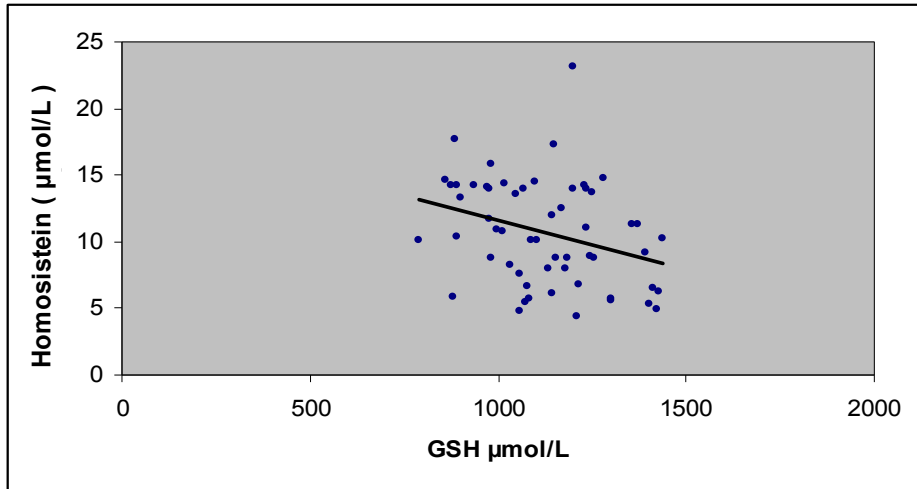
Şekil 4.8. Hasta ve kontrol grubunun GSH düzeyleri ilişkisi.

Hasta grubu ile karşılaştırılınca kontrol grubunda GSH değerleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.005$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Hasta ve kontrol grubu GSH dağılım grafiği.

Kontrol grubunda, GSH ile homosistein düzeyleri arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki bulundu ($r = -0.31$; $p = 0.018$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Kontrol grubunda GSH ile homosistein arasındaki ilişki.

Hasta grubunda GSH ile homosistein arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Hem hasta hem de kontrol grubunda GSH ile metiyonin, vitamin B₁₂, folat, yaş ve cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

5. TARTIŞMA

Şizofrenide metiyonin - homosistein metabolizmasında hangi yolla sorun vardır ve homosistein şizofreni için bir risk faktörü müdür sorularına cevap aradığımız çalışmamızda, 62 şizofreni ve 57 kontrol grubunda homosistein, metiyonin, vitamin B₁₂, folat ve GSH düzeyleri incelendi. Şizofreni grubunda LC/MS-MS yöntemi ile ölçülen homosistein düzeylerinin ortalaması (13.5 µmol/L) kontrol grubuna kıyasla (10.65 µmol/L) yüksek bulunsada bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Genel olarak dünyada plazma homosistein düzeyleri için ortalama değer 10 µmol/L, referans aralığı ise 5-15 µmol/L olarak kabul edilmektedir (32). Bizim çalışmamızda kontrol grubunun homosistein ortalama değeri bu referans değerlerinin içinde, hasta grubunun ise üst sınıra yakın olduğu görülmüştür.

Tüm dünyada yukarıda belirtilen referans değerleri kabul edilse de, homosistein düzeyleri genetik ve ırksal özelliklerden etkilendiği için referans değerler bölgeye özel belirlenmelidir. Türkiye’de homosistein referans değeri ile ilgili bir çalışma Ankara’da yapılmış ve 159 sağlıklı kişide, HPLC yöntemi ile plazma homosistein ortalama değeri 8.91 µmol/L olarak bulunmuştur (36). Yine başka bir çalışmada Gaziantep’de 126 sağlıklı kişide HPLC yöntemi ile plazma homosistein düzeyi ölçülmüş ve ortalama değeri 11.1 µmol/L bulunmuştur (13). Çalışmamızda ise Antalya’da 57 sağlıklı kişide LC/MS-MS yöntemi ile plazma homosistein ortalama değeri 10.65 µmol/L olarak bulunmuştur. Bu değerler arası farklılığın nedeni olarak yöntem farklılığı ve coğrafik faktörler olabilir.

Yapılan bazı çalışmalara göre, şizofreni hastalarında plazma homosistein düzeyleri yüksek bulunmuştur. 2005’de Brown ve ark (9), hcy yüksekliğinin şizofreni gelişimine katkısını anlayabilmek için oldukça geniş bir toplum temelli olgu kontrol çalışması yapmışlar ve üçüncü trimestirde artmış maternal serum homosisteininin şizofreni riskinde iki kattan daha fazla bir artışla ilişkili olduğunu bulmuşlardır (9).

Muntjewerff ve ark (124) 2006 yılında yaptıkları metaanaliz çalışmasında hcy düzeylerinde 5 µmol/L’lik bir artışın %70 oranında daha yüksek bir şizofreni riskiyle ilişkili olduğunu bulmuştur.

Yapılan bu çalışmalara göre, homosistein şizofreni hastalığı için bir risk faktörüdür. Bizim çalışmamızda ise şizofreni hastalarında kontrol grubuna kıyasla plazma homosistein ortalaması %26 oranında yüksek bulunsa da bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgularımızla uyumlu literatürde çalışmalar mevcuttur. Örneğin Virgos ve ark. (44) 1999'da 210 şizofreni hasta ile 218 kontrol grubu arasında plazma homosistein düzeylerini karşılaştırdıkları bir çalışmada iki grup arasında anlamlı bir fark bulmamışlardır. Araştırmacılar bu sonucu metiyoninin remetilasyon yolağının çalışmasına engel olabilecek folat eksikliğinin bölgelerinde fazla görülmemesine bağlamışlardır. Ancak, bu çalışmada direk folat ölçümü yapılmadığı için bu sonucu diyetle bağlamak yanlıştır. Susser ve ark. (12) 1998 yılında yaptığı bir çalışmada 19-55 yaş arası şizofreni ya da şizoafektif bozukluk tanısı almış 30 hastayı düşük folatlı diyet alan ve almayan şeklinde iki gruba ayırmış ve yüksek homosistein düzeyi olanların sadece düşük folatlı diyet alan grupta olduğunu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise hasta grubunda folat düşüklüğünün olmaması homosistein düzeyinde kontrole kıyasla fark olmamasına açıklık getirmektedir.

2003'de Muntjewerff ve ark. (74) 35 şizofreni 104 kontrol grubunda yaptığı çalışmada homosistein düzeylerinde anlamlı bir fark bulmamıştır. Bunu hasta ve kontrol grubunda vitamin B₁₂ düzeylerinde fark olmamasına bağlamıştır. Bizim çalışmamızda ise, hasta grubunda vitamin B₁₂ anlamlı derecede düşük, ayrıca hem hasta hem kontrol grubunda homosistein ile vitamin B₁₂ arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Vitamin B₁₂ homosisteinin metiyonine remetilasyonu için gerekli bir kofaktör olduğu için vitamin B₁₂ eksikliğinde homosistein düzeylerinde artış beklenmektedir. Çalışmamızda her iki grupta homosistein ile vitamin B₁₂ arasındaki negatif ilişki bu durumu açıklamaktadır. Homosisteini metiyonine dönüştüren MS yolağının kofaktörü olduğu bilinen vitamin B₁₂ yolağının dışında BHMT yolağı da homosisteini metiyonine dönüştürmektedir. Ancak, bu yolak MS enziminin aksine sadece karaciğerde ve bir miktar böbreklerde fonksiyon göstermekte ve ayrıca yolakta kullanılan betain, kolin oksidaz enzimi aracılığı ile kolinden üretilen, ağırlıklı olarak karaciğerde depolanan ve 3 aylık süre sonunda deposu boşalan bir maddedir (25). Bu da bize hasta ve kontrol grubunda vitamin B₁₂ eksikliğinde homosistein düzeyindeki artışı

açıklamaktadır. Ancak kontrol grubuna kıyasla hasta homosistein düzeyinde anlamlı bir artışın olmaması, metiyonin demetilasyon yolağında olabileceğini düşündürmektedir. Bunu anlamak için metiyonin düzeylerine bakılacak olursa hasta grubunda metiyonin düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. Hasta grubunda metiyonin ortalaması 22.2 $\mu\text{mol/L}$ iken kontrol grubunun metiyonin ortalaması 20.1 $\mu\text{mol/L}$ 'dir. Esansiyel bir aminoasit olan metiyonin düzeyinin hayvansal proteinlerce zengin diyet ile artabileceği söylene de, hastalardan 12 saatlik açlık sonrası kan alındığı için bu görüş dikkate alınmamıştır.

Şizofreni hastalarında plazma metiyonin düzeyini ölçen bir çalışma 1985 yılında Bjerkenstedt ve ark (147) tarafından yapılmış ve şizofreni hastalarında plazma metiyonin düzeylerini kontrole kıyasla yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada homosisteine ve yolaktaki diğer parametrelere ilişkin değerlere bakılmadığı için metiyonin – homosistein metabolizması üzerine bir yorum yapılamamıştır. Şizofreni hastalarında eş zamanlı olarak homosistein, metiyonin, vitamin B₁₂ ve folat değerlerini ölçen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamız şizofreni hastalarında metiyonin – homosistein metabolizmasını aydınlatması açısından önem taşımaktadır.

Polin 1961 yılında ve Cohen 1974 yılında (1) yaptıkları çalışmada 106 paranoid şizofreni hastalarında metiyoninin etkileri araştırılmış ve metiyonin verilen hastaların %57.9'unda fonksiyonel bir psikoza yol açtığı gözlenmiş ve hastalarda şizofrenik belirtilerde alevlenme olduğu sonucuna varılmıştır. Kronik şizofrenik hastalar metiyonine duyarlı ve metiyonine duyarlı olmayan olarak iki gruba ayrılmışlardır. Ancak bu ilgi çekici sonuçlar uzun süre fazla araştırılmamıştır. Daha sonra yayınlanmış olgu bildirileri ile tekrar tek karbon döngüsü kuramı gündeme gelmiştir (1,3). Bu çalışma hastalara verilen metiyoninin neden olduğu klinik alevlenmenin, homosistein düzeyinde bir artışa mı yoksa homosisteinin nörotoksik etkilerinin bir sonucu mu olduğu sorusuna cevap bulamamıştır.

Çalışmamızda hasta grubunda kontrole kıyasla metiyonin düzeyinin yüksek bulunmasının yanı sıra homosistein düzeylerinde hafif bir artışa rağmen anlamlı bir farkın olmaması metiyoninin demetilasyon yolağında bir sorun olabileceğini

düşündürmektedir. Metiyonin demetilasyon yolağında ATP kullanan bir reaksiyon ile metiyonin adenzil transferaz (MAT) tarafından metabolize olduğunda, çok yönlü metil vericisi olan S-adenozilmetiyonin (SAM) meydana gelmektedir. SAM transmetilasyon reaksiyonlarının ortak metil vericisi olarak çok sayıda akseptöre metil grubu vermektedir. SAM, SSS'nin ise tek metil vericisidir. SAM hücresel alıcılara metil grubu transfer etmesiyle S-adenosilhomosistein (SAH) oluşmaktadır. SAH'ın S-adenosil homosistein hidrolaz tarafından katalize edilerek homosistein ve adenzine ayrılması homosistein oluşumuna öncülük ettiği bilinen tek metabolik yoldur. Metiyonin demetilasyon yolağında yer alan SAM'ın MAT enzim eksikliğinde olduğu gibi düzeyinin azalması, metilasyon reaksiyonlarında sorun olduğu ileri sürülen şizofreni hastalığının patofizyolojisine açıklık getirmektedir (18,28). SAM düzeyini şizofreni hasta grubunda düşük bulan Sargent ve ark. (1) 1992'de yaptıkları çalışmada şizofreni hastalarında hipometilasyon kuramını ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada, plazma homosistein ve metiyonin düzeylerine bakılmadığı için SAM düşüklüğü homosistein artışına mı yoksa SAM sentezinde rol alan MAT enzim eksikliğine mi yoksa metiyonin düşüklüğüne mi bağlı olduğu soruları cevap bulamamıştır. Çünkü homosistein düzeyinin yükseldiği durumda SAM'ın sentezinde rol alan metiyonin düzeyi düşük ise homosistein remetilasyon yolağında ve bu yolda yer alan çalışmamızda gösterildiği gibi vitaminlerin eksikliği düşünülmelidir. Çalışmamızda bu yolda yer alan folat ve vitamin B₁₂ düzeylerine de bakılmıştır.

Homosistein düzeyleri yapılan çalışmalara göre yaş ve cinsiyete bağlı olarak farklılık göstermektedir. Çalışmamızda 23 kadın 34 erkek, yaş aralığı 19-62 ve yaş ortalaması 33.66 yıl olan kontrol grubunda homosistein ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Kontrol grubunda erkeklerde homosistein konsantrasyonu 10.80 ± 3.64 $\mu\text{mol/L}$ iken kadınlarda 9.66 ± 3.64 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Lussier-Cacan ve ark. (55) 1996'da temel ve sıradan rahatsızlıkları olmayan, çok sayıda sağlıklı kadın ve erkek üzerinde çalışmış ve cinsiyetin homosistein seviyesini belirleyen esas belirteç olduğunu ve kadınların erkeklerden %21 oranında daha düşük homosistein seviyesine sahip olduğunu bildirmişlerdi. Bunu erkeklerde vitamin alımında eksikliğe ve östradiol ile homosistein arasında negatif bir korelasyon olduğuna bağlamışlardır. Bu çalışmaların aksine

çalışmamızda kontrol grubunda homosistein ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulunmamasının nedeni olarak kontrol grubunda kadın ve erkekler arasında vitamin B₁₂, folat düzeyleri arası anlamlı bir farkın olmaması düşünülebilir.

Çalışmamızda kontrol grubunda yaş ile homosistein arasında bir ilişki bulunmadı. 2001 yılında Framingham ve ark. (49), 65 yaşın üzerindeki sağlıklı kişilerin homosistein düzeyinin 45 yaş altındaki kişilerle karşılaştırıldığında % 23 daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre 65 yaş üzerindeki plazma homosistein düzeyinin yüksekliğinin nedeni renal fonksiyonların, homosistein metabolizmasındaki SBS, olası diğer enzimlerin ve serum folat, B₁₂ vitamini düzeylerinin yaşla beraber azalması olarak yorumlanmıştır (52,53). Bu çalışmaların aksine, bizim çalışmamızda ise yaş ile homosistein arasında bir ilişki bulunmamasının nedeni, yaş ile vitamin B₁₂ ve folat düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunmaması olabilir.

Şizofreni hasta grubu çalışmamızda yaş ve cinsiyet faktörleri açısından değerlendirildiğinde, 26 kadın ve 36 erkek, yaş aralığı 20-51 yıl ve yaş ortalaması 36.79 yıl olarak bulundu. Hastaların homosistein düzeyleri ile yaş ve cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Hasta grubunda erkeklerde homosistein düzeyi 13.88 ± 8.06 $\mu\text{mol/L}$ iken kadınlarda 12.92 ± 8.20 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Levine ve ark. (56) 2002 yılında yaşları 18-70 arasındaki 150 erkek ve 43 kadın şizofrenik hasta grubu ile yaptıkları bir çalışmada, serum homosistein düzeylerini yaş gruplarına göre karşılaştırmışlar ve genç erkek şizofrenik hastalarda homosistein düzeylerinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yine Applebaum ve ark. (146) 2004 yılında yeni tanı almış şizofreni hastalarında serum homosistein düzeylerini incelemiş ve yine genç erkek şizofreni hastalarında yüksek homosistein düzeyleri olduğunu, diğer yaş grubu erkekler ve kadınlarda ise homosistein yüksekliği saptanamadığını bildirmişlerdir. Her iki araştırmacı bu sonuçları genç erkeklerde görülen beslenme eksikliğine ve erkeklerde kreatin düzeylerinin yüksek olmasına bağlamışlardır. Yapılan çalışmalarda erkeklerde kas kitlesinin daha fazla olmasından dolayı homosistein ile kreatin düzeyi arasında korelasyon olduğu düşünülmektedir. Çünkü yüksek homosisteinin metiyonine remetilasyonu ile artan SAM, metil grubunu guanidoasetik aside vererek kreatin sentezini artırmaktadır. Bu arada oluşan SAH'ın homosisteine dönüşümü de

artmaktadır (34,56). Yapılan çalışmaların aksine, çalışmamızda hastaların homosistein düzeyleri yaş ve cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulunmamasının nedeni olarak çalışmamızda metiyoninin homosisteine demetilasyon yolağında bir sorun olabileceği ve bu yolla yer alan SAM düzeylerindeki azalmaya bağlı kreatin düzeyinde azalma olduğu için genç erkeklerde homosistein düzeyinde bir fark olmadığını düşünebiliriz.

Çalışmamızda hasta grubunda genç erkeklerde homosistein düzeyinde artış görülmemesi nedeni, bu konuda suçlanan vitamin B₁₂ ve folat eksikliğinin görülmemesi olarak yorumlanabilir. Bizim sonuçlarımıza göre plazma total homosistein düzeyini etkileyen önemli bir belirteç olarak gösterilen yaş ve cinsiyet faktörü, plazma homosisteini üzerinde tek başına önem arz etmemektedir. Homosistein düzeylerini etkileyen beslenme, genetik, fiziksel aktivite gibi diğer faktörlerin de etkileri göz önünde bulundurulmalıdır. Nitekim İtalya’da 100 kadın üzerinde yapılan bir çalışmada östrojen hormonunun homosistein düzeyleri üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir (147).

Kan homosistein seviyesini belirleyen önemli faktörlerden biri de beslenmedir. Vitamin B₁₂ ve folat alımı homosisteinin metiyonine dönüşümü için gerekli kofaktörlerdir. Bunların eksik alımında homosistein artmaktadır. Çalışmamızda hasta grubunda vitamin B₁₂ değerlerinin ortalaması 274.25 ± 143.45 pg/ml , kontrol grubunun vitamin B₁₂ ortalaması 308.56 ± 121.79 pg/ml ’dır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda serum vitamin B₁₂ düzeyleri anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p=0.014$). Hem hasta hem kontrol grubunda homosistein ile vitamin B₁₂ arasında negatif yönlü anlamlı bir ilişki bulundu. Hasta grubunda folat değerlerinin ortalaması 9.40 ± 3.55 ng/ml, kontrol grubunun folat ortalaması 9.65 ± 3.31 ng/ml’dir. Hasta ve kontrol grubunda folat açısından bir ilişki görülmedi.

Şizofreninin beslenme ile ilişkisini gösteren ilk çalışma 1959-1961 yılları arasında Çin’de yapılmış ve yaşanan erken gestasyonel dönemde kıtlığa maruz kalan annelerin çocuklarında şizofreni gelişme riski iki misli arttığı gösterilmiştir (73). Bu çalışmalar Hey ve şizofreni gelişmesi arasındaki ilişkiyi kesin olarak ortaya koymamaktadır. Zira, kıtlık dönemleri her türden gerekli besin öğesinin alımının yetersiz olduğu dönemlerdir.

2005 yılında Stahl ve ark. (73) şizofreni hastalarında plazma homosistein düzeylerine beslenmenin etkisini anlamak için 256 şizofrenik hasta üzerinde çalışmışlardır. Şizofrenideki yüksek homosistein düzeylerinin düşük folat ve vitamin B₁₂ alımını da içeren kötü beslenme gibi bir takım faktörlere bağlı olduğunu ve homosistein düzeylerindeki yüksekliğin şizofrenide özgül klinik bir görünümle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. 2007 yılında Haidemenos ve ark (75) 97 şizofreni hastasında homosistein konsantrasyonu yüksek hastalarda folat ve vitamin B₁₂ düzeylerini düşük bulmuştur. Çalışmamızda da hasta ve kontrol grubunda homosistein düzeyi yüksek kişilerde vitamin B₁₂ düzeyleri düşük bulundu (p <0.05). Vitamin B₁₂'deki azalma kofaktörleri olduğu metiyonin sentaz (MS) ve MTHFR enzimlerinin çalışmamasına ve homosisteinin artmasına neden olmaktadır (18). Bu sonuç, homosisteini metiyonine dönüştüren yolda bir sorun olduğunu düşündürse de çalışmamızda hasta grubunda homosistein düzeyinde artış olmasına rağmen bu yükselişin anlamlı olmaması ve ayrıca hasta grubunda metiyonin düzeyindeki anlamlı artış, metiyoninin demetilasyon yolağında bir sorun olabileceğini göstermektedir. Vitamin B₁₂ düşüklüğü yoldan bağımsız olarak direkt olarak demiyelinizasyona ve akson dejenerasyonu ile psikiyatrik bozukluklara neden olabilmektedir (76).

1998 yılında Susser ve ark. (12) 19-55 yaş arası şizofreni ya da şizoafektif bozukluk tanısı almış 30 hastayı düşük folatlı diyet alan ve almayan şeklinde iki gruba ayırmış ve yüksek homosistein düzeyi olanların sadece düşük folatlı diyet alan grupta olduğunu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise hasta grubunda folat düşüklüğünün olmaması homosistein düzeyinde kontrole kıyasla fark olmamasına açıklık getirmektedir.

Homosistinürisi olan ya da homosisteinemisi olan kişilerde görülen şizofreni benzeri belirtilerin ortaya çıkması ve folat yada kobolamin tedavisiyle düzeldiğini bildiren çalışmalar vardır (148,149). 2006 yılında Levine ve ark. (150) 42 şizofreni hastasıyla yaptığı çalışmada, bu hastalara üç ay süresince homosistein düzeylerini düşürdüğü bilinen vitamin B₁₂, folik asit, pridoksin ve plasebo vermişlerdir. Üç ayın sonunda, bu hastaların plaseboya göre serum homosistein düzeylerinin belirgin olarak düştüğünü, hem pozitif ve negatif sendrom ölçeği puanlarında hem de nöropsikolojik test sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı

derecede düzelme olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda vitamin B₁₂ düzeyi düşük olan hastalara bu çalışmalarda olduğu gibi vitamin takviyesi yapılabilir.

Homosistein ile sigara sayısı arasında doğrusal bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Çalışmamızda hasta grubunda 34 adet sigara içen hasta ve 23 adet içmeyen hastalar arasında homosistein açısından anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. 1997 yılında Gilfix ve ark. (61) sigara sayısı ile homosistein arasında korelasyon tesbit etmişlerdir. Kato ve ark. (64) günde 20 adedin üzerinde sigara içen hastalarda homosistein düzeyinin %18 daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yine, Nygard ve ark. (65) her bir sigaranın homosistein konsantrasyonunu kadınlarda %1, erkeklerde %0.5 oranında artırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmalarda sigara içimi ile homosistein düzeyi artışı vitamin ihtiyacının artmasına bağlanmış ancak bu görüşü doğrulamak için vitamin ölçümü yapılmamıştır. Çalışmamızda ise homosistein ile sigara arasında bir ilişki bulunmamasının nedeni olarak vitamin B₁₂ ile sigara arasında anlamlı bir ilişkinin olmaması gösterilebilir. Çalışmamızla uyumlu olarak 2003 yılında Reif ve ark. (151), 2004 yılında Goff ve ark. (152) sigara ile şizofrenide homosistein arasında bir ilişki bulmamışlardır. Reif, Goff ve bizim çalışmamıza göre homosistein düzeyleri sadece sigara içimi ile ilişkili olmayıp metiyonin – homosistein yolağında oluşabilecek diğer eksikliklerle de ilişkilidir.

Metiyonin - homosistein yolağında metiyonin metabolizmasında görev yapan transsülfürasyon yolağında GSH meydana gelmektedir. Çalışmamızda hasta GSH düzeyleri kontrol grubuna kıyasla düşük bulundu. Hasta grubunda GSH değerlerinin ortalaması $1036.23 \pm 165 \mu\text{mol/L}$, kontrol grubunun GSH değerlerinin ortalaması $1127.44 \pm 167.36 \mu\text{mol/L}$ 'dir. Sadece kontrol grubunda GSH ile homosistein düzeyleri arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki bulundu. Homosistein metabolizmasının transsülfürasyon yolunun son ürünü olan sisteinden oluşan GSH sentezinde oluşabilecek aksaklıkların artmış oksidatif strese neden olarak şizofreni, bipolar bozukluk, depresyon gibi major psikiyatrik bozukluklara neden olabileceği son zamanlarda yaygınlaşmış bir düşüncedir (109,111). 2001 yılında Derin ve ark.'nın (153) yaptığı çalışmaya göre şizofrenik bozukluğu olan hastalarda, sağlıklı kontrollere göre eritrosit GSH düzeylerinin daha düşük olduğu saptanmıştır. 2010 yılında Gawryluk ve ark (153) depresyon,

şizofreni ve bipolar hastaların postmortem prefrontal kortekslerine bakıldığında redükte glutatyon seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda homosistein – metiyonin yolağında yer alan diğer parametrelere bakılmadığı için transsülfürasyon yolağı hakkında yorum yapmamışlardır.

Çalışmamızda gösterildiği gibi hasta grubunda GSH düzeyindeki anlamlı düşüklük şizofrenide artan oksidatif radikallerin yıkımı sırasında kullanıma bağlı olarak açıklanabileceği gibi; homosisteinin transsülfürasyon yolağındaki bir soruna da bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Hasta grubunda metiyoninin yüksekliğini sorumlu tuttuğumuz metiyonini homosisteine dönüştüren yolakta yer alan SAM, transsülfürasyon yolağını aktive eden bir moleküldür. Hasta grubunda GSH'ın ve dolayısıyla transsülfürasyon yolağının inhibisyonu düşüncesi, SAM molekülünde varsayılan azalma yani metiyonin homosisteine dönüştüren yolaktaki olabilecek sorunu desteklemektedir.

Çalışmamızda şizofreni hastalarında Hcy ile birlikte remetilasyon ve transsülfürasyon yolak son ürünleri olan metiyonin ve GSH kan seviyelerine bakma amacımız, sorunun hangi yolakta bozulmaya bağlı olduğunu görebilmektir. Hasta plazma homosistein düzeyi yüksek, plazma metiyonin düzeyi anlamlı yüksek, GSH ve vitamin B₁₂'nin anlamlı düşük bulunmuştur. Ayrıca her iki grupta vitamin B₁₂ ile homosistein düzeyleri arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki vardır. Hasta grubunda vitamin B₁₂ düzeyindeki anlamlı düşüş ve vitamin B₁₂ ile homosistein düzeyleri arasındaki negatif ilişki homosistein remetilasyonu yolağında bir sorun olabileceğini düşündürmektedir. Metiyonin düzeylerinin hasta grubunda anlamlı yüksek bulunması asıl sorunun metiyonini homosisteine dönüştüren metiyonin demetilasyonu basamağında olabileceğini düşündürmektedir. Bu yolakta olabilecek sorun aynı zamanda hasta grubunda homosistein düzeylerindeki yükselişin istatistiksel olarak anlamlı olmayışını ve aynı zamanda GSH düzeylerindeki anlamlı azalışı açıklamaktadır. Ayrıca demetilasyon yolağındaki bozukluk bu yolakta yer alan metilasyon reaksiyonlarında oluşabilecek aksaklıklara ve şizofreni hastalığı etyolojisine de açıklık getirmektedir. Hasta grubunda GSH düzeylerindeki anlamlı düşüş şizofreni gibi major psikiyatrik bozuklukların etyolojisinde suçlanan oksidatif strese maruziyeti desteklemektedir.

Şizofreni poligenetik özellikler gösteren ve çevresel faktörlerden de etkilenen hastalıktır. Şizofreni hastalarında homosistein yolağını araştıran çalışmaları karşılaştırmak homosistein ölçüm yöntemindeki farklılık, etnik karışım, tanısal değerlendirme farklılıkları, yaş, cinsiyet, düşük vitamin düzeyleri, alışkanlıklar ve enzim polimorfizmi gibi araya giren etkenlerin varlığı nedeniyle güç olmaktadır (47,48,73).

Birçok hastalıklarla ilişkisi ortaya konan homosisteinin gün geçtikçe daha hassas ölçümü üzerinde yapılan çalışmalar gün geçtikçe hız kazanmıştır. Son on yıldır Hcy'e klinik ilginin artmasıyla birlikte rutin kullanıma uygun analitik metodlar geliştirilmiştir. Literatür incelendiğinde plazma/serum örneklerinde tHcy ve metiyonin miktarı genel olarak yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC), enzim immunoassay (EIA), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi sistemi (GC-MS), sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi sistemleri (LC-MS) ile ölçülmüştür (15,16). Son yıllarda kullanıma giren LC-MS/MS yüksek hassasiyet, güvenilirlik, fiyat olarak uygun olması, kısa analiz süresi, reaktiflerin uzun süre stabil kalabilmesi ve LOQ, LOD seviyelerinin düşük olması gibi avantajlarından dolayı tercih edilen bir yöntem olmuştur.

Ardışık kütle spektrometresinin kullanılmaya başlaması sonucunda analizlerde sinyal/gürültü oranlarında artış ile analizin duyarlılığı artmıştır. Ayrıca parçalanmış ana iyonun istenen parçası izlenebildiğinden girişim yapan etkenler elimine edilerek analizin seçiciliği de artırılmıştır. Türkiye'de halen homosisteini ve metiyonini rutinde LC-MS/MS kullanarak kantitatif ölçüm yapan laboratuvar yoktur. Genel olarak homosistein için yenidoğan taraması şeklinde çalışmalar vardır. Çalışmamız bu açıdan önem arz etmektedir.

Homosistein analizinde günümüzde en yaygın olarak kullanılan, HPLC ile ayırımın ardından florimetrik dedeksiyonla yapılan tayinlerdir. Ayırım tekniği olarak en çok HPLC kullanılmasının sebebi homosisteinin kolon içerisinde benzer yapıdaki diğer amino tiyollerden ayırımının kolay olmasıdır. Ancak HPLC ile analizlerde kullanılan mobil faz miktarının fazla olması, türevlendirme ve ayırım için genellikle farklı pH'lar kullanılması, kolonda ayırımın en az 10 dk gibi bir sürede gerçekleşmesi ve bu sürede istenilen tüm amino asitlerin ayrılabilmesi ve

genel olarak sistemin pahalı olması yöntemin dezavantajları olarak sıralanabilir (125).

Kapiler elektroforez ile yapılan homosistein tayinlerinde ise spektrofotometrik dedeksiyonun yeterince hassas olmayışından dolayı kullanılan lazer indüktif floresans dedeksiyonunun pahalı olması ve elektrokimyasal dedeksiyon sırasında kullanılan elektrodun ayrımın yapıldığı voltajdan etkilenmesine bağlı olarak yanlış sonuçlar elde edilmesi bu yöntemin dezavantajlarıdır. İmmünolojik yöntemlerin en büyük dezavantajı ise kullanılan kitlerin ve genel olarak sistemin pahalı oluşudur (131).

Çalışmamızda LC-MS/MS kullanarak homosistein ve metiyonin ölçüm yöntemi uzun denemeler sonucunda geliştirildi. Bir yöntemin validasyonu için gerekli olan standart grafik eğrileri, kontrol çalışmaları, kör çalışmaları, gün içi, günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları, geri kazanım çalışmaları ve LOD, LOQ çalışmaları yapıldı ve yöntem valide edildi.

Bir yöntemin analitik ölçüm aralığı genel popülasyonun %0.5 – 99.5’ini kapsayacak şekilde geniş olması gerekmektedir. ESI-LC-MS/MS kullanarak yaptığımız çalışmamızda linearite aralığı 0.2 – 200 $\mu\text{mol/L}$ ’dir. GC-MS sistemi ile serum homosistein düzeyleri üzerine 2000 yılında Petr Husek (154) tarafından yapılan çalışmada tHcy için linearite aralığı 5-50 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir. Bu ölçüm aralığı oldukça sınırlıdır. Elektrosprey iyonizasyon ardışık kütle spektrometresi (ESI-LC-MS/MS) sistemi kullanılarak kararlı izotop dilüsyon yöntemi ile ilk toplam Hcy ölçümü 1999’da Magera ve ark. tarafından (143) gerçekleştirilmiştir. Linearite aralığı 2.5-60 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda linearite aralığı diğer çalışmalardan daha geniş olması yöntemin doğruluğunu artırmaktadır.

Tekrarlanabilirlik çalışması kullanılan yöntemin kesinliğinin bir göstergesi olup oldukça önemlidir. 1999’da ESI-LC-MS/MS kullanarak Magera ve ark.’nın yaptığı tHcy ölçümünde tekrarlanabilirliği gün içi %4.3, günlerarası %4.1 olarak bulmuştur (143). ESI-LC-MS/MS yöntemi ile yapılan en önemli çalışmalardan biri de 2007 yılında M. Rafii ve ark.(155) tarafından yapılan çalışmadır. Bu çalışmada deproteinizasyon ve ekstraksiyon sonrası pozitif ESI-LC-MS/MS yöntemi ile hcy analizi yapılmış ve farklı seviyelerde tHcy ölçümü için

tekrarlanabilirliği gün içi %4.5, günler arası %5.8 bulmuştur. Bizim çalışmamızda ise plazma total homosistein için tekrarlanabilirlik gün içi %2.7, günler arası %3.1 olup diğer çalışmalara göre daha iyi bir sonuç alınmıştır. Bu da çalışmamızın kesinlik ölçüsünün iyi olduğunu göstermektedir. 1999 yılında GC-MS yöntemiyle homosistein analizi çalışmasında tekrarlanabilirlik %6-7 arasında bulunmuştur (156). Bu çalışmadan da anlaşıldığı gibi LC-MS/MS daha hassas bir yöntemdir.

Yöntemin rutin kullanıma uygun olabilmesi için ön hazırlık süresinin ve numunenin cihazda değerlendirilme süresinin kısa olması gerekmektedir. Homosistein, sistein ve metiyonin transmetilasyon reaksiyonlarına birlikte katıldıklarından ve yapıları birbirlerine çok benzer olduğundan karışımlarının ayrılması oldukça güçtür. Ancak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi ayırma yöntemleriyle ayrıldıktan sonra kolon çıkışında uygun türevlendirici ayraçlar kullanılarak spektrofotometrik, florimetrik veya elektrokimyasal dedeksiyonla tayin edilebilmektedirler. Bunun için de analiz süreleri uzamaktadır ki bu süre 75 dakikaya kadar uzayabilmektedir. Özellikle immünolojik yöntemlerde türevlendirmenin ardından antikorla işaretleme işlemleri maliyeti ve süreyi uzatmaktadır (129,130). Çalışmamızda kullandığımız LC-MS/MS yönteminde ise sadece 10 dakika bekleme süresinin ardından numune cihaza verilebilmektedir. Cihazda bir numune 2 dk içinde okunmaktadır.

Geri kazanım çalışması yöntemin doğruluğunun bir göstergesi olup % olarak ifade edilir. Normalde %85- 115 aralığında kabul edilebilmektedir (157). Ducros ve ark (142) 2006 yılında LC-MS/MS yöntemiyle plazmada Hcy analiz etmiştir. Lineer aralığı 0-100 $\mu\text{mol/L}$, analiz süresi 3.5 dak, tekrarlanabilirlik %1.5-2.5, geri kazanım %93-92 olarak belirtilmiştir. Persichilli ve ark (135) 2010 yılında ESI-LC-MS/MS yöntemi ile plazmada tHcy analiz etmiş. Analiz süresi 3 dk tekrarlanabilirlik %5.3 - 5.5, geri kazanım %100.9-91.6 olarak bulmuştur. Çalışmamızda ise geri kazanım %100.5 ve 100.1 olup diğer çalışmalara göre daha iyi sonuç alınmıştır.

LOD yani teşhis sınırı, örnekteki bileşiğin saptanabilen en düşük miktarıdır. LOQ ise ölçülebilen en düşük analiz miktarıdır (157). 2006 yılında Ducros ve ark (142) yaptıkları çalışmada homosisteinin LOD 0.03 $\mu\text{mol/L}$, LOQ 0.09 $\mu\text{mol/L}$

olarak bulmuşlardır. 2010 yılında Persichilli ve ark (135) homosistein için LOD 0.01 $\mu\text{mol/L}$, LOQ 0.1 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulmuşlardır. 2006 yılında Weaving ve ark'nın (16) LC-MS/MS yöntemi ile plazma homosistein analizi yaptığı çalışmada ise LOD 0.2 $\mu\text{mol/L}$ LOQ 0.4 $\mu\text{mol/L}$ bulmuşlardır. Çalışmamızda ise homosistein LOD 0.06 $\mu\text{mol/L}$, LOQ ise 0.2 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. LOQ değerimiz referans değerinin çok altında olduğu için yöntemimizin hassasiyetinin iyi olduğunu göstermektedir.

2008 yılında Christel Hempen ve ark. (136) tarafından yapılan bir çalışmada da yine ESI-LC-MS/MS yöntemi kullanılarak metilmalonik asit ve Hcy birlikte analiz edilmiştir. Bu çalışmada bağlı formların indirgenmesi için DTT yerine TCEP [Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride] kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tHcy için tekrarlanabilirliği gün içi %2.3, günlerarası %5 olarak belirtilmiştir. Geri kazanım %97.5, teşhis limiti de 0,88 $\mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemde analiz süresi 4 dakika olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile kıyasladığımızda çalışmamızın, gün içi tekrarlanabilirlik %2.7, günlerarası tekrarlanabilirlik %3.1, geri kazanım %100.5, LOQ 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ve analiz süresinin 2 dk olması nedeniyle üstünlükleri vardır.

Literatürde metiyonin ölçümünde LC-MS/MS tekniği kullanan tek çalışma vardır. 2006 yılında Weaving ve ark'nın (16) LC-MS/MS yöntemi ile eş zamanlı olarak plazma ve idrarda homosistein, sistein ve metiyonin analiz etmiştir. Metiyonin için gün içi tekrarlanabilirlik %3.7, günlerarası tekrarlanabilirlik %11.8; geri kazanım %102.7; LOD 0.2 $\mu\text{mol/L}$, LOQ 0.4 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Analiz süresi 2 dk'dır. Çalışmamızda ise metiyonin tekrarlanabilirlik gün içi %3.1, günlerarası %3.3; geri kazanım %101.7 ve 99.3; LOD 0.04 $\mu\text{mol/L}$ LOQ 0.1 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Bu çalışmayla kıyaslanınca sonuçlarımız daha iyi bulunmuştur.

LC/MS-MS yaklaşık 2 dakika gibi kısa bir sürede analizin sonuçlanabilmesi, türevlendirme aşamalarına gerek kalmadan karışım halindeki örneklerin analiz edilebilmesi, internal standartın kullanımı ile son derece hassas ve güvenilir bir yöntem olması, otomasyona uygun olması ve kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi, testlerin 50 μl gibi çok az örnek miktarları ile çalışılabilmesi, yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların oranının az olması, kullanılan

maddelerin az miktarda böylece maliyet açısından ekonomik olması ile diğer yöntemlerden daha avantajlıdır. Çalışmamızın diğer çalışmalardan en önemli farkı, homosisteinin LC-MS/MS cihazında kantitatif ölçümü ile ilgili yayınların az, özellikle metiyoninin ölçümü ile ilgili sadece bir çalışmanın olmasıdır.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçları şu şekilde özetlenebilir.

1. Şizofreni hastalarında homosistein düzeyleri yüksek bulundu.
2. Şizofreni hastalarında metiyonin düzeyleri anlamlı yüksek bulundu.
3. Şizofreni hastalarında vitamin B₁₂ düzeyleri anlamlı düşük bulundu.
4. Şizofreni hasta ve kontrol grubunda homosistein ile vitamin B₁₂ arasında anlamlı negatif bir ilişki bulundu.
5. Şizofreni hastalarında GSH düzeyleri anlamlı düşük bulundu.
6. Kontrol grubunda GSH ile homosistein arasında anlamlı negatif bir ilişki bulundu.
7. Homosistein düzeyleri ile yaş, cinsiyet faktörleri, folat ve metiyonin arasında bir ilişki bulunmadı.
8. LC-MS/MS, plazma homosistein ve metiyonin ölçümü için hassas, otomasyona uygun bir yöntemdir. Ülkemizde LC-MS/MS kullanılarak homosistein düzeylerinin ölçümü ile ilgili sadece bir yayın vardır. LC-MS/MS kullanılarak metiyonin düzeylerinin ölçümü ile ilgili ise yayın bulunmamaktadır. Çalışmamız bu yönden de literatüre katkıda bulunacaktır.

7. ÖZET

Şizofreninin etyolojisi konusunda çeşitli kuramlar ortaya konmaya çalışılmakta ve çok sayıda çalışmada şizofreniye özgü biyolojik belirteçler araştırılmaktadır. Şizofreni etyolojisini açıklayabilmek amacıyla metiyonin - homosistein metabolizmasında bir bozukluk olabileceği fikrinden yola çıkarak yaptığımız çalışmamızda şizofreni tanısı almış 62 hasta, 57 kontrol grubunun serum homosistein, metiyonin, vitamin B₁₂, folat ve glutatyon düzeyleri araştırıldı. Şizofreni hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla homosistein değerleri yüksek, metiyonin düzeyleri anlamlı düzeyde yüksek, GSH ve vitamin B₁₂ düzeyleri ise anlamlı düzeyde düşük bulundu. Ayrıca her iki grupta vitamin B₁₂ ile homosistein düzeyleri arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki vardır.

Hasta grubunda vitamin B₁₂ düzeyindeki anlamlı düşüş ve vitamin B₁₂ ile homosistein düzeyleri arasındaki negatif ilişki homosistein remetilasyonu yolağında bir sorun olabileceğini düşündürmektedir. Metiyonin düzeylerinin hasta grubunda anlamlı yüksek bulunması asıl sorunun metiyonini homosisteine dönüştüren metiyonin demetilasyonu basamağında olabileceğini düşündürmektedir. Bu yolla olabilecek sorun aynı zamanda hasta grubunda homosistein düzeylerindeki yükselişin istatistiksel olarak anlamlı olmayışını ve aynı zamanda GSH düzeylerindeki anlamlı azalışı açıklamaktadır. Ayrıca demetilasyon yolağındaki bozukluk bu yolla yer alan metilasyon reaksiyonlarında oluşabilecek aksaklıklara ve şizofreni hastalığı etyolojisine de açıklık getirmektedir. Hasta grubunda GSH düzeylerindeki anlamlı düşüş şizofreni gibi major psikiyatrik bozuklukların etyolojisinde suçlanan oksidatif strese maruziyeti desteklemektedir.

LC-MS/MS, plazma homosistein ve metiyonin ölçümü için hassas, otomasyona uygun bir yöntemdir. Ülkemizde LC-MS/MS kullanılarak homosistein düzeylerinin ölçümü ile ilgili sadece bir yayın vardır. LC-MS/MS kullanılarak metiyonin düzeylerinin ölçümü ile ilgili ise yayın bulunmamaktadır. Çalışmamız bu yönden de literatüre katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: Şizofreni, homosistein, metiyonin, LC-MS/MS, vitamin B₁₂, folat.

8. ABSTRACT

Metabolism of Methionine - Homocysteine in Patients with Schizophrenia

There are various hypothesis about the etiology of schizophrenic disorders and several studies have been performed to evaluate biological markers for this disease entity. In order to define novel biological markers in the etiology of schizophrenia, we have studied levels of homocysteine, methionine, vitamin B₁₂, folate and glutathione in 62 patients as well as in 57 controls. As compared to controls, levels of homocysteine were elevated nonsignificantly, levels of methionine were elevated significantly and levels of GSH and vitamin B₁₂ were significantly lower in patients with schizophrenia. There was also an inverse correlation between the levels of vitamin B₁₂ and homocysteine in both groups.

Lower levels of vitamin B₁₂ in patients with schizophrenia along with inverse relationship between the levels of vitamin B₁₂ and homocysteine suggests a possible problem in homocysteine remethylation pathway. Higher levels of methionine in patients with schizophrenia suggests a possible problem at the level of demethylation of methionine. Any possible problem at this step could explain the statistically nonsignificant increase in the levels of homocysteine in these patients as well as significant decrease in levels of GSH. Errors in demethylation pathway could shed lights into potential new problems in methylation reactions and better understanding of etiology of schizophrenia. Significant decrease in levels of GSH in patients with schizophrenia further supports the potential role of oxidative stress in major psychiatric disorders.

LC-MS/MS method for measurement of plasma homocysteine and methionine levels is a sensitive and open to automated measurements. In our country there is only one study using LC-MS/MS method for measurement of homocysteine and there is no study using LC-MS/MS method for measurement of methionine. Our study will make significant impact in literature.

Key words: Schizophrenia, homocysteine, methionine, LC-MS/MS, vitamin B₁₂, folate.

9. KAYNAKLAR

1. Regland B. Schizophrenia and single-carbon metabolism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2005; 29: 1124-32.
2. Singh SM, Murphy B, O'Reilly LR. Involvement of gene-diet/drug interaction in DNA methylation and its contribution to complex diseases: from cancer to schizophrenia. *Clin Genet* 2003; 64: 451-60.
3. Selhub J. Folate, vitamin B₁₂ and vitamin B₆ and one carbon metabolism. *J Nutr Health Aging* 2002; 6(1): 39-42.
4. Vitvitsky V, Thoma M, Ghorpade A, Gendelman HE, Banerjee R. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem* 2006 24; 281(47): 35785-93.
5. Stanger O, Fowler B, Piertz K, Huemer M, Haschke-Becher E, Semmler A, Lorenzl S, Linnebank M. Homocysteine, folate and vitamin B₁₂ in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. *Expert Rev Neurother* 2009; 9(9): 1393-412.
6. Obeid R, Herrman W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *Febs Lett* 2006; 580(13): 2994-3005.
7. Zieminska E, Matyja E, Kozłowska H, Stafiej A, Lazarewicz JW. Exitotoxic neuronal injury in acute homocysteine neurotoxicity: Role of calcium and mitochondrial alterations. *Neurochem Int* 2006; 48(6-7): 491-7.
8. Reynolds EH. Benefits and risk of folic acid to the nervous system. *J Neurology Neurosurg Psychiatry* 2002; 72: 567-71.
9. Brown AS, Susser ES. Homocysteine and Schizophrenia: From prenatal to adult life. *Prog Neuropsychopharmacol and Biol Psychiatry* 2005; 29: 1175-80.
10. Regland B, Johansson BV, Grenfeldt B, Hjelmgren LT, Medhus M. Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. *J Neural Transm* 1995; 100: 165-9.
11. Muntjewerff JW, Blom HJ. Abberant folate status in schizophrenia patients: What is the evidence? *Prog Neuropsychopharmacol and Biol Psychiatry* 2005; 29: 1133-9.
12. Susser E, Brown AS, Klonowski E, Allen RH, Lindenbaum J. Schizophrenia and impaired homocysteine metabolism. A possible association. *Biol Psychiatry* 1998; 44: 141-3.
13. Aksoy SN, Geyikli İ, Saygılı İ. Sağlıklı kişilerde plazma homosistein düzeyinin belirleyicileri. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31 (4); 175-81.
14. Muntjewerff JW, Mechteld LC, Hoogendoorn A, Kahn R, Sinke R, Heijer MD, Kluijtmans L, Blom HJ. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype, and the risk for

- schizophrenia: a Dutch population based case-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 135(1): 69-72.
15. Rafii M, Elango R, House JD, Courtney-Martin G, Darling P, Fisher L, Pencharz PB. Measurement of homocysteine and related metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2009; 05: 002.
 16. Weaving G, Rocks F, Iversen SA, Titheradge MA. Simultaneous quantitation of homocysteine, cysteine and methionine in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 474-80.
 17. Kemperman RF, Veurink M, Van Der Wal T, Kneegting H, Bruggeman R. Low essential fatty acid and B-vitamin status in a subgroup of patients with schizophrenia and its response to dietary supplementation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 74(2): 75-85.
 18. Gouaille CB, Bottiglieri T. Homocysteine Metabolism. Edited by Bottiglieri T. *Homocysteine Related Vitamins and Neuropsychiatric Disorders*. Springer 2003; 43: 21-8.
 19. Temel İ, Özerol E. Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg* 2005; 9: 149-15.
 20. Anderson A, Isaksson A, Brattstrom L, Hultberg B. Homosistein and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization. *Clin Chem* 1993; 39: 1590-7.
 21. Refsum H, Heliand S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homosistein in plasma and urine. *Clin Chem* 1985; 31: 624-8.
 22. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum methods applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-79.
 23. Barber JR, Clarke S. Inhibition of protein carboxyl methylation by S-adenosyl-homocysteine in intact erythrocytes. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1984; 259: 7115-22.
 24. Gerritsen T, Waisman HA. Homocystinuria an error in the metabolism of methionine. *Pediatrics* 1964; 33: 413-20.
 25. Heil SG, Lievers KJA, Boers GH, Verhoef P, Den Heijer M, Trijbels FJM, Blom HJ. Betain-Homocysteine Methyltransferase (BHMT): Genomic and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 71: 511-9.
 26. Finkelstein JD, Martin JJ, Haris DJ. Methionine metabolism. In mammals the methionine-sparing effect of cysteine. *J Biol Chem* 1988; 263: 1750-4.
 27. Miner SES, Evrovski J, Cole DEC. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism. An Update. *Clinical Biochemistry* 1997; 30: 189-201.

28. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 131-8.
29. Finkelstein JD. The regulation of homocysteine metabolism. Kluwer Academic Publishers 1997; 5: 3-9.
30. Vivian F, Susan CG, Louis MF. Homocysteinemia and the endocrine system. Implications for Atherosclerosis and Thrombosis. *Endocrine Reviews* 1999; 20(5): 738.
31. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Gren R, Robinson K, Savon SR, Secic M, et al. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem* 1994; 40: 873-81.
32. Kang SS, Wong DM, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 279-98.
33. Brattström L, Lindgren A, Israelsson B, Andersson A, Hultberg B. Homocysteine and cysteine determinants of plasma levels in middle aged and elderly subjects. *J Intern Med* 1994; 236: 631-41.
34. Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine herure and arter methionine loading with regard to age, gender and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 79-87.
35. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zeimbekis A, Chrysohoou C, Stefanadis C. The association between lifestyle- related factors and plasma homocysteine levels in healthy individuals from the "ATTICA" Study. *Int J Cardiol* 2005; 98: 471-7.
36. Taskin G, Yilmaz-Sipahi E, Yildirimkaya M, Nadirler F, Halloran M, Ayoglu FN, Laleli Y. Plasma homocysteine levels in a healthy Turkish population sample. *Acta Cardiologica* 2006; 61: 35-42.
37. Sipahi E, Taskin G, Kumbasar D, Halloran M, Yildirimkaya M, Nadirler F, Yildirir A, Berkalp B, Laleli Y. Hyperhomocysteinemia and coronary artery disease in the Turkish population. *Acta Cardiol* 2002; 57: 415-20.
38. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland RM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 230-6.
39. Wu LL, Wu JT. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clinica Chimica Acta* 2002; 322: 21-8.
40. Folin M, Baiguera S, Gallucci M, Conconi M.T, Di Liddo R, Zanardo A, Parnigotto PP. A cross-sectional study of Homocysteine, NO levels, and CT-findings in Alzheimer Dementia, Vascular Dementia and Controls. *Springer Link* 2005; 6: 255-60.
41. Sachdev P. Homocysteine and neuropsychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr* 2004; 26(1): 49-55.

42. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease. plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 473-501.
43. Mudd SH, Levy HL, Skocuksy F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver LR, Beaudet AL, Sly WS, Vale P. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill New York 1995; 1279-327.
44. Virgos C, Martorell L, Simo JM, Valero J, Figuera L, Joven J, et al. Plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene variant: lack of association with schizophrenia. *Neuropsychiatr* 1999; 13(10): 2035-8.
45. Regland B, Germgard T, Gottfries CG, Grenfeldt B, Koch-Schmidt AC. Homozygous thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in schizophrenia-like psychosis. *J Neural Transm* 1997; 104(8-9): 931-41.
46. Fenton WA, Rosenberg LE. *Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism*. McGraw-Hill 1995; 3129-49.
47. Vermaak WI, Ubbink JB, Delport R, Becker RJ, Bissbort SH, Ungerer JP. Ethnic immunity to coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1991; 89: 155-62.
48. Ubbink JB, Vermaak WI, Delport R, Van der Merwe A, Becker PJ, Potgieter H. Effective homocysteine metabolism may protect South African blacks against coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 802-10.
49. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PWF, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentrations in the Framingham offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 613-21.
50. Norlund L, Grubb A, Flex. The increase of plasma homocysteine concentrations with age is partly due to the deterioration of renal function as determined by plasma cystatin C. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 175-8.
51. Gartler SM, Hornung SK, Motulsky AG. Effect of chronologic age on induction of cystathionine synthase, uroporphyrinogen I synthase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 1916-23.
52. Tucker KL, Selhub J, Wilson PW, Rosenberg IH. Dietary pattern relates to plasma folate and homocysteine concentrations in the Framingham Heart Study. *J Nutr* 1996; 126: 3025-31.
53. Van Asselt DZ, De Groot LC, Van Staveren WA. Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 328-34.
54. Ganji V, Kafai MR. Demographic, health, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 826-33.
55. Lussier S, Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological trait. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 587-93.

56. Levine J, Stahl Z, Sela BA, Gavendo S, Ruderman V, Belmaker RH. Elevated homocysteine levels in young male patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 1790-92.
57. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin. Chem* 1998; 44: 1833-43.
58. Tallova J, Tomandl J, Bicikova M, Hill M. Changes of plasma total homocysteine levels during the menstrual cycle. *European Journal of Clinical Investigation* 1999; 29: 1041-4.
59. Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo MR, Resende MP. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism, correlation with folate, vitamin B₁₂ and vitamin B6 status. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 220-4.
60. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease. Plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 114(5): 473-500.
61. Gilfix BM, Blank DW, Rosenblatt DS. Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. *Clin Chem* 1997; 43: 687-8.
62. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE, Kvale G, Vollset SE. Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(1): 136-43.
63. Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Richards EW, Krumdieck CL. Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 559-66.
64. Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE, Zeleniuch-Jacquotte A, Akhmedkhanov A, Riboli E. Epidemiologic correlates of serum folate and homocysteine levels among users and non-users of vitamin supplement. *Int J Vitam Res* 1999; 69: 322-9.
65. Nygard O, Vollset SE, Refsum HM. Total homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274 (19): 1526-33.
66. De Bree A, Verschuren WMM, Blom HJ, Kromhout D. Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 150-4.
67. Hustad S, Ueland PM, Vollset SE. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methyl-enetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 2000; 46: 1065-71.
68. Nedrebo BG, Ericsson UB, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Akvaag A. Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. *Metabolism* 1998; 47: 89-93.
69. Wollesen F, Brattström L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berne C. Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999; 55: 1028-35.

70. Chanarin I, Deacon R, Lumb M, Perry J. Cobalamin-folate interrelations. *Blood Rev* 1989; 3(4): 211-5.
71. Bottiglieri T. Folate, vitamin B₁₂ and neuropsychiatric disorders. *Nutr Rev* 1996; 54(12): 382-90.
72. Hector M, Burton JR. What are the psychiatric manifestations of vitamin B₁₂ deficiency? *J Am Geriatr Soc* 1998; 36(12): 1105-12.
73. Stahl Z, Belmaker RH, Friger M, Levine J. Nutritional and life style determinants of plasma homocysteine in schizophrenia patients. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005; 15: 291-5.
74. Muntjewerffa JW, Van Der Putb N, Eskesc T, Ellenbroekd B, Steegersc E, Blomb H, Zitmane F. Homocysteine metabolism and B-vitamins in schizophrenic patients: low plasma folate as a possible independent risk factor for schizophrenia. *Psychiatry Research* 2003; 121: 1-9.
75. Haidemenos A, Kontis D, Gazi A, Kallai E, Alin M, Lucia B. Plasma homocysteine, folate and B₁₂ in chronic schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2007; 31: 1289-96.
76. Reynolds E. Vitamin B₁₂, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol* 2006; 5: 949-60.
77. Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Alien RH. Diagnosis of cobalamin deficiency. In: Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990;34: 99-107.
78. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JCM, Garrett TJ, Podell ER, et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1720-8.
79. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Alien RH. Serum methylmalonic acid and total homocysteine in the diagnosis of deficiencies of cobalamin and folat. *Am J Med* 1993; 23: 45-67.
80. Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 1103-12.
81. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocystinemia vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl I Med*1974; 291: 537-43.
82. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stres in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab* 2005; 6(1): 27-36.
83. Van Guldener C, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(3): 281-9.
84. Gouaille CB, Bottiglieri T. Why do Homocysteine Levels increase? Edited by Bottigliere T. *Homocysteine Related Vitamins and Neuropsychiatric Disorders*. Springer 2003; 59-92.

85. Bisschops RHC, Graaf Y, Mali W, Grond J. Elevated levels of plasma homocysteine are the associated with neurotoxicity. *Atherosclerosis* 2004; 174: 87-92.
86. Stuhlinger MC, Stranger O. Asimmetric dimethyl-L-arginin (ADMA). A possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Curr Drug Metab* 2005; 6(1): 3-14.
87. Lipton SA, Kim VK, Choi YB, Kumar S, D'Emilla DM, Rayuda PV et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-metil-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 94: 5923-8.
88. Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis, a meta-analysis. *Thromb. Haemost* 1998; 80: 874-7.
89. Mattson MP, Shega TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003; 26(3): 137-46.
90. Carson NAJ, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Disease Childhood* 1962; 37: 505-13.
91. Mc Cully KS. Vascular pathology of homocysteinemia. Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56(1): 111-28.
92. Wilcken D, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079-82.
93. Unlu Y, Keles S, Kocogulları C.U, Kocak H, Bakan E. Hiperhomocysteinemia as a risk factor for deep vein trombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005; 30(3): 315-8.
94. Martinelli I, Battaglioli T, Pedotti P, Cattaneo M, Mannuci PM. Hyperhomosisteinemia in cerebral ven trombosis. *Journal of The American Society of Hematology* 2003; 102(4): 1363-6.
95. Grillo A, Guglielmo S, Tondi P, De Vitis I, Fedelli G, Gabarrini G, Gabarini A. Increased intima-media thickness in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2005; 22(9): 839-46.
96. Mallamaci F, Bonano G, Seminara G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Candela V, Scudo P, Spoto B, Testa A, Tripepi G, Tech S, Zoccali C. Hiperhomocysteinemia and arteriovenosus fistula thrombosis in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 702-7.
97. Ates A, Aydintug O, Olmez U, Duzgun N, Duman M. Serum homocysteine level is higher in Behcet's disease with vascular involment. *Rheumatol Int* 2005; 25: 42-4.
98. Hankey GJ, Eikelbom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407-13.
99. Bostom AG, Culleton BF. Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 891-900.

100. Stchouwer CD, Van Guldener L. Does homocysteine cause hypertension ? Clin Lab Med 2003; 41: 1408-11.
101. Bayraktar F, Dereli D, Ozgen AG, Yılmaz C. Plasma homocysteine levels in polycystic ovary syndrome and congenital adrenal hyperplasia. Endocr J 2004; 51: 601-8.
102. Cheng TT, Chiu CK. Elevated homocysteine levels in patients with Raynaud's phenomenon secondary to systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol 2002; 21: 251-4.
103. Marcucci R, Alesseandrello LA, Cellai AP, Rogolino A, Berloco P, Leprini E, Pagnini P, Abbate R, Prisco D. Cardiovascular and thrombotic risk factor for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. J Thromb Haemost 2005; 3: 929-34.
104. Langmeir M, Folbergrova J, Haugvicova R, Pokorny J, Mares P. Neuronal Cell Death in Hippocampus Induced by Homocysteic Acid in Immature Rats. Epilepsia 2003; 44: 299-304.
105. Bleich S, Degner D, Sperling W, Bonsch D, Thuratif N, Kornhuber J. Homocysteine as a neurotoxin in chronic alcoholism. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2004; 28: 453-64.
106. Müller T, Woitalla D, Hauptmann B, Fowler B, Kuhn W. Decrease of methionine and S-adenosylmethionine and increase of homocysteine in treated patients with Parkinson's disease. Neurosci Letters 2001; 308: 54-6.
107. Tolmunen T, Hintikka J, Voutilainen S, Ruusunen A, Alfthan G, Nyyssöne K, Viinamäki H, Kaplan GA, Salonen JT. Association between depressive symptoms and serum concentrations of homocysteine in men: a population study. American Journal of Clinical Nutrition 2004; 80: 1574-8.
108. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Ann Rev Biochem 1983; 52: 711-60.
109. Konukoğlu D, Akçay T. Glutasyon Metabolizması ve Klinik Önemi T Klin Tıp Bilimleri 1995; 15: 214-8.
110. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Pentoz Fosfat Yolu ve NADPH. Biyokimya Lipincott's Illustrated reviews serisi, Çeviri Editörü: Ulukaya E. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2007; 146.
111. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. Methods Enzymol 2002; 348: 93-112.
112. Mueser KT, McGurk SR. Schizophrenia. Lancet 2004; 363(19): 263-71.
113. Pesold C, Roberts RC, Kirkpatrick B. Neuroscience of schizophrenia. In: Panksepp J (Ed.). Textbook of biological psychiatry. New Jersey, Wiley-Liss 2004; 267-94.
114. Tsuang MT, Stone WS, Faraone SV. Genes, environment and schizophrenia. British J Psychiatry 2001; 178(48): 18-24.
115. Picker JD, Coyle JT. Do maternal folate and homocysteine levels play a role in neurodevelopmental processes that increase risk for schizophrenia? Harv Review Psychiatry 2005; 13: 197-205.

116. Rapoport JL, Addington AM, Frangou S. The Neurodevelopmental model of schizophrenia: update. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 434-49.
117. Rosenquist TH, Schneider AM, Monaghan DT. N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine induced developmental abnormalities. *Faseb J* 1999; 13: 1523-31.
118. Smythies JR, Gottfries CG, Regland B. Disturbance of one carbon metabolism in neuropsychiatric disorders: A review. *Biol Psychiatry* 1997; 41: 230-3.
119. Regland B, Abrahamsson L, Blennow K, Grenfeldt B, Gottfries CG. CSF methionine is elevated in psychotic patients. *J Neural Transm* 2004; 111: 631-40.
120. Susser ES, Lin SP. Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945. *Arch Gen Psychiatry* 1992; 49(12): 983-8.
121. Susser E, Neugebauer R, Hoek HW, Brown AS, Lin S, Labovitz D. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch Gen Psychiatry* 1996; 53(1): 25-31.
122. Nevo GA, Meged S, Sela BA, Hanoch-Levi A, Hershko R, Weizman A. Homocysteine levels in adolescent schizophrenia patients. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16(8): 588-91.
123. Levine J, Agam G, Selam BA, Garver DL, Torrey EF, Belmaker RH. CSF homocysteine is not elevated in schizophrenia. *J Neural Transm* 2005; 112: 297-302.
124. Muntjewerf JW, Kahn RS, Blom HJ, Heijer M. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2006; 11: 143-9.
125. Meyer VR. Practical high performance liquid chromatography, John Wiley & Sons, USA 1988.
126. Chou ST, Ko LE, Yang CS. High performance liquid chromatography with fluoimetric detection for the determination of total homocysteine in human plasma method and clinical applications. *Anal Chim Acta* 2001; 429: 331-6.
127. Mosharrafa M, Stauffer WM, Reed JH. Recent developments in clinical mass spectrometry. *Biomed Sci Instrum* 1971; 8: 71.
128. Clayton PT. Applications of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 2001; 24: 139-50.
129. Cooks RG, BuschKL, Glish GL. Mass spectrometry: analytical capabilities and potentials. *Science* 1983; 21: 222(4621): 273-91.
130. Lehrer M. In Kaplan LA. Mass spectrometry. St.Louis: Mosby Company, 1996; 167-84.
131. Skoog D, Holler FJ, Nieman TA, Enstrümental Analiz İlkeleri, Çeviri Editörleri: Kılıç, E, Köseoğlu, F, Yılmaz, H, Bilim Yayıncılık Ankara 1998; 235-53.

132. Kiser RW, Sullivan RE. Mass spectrometry. *Anal Chem* 1968; 40: 273-98.
133. Banks JF, Jr Shen S, Whitehouse CM, Fenn JB. Ultrasonically assisted electrospray ionization for LC/MS determination of nucleosides from a transfer RNA digest. *Anal Chem* 1994; 66: 406-14.
134. Lacey JM, Magera MJ, Matern D, Rinaldo P, O'Brien JF. A method for the rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography–mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* 2000; 23: 178.
135. Persichilli S, Gervasoni J, Zuppi C, Zappacosta B. A simplified method for the determination of total homocysteine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 2010; 33: 3119-24.
136. Hempen C, Wanschers H, van der Sluijs Veer G. A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391: 263–70.
137. Kuhn J, Götting C, Kleesiek K. Rapid micro-scale assay for homocysteine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 2006; 39: 164-6.
138. Tuschl K, Bodamer OA, Erwa W, Mühl A. Rapid of total plasma homocysteine by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 2005; 351: 139-41.
139. Gillingwater S, Cooper D, Morris M, Keevil B, McCann S. The analysis of total homocysteine in plasma using a quattro micro tandem mass spectrometer. *Application note* 2003.
140. Shuijun Li, Jingying J, Gangyi L, Yongbao C, Yiping W, Chen Y. Improved and simplified LC-ESI-MS/MS method for homocysteine determination in human plasma: Application to the study of cardiovascular diseases. *Journal of Chromatography B* 2008; 870: 63–7.
141. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations. *Clinical Chemistry* 2004; 50: 13–32.
142. Ducros V, Belva H, Casetta B, Favier A. A robust liquid chromatography tandem mass spectrometry method for total plasma homocysteine determination in clinical practice. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 987-90.
143. Magera MJ, Lacey JM, Casetta B, Rinaldo P. Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1999; 45: 1517–22.
144. A Division of Oxis Health Products, Inc. GSH-420 Quantitative, Colorimetric Determination of Total Glutathione For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.
145. Bjerkenstedt L, Edman G, Hagenfeldt L, Sedvall G, Wiesel FA. Plasma amino acids in relation to cerebrospinal fluid monoamine metabolites in

- schizophrenic patients and healthy controls. *Br J Psychiatry* 1985; 147: 276-82.
146. Applebaum J, Shimon H, Sela BA, Belmaker RH, Levine J. Homocysteine levels in newly admitted schizophrenic patients. *J Psychiatr Res* 2004; 38: 413-6.
 147. Marchesoni D, Driul L, Plamo L, Villani M, Becagli L, Mozzanega B. Menopause rather than estrogen modifies plasma homocysteine levels. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2003; 81: 293-7.
 148. Den Heijer M, Brouwer IA, Bos GMJ, Blom HJ, Van der Put NMJ, Spaans AP, Rosendaal FR, Thomas CMG, Haak HL, Wijermans PW, Gerrits WBJ. Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels a controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy. *Volunteers Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1998; 18: 356-61.
 149. Miodownik C, Lerner V, Vishne T. High-dose vitamin B₆ decreases homocysteine serum levels in patients with schizophrenia and schizoaffective disorders. A preliminary study. *Clin Neuropharmacol* 2007; 30(1): 13-7.
 150. Levine J, Stahl Z, Sela BA, Ruderman V, Shumaico O, Babushkin I. Homocysteine reducing strategies improve symptoms in chronic schizophrenic patients with hiperhomocysteinemia. *Biol Psychiatry* 2006; 60(3): 265-9.
 151. Reif A, Schneider MF, Kamolz S, Pfuhlmann B. Homocysteinemia in psychiatric disorders: associations with dementia and depression but not schizophrenia in female patients. *J Neural Transm* 2003; 110: 1401-11.
 152. Goff DC, Bottiglieri T, Arning E, Shih V, Freudenreich O, Evins AE et al. Folate homocysteine and negative symptoms in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 1705-8.
 153. Derin D, Yazıcı A, Erkoç Ş. Şizofrenik bozukluğu olan hastalarda serbest radikal metabolizması ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemi elemanlarının incelenmesi. *Klinik Psikofarmakoloji Bül* 2001; 11: 174-82.
 154. Husek P. Determination of homocysteine by gas chromatography-mass spectrometry following treatment with chloroformates: a comment. *Journal of Chromatography B* 2000; 740: 289-90.
 155. Rafii M. Homocysteine and cysteine in plasma and urine. *Anal Biochem* 2007; 371: 71-81.
 156. Ducros V, Schmitt D, Pernod G, Faure H, Polack B, Favier A. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of total homocysteine in human plasma by stable isotope dilution: method and clinical applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 729(1-2): 333-9.
 157. Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay F. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi. *Türk Biyokimya Derneği* 2006; 401-15.