

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL HİPERHOMOSİSTEİNEMİ
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA NAR
(*PUNICA GRANATUM L.*) ÇİÇEĞİNİN
PLAZMA VE BEYİN DOKULARINDA
OKSİDAN SİSTEMLER ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

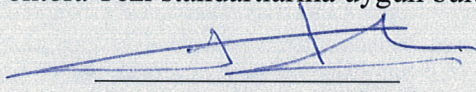
Abdullah YAŞAR

2013

ONAY SAYFASI

.....
Doç. Dr. Oktay BURMA
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

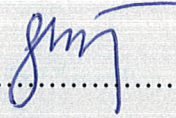
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

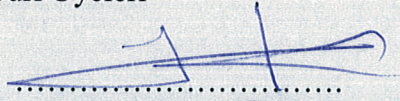
Prof. Dr. Selim KUTLU

Danışman

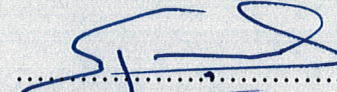

.....

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

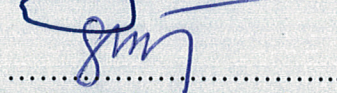
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR


.....

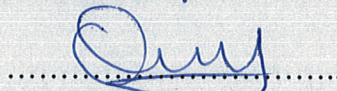
Prof. Dr. Engin ŞAHNA


.....

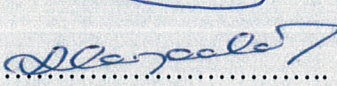
Prof. Dr. Selim KUTLU


.....

Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK


.....

Doç. Dr. Sinan CANPOLAT


.....

“Az çok diğ er tüm anneler gibi olan,

Ancak benim olduğu için farklı olan

Biricik Canım Annem”.

Senden başka kime adayabilirdim ki !

TEŞEKKÜR

Doktora eğitime engin bilgileri, sonsuz tecrübe ve deneyimlerini benimle paylaşarak çalışmalarımın her aşamasında büyük katkıda bulunan, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyip her daim yanımda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Selim KUTLU ve Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarım süresince yardımlarını gördüğüm Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarına, gösterdikleri sıcak ilgi ve sağladıkları çalışma ortamı nedeniyle Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni anabilim dalı öğretim elemanlarına, tez verilerimin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde verdiği büyük destek ve tüm yardımları için devamlı olarak bilgi alışverişinde bulunduğum Sayın Doç. Dr. Kağan KÖKTEN'e ve Çanakkale 18 Mart Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mevlüt AKÇURA'ya,

Biyokimyasal çalışmalarım süresince Biyokimya laboratuvarlarını günün her saatinde tarafıma çalışma ortamı olarak hazırlayan F.Ü. Merkezi Laboratuvar sorumlusu Sayın Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, HPLC çalışmalarımı yapan ve çoğu zaman kıymetli zamanını benim için harcayan laboratuvar teknisyeni Cengiz UÇAR'a,

SDS-PAGE tekniğiyle westernblot ve immunoblot ile protein analizleri tayininde kendi laboratuvar imkânlarını benimle paylaşan Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya,

Çalışmalarıma aktif olarak katılmayan ancak manevi olarak uzun ve yorucu süreçte her zaman moral ve motivasyon kaynağım olan KTÜ Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a F.Ü Biyofizik Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mete ÖZCAN'a ve bütün çalışmam boyunca burada ismini anma fırsatı bulamadığım değerli çalışma arkadaşlarıma,

Daima yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve eşime, en yorgun anımda dahi yaşattıkları yorgunlukla yorgunluğumu gideren miniklerim Bilgehan ve Oğuzhan'a en samimi duygularla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. ÖZET	xvi
2. ABSTRACT	xviii
3. GİRİŞ	1
3.1. HOMOSİSTEİN	1
3.1.1. Homosistein Metabolizması	2
3.1.2. Beyinde Homosistein Metabolizması	2
3.1.3. Homosistein Metabolizmasının Düzenlenmesi	3
3.1.4. Dolaşımdaki Homosistein Formları	4
3.1.5. Homosistein Düzeyleri	5
3.1.6. Hiperhomosisteinemi	5
3.1.7. Hiperhomosisteineminin Nedenleri	6
3.1.8. Hiperhomosisteineminin Oksidan/Antioksidan Sistemler Üzerine Etkileri	6
3.1.9. Homosisteinin Nöral Hasar Oluşturma Mekanizmaları ve Bilişsel Fonksiyonları	6
3.1.10. Homosistein ve Oksidatif Stres İlişkisi	9
3.1.10.1. Oksidatif Stres	9
3.1.10.2. Oksidatif Stres-Nörodejeneratif Hastalık İlişkisi	10
3.1.10.3. Homosistein ve Oksidatif Stres	11
3.1.11. Homosisteinin Nöroplastisite ve Beyin Maturasyonu İle İlişkisi	12
3.1.11.1. Nöroplastisite	12
3.1.11.2. Homosistein ve Nöroplastisite	13
3.2. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ	14
3.2.1. Serbest Radikaller	14
3.2.2. Reaktif Oksijen Türevleri	14
3.2.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Toksik Etkileri	15
3.2.4. Serbest Radikallerin Hücredeki Başlıca Zararlı Etkileri	16
3.2.4.1. Proteinlere Etkileri	17
3.2.4.2. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)	17
3.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	19

3.3.1. Glutasyon Peroksidaz (GSH-px)	19
3.3.2. Glutasyon Redüktaz (GR)	20
3.3.3. Redükte Glutasyon (GSH)	20
3.4. NÖRONAL VE GLİAL MARKIRLAR	21
3.4.1. Nöron Spesifik Enolaz (NSE)	21
3.4.2. S-100 Proteinini	25
3.4.2.1. S100B	27
3.4.3. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)	27
3.5. Nar (<i>Punica granatum L.</i>) ve Nar Çiçeği	28
3.5.1. Narçiçeğinin Antioksidan Aktivitesi ve Radikal Süpürücü Etkisi	29
3.6. Amaç	32
4. GEREÇ VE YÖNTEM	33
4.1. GEREÇ	33
4.1.1. Deney Hayvanları	33
4.1.2. Deneysel Uygulamalar	34
4.1.3. Narçiçeğinin Normal Yemle Beraber Karışımının Hazırlanması	35
4.1.4. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	35
4.1.4.1. Kan Örneklerinden Serum ve Plazma Hazırlanması	35
4.1.4.2. Beyin Dokusu Örneklerinden Homojenat Hazırlanması	36
4.1.4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
4.2. YÖNTEMLER	37
4.2.1. Plazma Homosistein Düzeylerinin Ölçümü	37
4.2.2. Plazma Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Ölçümü	38
4.2.3. Plazma GSH ve GSH-px Düzeylerinin Ölçümü	40
4.2.4. Doku Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Ölçümü	41
4.2.5. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-px) Aktivite Ölçümü	42
4.2.6. Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü	43
4.2.7. Doku Proteinleri Analizi ve SDS-PAGE Elektroforez Yöntemi	45
4.2.7.1. Elektroforezin Yapılışı	49
4.2.7.2. Westernblot	51
4.2.7.3. İmmunoblot	52
4.2.7.4. Bantların Görüntülenmesi	54
4.2.8. İstatistiksel Analizler	54

5. BULGULAR	55
5.1. Biyokimyasal Parametreler	55
5.1.1. Plazma Homosistein Düzeyleri	55
5.1.2. Plazma MDA Düzeyleri	56
5.1.3. Plazma GSH Düzeyleri	57
5.1.4. Plazma GSH-px Düzeyleri	58
5.1.5. Beyin Doku MDA Düzeyleri	59
5.1.6. Beyin Doku GSH Düzeyleri	60
5.1.7. Beyin Doku GSH-px Düzeyleri	61
5.1.8. Beyin Dokusunda NSE Ekspresyonunun Densitometrik Analizi	62
5.1.9. Beyin Dokusunda S100 Ekspresyonunun Densitometrik Analizi	63
5.1.10. Beyin Dokusunda GFAP Ekspresyonunun Densitometrik Analizi	64
6. TARTIŞMA	67
7. KAYNAKLAR	77
8.ÖZGEÇMİŞ	90

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Plazma Total Homosistein Düzeyleri	5
Tablo 2. Santral Sinir Sisteminde Bulunan İzoenzimlerin Özellikleri	22
Tablo 3. NSE ve NNE' ın Fonksiyonel Özelliklerinin Karşılaştırılması	23
Tablo 4. NSE ve NNE'ın Beyin Dokusundaki Dağılımı	24
Tablo 5. S100 Proteinlerinin Hastalıklarla İlişkisi	26
Tablo 6. Deney Hayvanlarına Verilen Yemin Bileşimi	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Gruplara Ait Plazma Homosistein Düzeyleri	55
Şekil 2. Gruplara Ait Plazma MDA Düzeyleri	56
Şekil 3. Gruplara Ait Plazma GSH Düzeyleri	57
Şekil 4. Gruplara Ait Plazma GSH-Px Düzeyleri	58
Şekil 5. Gruplara Ait Beyin Doku MDA Düzeyleri	59
Şekil 6. Gruplara Ait Beyin Doku GSH Düzeyleri	60
Şekil 7. Gruplara Ait Beyin Dokusu GSH-Px Düzeyleri	61
Şekil 8. Gruplara Ait Beyin Doku NSE Düzeyleri	62
Şekil 9. Gruplara Ait Beyin Doku S100 Protein Düzeyleri	63
Şekil 10. Gruplara Ait Beyin Doku GFAP Düzeyleri	64
Şekil 11. Farklı Grupların Farklı Beyin Bölgesi Homojenatlarının NSE Proteinlerinin Bantları	65
Şekil 12. Farklı Grupların Farklı Beyin Bölgesi Homojenatlarının S100 Proteinlerinin Bantları	65
Şekil 13. Farklı Grupların Farklı Beyin Bölgesi Homojenatlarının GFAP'lerinin Bantları	66

KISALTMALAR LİSTESİ

ABTS	: 3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit
APUD	: Amin precursor uptake and decarboxylation
ATP	: Adenozin trifosfat
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CBS	: Sistasyonin β -sentaz
CCl₄	: Karbon tetra klorür
DAB	: Diaminobenzidin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5-dithiobis, 2-nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
GFAP	: Glial fibriler asidik protein
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Hcy	: Homosistein
hHcy	: Hiperhomosisteinemi
HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michaelis sabitesi
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LPO	: Lipit peroksit
LTP	: Uzun dönem potansiyel
M	: Molar
MAT	: Metiyonin S-adenozil transferaz
MDA	: Malondialdehid
MS	: Metiyonin sentaz

MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
MWM	: Morris water maze testi
NADPH	: Nikotin amid adenin dinükleotid (Redükte form)
NaN₃	: Sodyum nitrat
NÇ	: Narçiçeği
nmol	: Nanomol
NNE	: Non nöronal enolaz
NO	: Nitrik oksit
NSE	: Nöron spesifik enolaz
OD	: Optik dansite
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforez
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
PTA	: Fosfotungustik asit
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
S100	: İntrasellüler glikoprotein
SAH	: S-adenozil-L-homosistein
SAM	: S-adenozil metiyonin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SH	: Sülfhidril grubu
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyoarbütirik asit
TEMED	: Tetrametilendiamin
WB	: Westernblot

1. ÖZET

Hiperhomosisteinemi (hHcy), serbest radikal üretimi ve reaktif gliozis gibi beyin hasarı durumları için önemli bir risk faktörüdür. *Punica granatum* L. (Narçiçeği) ise güçlü bir antioksidan olarak bilinmektedir. Bu çalışmada, kronik hHcy oluşturulan ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistemler ve reaktif gliozis üzerindeki etkilerin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca NÇ'nin hHcy ile indüklenmiş oksidatif strese karşı muhtemel koruyucu etkinliği belirlenmiştir.

Çalışmada toplam 21 adet yetişkin Wistar cinsi erkek rat kullanılmıştır. Kontrol grubundaki hayvanlar (n=7) 6 hafta boyunca sadece normal rat yemiyle beslenmiştir. 2. gruba (n=7) 6 hafta boyunca normal beslenmelerine ilaveten içme sularına 1,5 g/kg/gün dozda L-metiyonin katılarak kronik hHcy oluşturulmuştur. 3. gruba ise (n=7) aynı yolla hHcy oluşturularak 500 mg/kg/gün dozda NÇ ekstresi, pellet halindeki standart yem içinde verilmiştir. Altı haftalık deney periyodunun sonunda tüm ratlar dekapite edilerek kan örnekleri ve beyin dokuları elde edilmiştir.

hHcy grubunda lipid peroksidasyon göstergesi olan parametreler artarken, NÇ uygulanmasının bu parametreleri anlamlı şekilde düşürdüğü gözlenmiştir. hHcy'nin beyindeki reaktif gliozis göstergeleri olan glial fibriler asidik protein ile S100 proteini düzeylerini ve nöron spesifik enolaz aktivitesini artırdığı, NÇ'nin ise bu artışları önlediği belirlenmiştir.

Sonuç olarak NÇ'nin beyin dokularında hHcy'nin yol açtığı lipid peroksidasyonu azalttığı, antioksidan aktiviteyi artırdığı ve reaktif gliozisi

engellediği ortaya konmuştur. Bu sonuçlara dayanarak N'nin rat beyin dokularında nöroprotektif etkilere sahip olduğu ifade edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Hiperhomosisteinemi, narçiçeği, oksidan-antioksidan sistemler, reaktif gliozis, rat.

2. ABSTRACT

CHRONIC HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN RATS POMEGRANATE (PUNICA GRANATUM L.) FLOWER PLASMA AND BRAIN TISSUES OXIDANT SYSTEM AND THE EFFECTS OF OXIDATIVE DAMAGE.

Hyperhomocysteinemia (hHcy) is an important risk factor in brain damage circumstances such as free radical production and reactive gliosis. *Punica granatum* L. (PGL) is known as a powerful antioxidant substance. It is aimed to investigate the effect of homocystein on oxidant-antioxidant systems and reactive gliosis in rat with hHcy in the present study. Additionally, it is determined the possible protective effect of PGL against the hHcy induced oxidative stress.

Totally 21 adult Wistar rats were used in this study. Animals in control group (n=7) were only fed with standard food for six weeks. hHcy was constituted in second group (n=7) by applying L-methionine (1.5 g/kg/day) in drinking water in addition to standard feed for six week. The rats in third group were received PGL (500mg/kg/day) in standard rat feed in addition to L-methionine for six week (n=7). All rats were decapitated and blood and brain tissue samples were collected after six weekly experimental period.

Some parameters revealing lipid peroxidation increased in hHcy group whereas PGL treatment significantly decreased these parameters. Additionally, hHcy caused augmentation on glial fibrillary acidic protein and S100 protein levels and neuron specific enolase activity. PGL treatment prevented these augmentations.

In summary, it is revealed that PGL diminished hHcy induced lipid peroxidation, increased antioxidant activity and decreased reactive gliosis in rat brain tissues. Based on these results, we could express that PGL has neuroprotective effect in rat brain.

Key words: Hyperhomocysteinemia, Punica granatum L., oxidant-antioxidant systems, reactive gliosis, rat.

3. GİRİŞ

3.1. HOMOSİSTEİN

Yüksek plazma konsantrasyonları vasküler hastalıklar açısından önemli bir risk faktörü olan homosistein (Hcy; 2-amino-4-merkaptobutirik asit), metiyonin metabolizması sırasında bir ara ürün olarak oluşan ve proteinlerin yapısına katılmayan bir aminoasittir (1,2,3,4). Sülfür içeren bu aminoasit, ilk kez 1932 yılında DuVigneaud tarafından tanımlanmıştır (5,6).

Hcy metabolizmasında önemli bir yere sahip olan metiyonin; memelilerin normal büyüme ve gelişimi için esansiyeldir (7).

Metiyonin ile Hcy birbirlerinin prekürsörleri niteliğinde olup, birinin detoksifikasyonu diğerinin sentez aşamasını kapsamaktadır ve bu ilişkinin temeli metiyonin metabolizmasını oluşturmaktadır (8).

Yüksek plazma total Hcy düzeylerini kardiovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğu ilk kez 1969 yılında McCully tarafından homosistinürinin tanımlanmasıyla ortaya konulmuştur. McCully, hiperhomosisteinemi (hHcy) ve homosistinüri görülen çocuklarda ilerlemiş damar lezyonlarına rastlamış ve metiyonin metabolizmasındaki bir bozukluğun buna sebep olduğunu ileri sürmüştür (9). Son yıllarda, ılımlı düzeyde hHcy'nin artmış periferik damar hastalıkları, venöz tromboz, kardiovasküler hastalıklar ve inme ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (10,11,12).

Hcy; serebrovasküler, periferik vasküler, koroner kalp hastalığı ve tromboz için önemli bir risk faktörü olup (4,13), vasküler ve kardiovasküler bozukluklar ile arasındaki ilişki yaş, sigara içimi, hipertansiyon, dislipidemi ve şişmanlık gibi diğer risk faktörlerinden bağımsızdır (14).

3.1.1. Homosistein Metabolizması

Hcy metabolizmasında *remetilasyon* ve *transsülfürasyon* olmak üzere başlıca 2 yol vardır. Metiyoninden oluşan Hcy, ya remetilasyon ile tekrar metiyonine dönüştürülmekte ya da sistatyonin ve sistein ara bileşikleri üzerinden sülfata metabolize edilmektedir (15). Her iki yol da aynı öneme sahip olup, aynı oranda kullanılmaktadır.

3.1.2. Beyinde Homosistein Metabolizması

Mevcut bulgulara göre Hcy, plazma ile beyin arasında muhtemelen spesifik çift yönlü hücresel taşıyıcılar vasıtasıyla geçebilmektedir (16). Beyin omurilik sıvısındaki (BOS) Hcy konsantrasyonu serumdaki ile paralel değişim gösterir. Ancak serumdaki konsantrasyonu 20-100 kat daha fazladır (17,18,19). Plazma Hcy seviyesindeki artış beyinde de Hcy ve S-adenozil-L-homosistein (SAH) artışına yol açar (20).

Hcy'in beyin hücrelerine geçişi tam olarak açığa kavuşturulmamıştır. Hayvan çalışmalarında basit difüzyona ilaveten özel, doyurulabilir reseptörler aracılığıyla transport edilebildiği bildirilmiştir (16,21,22). Normal şartlar altında insan nöral hücreleri Hcy üretebilme kapasitesine sahiptir ve beyinde Hcy'in üretilbildiği

gösterilmiştir (23). Beyinde Hcy metabolizmasında bölgesel farklılık olup olmadığı araştırılmamıştır. hHcy'k fare modelinde, Hcy'in kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü bozduğu gösterilmiştir (23).

3.1.3. Homosistein Metabolizmasının Düzenlenmesi

Memeli dokularında Hcy (veya metiyonin) metabolizmasının düzenlenme mekanizmasını, iki metabolik alanda kompetatif reaksiyonlar arasında substrat dağılımı oluşturmaktadır. Düzenlenmede birinci basamağı metiyoninin protein sentezi ile S-adenozil metiyonin (SAM) oluşumu arasındaki yarış oluşturunken; ikinci basamak ise Hcy'i kullanan reaksiyonları kapsamaktadır (8,24).

Metiyonini koruyan enzimler sülfür içeren substratlarına karşı nispeten düşük michaelis sabitesi (K_m) değerlerine sahip olup, kendi ürünleri ve diğer metabolitler tarafından inhibe edilirler. Fazla metiyonin ile beslenen ratların karaciğerlerinde bu enzimler azalmaktadır. Üç izoenzim formuna sahip olan metiyonin S-adenozil transferaz (MAT) 'ın düşük K_m 'li, tip I ve tip II ekstrahepatik MAT izoenzimleri ile çoğu SAM bağımlı transmetilazlar, metiyonin sentaz (MS) ve betain-homosistein metil transferaz, metiyonin koruyan gruba ait enzimlerdir. Bu enzimler ile ara özelliklere sahip adenzilhomosisteinaz enzimi birlikte metiyonin döngüsünü oluşturmaktadır. Metiyonini katabolize eden enzimler ise yüksek K_m değerlerine sahip olup, döngü metabolitleri tarafından aktive edilirler ve metiyonin ile beslenme sonucu bunların hepatik düzeyleri artar. Sistatyonin sentaz, sistatyonaz, yüksek

K_m 'ne sahip hepatik MAT III ve adenoilhomosisteinaz ise katabolize eden enzimler grubunda yer almaktadır (8,24).

Hcy metabolizmasının düzenlenmesinde en önemli belirleyicilerden biri SAM'dir. (25,26). Metiyoninden zengin hayvansal proteinlerin diyetle fazla alınması veya doku SAM düzeylerinin yaşamsal öneme sahip transmetilasyon reaksiyonlarını sürdürmek için yeterli olduğu durumlarda SAM, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) aktivitesini inhibe ederek Hcy'in metiyonine remetilasyonunu baskılar (27,28). Ayrıca SAM, sistatyonin- β -sentaz (CBS) aktivitesini ve γ -sistatyonaz aktivitesini de artırır ve Hcy transsülfürasyon yoluna girer (25,27,28). Aksine, düşük metiyonin alımı ve/veya metil grupları ve transmetilasyon reaksiyonlarına ihtiyacın arttığı durumlarda MTHFR bağımlı folat mobilizasyonunun hızlanması ile remetilasyon yolu aktifleşir ve Hcy tekrar metiyonine dönüştürülür (28). Uzun süreli yüksek metiyonin alımı remetilasyonun inhibisyonu ile ilişkili olup, transsülfürasyon yolunun satürasyonuna yol açabilir. Bu durum Hcy'in hücrelerden dışarı atılmasına ve böylece plazma Hcy düzeylerinin yükselmesine yol açmaktadır (29).

3.1.4. Dolaşımdaki Homosistein Formları

Plazmada bulunan Hcy'in ancak %1 gibi çok az bir kısmı indirgenmiş formda bulunmaktadır. Yükseltgenmiş Hcy'in ise %80-90 kadarı başta albümin olmak üzere plazma proteinlerine disülfid bağlarla bağlanmıştır. Bağlı olmayan fraksiyon ise fizyolojik pH'da oksidasyona duyarlı olup, kendisiyle birleşerek dimer Hcy (homosistin) veya başta sistein olmak üzere diğer tiyollerle birleşerek sistein-Hcy

karışık disülfidi oluşturmaktadır. Total plazma Hcy'i bu üç formun toplamıdır (30,31).

3.1.5. Homosistein Düzeyleri

Hcy düzeyleri genel olarak total plazma Hcy'i veya total serum Hcy'i olarak ölçülmektedir. İnsanlarda normal total Hcy konsantrasyonları plazmada 5-15 $\mu\text{mol/L}$, serumda ise 13-18 $\mu\text{mol/L}$ olarak kabul edilmektedir. Pediatrik normal Hcy düzeyleri ise 3.7-10.3 $\mu\text{mol/L}$ arasındadır. Yapılan çalışmalarda yaşlanma, cinsiyet ve kadınlarda postmenopozal durumun Hcy düzeylerini etkilediği ortaya konulduğundan, Hcy'in normal düzeyleri belirlenirken bu durumların dikkate alınması gerekmektedir (3,30).

3.1.6. Hiperhomosisteinemi

Plazma total Hcy düzeylerinin 15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde olması "hiperhomosisteinemi" (hHcy) olarak kabul edilmektedir. hHcy kendi arasında hafif, orta ve şiddetli olmak üzere 3 form hâlinde ele alınmış olup (30), tablo 1'de gösterilmiştir.

Normal Aralık	5-15	$\mu\text{mol/L}$
Arzulanan	<10	$\mu\text{mol/L}$
HİPERHOMOSİSTEİNEMİ		
Hafif Form	15-25	$\mu\text{mol/L}$
Orta Form	25-50	$\mu\text{mol/L}$
Şiddetli Form	50-500	$\mu\text{mol/L}$

Tablo 1. Plazma total Hcy düzeyleri.

3.1.7. Hiperhomosisteineminin Nedenleri

Plazma Hcy düzeylerini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; CBS, MTHFR, MS eksikliği/defekti, fizyolojik faktörler, edinsel faktörler, vitamin eksiklikleri [folik asit, vitamin B₁₂ (Kobalamin), vitamin B₆], ilaçlar, kronik hastalıklar ile beslenme ve yaşam şekli olmak üzere sınıflandırılabilir (3,31,32,33).

Transsülfürasyon ve remetilasyon yollarına ait enzimlerin genetik defektleri veya eksiklikleri hHcy'ye yol açmaktadır.

3.1.8. Hiperhomosisteineminin Oksidan/Antioksidan Sistemler Üzerine Etkileri

- Süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal oluşumunu artırır.
- Endotelial glutatyon peroksidaz (GSH-px) aktivitesini baskılar.
- Lipid peroksidasyonunu (LPO) artırır.

3.1.9. Homosisteinin Nöral Hasar Oluşturma Mekanizmaları ve Bilişsel Fonksiyonları

Hcy, nöral hücreler için toksiktir (34,35,36,37,38,39). Hcy'in dejeneratif hastalıklar ile ilişkisi, başlangıçta yaşlılardaki plazma Hcy seviyesinin yüksekliği dolayısıyla gündeme gelmiştir (17,40). Hafif kognitif fonksiyon bozukluğu, demans, alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı insanlarda sık görülen nörodejeneratif hastalıklardır. Bu hastalıkların Hcy ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar arada bir

bağlantı olabileceğini göstermektedir (41,42,43). Depresyon ve şizofrenide de Hcy ile ilişkili bozukluklar ileri sürülmüştür. Hcy ile nörodejeneratif bozukluklar arasındaki ilişki vitamin tedavisi çalışmalarıyla doğrulanmamışsa da, bu konuda kesin sonuçlara varmak için genel ölçekli kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır. Vitaminlere başlama zamanı, vitamin dozu gibi faktörler göz önüne alınmalıdır. Hastalık oluştuktan sonraki girişimlerin yararı, önleme girişimlerine göre daha az olabilir (17). Aslında gıdalara folat ilavesinden sonraki dönemde Kanada ve ABD’de inme mortalitesinin azaldığı bildirilmiştir (44). Folat ve vitamin B₁₂ eksikliği hHcy’ye yol açtığından bu vitaminlerin eksiklikleri sırasında gözlenen nörolojik bulgular, dolaylı olarak hHcy ile ilişkilendirilmekte ve kimi zaman çalışmalar iç içe sunulmaktadır (34). Bu türden çalışmalar değerlendirilirken bulguların doğrudan doğruya hHcy ile ilgili olup olmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Artmış Hcy düzeyleri erişkinlerde olduğu kadar gelişmekte olan sinir sistemi üzerinde de olumsuz etkilere sahiptir (34). Mental retardasyon ve anormal beyin gelişimiyle karakterize bir hastalık olan Down sendromunda, Hcy metabolizmasına katılan enzimlerde değişiklikler olması, Hcy’in nöral gelişim ile ilişkili olduğuna dair bir kanıt olarak değerlendirilebilir (45,46).

Hcy’e maruz bırakılan hayvanlarda Hcy beyinde birikir, gelişme geriliği oluşur, nöral ve kognitif disfonksiyon ve beyin enerji metabolizmasında bozulma meydana gelir (47,48,49,50,51). Folattan yoksun diyetle beslenen hHcy’k erişkin sıçan modelinde düşük folat/ hHcy’k sıçanların beyin mikrovasküler yapısı elektron

mikroskobu ile incelendiğinde endotelde stoplazmik şişme, mitokondrial dejenerasyon ve perivasküler amorf fibrozis tespit edilmiştir (52).

Bozulmuş CBS aktivitesi ya da folat eksikliği beyin hücrelerinde intrasellüler Hcy düzeylerini arttırır (53). CBS enzim ekspresyonunun değiştirildiği fare modellerinde, Hcy artışı ile birlikte nörolojik hasar olduğu bildirilmiştir (23,54,55). Yine CBS enzim eksikliği olan farelerde nöral plastisitede değişiklik, ağır gelişme geriliği ve erken ölüm bildirilmiştir (56).

Baydaş ve arkadaşları (47), hHcy'in pasif sakınma ve Morris Water Maze (MWM) testleriyle ölçülen öğrenme ve hafızayı anlamlı şekilde bozduğunu ve melatonin uygulamasının bu bozulmayı düzelttiği bildirilmiştir. Streck ve arkadaşları da (48), Hcy uygulamasının sıçanlarda hafızayı kötüleştirdiğini bildirmişlerdir. Algaidi ve arkadaşlarının (51), yaptığı çalışmada genç-erişkin sıçanlara Hcy uygulanması kognitif bozulmaya yol açmamış, tersine uzaysal öğrenmede kısmi bir iyileşme ile sonuçlanmıştır. Bu bulgu diğer bazı çalışmalardan farklıdır. Yazarlar bu durumu, gelişmekte olan ve yaşlı sıçan beyinlerinin Hcy hassasiyetinin kendilerinin kullandığı genç-erişkin sıçanlardan farklı olmasına bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Hcy'in öğrenme üzerine bu olumlu etkisini N-Metil D-Aspartat ve metabotropik glutamat reseptörleri üzerinden sinaptik plastisiteyi ve transmisyonu arttırmalarına bağlı olabileceğini, ancak uzun dönemde bu artmış eksitabilitenin nöron kaybıyla sonuçlanabileceğini belirtmişlerdir. Troen ve arkadaşlarının (57), çalışmasında da MWM testiyle kognitif disfonksiyon tespit edilmiş, ancak beyinde histolojik düzeyde bir bozukluğa rastlanmamış, beyin metilasyon potansiyelinde değişiklik saptanmıştır.

3.1.10. Homosistein ve Oksidatif Stres İlişkisi

3.1.10.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde prooksidan ve antioksidan dengesinin bozulması olarak tanımlanabilir. Bu denge bozulduğunda, serbest radikaller ve serbest radikallerden türeyen non-radikal reaktifler hücrelerdeki makromoleküllerde oksidatif hasar oluşturur. Böylece genler, proteinler, yapısal karbonhidratlar ve lipidlerde yapı-fonksiyon bozulması meydana gelir. Oksidatif stres akut ve kronik birçok hastalığın patogenezinde asli rol oynar (58,59,60). Bu reaktiflerin yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkileri olsa da ılımlı konsantrasyonlarda fizyolojik anlamda önemli düzenleyici rolleri vardır. Nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS) bazı canlı sistemlerinde diğer fizyolojik fonksiyonlar için sinyal başlatıcı (signalling) özelliklere sahiptir. NO'nun vasküler tonus düzenlenmesindeki rolü, ROS'un doku oksijen basıncının bir göstergesi olarak ventilasyonun ve eritropoietin sentezinin kontrolü örnek olarak verilebilir (58).

Biyolojik sistemlerde oksidasyon, daha çok serbest radikaller aracılığıyla oluşmaktadır. Serbest radikaller yörüngelerinde eşlenmemiş elektron taşıdıklarından ve kararsız bileşik olduklarından dolayı, diğer moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler (59,61).

Süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen, karbon tetra klorür (CCl₄), NO, finilhidrazin radikali, tiyol bileşikleri ve vücutta

bulunan bazı metaller biyolojik sistemlerde oksidasyon reaksiyonlarında yer alırlar (60,62,63).

Biyolojik sistemdeki ROS'nin en önemli kaynağı aerobik metabolizmadır. Reaktif oksijen türleri, radikaller ve non-radikaller şeklinde gruplanabilir. Radikal olmayan oksijen yörüngelerinde elektron eksikliği yoktur ve radikallere göre daha zayıf oksidanlardır (58).

Biyolojik sistemde oksidan maddelerin tehlikeli şekilde yükselmesini engelleyen ve oksidasyon-redüksiyon homeostazının sağlanmasına katkıda bulunan çeşitli enzim ve maddeler vardır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, GSH-Px, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferin, ferritin, hemoglobin, miyoglobin, vitamin E, C, A, melatonin, glutatyon (GSH), N-Asetil Sistein (NAC), ubikinon, selenyum. Burada belirtilenler dışında çok sayıda endojen ve eksojen antioksidan keşfedilmiştir (58,61,62).

3.1.10.2. Oksidatif Stres ve Nörodejeneratif Hastalık İlişkisi

İnsanda sık bir mental retardasyon nedeni olan Down sendromu (trizomi 21) erişkin dönemde Alzheimer hastalığıyla da ilişkilidir. Down sendromu olan embriyonik kortikal nöron kültürlerinde ROS üretiminin kontrole göre 3-4 kat arttığı gözlenmiş ve antioksidan ajanlarla nöron dejenerasyonu önlenebilmiştir (64). Alzheimer hastalığında diğer bulguların yanı sıra beyinde kayda değer bir lipid peroksidasyonu ve serebrospinal sıvıda artmış 4-hidroksinonenal konsantrasyonu tespit edilmiştir (65,66,67). Dahası ROS'un β -amiloid ($A\beta$) hasarına aracılık ettiği de

bildirilmiştir (68,69). Amiyotropik lateral skleroz (ALS) da bir dejeneratif nöron hastalığı olup %20 oranında SOD mutasyonu ile birlikte olması ROS'un rolünü gündeme getirmektedir. Transgenik fare çalışmalarında da SOD mutasyonu ALS hastalığına benzer bulgulara yol açmıştır. SOD mutasyonu nöral apoptozisi de tetiklemektedir (58,68,69,70,71,72).

3.1.10.3. Homosistein ve Oksidatif Stres

Hcy'in nörotoksik hasar mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar daha önce de belirtildiği gibi oksidatif hasar ve bununla bağlantılı olarak apoptosiz ile nöroplastisitede meydana gelen değişikliklerin temel rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Hcy'in oksidatif stres aracılığı ile nöronal disfonksiyona neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (17,35,73). Hcy, vücut antioksidan rezervlerini, GSH-Px'ı ve SOD'u inhibe ederek, doku vitamin A, C ve E düzeylerini düşürerek zarara uğratar (74,75,76). Hcy, A β bağlı nörotoksiteyi oksidatif stres aracılığı ile artırır (77). Hcy'in sitotoksitesi NAC, vitamin E ve C gibi antioksidanlarla azaltılabilmektedir (78,79,80). Vitamin A ve C aynı zamanda Hcy'in neden olduğu hafıza bozukluğunu düzeltebilmiştir (80).

Hcy metabolizması hücrede redoks potansiyeli tarafından düzenlenir (81,82). Hcy'in ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayan MS ve CBS gibi bazı enzimlerin aktivitesi hücredeki oksidatif duruma göre düzenlenir (82,83,84).

Baydaş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, metiyoninden zengin diyetle oluşturulan hHcy'k sıçan modelinde hipokampusta GSH-Px aktivitesi düşük bulunmuş ve Hcy'in GSH aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (47).

Hcy'in kendisi de otooksidasyona uğrar ve redoks sinyal yollarını nöral ve vasküler hücrelerde bozar (82,85,86).

hHcy'de SAM oranı SAH'a göre düşüktür (17,20). SAM antioksidan bir maddedir. SAM, GSH sentezini artırır, LPO'yu yaklaşık %65 oranında azaltır (87), deneysel sıçan iskemi modelinde oksidatif stresle ilişkili nöral ölümü azaltır (88). Dahası uzun süreli SAM uygulaması sıçan beyinde GSH konsantrasyonunu arttırmış, LPO'yu azaltmıştır (89).

3.1.11. Homosisteinin Nöroplastisite ve Beyin Maturasyonu ile İlişkisi

3.1.11.1. Nöroplastisite

Sinaptik devrelerin oluşumundan sonra yeni sinapsların oluşumu veya kaybı ya da var olan sinapsların modifikasyonu, kısacası bu nöronal devrelerin değişebilme kapasitesi sinaptik plastisite olarak adlandırılır. Sinir sisteminin bu değişebilme kapasitesi öğrenme ve hafıza ile yakından ilişkili olup, sinir sisteminin çevresel değişikliklere cevabını temsil eder (90). Sinaptik plastisite sinir sistemi değişimindeki bir mekanizmayı anlatmaktan ziyade bir değişim fenomeni olarak tanımlanabilir (91).

Nöral plastisite moleküler düzeyden sinaptik, hücresel, nöronal ağ ve sisteme kadar her seviyede gözlemlenir. Örneğin; hem normal hem de yaralanmış

hayvanlarda kortikal temsiliyet haritaları değişebilir, sinapslar morfolojilerini değiştirebilir, dendiritler ve çıkıntılar büyüyüp büzülebilir, aksonlar yolunu değiştirebilir, çeşitli transmitterler modüle edilebilir, sinapslar potansiyalize veya deprese olabilir ve sınırlı da olsa yeni nöronlar oluşup farklılaşabilir (91).

3.1.11.2. Homosistein ve Nöroplastisite

Hcy ile ilgili olarak elde edilen bazı bulgular Hcy'in sinaptik fonksiyonları değiştirdiğini düşündürmektedir (47,51,73). Sinaptik disfonksiyon ve dejenerasyon bazı nörolojik bozuklukların patogeneğinde yer almaktadır (73). İnsan çalışmalarında Hcy'in nöral plastisite ve nörodejeneratif bozukluklarda rolü olduğu belirtilmiştir (34).

Erişkin sıçanlara kronik Hcy uygulamasından sonra hipokampus üzerinde yapılan incelemede temel sinaptik transmisyon hızının azaldığı ancak beklenenin tersine uzun süreli potansiasyonda (LTP) azalma değil artma oluştuğu bildirilmiştir (92). Yine aynı grubun yaptığı bir çalışmada erişkin sıçanlara 14 hafta boyunca Hcy uygulaması hipokampus CA₁ alanında bazal sinaptik transmisyon ve LTP'de değişiklik meydana getirmiştir (51). Bu çalışmalardan daha önce yapılan bir çalışmada CBS eksikliği olan sıçanlarda LTP artışı tespit edilmiş, ancak bu artışın hidrojen süflide bağlı olduğu ve CBS enziminin beyindeki hidrojen sülfid oluşumunu katalize ettiği bildirilmiştir. CBS eksikliğinde aynı zamanda belirgin hHcy oluşması LTP artışıyla Hcy arasında bir bağ olabileceğini de düşündürmektedir (93). Adı geçen çalışmalardaki bu sonuçlar, öğrenme ve plastisitede kritik rolleri olan N-Metil-D-

Aspartat ve glutamat reseptörleriyle ilişkilendirilmiştir (94). Öte yandan Hcy'in başlangıçta fizyolojik parametreler üzerindeki olumlu etkisinin zamanla eksitotoksositeyle ilgili nöronal disfonksiyona yol açabileceği ileri sürülmüştür (51).

3.2. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ

3.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, atomik veya moleküler yapılarında eşlenmemiş elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan moleküllerdir. Hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkabildikleri gibi, çeşitli dış etkenlerin varlığında da oluşmaktadırlar. Eşlenmemiş elektrona sahip bu molekül veya atom, elektronunu bir başka moleküle vererek veya ondan elektron alarak daha stabil hale gelme eğilimindedir (61,95,96,97).

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşmaktadır (95).

- Bir molekülü oluşturan kovalent bağın hemolitik yarılmaması ve eşlenmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması sonucu,
- Bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu,
- Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu oluşmaktadır.

3.2.2. Reaktif Oksijen Türevleri

Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan

radikallerdir. Serbest radikallere oksidan moleküller, *serbest oksijen radikalleri* veya en doğru adlandırma ile *“reaktif oksijen türevleri (ROS)”* de denilmektedir.

Normal metabolizma esnasında gelişen oksidasyon-redüksiyon olayları sonucunda oluşan reaktif oksijen türevleri biyolojik bir bozukluğa neden olmamasına rağmen; bazı hücrel metabolik bozukluklar nedeniyle (iskemi, inflamasyon, radyasyon, hiperoksi vb.) çok daha fazla miktarlarda üreilmeleri sonucu membranlar, nükleik asitler, enzimler ve polisakkaritler üzerinde değişik derecelerde toksik etki yaparak çeşitli dokularda hasara yol açmaktadırlar (98,99).

3.2.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Toksik Etkileri

Organizma fizyolojisinde birçok reaksiyonda rol oynayan serbest radikallerin aşırı üretilmesi veya antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda; doku hasarına neden olan oksidatif strese bağlı olarak, özellikle serbest radikallerin hedef hücrel makromoleküller olan membran lipitleri, deoksiribonükleik asit (DNA), karbonhidratlar, proteinler ile reaksiyona girmeleri sonucu hücre hasarı hatta ölümü meydana gelebilir (100,101,102,103).

Normal insan metabolizmasında az miktarda serbest oksijen radikalleri oluşur. Serbest oksijen radikalleri hücrede aerobik metabolizma sonucu üretilir ve hücrelerdeki tüm moleküller ile reaksiyona girebilir, ancak en çok lipidler saldırıya uğrar. Üretim miktarı metabolizma hızına bağlı olarak artar (104).

Normal şartlarda metabolik reaksiyonlarda kullanılan oksijenin sadece %5-10'u kuvvetli toksik ara ürünlere dönüşür (105). Aerob organizmalar intraselüler

ve ekstraselüler antioksidan savunma sistemleri ile bu toksik metabolitleri etkisiz hale getirerek kendilerini korur ve zararı minimum seviyede tutar (104).

Antioksidan savunma sisteminin gücünün zayıfladığı veya serbest radikal üretiminin bu savunma sisteminin gücünü aştığı hallerde hücreler zarar görür. Oksijen radikalleri çok kısa süreli oluştukları halde bu süre içinde etkin olarak detoksifiye edilmezlerse proteinler, nükleik asitler, lipidler, karbonhidratlar ve glikoproteinleri içine alan bütün biyolojik materyal ile reaksiyona girerek reversibl ve irreversibl değişikliklere yol açarlar (106).

3.2.4. Serbest Radikallerin Hücredeki Başlıca Zararlı Etkileri

DNA'nın tahrip olması, nükleotid yapılı koenzimlerin yıkılımı, enzimlerin inaktivasyonu, proteinlerin zarar görmesi, membran ve serum lipidlerinde peroksidasyon, hücre yüzeyindeki reseptörlerde değişiklik, Na-K-ATPaz, Ca-ATPaz gibi hücre iyon transport proteinlerinin tahrip olması, bağ dokusu harabiyeti ve ekstraselüler etkiler sayılabilir.

Serbest radikallerin, bu etkileri ile çeşitli hastalıkların oluşumunda rol oynadıkları kabul edilmektedir. Bu hastalıklar; ateroskleroz, malign hastalıklar, iskemik reperfüzyon hasarı, diyabetin mikroanjiopatik komplikasyonları, romatoid artrit ve otoimmün hastalıklar, böbrek bozuklukları (otoimmün nefroz, aminoglikozid nefrotoksitesi), göz hastalıkları (maküler dejenerasyon, katarakt), karaciğer bozuklukları (endotoksin, asetaminofen, demir), gastrointestinal bozukluklar

(ülseratif kolit, non steroid antiinflamatuvar droglara bağılı hasar) ve nörodejeneratif olarak özetlenebilir (107).

3.2.4.1. Proteinlere Etkileri

Radikallerle ilgili protein hasarı; elektron sızıntısı, metal iyon bağımlı reaksiyonlar, lipid ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilir. Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri, aminoasit kompozisyonlarına bağılıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikal hasarına açıktırlar (95,108). Bu aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerin parçalanmasına çapraz bağ oluşumuna, agregasyona ve proteinlerin proteolitik parçalanmaya yatkın hale gelmesine neden olmaktadır.

3.2.4.2. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Serbest radikal hasarına en hassas biyomoleküller membran lipidleridir. LPO, membran yapısını teşkil eden fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki poliansature yağ asitlerinin, ROS tarafından peroksitler alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi sekonder ürünlere yıkılma reaksiyonudur (109).

Biyolojik membranlarda serbest radikallerle indüklenen LPO, başlangıç basamağı, ilerleme ve yayılma basamağı ve sonlanma basamağı olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir (109,110,111,112).

LPO çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına veya indirekt olarak reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olmaktadır. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması nedeniyle reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikrovizkozitesi önemli şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid (MDA), membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklamaktadır (95).

Çeşitli çalışmalarda LPO artışına GSH-Px (34,113) ve diğer antioksidanlarda azalma eşlik etmiştir (114,115). Yapılan çalışmalarda 4-hidroksi-2-noneal (HNE)'in GSH ile kendiliğinden reaksiyona girdiği, ancak hücre içinde GSH-S transferazların reaksiyona katılmasıyla reaksiyonun daha hızlı ilerlediği gösterilmiştir (116,117).

GSH-Px, HNE ile inkübe edildiğinde zaman ve konsantrasyona bağlı kompetitif inhibisyon nedeniyle enzimatik aktivite kaybolur (59). HNE ile intrasellüler GSH konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, başlangıçtaki azalmayı takiben bir artış olduğunu bildirmektedir (118,119). HNE bir yandan GSH'u azaltırken diğer yandan sentezini de indüklemektedir (120). Folat eksikliği durumunda beyin hücrelerinde GSH düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (53). LPO ürünlerinin GSH sentezini arttırmaları bu durumu açıklayabilir. LPO oksidatif

stresin göstergelerinden biri olarak da değerlendirilebilir (60). Bu amaçla LPO ürünlerinden olan MDA ve 4-hidroksinonealin ölçümü yapılmaktadır (59).

3.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Normal fizyolojik koşullarda hücreler, oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur.

Antioksidanlar etkilerini başlıca serbest radikal oluşumunu önleyerek ve oluşan serbest radikalleri etkisiz hale getirmek suretiyle iki şekilde gösterirler. (95,121)

3.3.1. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-px, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozolde yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir (122,123). GSH-Px enziminin selenyum bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki formu bulunur. Selenyum bağımlı izoenzim, selenosistein formundadır. Hem hidrojen peroksit (H_2O_2)'e hem de hidroperoksitlere etki etmektedir. Selenyuma bağımlı olmayan form ise hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olup, sadece lipid hidroperoksitlerin yıkımında görev alır (124).

GSH-Px, aşırı hidrojen peroksit varlığında GSH'un okside glutatyona (GSSG, glutatyon disülfid) oksidasyonunu katalize eder. Bu arada H_2O_2 ise suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur.

3.3.2. Glutatyon Redüktaz (GR)

Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş GSH'un tekrar indirgenmiş şekle dönmesi gerekir. GR redükte nikotin amid adenin dinükleotid (NADPH) varlığında, GSSG'un indirgenme reaksiyonunu katalizler (124).

3.3.3. Redükte Glutatyon (GSH)

GSH (L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin); glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptittir. Aktif grubu sisteinin sülfhidril (-SH) grubudur. Redükte ve okside şekilde bulunan GSH hücrenin oksidasyon-redüksiyon dengesini koruyan önemli bir indirgen ve antioksidan olup, hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır (95).

GSSG'un total GSH'a (GSH+GSSG) oranı, oksidatif stres için sensitiv bir indikatör olarak değerlendirilmektedir (125).

Çok önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır. Ayrıca proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutarak oksidasyondan korur ve fonksiyonel protein ve enzimlerin inaktivasyonunu önler. GSH, glutatyon-S-

transferaz enziminin katalizi ile endojen ve eksojen toksik bileşikleri de konjuge etmektedir (95,125).

GSH, organizmanın tüm hücrelerinde bulunan, hücrenin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin %90 kadarını oluşturur. (126).

hHcy'nin etyopatogenezi hakkında birçok görüş bulunmakla birlikte, gerçek sebep tam olarak belli değildir. Son yıllarda hHcy'nin patogenezi ve oluşan doku hasarı üzerine serbest radikallerin önemli rol oynadıklarına ilişkin pekçok araştırma yapılmıştır (127,128). hHcy'li hastalarda antioksidan savunma mekanizmaları özellikle GSH-px, SOD gibi enzim aktiviteleri düşük bulunmuştur. Bu nedenle ki, hHcy'nin mikroanjiopatik komplikasyonların tedavisinde serbest radikal temizleyicileri ve antioksidanlar büyük önem kazanmıştır (100).

3.4. NÖRONAL VE GLİAL MARKIRLAR

3.4.1. Nöron Spesifik Enolaz (NSE)

NSE, glikolik yolun enzimi olan enolazın bir izoenzimidir. Enolaz, 2-fosfoglisaratın fosfoenolpirüvata dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. İlk kez 1965'de Moore ve Mc Gregor beyin dokusu protein haritaları üzerinde çalışırken '14-3-2' proteini olarak adlandırılmıştır. Daha sonra nörona lokalizasyonu nedeniyle 'nöron spesifik protein' adı verilmiştir (129).

Merkezi sinir sistemindeki enolaz formunun en asidik olanı NSE'dir. Bunun dışında orta ve düşük asiditeli formları da vardır (130). Genel olarak enolazın alfa,

beta ve gama alt ünitelerinin ikili kombinasyonları izoenzimleri oluşturur. Bu izoenzimlerden NSE gama-gama enolazdan oluşmaktadır. Nöronlarda ve nöroendokrin hücrelerde bulunmaktadır. Alfa-beta ve beta-beta enolaz yalnızca kas dokusunda bulunur. Santral sinir sisteminde bulunan izoenzimlerin özellikleri Tablo 2’de gösterilmiştir (130,131).

Tablo 2. Santral Sinir Sisteminde Bulunan İzoenzimlerin Özellikleri

	NNE	Hibrid	NSE
Molekül Ağırlığı	87.000	82.500	78.000
Alt ünite kompozisyonu	$\alpha\alpha$	$\alpha\gamma$	$\gamma\gamma$
Alt ünite molekül ağırlığı	43.500	43.500/39.00	39.000
İzoelektrik nokta	7.2	Bilinmiyor	4.7
Elektroforetik mobilite	0.2	Bilinmiyor	0.8
Anti-NNE serumla reaksiyon	+++	+-	-
Anti-NSE serumla reaksiyon	-	+-	+++

NSE’in beynin total çözünebilir proteininin % 0.4-2.2 kadarını oluşturduğu gösterilmiştir (132). NSE beyinde sadece nöronlarda ve sitoplâzmada bulunan ancak nükleusta bulunmayan bir proteindir. Sitoplâzma içinde poliribozomların, mikrotübüllerin, mitokondrilerin dış membranlarının ve granüllü endoplazmik retikulumun çevresinde immunpresipitatu gösterilmiştir (131,133).

NSE’in en yüksek düzeyleri beyinde bulunur. Periferik sinir sistemi ve çeşitli nöroendokrin bezlerde de orta düzeylerde görülür. En düşük düzeyleri ise serum ve BOS’da tespit edilir. Karaciğer ve kas gibi dokularda eser oranlarda bulunmaktadır.

Bununla birlikte pineal bez, adrenal bez, hipofiz, tiroid ve pankreas'ta, APUD (amin precursor uptake and decarboxylation) hücreleri, trombosit ve eritrositlerde de NSE bulunmaktadır. Tablo 3'te NSE ile non nöronal enolaz (NNE)'in fonksiyonel özelliklerinin karşılaştırılması yapılmıştır (130,131).

Tablo 3. NSE ve NNE'in Fonksiyonel Özelliklerinin Karşılaştırılması

	NNE	NSE
Substrat K_m	1.3×10^{-4}	1.2×10^{-4}
K_a Mg	6.1×10^{-4}	2.4×10^{-4}
Klorür stabilitesi	Yok	Var
Üre stabilitesi	Yok	Var
Isı stabilitesi (50 °C)	Yok	Var
Hücrel dağılım	Glial hücreler ve nöron olmayan hücreler	Nöron ve nöroendokrin hücreler
Gelişimsel Profil	Oluşumu glial matürasyona bağlı değil	Oluşumu nöron farklılaşmasına bağlı

Amyotrofik lateral sklerozda, serum ve BOS'da NSE düzeyleri artmaktadır. Kafa travması, serebral infarkt gelişimi sırasında, periferik sinir sistemini ilgilendiren hücre hasarlarında, bakteriyel menenjit ve ensefalit durumlarında NSE düzeyleri artmıştır (134,135). Perinatal asfiksili yenidoğanlarda BOS'ndaki NSE artışı ve bu artışın hasarın derecesiyle orantılı olduğu gösterilmiştir (136,137).

Yapılan rat çalışmalarında, nöronal gelişim sırasında NSE'in nöronların fonksiyonel olgunlaşmasının başlamasıyla ortaya çıktığı görülmüştür (130). Çeşitli nöroendokrin kanserler ve APUD'omalardaki değişmiş nöroendokrin hücrelerin NSE'den çok zengin olması bu hastalıklarda diagnostik ve prognostik indeks olarak

kullanım alanı sağlamıştır. Tablo 4'te NSE ve NNE'nin beyin dokusundaki dağılımı gösterilmiştir (130).

Tablo 4. NSE ve NNE'in Beyin Dokusundaki Dağılımı

	NNE	NSE
1- Glial hücreler		
- Astrositler	+	-
- Oligodendrositler	+	-
- Radyal glial hücreler	++	-
- Ependimal hücreler	+	-
- Tanositler	+	-
2- Nöronlar		
Serebellum		
- Stallit sepet hücreleri	+	++
- Purkinje hücreleri	-	+++
- Golgi tip 2 hücreleri	-	++++
- Granüllü hücreler	-	++
- Derin serebeller nöronlar	-	++++
Hipokampus		
- Piramidal olmayan nöronlar	-	++++
- CA3 piramidal nöronlar	-	+++
- Dentat granüllü hücreler	-	++
- CA1 ve 2 nöronlar	+	+
Korteks		
- Piramidal olmayan nöronlar	-	++++
- Yüzeyel piramidal hücreler	+	++
- Derin piramidal hücreler	-	+++
Talamus		
- Retiküler nöronlar	-	+++

Küçük hücreli akciğer kanseri olan hastalarda serum NSE düzeylerinin yükseldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (138,139). NSE santral sinir sistemi hücrelerinde, eriyebilen proteinlerde ortalama %1.5 kadar yüksek oranlarda bulunduğundan, iskemik ve nekrotik hasarlarda en önce ve hasarla orantılı olarak salınan bir enzimdir (135).

3.4.2. S-100 Proteini

S-100 proteini intrasellüler bir glikoproteindir. Asidik bir protein olup kalsiyum bağlar. 10-20 kilodalton (kDa) ağırlığındadır. Homodimer veya heterodimerler oluşturur. Birkaç yıl öncesine kadar üç farklı S-100 proteininin yapısı bilinirken bugün birçok formları tespit edilmiş bulunmaktadır. (140).

S-100 protein ailesi, kalsiyum bağlayan proteinlerin en geniş alt grubu olup 20'ye yakın değişik tipleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında en son bulunanlar; S-100A14 ve S-100Z'dir. S-100 proteini pleotropik kalsiyum bağımlı hücresel olaylarda rol oynar. Bazı S-100 proteinlerinin fizyolojik olarak kalsiyumdan daha çok çinkoya affiniteleri vardır. Örneğin; S-100A2 ve S-100A3'ün kalsiyuma çok düşük affiniteleri varken, çinkoya yüksek affiniteleri vardır (140).

Tipik bir S-100 geni üç ekson'dan meydana gelir. S-100 proteini genel olarak sinyal transdüksiyonu, hücre farklılaşması, hücre motilizasyonu ve transkripsiyonu gibi birçok hücre aktivitesinde rol oynar. Hücredeki bu olaylar S-100 proteininin kalsiyum bağımlı bir yolla hedef proteinlerinin aktivitesini modüle ettikleri düşünülmektedir (140).

S-100B ve S-100A12'nin son zamanlarda tespit edilen bir yüzey reseptörü olan RAGE (receptor for advanced glycation) reseptörlerine bağlanarak sinyal mekanizmalarını başlattığı düşünülmektedir (140).

S-100 proteininin romatoid artrit, akut inflamatuvar lezyonlar, kardiyomyopati, Alzheimer hastalığı ve kanser gibi ciddi hastalıklarla yakın ilişkili olduğu tespit edilmiştir. S-100 proteininin bu hastalıkların klinik yaklaşımında ve yaşam süresini tahminde bir markır olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (140). Tablo 5 'te S-100 proteinlerinin hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir.

Tablo 5. S100 Proteinlerinin Hastalıklarla İlişkisi

Protein	İlgili Hastalık
S-100B	Alzheimer hastalığı, Down's sendromu
S-100A1	Kardiyomiyopati
S-100A2	Kanser, tümör supresyonu
S-100A4	Kanser, metastaz
S-100A6	Kanser, amyotrofik lateral skleroz
S-100A8/9	İnflamasyon, yara iyileşmesi
S-100A11	Kanser, oküler hastalıklar
S-100A12	İnflamasyon
S-100P	Kanser

3.4.2.1. S100B

S-100B, astrosit, oligodendrosit ve schwan hücrelerinden sentezlenir. Total beyin proteinlerinin %0,2'sini oluşturur. S-100B, beyin hasarında BOS'na ve daha sonra kana rahatlıkla geçebilmektedir. S-100B seviyesinin BOS ve plazmada ölçümü, serebral iskemisi olan hastaların tayini için iyi bir göstergedir. Bununla birlikte plazmadaki değerleri özellikle malign melanom ve kardiyak cerrahiye maruz kalan pediatrik hastaların takibinde önemli bir markırdır (140).

3.4.3. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)

Reaktif gliosis, fiziksel ve kimyasal tahriplerden kaynaklanan nöronal bozukluğa karşı astrositlerin bir reaksiyonudur. Bu olay astrositleri için spesifik belirleyici olan GFAP'in aşırı ekspresyonu ile karakterize edilir. GFAP bir hücre içi ara filamenttir. GFAP'nin stabil astrosidik süreçlerde esas olduğu ve hatta nöronal hasarlarda merkezi sinir sisteminin morfojenezi için kritik bir materyal olduğu bilinmektedir. Nöronal hasara cevap olarak astrositler GFAP yapımını hızlandırırlar (141,142).

Ara filaman proteinler beyin hücre iskeletini oluşturan ana unsurlardır (143). Bir hücre iskelet protein ailesi üyesi olarak GFAP'nin astrositlerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün sağlanmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Sıçan çalışmalarında GFAP eksikliğinin sinaptik fonksiyonlarda değişikliğe yol açtığı tespit edilmiştir (144). Santral sinir sisteminde, travma, genetik bozukluk, kimyasal hasar

gibi durumlarda astrositler reaktif hale gelir, astrogliozis denilen tarzda cevap verirler. Astrogliozis GFAP senteziyle karakterizedir (145).

Olgun olmayan astrositler esas olarak vimentin sentezlerler. Bu hücreler matür hale geldiğinde vimentin yerine GFAP sentezine kayma olur. Dolayısıyla GFAP sentezi beyin maturasyonunun bir göstergesi olarak da değerlendirilmektedir (146,147). İnsanda GFAP gen mutasyonu erken yaşta ölümle sonuçlanan nörodejeneratif hastalıklara yol açmaktadır (148). GFAP santral sinir sistemi hasarını gösteren bir test olarak kullanılabilmektedir (149).

3.5. Nar (*Punica granatum* L.) ve Nar Çiçeği

Punicaceae familyasından içinde küçük çekirdekler ve meyve gövdesini oluşturan yüzlerce tanecikten oluşmuş, hafif ekşi tadında ılıman iklimler de yetiştirilen bir meyve türüdür. Narçiçekleri (NÇ), meyvelerinin ortasından çıkar ve 5 parçadır.

Punica granatum L. çiçeğinin metanolik ekstresinde, pelargonidin 3,5 diglikozit, ursolik asit, urolük asit, daukosterol, oleonikasit, brevifolinkarboksilat, pomegranat, sitosterol ile maslinik asit, asiatic asit ve alkan yapısında maddeler izole edilmiştir. Petrol eterli ekstresinde, sitosterol ve ursolik asit, kloroformlu ekstresinde bu ana bileşenler yanında maslinik asit, asiatic asit, sitosterol-P-D-glukozit; etil asetat ekstresinde 3,3',4'-tri-O-metilelajik asit, daukosterol, urolük ve maslinik asit; aseton ekstresinde etil brevifolinkarboksilat; etanolü ekstrede ise D-mannitol, elajik asit ve gallik asit, petrol eteri ekstresinde epikateşin, kateşin ve

yine gallik asit, elajik asit ve fenolik bileşiklerin bulunduğu saptanmıştır (150,151,152). *Punica granatum* L. çiçeği üzerinde yapılan çalışmalar sonunda elde edilen kimyasal maddeler sırasıyla incelenmiştir ve yapılarına göre gruplandırılarak açıklanmıştır (151).

NÇ'nde bol bulunan başlıca fenolik bileşikler, fenolik asit flavonoidler, antiosiyantinler ve proantiosiyantinlerdir. Polifenoller veya fenolik bileşenler iki ana kısma ayrılabilir; flavonoidler ve non-flavonoidlerdir. Fenolik bileşimler, antioksidan aktivite, serbest radikallerin temizlenmesi, lipoprotein oksidasyon inhibisyonu, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyon redüksiyonu gibi potansiyel kalp hastalığı risk faktörlerinin azaltılması ve ortadan kaldırılması işlevleri ile ilgilidir (153).

3.5.1. Narçiçeğinin Antioksidan Aktivitesi ve Radikal Süpürücü Etkisi

Punica granatum L. çiçeklerinden izole edilen polisakkaritlerin radikal süpürücü etkilerine 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azinobis (3-etil benzotiyazolin-6-sulfonik asit) (ABTS)' i inhibe etme özellikleri kullanılarak bakılmıştır. *Punica granatum* L. çiçekleri 4 µg/ml konsantrasyonda DPPH radikalini %69, ABTS radikalini ise %88 inhibe ettiği bulunmuştur (154).

Punica granatum L. meyve suyu, ariller, kabuk (mezokarp ve endokarp) ile onların sulu, etil asetatlı ekstraktlarının antioksidan özelliklerine DPPH, lipooksijenaz ve luminol-ksantin oksidaz sistemleriyle bakılmıştır. Ariller, meyve suyu, mezokarp ve endokarp sulu ve etil asetatlı ekstraktlara göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Antioksidan kapasiteleri kabuk > meyve suyu > ariller şeklindedir. *Punica granatum*

L. çiçeğinin güçlü antioksidan aktivitesi olduğu için gıda desteği olarak beslenmede kullanılabileceği saptanmıştır (155).

Diğer bir yapılan *in vitro* aktivite çalışmasında, *Punica granatum* L. çiçeklerinin etanolik ekstresi kullanılmıştır. Çiçeğin yüksek miktarda polifenol içerdiği ve güçlü antioksidan aktivitesinin bunlardan kaynaklandığı bulunmuştur. DPPH sistemde %81,6 aktivite göstermiştir. ROS ve nitrojen türevleriyle yapılan *in vivo* hayvan deneylerinde reaktif oksijenden ileri gelen doku hasarını iyileştirdiği gözlemlenmiştir (156).

Punica granatum L. çiçeklerindeki polifenollerin insanlarda ve aterosklerotik farelerde yapılan *invitro* ve *invivo* çalışmalarda makrofajlarda LDL oksidasyonunu engellediği bulunmuştur. Farelerde aterosklerotik lezyonların gelişmesini inhibe ettiği bunu da LDL oksidasyonunu engelleyerek yaptığı düşünülmektedir (157).

Kurutulmuş *Punica granatum* L. meyve kabukları etil asetat, aseton, metanol ve su ile soxhlet apereyinde ayrı ayrı 4 er saat ekstre edilmiştir. Antioksidan aktiviteleri fosfomolibden kompleksindeki değişimle ölçülmüştür. Bütün ekstrelerde antioksidan aktivite saptanmıştır ancak en az su ekstresinde gözlenmiştir. Aktivite sırası metanol > etil asetat > aseton> sudur (158).

CCl₄ verilmiş sıçanlarda *Punica granatum* L. çiçeğinin metanol ekstresi ile *in vivo* bir çalışmada katalaz, peroksidaz ve SOD enzimleri verilerek lipid peroksidasyonu çalışılmıştır. *Punica granatum* L. çiçeği ekstraktının güçlü

antioksidan olduğu gözlenmiştir. Ayrıca CCl_4 ' ün karaciğer hasarı etkisine karşı *Punica granatum* L. meyve kabuğu da koruyucu etki göstermiştir (159).

Punica granatum L. meyve kabuğundan gallokateşinler ve prodelfinidinler yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile saflaştırılmıştır. Antioksidan aktiviteleri için fosfatidilkolin lipozomlarının askorbat-demir indüklü peroksidasyonu ve TEAC yöntemiyle Trolox'a eşdeğer aktivite değerleri ölçülmüştür. Sulu fazda bulunan prodelfinidin türevleri gallokateşin monomerlerinden daha aktif çıkmıştır. Lipid peroksidasyonu inhibisyonunda, lipit fazında ise yalnızca tek monomer olan [gallokateşin-(4-8)-kateşin] daha efektif bulunmuştur (160).

Başka bir çalışmada fare beyinde H_2O_2 indüklü LDL oksidasyonu çalışılmıştır. Hidroksil (OH), süperoksit (O_2) radikalleri ve NO kullanılmıştır. *Punica granatum* L. Ekstresi hidroksil ve süperoksit iyonuna karşı radikal süpürücü etki göstermiştir. Antosiyanidinler buna ek olarak hidrojen peroksit iyonuna karşı da bu etkiyi göstermiştir. Bu sonuçlardan antosiyanidinlerin *Punica granatum* L. ekstraktlarında antioksidan aktiviteye katkıda bulundukları anlaşılmıştır (161).

Punica granatum L. çiçeği ekstresinin şeker hastalıklı obez farelerde yapılan deneylerde peroksizom arttırıcı reseptörü uyararak kardiyak lipit alınımını inhibe ettiği ve sirkülasyonunu azalttığı böylece yükselen kardiyak yağ asitlerini düşürdüğü bulunmuştur (162). *Punica granatum* L. çiçeği metanol ekstresinin (500 mg/kg günlük) 6 hafta oral uygulanmasıyla insülin reseptörünün duyarlılığını arttırarak plazma glukoz seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir (163). Diğer bir çalışmada normal

ve alloksanla indüklenen diabetli farelerde NÇ'nin sulu-etanollü ekstrelerinin (% 50), önemli ölçüde kan glukozunu düşürdüğü gözlenmiştir (164).

3.6. Amaç

Bu çalışmada hHcy'nin sebep olduğu oksidatif stres üzerindeki NÇ'nin rolü ve antioksidan aktivitesi ile bu stresle başa çıkabilmedeki etkisinin araştırılması, NÇ'nin, antioksidan etki göstereceği dozda hHcy oluşturulmuş ratlara verilmesi ve hHcy'nin beyinde oluşturduğu oksidatif hasarı önlemesi ve anti hHcy'k etkisinin olduğunun araştırılması amaçlanmıştır.

Oksidan-antioksidan sistemin ne yönde etkilendiğinin değerlendirilmesi amacıyla çalışmamızda hHcy oluşturulan ve hHcy ile birlikte NÇ uygulanan ratlarda plazma ve beyin dokusunda lipid peroksidasyonun göstergesi olarak MDA, hücresel antioksidan özellikli GSH ve GSH-Px aktivite düzeyleri ölçülecektir. Bununla birlikte hHcy'nin beyinde oluşturduğu oksidatif hasarın göstergesi olan, nöronal ve glial markırlar (NSE, S100 ve GFAP)'ın sodyum dodesil sülfat poli akrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemiyle tespit edilerek NÇ uygulamasının bu etkiyi ne yönde ve düzeyde değiştirdiğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. GEREÇ

4.1.1. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan Wistar cinsi ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Ratlar, havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikası'nda özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Deney Hayvanlarına Verilen Yemin Bileşimi

Yem Bileşimi	%
Su (en çok)	12
Ham protein (en az)	24
Ham selüloz (en çok)	7
Ham kül (en çok)	8
HCl'de çözünmeyen kül (en çok)	2
NaCl (en çok)	1
Metabolik enerji	2650 kcal/kg
Mineral karması*	1.25
Vitamin karması**	1.25

* Mineral Karması: Kalsiyum (%1.0-2.8), Fosfor (%0.9), Sodyum (%0.5-0.7) Mangan (10 mg/kg) Çinko (4 mg/kg).

** Vitamin Karması: Vit. A (300 IU/kg), Vit. D₃ (1000 IU/kg), Vit.E (60 mg/kg) Vit. B₂ (4 mg/kg).

4.1.2. Deneysel Uygulamalar

Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (13.08.2009 / Karar No: 52) onayı alınarak, çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Deney süresi 6 hafta olarak belirlendi. Deney hayvanlarının bulundukları ortamın sıcaklığı 22-23 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık ve 12 saat karanlıkta takip edildi.

Deneysel çalışmada ortalama ağırlıkları 220 gr (220 ± 20 gr) olan toplam 21 adet Wistar cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar ağırlıkları birbirlerine en yakın olanlar ayrı ayrı seçilerek her kafeste 3 ya da 4 rat olacak şekilde yerleştirildi. Toplam 3 grup oluşturuldu. Mevcut laboratuvar şartlarımızda, çalışmanın başlangıcında her hafta düzenli bir şekilde ağırlık değişiklikleri kaydedildi. Bu gruplar;

Grup 1 (Kontrol Grubu; n=7): Bu grup, 6 haftalık uygulama boyunca her gün sadece rat yemi ve su ile beslendi.

Grup 2 (hHcy Grubu; n=7): Bu gruba, 6 hafta boyunca içme sularına 1,5 g/kg/gün dozda L-metiyonin (Merck, Germany) katılarak kronik hHcy oluşturuldu (165). Çalışmada oral uygulanan metiyonin dozunun Hcy düzeyini, kontrole göre yaklaşık 3-6 kat artırdığı yayınlanan çalışmalarla gösterilmiştir (47,166). Bu kronik hHcy oluşturmak için yeterli bir dozdur. Metiyonindeki sülfür grubunun özelliğinden

dolayı, ratlar ilk gün kontrole oranla daha az su tükettiler. Fakat sonraki günler kontrol grubuyla eş miktarda su içtiler.

Grup 3 (hHcy+NÇ Grubu; n=7): Bu gruba, 6 haftalık deney süresince içme suyu ile 1,5 g/kg/gün dozda L-metiyonin'e ilaveten, 500 mg/kg/gün dozda NÇ olacak şekilde daha önceden yemlerine karıştırılarak pelet haline getirilen yemler her gün düzenli olarak verildi.

4.1.3. Narçiçeğinin Normal Yemle Karışımının Hazırlanması

İçeriği Tablo 6'da verilen normal rat yemi ile ticari olarak dışarıdan satın alınan kurutulmuş narçiçekleri bir havanda iyice dövülerek ince toz haline getirildi. NÇ'nin dozu çalışmamızın amacına uygun bir şekilde 500 mg/kg/gün olacak şekilde toz halindeki normal rat yemi ile uygun oranda karıştırılarak homojen hale getirildi. Bu karışım deney hayvanlarının maksimum derecede tüketebilmeleri için çeşme suyu ile sulandırılarak uygun boyutlarda pellet haline getirildi. Hazırlanan pellet yemler karanlık, kuru ve serin ortamda kurutularak deney hayvanlarına verilmek üzere hazır hale getirildi.

4.1.4. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

4.1.4.1. Kan Örneklerinden Serum ve Plazma Hazırlanması

Altı hafta sonunda deneysel uygulamalar sonrasında dekapite edilen ratların kanları yapılacak analizler için uygun olacak şekilde heparinli, etilen diamin tetraasetik asit (EDTA)'li ve düz biyokimya tüplerine alındı. Alınan kanlar 3000 rpm'de

10 dakika santrifüj edilerek (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany) serumlarına ayrıldı. Çalışmada birçok parametreye bakılacağı için, elde edilen serum örnekleri küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konuldu. Biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -20 °C' de saklandı.

4.1.4.2. Beyin Dokusu Örneklerinden Homojenat Hazırlanması

Dekapite edilen ratların kanlarının alınması sonrasında total beyinleri itinayla çıkarıldıktan sonra, beyinin hipokampus, korteks ve serebellum bölgesi ayrılarak kuru buzda hemen donduruldu. Örnekler, darası alınmış olan polipropilen tüplere aktarıldı. Ağırlıkları hassas terazide tartılarak belirlendi ve analizler yapılncaya kadar tüm örnekler -70 °C' de saklandı. Doku kısım örneklerinin hazırlanmasında, Baydaş ve arkadaşları tarafından uygulanan homojenizasyon yöntemi kullanıldı (167).

Bu yöntemle önceden ayrılmış taze veya dondurulmuş dokular 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solüsyonunda (10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1 mM fenil metil sülfonil florid (PMSF), 5pM soybean [Sigma Chemical Co., Deisenhofen, Germany) (bir tripsin inhibitörü olarak] cam bir homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı ultrasantrifüjde +4°C'de 60 dakika süreyle 60.000 xg' de santrifüj edildi. İlk süpernatantlar polipropilen tüplere alınarak LPO, GSH ve GSH-Px analizleri yapılncaya kadar -70°C' de saklandı. Pelletler eşit hacimde ilave edilen homojenizasyon solusyonunda [25 mM Tris-HCl (pH= 7,4), 0.1 mM PMSF, (soluble powder; Sigma, St. Louis, MO, USA) % 2'lik Triton X-100 ve % 1'lik SDS]] yeniden

süspanse edildi. +4°C' de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4°C' de 60 dakika süreyle 60.000 xg'de santrifüj edildi. Elde edilen 2. süpernatantlar polipropilen tüplere alınarak SDS-PAGE ve westernblot (WB) analizleri için -70°C' de saklandı.

4.1.4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merck (Germany), Sigma-Aldrich (ABD) ve MP Biomedicals (Germany) firmalarından temin edilmiştir.

4.2. YÖNTEMLER

4.2.1. Plazma Homosistein Düzeylerinin Ölçümü

Hcy düzeyleri EDTA'lı plazmada HPLC yöntemi ile Clin Rep marka ticari kitler (Recipe Chemicals Instruments GmbH, Germany) kullanılarak ölçüldü. HPLC'de Agilent 1100 Shimadzu RF-10AXL floresans dedektör (Shimadzu Co., Japan) kullanıldı ve eksitasyon 385 nm'de, emisyon 515 nm'de uygulandı. Kolon sıcaklığı 30 °C olarak ayarlandı ve ticari kitin özel C8 kolonu kullanıldı. Bu çalışmada akış hızı 1 ml/dk, injeksiyon hacmi 20 µl ve çalışma süresi 10 dakika alınarak ölçüm yapıldı.

4.2.2. Plazma Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Ölçümü

LPO'un son ürünü olan MDA tayini, Satoh (168) ve Yagi (169)'den modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak, Techcomp 8500 II uv-vis (Techcomp Ltd., China) spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

Plazmada bulunan ve lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA, aerobik şartlarda pH'nın 3.4 olduğu bir ortamda tiyobarbütirik asit (TBA) ile 95°C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan bu rengin 532 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile MDA miktarı saptanır.

Ayıraçlar:

1. N/12'lik H₂SO₄
2. %10'luk fosfotungustik asit (PTA)
3. TBA ayıracı (Eşit hacim %0.67 TBA ile glasiyel asetik asit karıştırılır)
4. n-Bütanol
5. Standart

Stok standarttan, 10 µl alınıp 100 ml'ye tamamlanarak, konsantrasyonu 40 mmol/L olan günlük stok standart hazırlandı. Bu stok standarttan belli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 2, 4, 8, 10, 20 nanomol (nmol) /ml konsantrasyonlarda çalışma standartları tüpleri hazırlandı. Tüpler iyice karıştırıldı. Üzerlerine cam bilye konularak 95 °C'de 60 dakika kaynar su banyosunda kaynatıldıktan sonra soğutuldu

ve her tüpe 3 ml. n-Bütanol ilave edildi. Daha sonra vortekslenen tüpler 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Bütün standartların n-Bütanol fazı 532 nm’de köre karşı okundu ve bu standartlardan eğri çizimi yapıldı. Daha sonra çalışılan tüm örnekler için bu eğri kullanılarak MDA düzeyleri belirlendi. Ölçülen plazma MDA düzeyleri nmol/ml olarak ifade edildi.

Hazırlanan örnek tüplerine sırasıyla 0.3 ml Plazma, 4 ml N/12 H₂SO₄ ve 0.5 ml % 10’luk PTA konularak tüpler iyice karıştırıldı, oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, altta kalan presipitat alındı, üzerine 3 ml distile su konularak vortekslendi ve iyice homojenize edildi. Daha sonra tekrar 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve yine presipitat alındı. Her bir örnek tüpüne 4 ml distile su ve 1 ml TBA ayırıcı, standart tüplerine 3 ml distile su 1 ml TBA ayırıcı ve 1’er ml standart eklenerek tüpler vortekslendi ve üzerlerine cam bilye konularak 95 °C’de 60 dakika kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Soğuk su altında soğutulan tüplere 3 ml n-Bütanol eklenerek vortekslendi. Tüpler tekrar 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak spektrofotometrede (Techcomp 8500 II uv-vis (Techcomp Ltd., Çin)) 532 nm’de köre karşı absorbansları okundu.

532 nm’de okunan örnek absorbansları (OD), standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \frac{\text{Örnek O.D}}{\text{Std. O.D}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

4.2.3. Plazma GSH ve GSH-px Düzeylerinin Ölçümü

Plazma GSH ve GSH-px aktivitesi düzeyi Koster ve arkadaşlarının belirlediği spektrofotometrik metoduna göre tayin edildi.

Plazmadaki GSH ve GSH-px Cumenehidroperoksit ile oksidasyona uğratılır. Renk ajanı olarak 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonu ile karıştırılması sonucu hem kör hem de örneklerde meydana gelen sarı renk kompleksinin spektrofotometrede 412 nm’de okunması esasına dayanır.

Ayırıcılar:

2 mM DTNB (5,5-dithiobis 2-nitrobenzoik asit)

0,1 M pH 7.4 Potasyum Fosfat Tamponu

% 1 Sodyum Sitrat

100 µl numune (plazma) üzerine 1.5 ml fosfat tamponu eklendi. Her bir örnek üzerine 400 µl DTNB (% 1 sodyum sitrat içinde) ilave edildikten sonra 5 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Numunelerin absorbanları 412 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı spektrofotometrede (Techcomp 8500 II uv-vis (Techcomp Ltd., China)) okutularak sonuçlar hesaplandı.

Sonuçlar, $\epsilon_{\max}=13600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ formülü kullanılarak hesaplandı ve µmol/L olarak ifade edildi.

4.2.4. Doku Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Ölçümü

Örneklerdeki GSH seviyeleri, GSH-400 (Oxis International, Inc., Portland, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi.

Ayıracılar

Ayırac I (R1); 0.2 N HCl de hazırlanmış 1.2×10^{-2} M kromojenik solüsyonu

Ayırac II (R2); % 30 NaOH Tampon solüsyonu (S3); 0.2 mM dietilen triamin penta asetik asit ve % 25 (w/v) lubrol içeren 20 mM potasyum fosfat (pH: 7.8) solüsyonu

Kör, standart ve örnekler için polipropilen mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı. Standartlar için hazırlanmış tüplere değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart solüsyonlarından 100 µl alındı ve 900 µl tampon solüsyonu ilave edildi.

Kör için hazırlanmış tüpe 100 µl kör solüsyonu alındı ve 900 µl tampon solüsyonu ilave edildi. Örnekler için hazırlanmış tüplerin her birine 100 µl örnek alındı ve 900 µl tampon solüsyonu ilave edildi. Kör, standart ve örnek tüplerinin her birine 50 µl R1 ayıracından eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı. Kör, standart ve örnek tüplerinin her birine 50 µl R2 ayıracından ilave edilerek karanlık ortamda 25°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler küvetlere aktarıldı ve absorbansları 400 nm'de spektrofotometrede okundu. Örneklerin okunan absorbans değerleri kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı.

4.2.5. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-px) Aktivite Ölçümü

GSH-px, redükte GSH'u kullanarak H_2O_2 'in suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. GSH-px aktivitesi, Paglia de Valentine (170) metodu ile ölçüldü.

GSH-px, H_2O_2 varlığında GSH'un GSSG'na dönüşmesini katalize eder. H_2O_2 'in bulunduğu ortamda GSH-px'in oluşturduğu GSSG, GR ve NADPH yardımıyla tekrar GSH'a dönüştürülür. GSH-px, aktivitesi deney ortamındaki NADPH'ın okside formuna çevrilmesi ile optik dansite (OD)'de meydana gelen absorbans farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplanır.

Ayırıcılar:

1. EDTA'li Fosfat Tamponu (50 mM, pH: 7,5)

(600 ml, 50 mM Na_2HPO_4 ile 400 ml 50 mM KH_2PO_4 karıştırılır; 2.08 g Na_2EDTA eklenir.

2. GSH (150 mM)
3. NADPH (10 mM)
4. GSH Redüktaz (1 U/10 μ L)
5. NaN_3 (1M Sodyum azid)
6. H_2O_2 çözeltisi (2 mM)

Hazırlanan her bir tüpe sırasıyla 2,65 ml EDTA'li Fosfat tamponu, 0,10 ml GSH, 0,10 ml NADPH, 0,01 ml GSH Redüktaz, 0,01 ml NaN_3 ve 0,02 ml örnek

(Homojenat) eklenerek tüpler iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda her tüpe 0.1 ml H₂O₂ çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbens azalmaları 5 dakika boyunca 15 saniyede bir kaydedildi. İlk absorbens değerinden son absorbens değeri çıkartılarak 5 dakikalık net değişim alındı ve bu değer 5'e bölünerek dakikadaki absorbens değişimi bulundu.

$$U/L \text{ (mikromol/min/L)} = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times l}$$

E : NADP'nin ekstinksiyon sabiti (6.22×10^3)

V_t : Total reaksiyon hacmi (ml)

V_s : Total hacim içindeki numune hacmi (ml)

l : Küvet çapı (1 cm)

$\Delta A/t$: Dakikadaki absorbens değişimi

10^6 : Molü mikromole çevirim faktörü

$$U/L = \frac{\Delta A/t \times 3 \times 10^6}{6.22 \times 10^3 \times 0.02 \times 1} = \frac{\Delta A/5 \text{ dk} \times 3 \times 10^6}{124.44}$$

4.2.6. Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü

Doku MDA düzeylerinin tayini Ohkawa ve ark. (171)'dan modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak yapıldı.

Doku MDA tayini, aerobik şartlar altında ve pH:3,5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda 1 saat inkübasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder

ürünü olan MDA'nın TBA ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

Ayırıcılar

1. % 8.1'lik SDS
2. % 20'lik Glasiyel Asetik Asit
3. % 0.8 TBA
4. n-Bütanol / Piridin (15/1, v/v)
5. Standart

Stok standarttan, günlük standart dilüe edilerek değişik derişimler hazırlanır ve standart çalışması yapılarak eğri çizilir. Bu eğriden faydalanılarak sonuçlar hesaplanır.

Hazırlanan örnek tüplerine 0,2 ml homojenat, 0,2 ml SDS, 1,5 ml Asetik asit, 1,5 ml TBA ayıracı ve 0,6 ml saf su, standart tüplerinin her birine 0.2 ml standart (4.4 nmol/ml), 0.2 ml SDS, 1.5 ml Asetik asit, 1.5 ml TBA ayıracı ve 0.6 ml saf su ilave edilerek iyice karıştırıldı. 95°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra soğuk su altında soğutulan standart ve örnek tüplerine 1 ml saf su ve 5 ml n-Bütanol/Piridin ilave edilerek iyice karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak 532 nm'de köre karşı standart ve örnek absorbansları ölçüldü.

532 nm'de okunan OD, standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formöl yardımıyla değerlendirildi

$$\text{MDA (nmol/gr yaş doku)} = \frac{\text{Örnek O.D}}{\text{Std. O.D}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

4.2.7. Doku Proteinleri Analizi ve SDS-PAGE Elektroferez Yöntemi

Doku proteinleri, SDS-PAGE tekniği ile ayrıştırıldı (172). Ayrıştırılan proteinler nitroselölöz membran kâğıda (Schleich ve Schuell inc. USA) transfer edildi. Non-spesifik olan bağlanmalar %1 bovine serum albümin ile inkübasyon yoluyla bloklandı. Primer antikor (rabbit anti-rat) %0.05 Tween-20 içeren tamponda seyreltildi. Blotlar diaminobenzidin ve goat anti-rabbit immunoglobulin peroksidaz konjugatı kullanılarak görünür hale getirildi. Elde edilen NSE, S100, ve GFAP protein bantlarının rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

SDS-PAGE jel sisteminde akrilamid monomerlerinden yararlanılır. Amonyum persülfat gibi bir serbest radikal ile tetrametilendiamin (TEMED) gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmekte ve daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanal bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir. SDS-PAGE analizinde jelin yapısında yer alan sodyum dodesilsülfat (SDS) deterjanın bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS

bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları, aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz çevre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi ya da bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilmeye çalışılır. Protein moleküllerinin hareketi güç kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein molekülleri şayet 40 kDa aralığına tekabül ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 40 kDa'dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürülür. Diğer bir ifade ile molekülün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürülür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır (173).

SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler

Jellerin hazırlanması

SDS-PAGE de kullanılan Separating (ayırma) jeli (%12) ve Stacking (yükleme) jeli (%4) olarak ayrı ayrı hazırlandı.

Separating (ayırma) jelinin hazırlanması (%12)		
Solüsyon Çeşidi	Miktar	Son konsantrasyon
Distile su	3,35 ml	-
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	-
% 10 SDS	100 µl	-
Akrilamid /Bis (%30)	4.0 ml	-
Amonyum persülfat (%10)	50 µl	-
TEMED	5 µl	-
Toplam	10.0 ml.	

Stacking (yükleme) jelin hazırlanması (%4)		
Solüsyon Çeşidi	Miktar	Son konsantrasyon
Distile su	6.1 ml	-
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml	-
SDS (%10)	100 µl	-
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 ml	-
Amonyum persülfat (%10)	50 µl	-
TEMED	10 µl	-
Toplam	10.0 ml	-

Örnek solusyonların (Sample Buffer) hazırlanması		
Solüsyon Çeşidi	Miktar	Son konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml	0.125 M
% 10 SDS	1.6 ml	%4
%0.05 bromofenol blue	0.2 ml	%0.002
Gliserol	0.8 ml	% 20
2-β-merkaptoethanol	0.4 ml	%10
Distile su	3.75 ml	-
Toplam	8.0 ml	-
Tank Solüsyonu		
Solüsyon Çeşidi	Miktar	Son konsantrasyon
Tris base	9.0 gr	-
Glisin	43.0 gr.	-
Distile su	600 ml	-
Boyama çözeltisi (Stain solusyon/100 ml):		
Solüsyon Çeşidi	Miktar	Son konsantrasyon
%0.1 Coomassie blue R-250	-	-
%45 Metanol	-	-
%10 Glasiyal asetik asit	-	-
%45 Distile su	-	-
Boya çıkarma çözeltisi (Destain solusyon/100ml)		
Solüsyon Çeşidi	Miktar	Son konsantrasyon
%45 Metanol	-	-
%10 Glasiyal asetik asit	-	-
%45 Distile su	-	-

4.2.7.1. Elektroforezin Yapılışı

Serbest ve serbest olmayan protein örnekleri Laemmli tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi (173). Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik seperating jel solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solüsyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar (≈ 1 cm) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi. Tarak dişlerinin ara dolgu maddesi olarak ifade edilen stacking jel 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solüsyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Stacking jel çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25-30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solüsyonu; 0,125 M Tris (pH 6.8), %2'lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisi, %20'lik gliserol, %10'luk 2- β -merkaptoethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 μ l olarak alınan her bir

protein örneğine eşit oranda çözücü solüsyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırladığımız karışımdan 10-20 µl kadar transfer edildi.

Hazırlanan jel üzerindeki 9 kuyu şu şekilde şematize edildi:

İlk 3 kuyu	→	kontrol grubu,
Sonraki 3 kuyu	→	hHcy grubu,
Son 3 kuyu	→	hHcy+NÇ grubu.

Her grup protein için 4 kez elektroforez yapılarak sonuçlar teyit edildi. Örnekler transfer edildikten sonra tank içerisine yeterli miktarda tank solüsyonu ilave edildi. Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5-10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180-200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı. Örnekler cam kasetin altına geçtikten sonra GFAP ve diğer proteinler için 25 dakika bekletildi. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel % 1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Boya solüsyonundan alınan jel boyayı giderici solüsyon (destain solüsyon) ortamına alındı. Ara sıra çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solüsyonda 5'er dakika bekletildi ve solüsyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2-3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki

boya giderilmiş oldu. Jel üzerinde görünür hale gelen protein bantlarının fotoğrafları bir kamera yardımıyla çekildi.

4.2.7.2. Westernblot

WB; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirilmektedir (174).

WB tekniği, elektroforez işlemi takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenmesidir (174,175).

Nitroselüloz membrana transfer sırasında jel ile nitroselüloz membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kâğıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır. Nitroselüloz membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir (175).

Spesifik antikorlar olarak monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj

sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir. (176).

WB'ta monoklonal antikorların kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır (175).

Özgül antikorlarda raportör madde olarak genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler kullanılmaktadır. Enzim olarak alkalen fosfataz ve peroksidaz enzimleri tercih edilmektedir. Bu enzimlerin substratları ve kromojen maddeleri birbirinden farklıdır. Son yıllarda enzimle işaretlemeye, testin duyarlılığını arttırmak amacıyla peroksidazla işaretli avidin biyotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan kromojenlerin en önemli özelliği çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır (174).

4.2.7.3. İmmunoblot

Beyin dokusu örneklerinin WB analizi, Baydaş ve arkadaşları tarafından uygulanan metoda göre yapıldı (167).

Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran (Schleicher and Schuell, Inc., USA) yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kağıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solüsyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solüsyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 60 dakika boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solüsyonla ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)) çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar (NSB), 100 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sıgır serum albumini ile 37 °C'de 90 dakikalık inkübasyonla bloklandı. Primer antikor olarak poliklonal rabbit anti-rat özgül antikorlar kullanıldı. Primer antikor % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:2000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar özgül antikorlar ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulin

ile 37 °C’de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitrosetüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı.

4.2.7.4. Bantların Görüntülenmesi

Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı. DAB ile reaksiyon sonucu nitrosetüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5-10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB ile renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitrosetüloz membranlar iyice yıkandı. Nitrosetüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı.

4.2.8. İstatistiksel Analizler

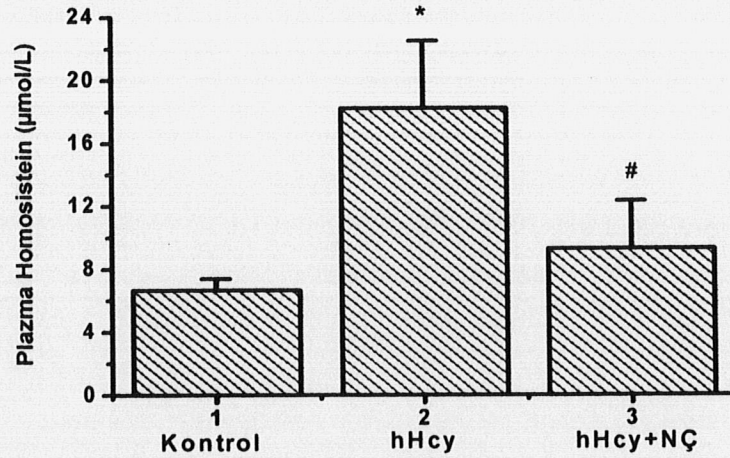
İstatistiksel değerdendirmeler, SPSS for Windows 16.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında parametrelerin karşılaştırılmasında One-way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve Post hoc Tukey testi kullanıldı. Proteinlerin densitometrik düzeylerindeki farklar Mann Whitney U testi ile değerdendirildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ değerdeleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Biyokimyasal Parametreler

5.1.1. Plazma Homosistein Düzeyleri

Hcy düzeyleri, hHcy grubu ($18.21 \pm 0.95 \mu\text{mol/L}$); Kontrol ($6.64 \pm 2.57 \mu\text{mol/L}$) ve hHcy+NÇ grubuna ($9.28 \pm 0.89 \mu\text{mol/L}$) göre anlamlı şekilde yüksek tespit edildi (* $p < 0.01$), (# $p < 0.01$). Kontrol ile hHcy+NÇ grubu karşılaştırıldığında aralarında fark bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p > 0.05$) Gruplara ait plazma Hcy düzeyleri Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Gruplara Ait Plazma Hcy Düzeyleri.

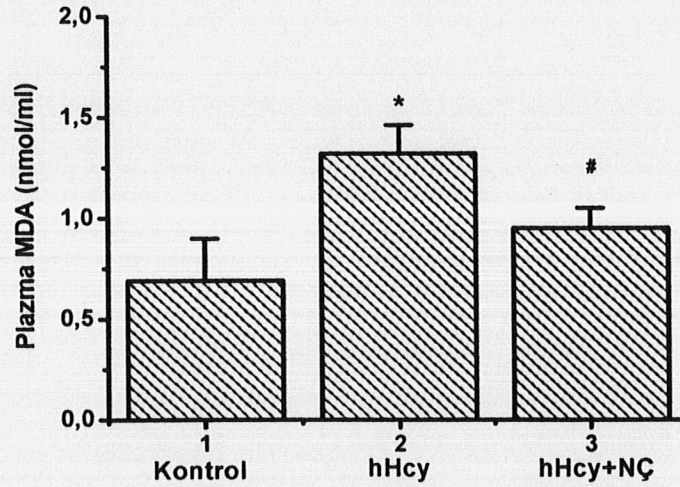
*: $p < 0.01$; Kontrol ve NÇ grubu ile,

#: $p < 0.01$ hHcy grubu ile,

#: $p > 0.05$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

5.1.2. Plazma MDA Düzeyleri

Plazma MDA düzeyleri, hHcy grubu (1.32 ± 0.19 nmol/L); Kontrol (0.69 ± 0.47 nmol/L) ve hHcy+NÇ grubuna (0.95 ± 0.17 nmol/L) göre anlamlı şekilde yüksek tespit edildi (* $p < 0.01$). Yine Kontrol ile hHcy+NÇ grubu karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi. (# $p < 0.01$) Gruplara ait plazma MDA düzeyleri Şekil 2’de verilmiştir.



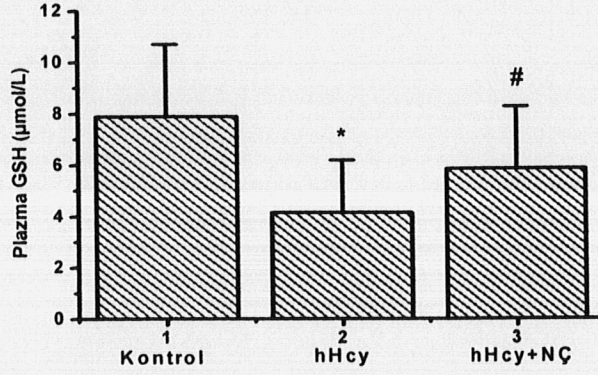
Şekil 2. Gruplara Ait Plazma MDA Düzeyleri.

*: $p < 0.01$ Kontrol ve NÇ grubu ile,

#: $p < 0.01$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

5.1.3. Plazma GSH Düzeyleri

Plazma GSH düzeyleri, hHcy grubu ($4.15 \pm 2.03 \mu\text{mol/L}$); Kontrol ($7.89 \pm 2.80 \mu\text{mol/L}$) ve hHcy+NÇ grubuna ($5.85 \pm 2.41 \mu\text{mol/L}$) göre anlamlı şekilde düşük tespit edildi (* $p < 0.01$). Yine Kontrol ile hHcy+NÇ grubu karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. (# $p < 0.01$) Gruplara ait plazma GSH düzeyleri Şekil 3'te verilmiştir.



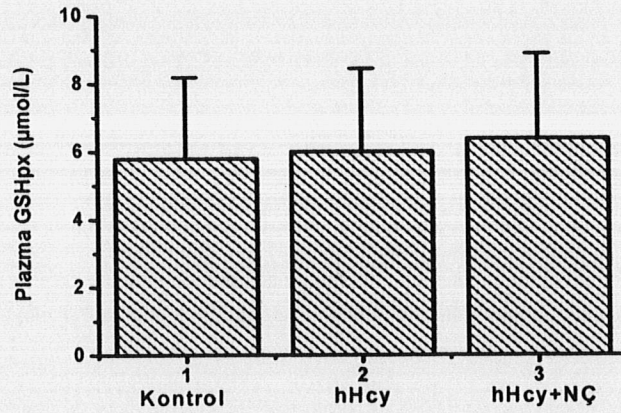
Şekil 3. Gruplara Ait Plazma GSH Düzeyleri.

*: $p < 0.01$ Kontrol ve NÇ grubu ile,

#: $p < 0.01$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

5.1.4. Plazma GSH-Px Düzeyleri

Plazma GSH-Px düzeyleri, Gruplar arasında hHcy grubu ($6.00 \pm 2.44 \mu\text{mol/L}$); Kontrol ($5.79 \pm 2.40 \mu\text{mol/L}$) ve hHcy+NÇ ($6.37 \pm 2.53 \mu\text{mol/L}$) anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$). hHcy+NÇ grubu, hHcy ve Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hHcy+NÇ, Kontrol ve hHcy grubuna göre yüksek olduğu tespit edilmiş olsa da bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Gruplara ait plazma GSH-Px düzeyleri Şekil 4'te verilmiştir.



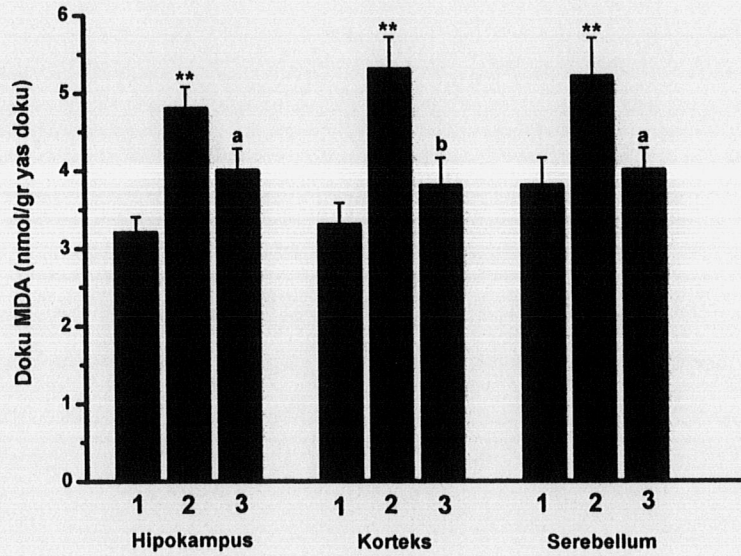
Şekil 4. Gruplara Ait Plazma GSH-Px Düzeyleri.

$p > 0.05$ hHcy grubu Kontrol ve NÇ grubu ile

$p > 0.05$ Kontrol grubu ile hHcy+NÇ grubu ile karşılaştırıldığında.

5.1.5. Beyin Doku MDA Düzeyleri

Tüm grupların hipokampus, korteks ve serebellumlarında bulunan MDA değerleri. (** $p<0.01$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli; ^a $p<0.05$ hHcy grubu ile karşılaştırıldığında önemli; ^b $p<0.01$ hHcy grubu ile karşılaştırıldığında önemli; 1: kontrol, 2: hHcy, 3: hHcy+NÇ). Gruplara ait Beyin Doku MDA düzeyleri Şekil 5'te verilmiştir



Şekil 5. Gruplara Ait Beyin Doku MDA Düzeyleri.

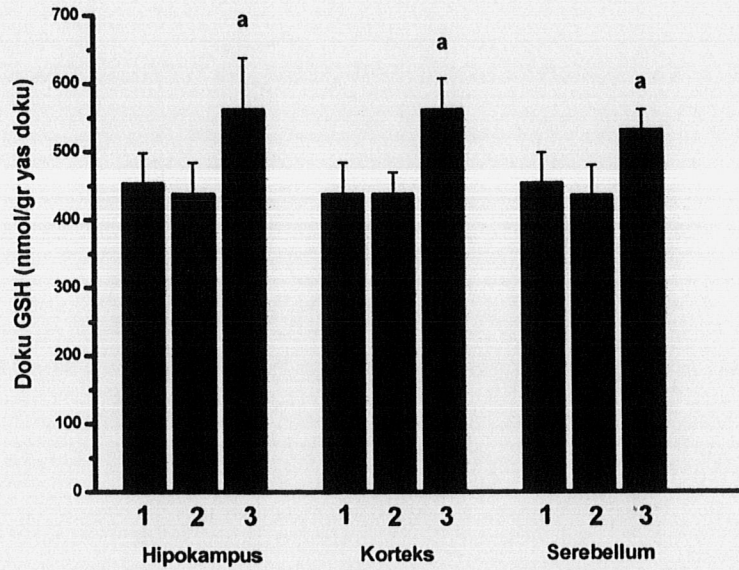
** : $p<0.01$, kontrol grubu ile

^a : $p<0.05$ hHcy grubu ile

^b : $p<0.01$ hHcy grubu ile karşılaştırıldığında

5.1.6. Beyin Doku GSH Düzeyleri

Beyin dokusu GSH düzeylerinin analizi. GSH'un hipokampus, korteks ve serebellum bölgelerinde hHcy+NÇ gruplarında yükseldiği gözlemlendi. Üç farklı bölgenin hHcy+NÇ grubu kontrol ve hHcy grubu ile karşılaştırıldığında önemli ($p<0.05$) 1:Kontrol, 2:hHcy, 3:hHcy+NÇ) Gruplara ait Beyin Doku GSH düzeyleri Şekil 6.'da verilmiştir.

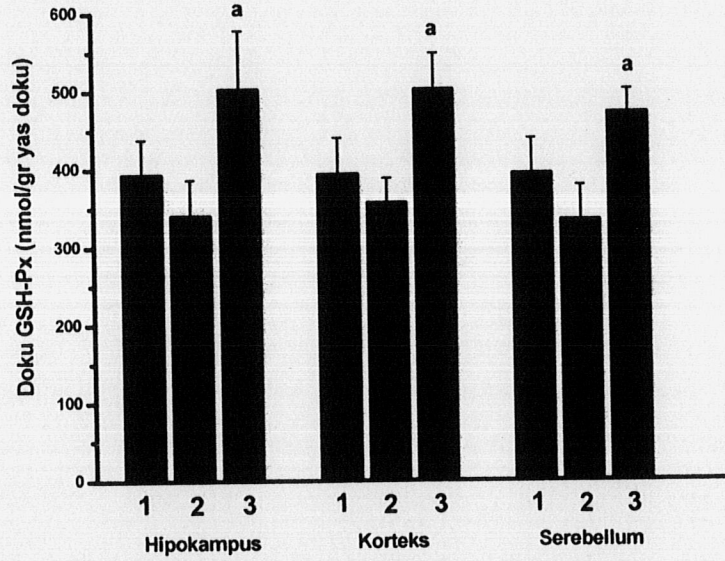


Şekil 6. Gruplara Ait Beyin Doku GSH Düzeyleri.

^a $p<0.05$ hHcy ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

5.1.7. Beyin Doku GSH-Px Düzeyleri

Beyin dokusu GSH-Px düzeylerinin analizi sonucu GSH-Px'ın hipokampus, korteks ve serebellum bölgelerinde hHcy+NÇ gruplarında yükseldiği gözlemlendi.^a $p<0.05$ hHcy+NÇ, Kontrol ve hHcy grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulundu 1:Kontrol, 2:hHcy, 3:hHcy+NÇ) Gruplara ait Beyin Doku GSH-Px düzeyleri Şekil 7'de verilmiştir.

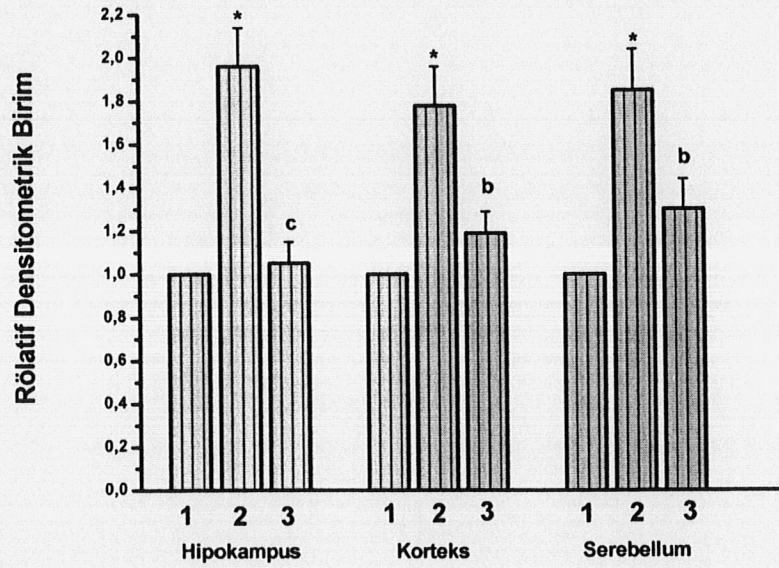


Şekil 7. Gruplara Ait Beyin Dokusu GSH-Px Düzeyleri.

^a $p<0.05$ hHcy ve Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

5.1.8. Beyin Dokusunda NSE Ekspresyonunun Densitometrik Analizi

Beyin dokularında NSE'in relative densitometrik analizi. (* $p<0.001$) Kontrol grubu ile, (^b $p<0.01$) hHcy grubu ile, (^c $p<0.001$) hHcy grubu ile karşılaştırıldığında önemli (1: kontrol, 2: hHcy, 3: hHcy+NÇ). Gruplara ait Beyin Doku NSE düzeyleri Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. Gruplara Ait Beyin Doku NSE Düzeyleri

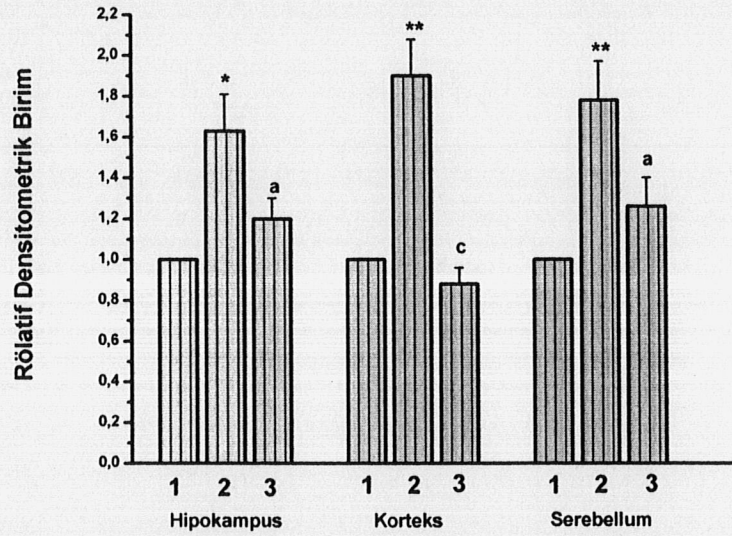
* : $p<0.001$ Kontrol grubu ile,

^b: $p<0.01$ hHcy grubu ile,

^c: $p<0.001$ hHcy grubu ile karşılaştırıldığında

5.1.9. Beyin Dokusunda S100 Ekspresyonunun Densitometrik Analizi

Beyin dokularında S100 proteininin relative densitometrik analizi. (* $p < 0.01$) Kontrol grubu ile, (** $p < 0.001$) Kontrol grubu ile, (^a $p < 0.05$) hHcy grubu ile, (^c $p < 0.001$) hHcy grubu ile karşılaştırıldığında önemli. (1: kontrol, 2: hHcy, 3: hHcy+NÇ). Gruplara ait Beyin Doku S100 proteini düzeyleri Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. Gruplara Ait Beyin Doku S100 Protein Düzeyleri

* : $p < 0.01$ Kontrol grubu ile,

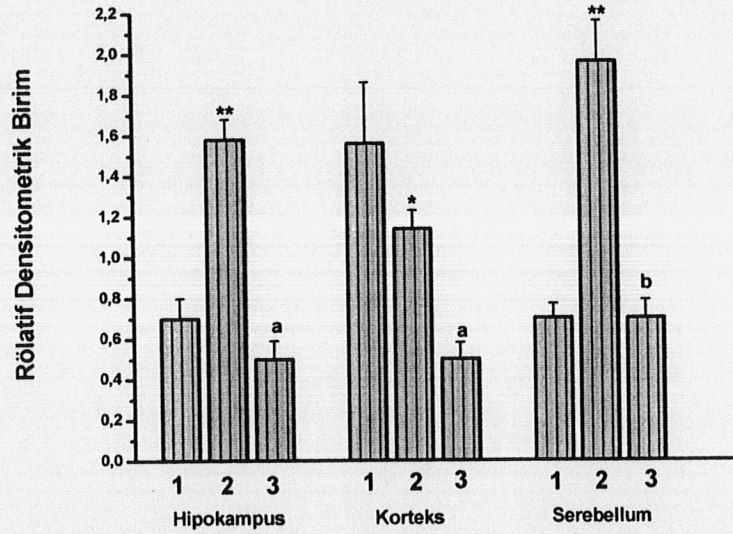
** : $p < 0.001$ Kontrol grubu ile,

^a : $p < 0.05$ hHcy grubu ile ,

^c : $p < 0.001$ hHcy grubu ile karşılaştırıldığında

5.1.10. Beyin Dokusunda GFAP Ekspresyonunun Densitometrik Analizi

Beyin dokularında GFAP proteininin relative densitometrik analizi. (* $p < 0.01$) hHcy+NÇ grubu ile, (** $p < 0.001$) Kontrol ve hHcy+NÇ grubu ile, (^a $p < 0.05$) hHcy grubu ile, (^b $p < 0.001$) hHcy grubu ile karşılaştırıldığında önemli. (1: kontrol, 2: hHcy, 3: hHcy+NÇ). Gruplara ait Beyin Doku GFAP proteini düzeyleri Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. Gruplara Ait Beyin Doku GFAP Düzeyleri

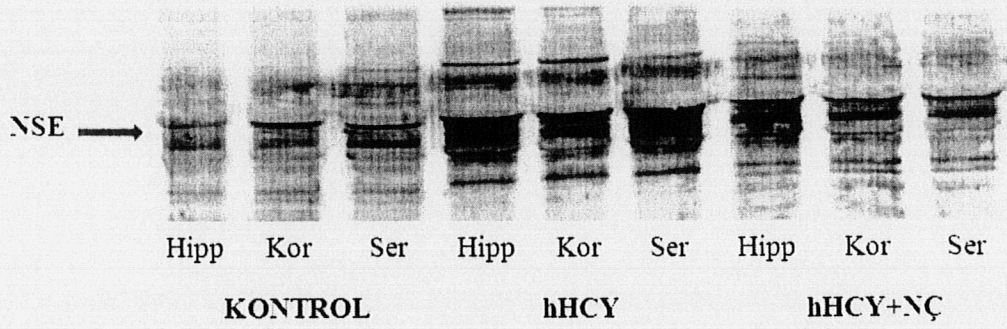
* $p < 0.01$ hHcy+NÇ grubu ile

** $p < 0.001$ Kontrol ve hHcy+NÇ grubu ile

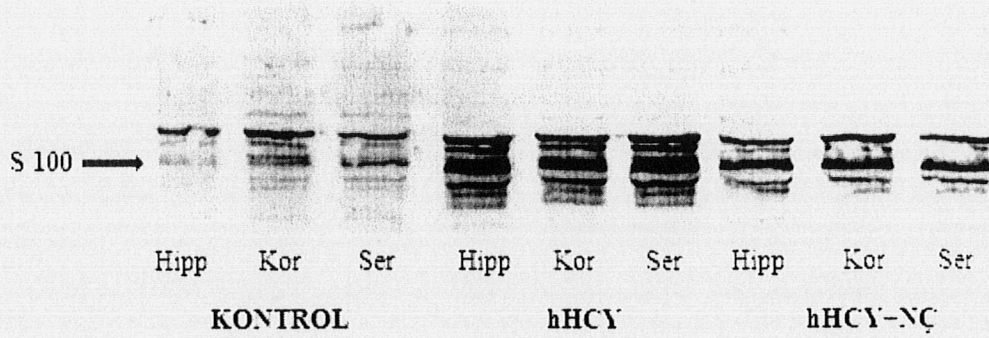
^a $p < 0.05$ hHcy grubu ile,

^b $p < 0.001$ hHcy grubu ile karşılaştırıldığında

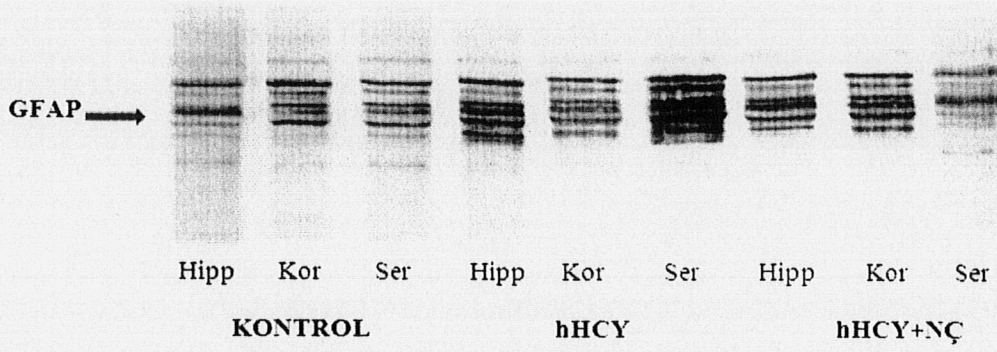
Şekil 11. Kontrol, hHcy ve hHcy+NÇ Gruplarının Hipokampus, Korteks ve Serebellum Homojenatlarından Elde Edilen NSE Proteinlerinin Western Blot Analizi.
(Hipp: Hipokampus Kor: Korteks Ser: Serebellum)



Şekil 12. Kontrol, hHcy ve hHcy+NÇ Gruplarının Hipokampus, Korteks ve Serebellum Homojenatlarından Elde Edilen S100B Proteinlerinin Western Blot Analizi. (Hipp: Hipokampus Kor: Korteks Ser: Serebellum)



Şekil 13. Kontrol, hHcy ve hHcy+NÇ Gruplarının Hipokampus, Korteks ve Serebellum Homojenatlarından Elde Edilen GFAP Proteinlerinin Western Blot Analizi. (Hipp: Hipokampus Kor: Korteks Ser: Serebellum



6. TARTIŞMA

Son 10 yılda Hcy'in, morbidite ve mortalite nedenleri arasında sayılan hastalıklar açısından önemli bir risk faktörü olduğu saptanmıştır. Bu hastalıkların başında koroner kalp hastalığı ve inme gelmektedir. Öyle ki bu hastalıklar için Hcy'in diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak tek başına bir markır olduğu kabul edilmektedir (10,14,177).

Nygard ve ark.'nın yaptıkları prospektif bir çalışmada koroner kalp hastalığı anjiyografik olarak gösterilmiş 587 hastada yüksek Hcy düzeyleri ile tüm nedenlere bağlı ölümler arasında ciddi bir ilişki ortaya konmuştur (178). Günümüzde Hcy artık reaktif gliosis için bağımsız ve üzerinde durulması gereken önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir.

Hcy'in trombomodülin aktivitesini azaltarak protein C aktivitesini azalttığı, protein C tarafından inaktive edilen temel koagülasyon faktörlerini harekete geçirdiği (179), antitrombin III'ü inhibe ettiği, endotel hücrelerindeki doku faktörünü aktive ettiği (180), serum fibrinojen düzeylerini artırdığı, fibrinolitik aktiviteyi bozduğu, bu etkileriyle prokoagülan aktivite ve protrombotik bir ortam oluşturduğu bilinmektedir. Hcy'in ayrıca özellikle LDL olmak üzere lipidlerin oksidasyonunu sağlayarak damar duvarında köpük hücre oluşumuna yol açtığı ve ateroskleroza zemin hazırladığı da gösterilmiştir (180,181). hHcy'nin ateroskleroz ve komplikasyonlarının gelişimine katkıda bulunduğu ileri sürülen mekanizmalardan en çok kabul görenlerinden biri de, oluşturduğu serbest radikallerin toksik etkisiyle endotelde meydana getirdiği hasar ve endotelial fonksiyonlardaki bozukluklardır (182,183).

Nar bitkisinin çeşitli ekstraktlarını antibakteriyel, antifungal, antiülser, antidiyabetik, antioksidan özellikte olduğu belirtilmektedir (164,184,185,186). Flavonoidler, en önemli ve en yaygın fenolik bileşiklerdendir (187,188). Bu bileşiklerin, fenolik yapılarından dolayı serbest radikal aracılı rahatsızlıklarda faydalı olduğu bildirilmektedir (189). Nardan elde edilen çeşitli alkalooidler, flavonoidler, polifenolik bileşikler, taninlerin (punikalin, pedunkulagin, punikalagin, gallik ve ellagik asit esterleri) kuvvetli antioksidan özellikte oldukları bildirilmiştir (186).

Mevcut bulgularımız, metiyonin ile birlikte uygulanan NÇ'nin hHcy oluşmasını önlediğini ve Hcy düzeylerinde oldukça önemli bir azalma oluşturduğunu ortaya koymuştur. NÇ'nin bu etkisinin muhtemelen Hcy metabolizmasındaki enzimler veya kofaktörler ile etkileşiminden kaynaklandığı düşünülebilir.

Hcy'in olumsuz ve reaktif gliozisi tetikleyen en önemli etkilerinden biri hiç şüphesiz oksidatif stres oluşturması ve lipid peroksidasyonuna yol açmasıdır. Pro-oksidan bir molekül olarak kabul edilen Hcy'in otooksidasyonu potansiyel sitotoksik pekçok ROS'in oluşumuna neden olmaktadır. Hcy'in yüksek düzeyde reaktif tiyol grubu hızlı bir şekilde okside olur ve bu oksidasyon esnasında süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal meydana gelir (190). Beyindeki oksidatif hasarın mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte, hHcy'nin Hcy otooksidasyonu ve tiolakton oluşumu yoluyla bilinen lipid peroksidasyon başlatıcılarının, hidroksil radikallerin üretimini teşvik ettiği ileri sürülmektedir (191).

Yapılan çeşitli çalışmalarda da Hcy'in lipid peroksidasyonunu artırdığı farklı şekillerde ortaya konulmuştur. Lipid peroksidasyonun değerli bir göstergesi olarak F2-izoprostan konsantrasyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada, yüksek plazma Hcy düzeyleri erkeklerde artan invivo lipid peroksidasyon ile ilişkilendirilmiştir (192).

Zhang ve ark. Metiyoninden zengin veya folattan fakir diyet uygulanarak orta düzeyde hHcy oluşturulan ratlarda oksidatif stres göstergesi olarak MDA düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir (193). Young ve ark. ise deneysel olarak hHcy oluşturulan domuzlarda kardiyak lipid peroksidasyon düzeylerinin yükseldiğini ortaya koymuşlardır (194). Ventura ve ark.'nın yaptığı diğer bir klinik çalışmada ise insanlarda oral metiyonin yüklemesi sonucu oluşan hHcy'nin invivo lipid ve protein oksidasyonunda artış ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada hHcy'de okside protein, ve MDA düzeylerinin de arttığı, ve Hcy ile MDA arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu ($r=0.47$, $p<0.05$) ortaya konulmuştur (195). Yapılan diğer bir çalışmada ise kardiyovasküler hastalığı olanlarda Hcy düzeylerinin ve buna paralel olarak MDA düzeylerinin yüksek bulunduğu ve Hcy ile MDA arasında güçlü bir pozitif ilişki ($r=0.59$, $p<0.05$) bulunduğu belirtilmiştir (196). Lipid peroksidasyon derecesini yansıtmak için tiyo barbitürat reaktif madde düzeylerinin ölçüldüğü diğer bir çalışmada da yine yüksek Hcy düzeylerinin artan lipid peroksidasyon ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (197). hHcy'nin lipid peroksidasyonunu artırdığı yönündeki çok sayıda çalışmaya rağmen, sınırlı sayıda birkaç çalışmada ise Hcy

düzeyleri ile oksidatif stres arasında önemli bir ilişki bulunmadığı yönünde veriler sunulmuştur (198).

Serbest radikaller yüksek reaktivitelerinden dolayı membran çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşerek peroksidasyonu başlatmaktadır. Bu şekilde oluşan lipid peroksitleri kolaylıkla yıkılarak başta MDA olmak üzere farklı sekonder ürünleri meydana getirmektedir. Bu ürünlerin çok çabuk bir şekilde ortamda farklı ürünlere dönüşmesi ve saptanmalarının zorluğu nedeniyle, lipid peroksidasyonunun indeksi olarak TBA reaksiyonu ile MDA düzeylerini ölçtük. Mevcut çalışma bulgularımız hHcy'nin beyin dokusunda lipid peroksidasyonunu artırdığını ortaya koymuştur. NÇ uygulanması ise MDA'yı azaltmıştır.

NÇ ekstraktlarının serbest radikalleri uzaklaştırdığı ve makrofaj oksidatif stresini ve hayvanlardaki lipid peroksidasyonunu azalttığı ve ayrıca yaşlı insanlarda plazma antioksidan kapasitesini artırdığı ifade edilmektedir. Ratlarla yapılan çalışmalarda NÇ'nden elde edilen ekstrakt peritoneal makrofajlardaki oksidatif stresi % 19, hücreli lipid peroksidasyonu % 42 azalttığı ve ayrıca GSH seviyesini de % 53 oranında artırdığı tespit edilmiştir (199). GSH'ın apoptozisin regülasyonunda önemli bir rol oynadığı, Hcy ve diğer prooksidan bileşiklerin oluşturduğu serbest oksijen radikallerinin lipoprotein ve proteinleri oksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (200).

Bizim çalışmamızda plazma GSH düzeyleri, hHcy oluşturulan grupta, istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu. Beyin

dokusunda ise NÇ uygulanan grupta GSH düzeyi daha da artarak homosistein grubuna göre anlamlı derecede yüksek tespit edildi. Plazma ve beyin dokusu GSH düzeyleri, NÇ uygulanan grupla methionin uygulanan grup kıyaslandığında NÇ'nin hücre içi antioksidan olan GSH'ı destekler nitelikte yükselterek anlamlı bir fark sergilediği görüldü. Bu sonuçlar NÇ'nin, hHcy'nin oluşturduğu lipid peroksidasyonu da aşarak GSH düzeylerinin oldukça çarpıcı bir şekilde artmasına neden olduğunu göstermektedir.

Kuvvetli bir antioksidan olduğu kabul edilen NÇ'nin antioksidan enzimler üzerine etkisini konu alan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak güçlü antioksidan olarak bilinen bazı maddelerin antioksidan olarak görev yapan enzimler üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Maritim ve ark. streptozotosin ile diyabet oluşturdukları ratlarda oksidatif stres biyomarkırlarını araştırdıkları bir çalışmada, lipoik asidin karaciğer, böbrek ve kalpte GSH-Px enzim aktivitelerini değiştirerek diyabet sonucu oluşan oksidatif stresi azalttığını belirtmişlerdir (201). Shila ve ark. ise arsenik intoksikasyonu oluşturulan ratlarda beyinde artan oksidan üretimi ve lipid peroksidasyon düzeylerinin lipoik asit uygulanmasından sonra azaldığını ortaya koymuşlardır. İntoksikasyon ile azalan enzim aktivitelerine rağmen, lipoik asidin bütün beyin bölgelerinde GSH-Px enzim aktivitelerini artırdığını belirtmişlerdir (202). Lipoik asidin antioksidan enzim aktivitelerini artırdığını belirten başka çalışmalar da yapılmıştır (203,204).

Çalışmamızda gruplara ait beyin dokusu GSH-Px aktivitelerini karşılaştırdığımız zaman, hHcy oluşturulan grupta GSH-Px aktivitelerinin, kontrol

grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü. NÇ uygulanmasının ise bu azalmanın önüne geçtiği ve GSH-Px aktivitesinin daha ılımlı bir seviyede tutulduğu belirlendi. Bunun yanı sıra Plazma GSH-Px düzeylerine bakıldığında ise NÇ uygulanan gruptaki GSH-Px düzeyi kontrol ve Hcy grubuna oranla artış göstermesine rağmen bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Astrositler, merkezi sinir sistemi dejenerasyonunda ilk hücrel cevabı oluştururlar. Bu cevap S100B'nin aşırı ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. İntrasellüler bir protein olan ve başlıca astrositlerde bulunan S-100B astrosit markırı olarak bilinmektedir. S-100B, nöronal stoplazmada serbest Ca^{++} düzeylerini artırır, nöron büyümesini uyarır ve nöronal yaşamı olumlu yönde etkiler (141). Bazı toksik maddelerin de glial markırları artırdığı yönünde çalışmalar yapılmıştır. S100B ekspresyonundaki artış toluen solutulan ratlarda gösterilmiştir (205). Yine yapılan başka bir çalışmada (142), toluene maruz kalmanın özellikle hipokampusta S100B içeriğini yükselttiği bulunmuştur. Reaktif gliozisi uyaran toluenin SOR üretimini arttırarak bunu sağladığı düşünülmektedir. SOR'nin reaktif gliozisi başlattığı tahmin edilmekte ve antioksidan uygulanmasıyla da LPO'yu engelleyerek ve serbest radikalleri nötralize ederek gliozisi azalttığı düşünülmektedir. Serbest radikal artışı reaktif glioziste rol oynadığı için E-vitamininin serbest radikal oluşumunu engelleyerek veya serbest radikalleri nötralize ederek gliozisi engelleyebilmesinin muhtemel olduğu savunulmuştur (206). Antioksidan olarak bilinen NÇ'nin etkilerine ait bulgularımız bu sonucu desteklemektedir.

NÇ'nin hHcy'de nöronal ve glial dejenerasyonun markırları olan NSE ve S100B proteinleri üzerindeki etkilerini konu alan bir çalışma bulgusu bulunmamaktadır. Bu çalışmamızda beynin birkaç bölgesinde, metiyonin ile hHcy oluşturulmasıyla S100B protein ekspresyonunun ve onun düşük molekül ağırlıklı proteinlerinin oluşumunun arttığı gözlemlendi. Elde edilen sonuçlarda beyin dokusunun farklı her üç bölgesinde S100B proteininin hHcy grubunda arttığı ve kontrol ile NÇ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği tespit edildi. Yine NÇ uygulanan grupta NÇ'nin S100B'yi azaltarak kontrol grubuna yakın düzeyde beyni koruduğu gözlemlendi. Bu bulgular hHcy'de glial hücrelerin hiperaktivasyonu, LPO miktarındaki artış ve S100B ile LPO değerlerinin pozitif yönde korelasyon göstermesi artan SOR'nin glial hücrelerde aktivasyona yol açtığı sonucunu işaret etmektedir. NÇ'nin hem glial hücreleri koruduğu hem de bu hücrelerin çevrelerine zarar verecek düzeyde hiperaktif kalmalarını önlediği ve hem nöronlar üzerinde direk koruyucu hem de metabolik ve kimyasal olaylarda glial hücre üzerinde koruyucu etki gösterdiği düşünülebilir.

Merkezi sinir sisteminde antioksidan GSH başlıca glial hücreler içerisinde yoğunudur. Glial hücrelerin, oksidasyona dayanan nörotoksiteden nöronların ve nöronal GSH'ın korunmasında anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (142). Bu yüzden astrositlerin nöronal oksidan ve antioksidan dengeyi koruduğuna inanılır. Glial hücrelerin nörotoksik tahriplere nöronlardan daha duyarlı olduğu ve ayrıca nöroprotektif tedaviye daha hassas olduğu açıktır. Bu hücreler nöronlar ve kapiller arasında bariyer oluştururlar ve ayrıca nöronların yaşam ortamının düzenlenmesinde

önemli rol oynarlar. Tüm bu bilgiler beyinde hasar oluşturan hastalıklar gibi önemli bir dejeneratif etkiye karşı glial hücrelerin yaşamlarını yükselterek nöronları koruyabileceğine işaret etmektedir (142,207).

Mevcut çalışmada hHcy'nin hem glial hem de nöronal markırların ekspresyonunu artırdığı ve NÇ'nin bu markırların artışını engellediğini gözlenmiştir. NÇ'nin hangi mekanizmayla LPO seviyelerini düşürdüğü ve nöronal ve glial markırların ekspresyonunu engellediği bilinmemektedir. Bu olay muhtemelen serbest radikal aracılı bir yol ile meydana gelmektedir. Doku hasarı, çok yüksek Hcy seviyeleri olan kronik hHcy' de gözlenmektedir. Bunun serbest radikal ürünlerinin oksidatif hasar oluşturmasıyla ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (208,209). Böyle bir hasarın sonuçlarından birisi hücrel antioksidan olan GSH'ın baskılanmasıdır (210). Bu bilgiler doğrultusunda astrositlerin oksidatif strese karşı olan duyarlılıklarıyla, nöronları hasara karşı daha da duyarlı hale getirebildikleri, nöronal ve glial hasarın NSE ve S100B'nin aşırı üretimine yol açtığı söylenebilir.

Mevcut bulgularımıza göre NÇ uygulanmasının, S100B proteininin aşırı üretimini azaltarak glial reaktiviteyi koruduğunu ortaya koymuş, diğer bir markır olan NSE'deki artışı engellemiştir. NÇ'nin reaktif gliozisi nasıl engellediği tam olarak bilinmemekle beraber oksidatif stresi engellediği tahmin edilmektedir. Oksidatif stresin glial reaktiviteyi etkilediği bilinmektedir (142,211).

Mevcut çalışmada rat beyninin hipokampus, korteks ve serebellum bölgelerinde Hcy uygulanmasıyla glial markırların arttığı tespit edilmiştir. GFAP'nin

49 kDa'lık esas bandı kontrole göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Antioksidan madde içeren ve bunu içerisindeki polifenolik bileşikler ve flavonoidler sayesinde sağlayan NÇ uyguladığımız hHcy gruplarında anlamlı olarak GFAP protein ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada Hcy uygulanan grupta GFAP içeriğinin özellikle serebellumda, arttığı belirlenmiştir. Yine hipokampus ve korteks kısmında serebelluma göre farklı bir artış gözlenmesi de bu bölgelerdeki hHcy grubu kontrol ve NÇ grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıydı. Daha önceki çalışmalarımızda melatonin gibi çeşitli antioksidan maddelerin değişik nörotoksik ajanları azaltarak iyileştirici yönde etki yaptığı tespit edilmişti. Bu çalışmamızda Hcy grubuna NÇ'nin uygulanmasıyla hHcy'de yükselen GFAP proteinlerinde kontrol grubundaki değerlere yakın bir azalış görüldüğü hatta GFAP proteini NÇ uygulanan grubun beyin kortekslerinde kontrol grubundan daha aza indiği gözlemlendi. Bu sonuç serbest radikal prosesi reaktif glioziste bir rol oynadığı için NÇ'nin serbest radikalleri inhibe ederek reaktif gliozisi engellediğini ve nöroenezisteki bozuklukların kısmen düzeldiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak;

Deneysel olarak kronik hHcy oluşturulan ratlarda NÇ uygulanması plazma Hcy düzeylerini önemli bir oranda azaltmış ve hHcy oluşumunu engellemiştir. Bu etkinin mekanizması bilinmemekle birlikte, NÇ'nin muhtemelen Hcy metabolizmasında görev yapan enzimlerin aktivitelerini veya bu enzim kofaktörlerinin düzeylerini artırarak etkili olduğu düşünülebilir.

hHcy'nin lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak plazma ve dokularda MDA düzeylerini artırdığı belirlenmiştir. NÇ'nin ise hHcy'den kaynaklanan oksidatif stres sonucu artan MDA düzeylerini azaltmıştır.

hHcy'nin plazma GSH-Px aktivitesini etkilememiş, fakat beyin dokusunda GSH-Px aktivitelerinde anlamlı şekilde azalmaya yol açmıştır. hHcy'de GSH-Px aktivitelerinin baskılanmasının muhtemel mekanizması olarak Hcy'nin H₂O₂ oluşumunu ve oksidatif stresi artırmasına karşılık antioksidan savunma amaçlı olarak bu enzimlerin tüketildiği sonucuna varılabilir.

hHcy'nin önemli bir endojen antioksidan olan beyin doku GSH düzeylerini azalttığı, NÇ'nin ise hem plazma hem de beyin GSH düzeylerini artırdığı gözlenmiştir.

hHcy'de beyinde glial ve nöronal markırların arttığını ve bu artışın NÇ tedavisi ile düzeldiği gözlemlendi. Ratlarda hHcy varlığında NÇ tedavisinin hipokampus, korteks ve serebellumda nörodejenerasyon üzerinde olumlu etkilere neden olabileceği söylenebilir. Bu sebeple hHcy'de oluşabilecek nöronal ve glial hasara karşı NÇ'nin koruyucu bir madde olabileceği değerlendirilmiştir.

7.KAYNAKLAR

1. Guilliams TG. Homocysteine - a risk factor for vascular diseases: Guidelines for the clinical practice. JANA. 2004; 7(1): 11-24.
2. Kalikiri PC. Hyperhomocysteinaemia a risk factor worth considering. JIACM. 2003; 4(2): 147-151.
3. Langman LJ, Cole DE. Homocysteine. Crit Rev Clin Lab Sci. 1999; 36(4): 365-406.
4. Selhub J. Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr. 1999; 19: 217-246.
5. Challem J, Dolby V. Homocysteine the Secret Killer. Keats Publishing, Inc New Canan, USA. 1997.
6. McCully KS. The biomedical significance of homocysteine. Journal of Scientific Exploration, 2001; 15(1): 5-20.
7. Miller AL, Kelly GS. Methionine and homocysteine metabolism and the nutritional prevention of certain birth defects and complications of pregnancy. Alt Med Rev, 1996; 1(4): 220-235.
8. Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2000; 32: 385-389.
9. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia. Am J Pathol. 1969; 56: 111-128.
10. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA, 1995; 274: 1049-1057.
11. den Heijer M, Keijzer MB. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thrombosis. Clin Chem Lab Med. 2001; 39: 710-713.
12. Eikelboom JW, Lonn E, Genest JJ, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. Ann Intern Med. 1999; 131: 363-375.
13. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol. 1996; 27: 517-527.
14. Fallest-Strobl PC, Koch DD, Stein JH, McBride PE. Homocysteine: a new risk factor for atherosclerosis. Am Fam Physician. 1997; 56: 1607-1610.
15. Mineer SE, Evrovski J, Cole D. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism. An Update. Clin Bioch. 1997; 30: 189-201.
16. Grieve A, Butcher SP, Griffiths R. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. J Neurosci Res; 1992; 32:60-68.
17. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. FEBS Lett. 2006; 580:2994-3005.Review.

18. Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Arning E, Winick NJ. Effects of intraventricular methotrexate on folate, adenosine, and homocysteine metabolism in cerebrospinal fluid. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26:386–388.
19. Surtees R, Bowron A, Leonard J. Cerebrospinal fluid and plasma total homocysteine and related metabolites in children with cystathionine beta-synthase deficiency: the effect of treatment. *Pediatr Res* 1997; 42:577–582.
20. Gharib A, Chabannes B, Sarda N, Pacheco H. In vivo elevation of mouse brain Sadenosyl- l-homocysteine after treatment with l-homocysteine. *J Neurochem* 1983; 40:1110–1112.99
21. Griffiths R, Grieve A, Allen S, Olverman HJ. Neuronal and glial plasma membrane carrier-mediated uptake of L-homocysteate is not selectively blocked by beta-pchlorophenylglutamate. *Neurosci Lett* 1992; 147:175–178.
22. Zeise ML, Knopfel T, Zieglansberger W. (+/-)-beta-Parachlorophenylglutamate selectively enhances the depolarizing response to l-homocysteic acid in neocortical neurons of the rat: evidence for a specific uptake system. *Brain Res* 1988; 443:373–376.
23. Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, et al. Elevated levels of homocysteine compromise blood–brain barrier integrity in mice. *Blood* 2006; 107:591–593.
24. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26: 219-225.
25. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem.* 1990; 1: 228-237.
26. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: Interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr.* 1992; 55: 131-138.
27. Fowler B. Disorders of homocysteine metabolism. *J Inherited Metab Dis.* 1997; 20:270-285.
28. Moat SJ, Lang D, McDowell IFW, et al. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2004; 15: 64-79.
29. 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.
30. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry.* 1998; 44: 1833-1843.
31. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B vitamins and coronary artery disease. *Med. Clin North Am.* 2000; 84(1): 215-237.
32. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *The Lancet.* 1999; 354: 407-412.
33. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985; 37: 1-31.
34. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003; 26:137-146. Review.

35. Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and antiapoptotic protein levels. *Neuroscience* 2005; 135:879-886.
36. Baydas G, Ozer M, Yasar A, Koz ST, Tuzcu M. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Biochem Moscow* 2006; 71:91-95.
37. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-daspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:5923-5928.
38. Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. *Neurotoxicology* 1998; 19:599-603.
39. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000; 20:6920-6926.
40. Herrmann W, Quast S, Ullrich M, et al. Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Atherosclerosis* 1999; 144:91-101.
41. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346:476-483.
42. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:636-643.
43. Karaman Y. Alzheimer hastalığı, vasküler demans ve hafif kognitif etkilenmede plazma homosistein, vitamin B₁₂ ve folat seviyeleri. *J Neurol Sci (Türk).* 2006; 23:175-184.
44. Yang Q, Botto LD, Erickson JD, et al. Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation* 2006; 113:1335-1343.
45. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:495-501.104
46. Walter JH, Wraith JE, White FJ, Bridge C, Till J. Strategies for the treatment of cystathionine beta-synthase deficiency, The experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30 years. *Eur J Pediatr* 1998; 157 (Suppl. 2.):71-76.
47. Baydas G, Ozer M, Yasar A, Tuzcu M, Koz ST. Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. *Brain Res* 2005; 1046:187-194.
48. Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav Brain Res* 2004; 153:377-381.
49. Streck EL, Delwing D, Tagliari B, et al. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Neurochem Int* 2003; 43:597-602.

50. Streck EL, Zugno AI, Tagliari B, et al. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Metab. Brain Dis.* 2002; 17:83–91.
51. Algaidi SA, Christie LA, Jenkinson AM, et al. Long-term homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signalling and synaptic plasticity. *Exp Neurol* 2006; 197:8-21.
52. Kim JM, Lee H, Chang N. Hyperhomocysteinemia due to short-term folate deprivation is related to electron microscopic changes in the rat brain. *J Nutr* 2002; 132:3418-3421.
53. Shea TB, Rogers E, Ashline D, Ortiz D, Sheu MS. Apolipoprotein E deficiency promotes increased oxidative stress and compensatory increases in antioxidants in brain tissue. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1115–1120.
54. Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2005; 29:1140–1151.
55. Vitvitsky V, Dayal S, Stabler S, et al. Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287:39–46.
56. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, et al. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:1585–1589.
57. Troen AM, Shukitt-Hale B, Chao WH, et al. The cognitive impact of nutritional homocysteinemia in apolipoprotein- E deficient mice. *J Alzheimers Dis* 2006; 9:381-92.105
58. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47–95. Review.
59. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect* 1998; 106 (Suppl 5):1229-1234. Review.
60. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160:1–40.
61. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin.* 1993; 49: 481-493.
62. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84. Review.
63. Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayıroğlu F. Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücrel Antioksidan Savunma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 1995; 2: 137-142.
64. Busciglio J and Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 1995; 378:776-779.
65. Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, and Markesbery WR. Elevated 4- hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18:457-461.108
66. Praticò D, Lee VMY, Trojanowski JQ, Rokach J, and Fitzgerald GA. Increased F2- isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J* 1998; 12:1777-1783.

67. Sayre LM, Zelasko DA, Harris PLR, et al. 4- Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1997; 68:2092-2097.
68. Behl C, Davis JB, Lesley R, and Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid protein toxicity. *Cell* 1994; 77:817-827.
69. Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, and et al. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 1997; 54:533-539.
70. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn SOD gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362:59-62.
71. Tu P, Gurney ME, Julien JP, Lee VMY, Trojanowski JQ. Oxidative stress, mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease. *Lab Invest* 1997; 76:441-456.
72. Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH Jr, and Cleveland DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu, Zn superoxide dismutase mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:13901-13906.
73. Mattson MP. Apoptotic and anti-apoptotic synaptic signaling mechanisms. *Brain Pathol* 2000; 10:300-312.
74. Huang RF, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 2001; 131:33-88.
75. Henning SM, Swendseid ME, Ivandic BT, Liao F. Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free Radic Biol Med* 1997; 23:936-942.
76. Upchurch GR, Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1997; 272(27): 17012-17017.
77. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, et al. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem* 2001; 78:249-253.
78. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, et al. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 2003; 14:32-42.
79. Reis EA, Zugno AI, Franzon R, et al. Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. *Metab Brain Dis* 2002; 17:211-217.
80. Wyse AT, Zugno AI, Streck EL, et al. Inhibition of Na(+), K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 2002; 27:1685-1689.
81. Banerjee R, Zou CG. Redox regulation and reaction mechanisms of human cystathionine beta-synthase: a PLP-dependent hemoreceptor protein. *Arch Biochem Biophys* 2005; 433:144-156.
82. Zou CG and Banerjee R. Homocysteine and redox signaling, *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:547-559.

83. Mosharov E, Crawford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000; 39:13005–13011.
84. Maclean KN, Janosik M, Kraus E, et al. Cystathionine beta-synthase is coordinately regulated with proliferation through a redox-sensitive mechanism in cultured human cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Physiol* 2002; 192:81–92.
85. Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG. Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids* 2003; 25:409–417.
86. Weiss N, Heydrick SJ, Postea O, et al. Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state—impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1455–1461.
87. Villalobos MA, De La Cruz JP, Cuerda MA, et al. Effect of S-adenosyl-L-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia–reperfusion. *Brain Res* 2000; 883:31–40.
88. Matsui Y, Kubo Y, Iwata N. S-adenosyl-L-methionine prevents ischemic neuronal death. *Eur J Pharmacol* 1987; 144:211–216.
89. De La Cruz JP, Pavia J, Gonzalez-Correa JA, Ortiz P, Sanchez De La CF. Effects of chronic administration of S-adenosyl-L-methionine on brain oxidative stress in rats. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2000; 361:47–52.
90. Schuman EM, Murase S. Cadherins and synaptic plasticity: activity dependent cyclindependent kinase 5 regulation of synaptic beta-catenin-cadherin interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358:749-756.
91. Nudo RJ. Plasticity. *NeuroRx* 2006; 3:420-427. Review.
92. Christie LA, Riedel G, Algaidi SA, Whalley LJ, Platt B. Enhanced hippocampal long-term potentiation in rats after chronic exposure to homocysteine. *Neurosci Lett* 2005; 373:119-24.
93. Eto K, Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *J Neurosci* 2002; 22:3386-3391.
94. Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor functions in learning and memory. *Behav Brain Res* 2003; 140:1-47. Review.
95. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza yayınları 1995: 3-95.
96. Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest radikaller. *Türkderm*. 1996; 30:116-122.
97. Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals. *Biochemical and Molecular Medicine*. 1996; 59: 93-97.
98. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: Clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery* 1993; 113: 479-483.
99. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994; 74: 139-162.

100. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *The Lancet* 1994; 344: 721-724.
101. Lledias F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* 1998; 273: 10630-10637.
102. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biologies.* 2004; 327: 649-662.
103. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2004; 44: 275-295.
104. Young MJ, Boulton AJ, Macleod AF, Williams DR, Sonksen PH. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia* 1993; 36: 150-154.
105. Clark IA. Tissue damage caused by free oxygen radicals. *Pathology* 1986; 18: 181-186.
106. Günel S, Cihan T, Ünal N, Ceyhan A. Serbest radikaller ve anestezi. *Sendrom* 1996; 12 (8): 65-69.
107. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidler ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 336-341.
108. Erden M. Serbest radikaller. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.* 1992; 12: 201-207.
109. Köse K, Doğan P. Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi Ek-1:* 1992; 340-350.
110. Balz F. Ischemia reperfusion injury. *British Journal of Surgery.* 1994; 81: 637-647.
111. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid Research* 1998; 39:1529-1542.
112. Sainz RM, Reiter RJ, Mayo JC, et al. Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: effect of pinealectomy. *Journal of Reproduction and Fertility.* 2000; 119: 143-149.
113. Martínez-Blasco A, Bosch-Morell F, Trenor C, Romero FJ. Experimental diabetic neuropathy: role of oxidative stress and mechanisms involved. *Biofactors* 1998; 41-43.
114. Low P.A. , Nickander KK. Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 873-877.
115. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, et al. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995; 18:1160-1167.
116. Jensson H, Guthenberg C, Alin P, Mannervik B. Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals. *FEBS Lett* 1986; 203:207-209
117. Danielson UH, Esterbauer H, Mannervik B. Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. *Biochem J* 1998; 247:707-713.
118. Dickinson DA, Iles KE, Watanabe N, et al. 4-hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 974.

119. Liu RM, Gao L, Choi J, Forman HJ. gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 1):861-869.
120. Iles KE, Liu RM. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 547-556. Review.
121. Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Tissue perfusion in critical illnesses. 1993; 344: 721-724.
122. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: 339-345.
123. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology Medicine*. 2001; 31: 1287-1312.
124. Seven A, Candan G. Antioksidant defense systems. *Cerrahpaşa J Med*. 1996; 27:41-50.
125. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2003; 2: 278-291.
126. Meister A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem. Pharmacol*. 1992; 44(10): 1905-1915.
127. Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson MJ. Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. *Biochem J* 1993; 291(2): 529-535.
128. Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D. New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabetes Med*. 1992; 9(3) : 297-299.
129. Moore BW, McGregor D. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J. Biol. Chem*. 1965; 240: 1647-1653.
130. Marangos PJ, Schmechel DE. Neuron specific enolase, a clinically useful for neurons and neuroendocrine cells. *Annu. Rev. Neurosci*. 1987; 10: 269-295.
131. Schmechel DE, Brightman MW, Marangos PJ. Neurons switch from non-neuronal enolase (NNE) to neuronal enolase (NSE) during development. *Brain. Res*. 1980; 190: 195-214.
132. Marangos PJ, Zis AP, Clark R, Goodwin FK. Neuronal non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain. Res*. 1978; 150: 117-133.
133. Vinore SA, Herman MM, Rubinstein LJ, Marangos PJ. Electron microscopic localization of neuron specific enolase in rat and mouse brain. *J. Histochem. Cytochem*. 1984; 32: 1295-1302.
134. Büyükpamukçu M, Akyüz C, Sevinir B, Hazar V. Çocukluk çağı kanserlerinde biyolojik belirleyiciler. *Pediatrici: Yeni bilgiler, yeni görüşler*. Ankara 1995; 749-763.
135. Garcia-Alix A, Cabanas F, Pellicer A, et al. Neuron specific enolase and myelin basic protein: relationship of cerebrospinal fluid to the neurologic condition of asphyxiated full-term infants. *Pediatrics* 1994; 93(2): 234-240.
136. De Giorgio CM, Correale JD , Gott PS, et al. Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology* 1995; 45: 1134-1137.

137. Rabinowicz AL, Correale JD, Couldwell WT, DeGiorgio CM. CSF neuron specific enolase after methohexital activation during electrocorticography. *Neurology* 1994; 44: 1167-1169.
138. Kato K, Suzuki F, Semba R. Determination of brain enolase isoenzymes with an enzyme immunoassay at the level of single neurons. *J. Neurochem.* 1981; 37: 998-1002.
139. Zeltzer PM, Marangos PJ, Sather H, et al. Prognostic importance of serum neuron specific enolase in local and widespread neuroblastoma. *Adv. Neuroblast Res.* 1985; 175: 319-329.
140. Heinzmann WC, Fritz G, Schafer WB. S100 proteins: Structure, Functions and Pathology. *Frontiers in Bioscience Zürich* 2002; 7: 1356-1368.
141. Baydas G, Nedzvetsky VS, Tuzcu M, Yasar A, Kirichenko SV. Increase of glial fibrillary acidic protein and S100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 462 (1-3): 67-71.
142. Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, et al. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol. Lett.* 2003; 137: 169-174.
143. Hutchins J Band Casagrande V.A. Vimentin: changes in distribution during brain development. *Glia* 1989; 2: 55-56.
144. McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, et al. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 6361-6366.
145. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 2000; 25: 1439-1451. Review.
146. Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J. Med. Biol. Res.* 1999; 32: 619-631
147. Yang Q, Hamberger A, Wang S, Haglid KG. Appearance of neuronal S-100 beta during development of the rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1996; 91: 181-189.
148. Quinlan RA, Brenner M, Goldman JE, Messing A. GFAP and its role in Alexander disease. *Exp. Cell Res.* 2007; 313:2077-2087. Review.
149. Bloomfield SM, McKinney J, Smith L, Brisman J. Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury. *Neurocrit. Care* 2007; 6: 121-138. Review.
150. Manav, S. Nar (*Punica granatum L.*) meyva kabuklarını eczacılıkta değerlendirme açısından Türkiye’de yetişen doğal ve kültür nar çeşitlerinin karşılaştırılması. Yüksek lisans tezi Ankara Üniversitesi, Ankara 1988.
151. Şule AKSU, *Punica granatum L.* üzerinde farmakognozik araştırmalar yüksek lisans tezi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2007.
152. Huang, T.H.W. Peng, G. Kota, et al. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR- α and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005; 207(2), 160-169.

153. Vaughan. Antioxidant properties of muscadine grape products trivette I. 2003.
154. Rout, S, ve Banerjee, R, Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *Punica granatum*. *Bioresource Technology*, 2007; 98, 3159–3163.
155. Ricci, D, Giamperi, L, Bucchini, A. ve Fraternale, D. Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia*, 2006; 77, 310–312.
156. Kaur, C, and Kapoor, H, C, Antioxidant activity of some fruits in Indian diet. *Acta Horticulturae*, 2005; 696, 563-565.
157. Aviram, M, Dornfeld, L, Kaplan, M, et al. Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 2002; 28(2/3), 49-62.
158. Negi, P.S, Jayaprakasha, G.K. and Jena, B.S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 2003; 80(3), 393-397
159. Murthy, K.N, Chidambara-Jayaprakasha, G.K. ve Singh, R.P. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50(17), 4791-4795.
160. Plumb, G. W, De Pascual-Teresa, S, Santos-Buelga, C, Rivas-Gonzalo, J.C, Williamson, G. Antioxidant properties of galocatechin and prodelphinidins from pomegranate peel. *Redox Report*, 2002; 7(1), 41-46
161. Noda, Y, Kaneyuka, T, Mori, A, Packer, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50, 166–171.
162. Huang, T.H.W. Peng, G. Kota, B.P. Li, Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: role of lowering circulating lipids. *British Journal of Pharmacology*, 2005; 145(6), 767-774.
163. Huang, T.H.W. Peng, G, Kota, B.P. et al. Pomegranate Flower Extract Diminishes Cardiac Fibrosis in Zucker Diabetic Fatty Rats: Modulation of Cardiac Endothelin-1 and Nuclear Factor-kappaB Pathways. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2005; 46(6), 856-862.
164. Jafri, M.A, Aslam, M, Javed, K, Singh, S, Effects of *Punica granatum* Linn Flowers on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 70, 309–314.
165. Ungvari Z, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1899-1904.
166. Bagi Z, Cseko C, Toth E, Koller A. Oxidative stress-induced dysregulation of arteriolar wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 285:2277–2283.

167. Baydas G, Nedzvetsky VS, Nerush PA, et al. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex. *Neurosci. Lett.* 2002; 326:109-112.
168. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta.* 1978; 90: 37-43.
169. Yagi K. Assay of lipid peroxidation in blood plasma or serum. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 328-331.
170. Paglia De Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70: 158-159.
171. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95: 351-358.
172. Nedzvetsky VS, Berezhich VA, Ouberniak TI and Zhmareva EN. Characteristics of specific intermediate filament proteins in human brain tumours. *Biokhimiia.* 1986; 51, 1843-1850.
173. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
174. Harlow E, Lane D. *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988: 471-504.
175. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 1981; 112: 195-203.
176. Fowler, SJ. Use of monoclonal antibodies for western blotting with enhanced chemiluminescent detection, In: Davis, WC. (ed). *Monoclonal Antibody Protocols*, Humana Press, New Jersey, 1995, 115-127.
177. Robinson K, Mayer E, Jacobsen DW. Homocysteine and coronary artery disease. *Cleve Clin J Med.* 1994; 61(6): 438-50.
178. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337(4): 230-236.
179. Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood.* 1990; 75(4): 895-901.
180. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13(9): 1327-1333.
181. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N. Eng. J. Med.* 1998; 338: 1042-1050.
182. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *Clin. Invest.* 1986; 77(4): 1370-1376.
183. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 72(2): 324-332.

184. Charya, M.A. S, Reddy, S.M, Kumar, B.P, Reddy, S.R, Laboratory evaluation of some medicinal plant extracts against two pathogenic fungi. *New Botany* 1979; 6,171.
185. Ajaikumar, K.B. Asheef, M. Babu, B.H, Padikkala, J, The inhibition of gastric mucosal injury by PGL (pomegranate) methanolic extract. *J. Ethnopharmacol.* 2005. 96, 171–176.
186. Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. 2009 Jan;47(1):50-4.
187. Schinella, G.R. Tournier, H.A. Prieto, J.M, Mordujovich de Buschiazso, P, Rios, J.L. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci.* 2002; 70, 1023–1033.
188. Tepe, B. Sökmén, M. Akpulat, A.H, Sökmén, A, In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chem.* 2005; 90, 685–689.
189. Czinner E, Hagymási K, Blázovics A, et al. In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. 2000; Dec;73(3):437-43.
190. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Invest.* 1996; 98 (1): 5-7.
191. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium- derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest.* 1993; 91(1): 308-318.
192. Voutilainen S, Morrow JD, Roberts LJ, et al. Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1263-1266.
193. Zhang R, Ma J, Xia M, Zhu H, WengHua Ling WH. Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes. *J. Nutr.* 2004; 134(4): 825-830.
194. Young PB, Kennedy S, Molloy AM, et al. Lipid peroxidation induced in vivo by hyperhomocysteinaemia in pigs. *Atherosclerosis.* 1997; 129(1): 67-71.
195. Ventura P, Panini R, Verlato C, Scarpetta G, Salvoli G. Peroxidation indices and total antioxidant capacity in plasma during hyperhomocysteinemia induced by methionine oral loading. *Metabolism.* 2000; 49: 225-228.
196. Moselhy SS, Demerdash SH. Plasma homocysteine and oxidative stress in cardiovascular disease. *Dis Markers.* 2004; 19: 27-31.
197. El-Saleh SC, Al-Sagair OA, Al-Khalaf MI. Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *Int. J. Cardiol.* 2004; 93(1): 19-23.
198. Huerta JM, Gonzalez S, Fernandez S, Patterson AM, Lasheras C. No evidence for oxidative stress as a mechanism of action of hyperhomocysteinemia in humans. *Free Radic Res.* 2004; 38(11): 1215-1221.
199. Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: Effect of DL- α -lipoic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 398:139–146.

200. Hernanz A, Fernandez-Vivancos E, Montiel C, Vazquez JJ, Arnalich F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci.* 2000; 67(11): 1317-1324.
201. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* 2003; 14(5): 288-294.
202. Shila S, Kokilavani V, Subathra M, Panneerselyam C. Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology.* 2005; 210(1): 25-36.
203. Arivazhagan P, Juliet P, Panneerselyam C. Effect of dl-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aged rats. *Pharmacol Res.* 2000; 41: 299-303.
204. Balachandar AV, Malarkodi KP, Varlakshmi P. Protective role of DL alpha- lipoic acid against adriamycin-induced cardiac lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol.* 2003; 22(5): 249-254.
205. Gotohda T, Tokunaga I, Kubo S, et al. Effect of toluene inhalation on astrocytes and neurotrophic factor in rat brain. *Forensic. Sci. Int.* 2000; 113(1-3): 233-238.
206. Halks-Miller M, Henderson M, Eng LF. Alpha tocopherol decreases lipid peroxidation, neuronal necrosis, and reactive gliosis in reaggregate cultures of fetal rat brain, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1986; 45 (4): 471-84.
207. Kesavulu MM, Giri R, Rao BK, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab.* 2000; 26 (5): 387-392.
208. Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J. Pineal Res.* 2002; 32 (4): 225-230.
209. Ercel E, Baydas G, Akyol A, Eksioglu E, Canpolat L. The effect of vitamin E on the sciatic nerve lipid peroxidation in streptozotocin induced diabetes mellitus. *Biomed Res.* 1999; 10: 95-101.
210. Guyot LL, Diaz FG, O'Regan MH, Song D, Phillis JW. The effect of topical insulin on the release of excitotoxic and other amino acids from the rat cerebral cortex during streptozotocin-induced hyperglycemic ischemia. *Brain Res.* 2000; 872 (1-2): 29-36.
211. Baydas G, Reiter RJ, Yaşar A, et al. Melatonin Reduces Glial Reactivity in the Hippocampus, Cortex, and Cerebellum of Streptozotocin-induced Diabetic rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2003; 35: 797-804.

8. ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Elazığ ili Palu ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi sırasıyla Palu Atatürk İlkokulu ve Palu Lisesinde tamamladım. 1993 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım, 1997 yılında iyi dereceyle mezun oldum. 1998-2000 yılları arasında Elazığ ili Karakoçan ilçesinde öğretmenlik göreviyle beraber Fırat üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında başladığım yüksek lisansımı tamamladım. 2000-2008 yılları arasında Fırat Üniversitesi Hastanesinde Biyolog olarak çalıştım. Doktora eğitimime 2003 yılında başladım. 2008 yılında kurulan Bingöl Üniversitesi'ne Sağlık Kültür ve Spor Daire Başkanı olarak atandım. Hâlâ aynı görevi sürdürmekteyim. Evli ve iki çocuk babasıyım.