

T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

NORMAL VE SÜLFİT OKSİDAZ YETERSİZLİKLİ SIÇANLARDA

HOMOSİSTEİN VE SÜLFİT MOLEKÜLÜNÜN NÖROTOKSİK

ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR.TONGUÇ OLGUN ÖZCAN

DANIŞMAN

PROF.DR.VURAL KÜÇÜKATAY

DENİZLİ - 2014

T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

NORMAL VE SÜLFİT OKSİDAZ YETERSİZLİKLİ SIÇANLARDA

HOMOSİSTEİN VE SÜLFİT MOLEKÜLÜNÜN NÖROTOKSİK

ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR.TONGUÇ OLGUN ÖZCAN

DANIŞMAN

PROF.DR.VURAL KÜÇÜKATAY

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 03.06. 2011 tarih ve 2011TPF023 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2014

Prof.Dr.Vural KÜÇÜKATAY danışmanlığında Dr.TONGUÇ OLGUN ÖZCAN tarafından yapılan "Normal ve Sülfite Oksidaz Yetersizlikli Sığırlarda Homosistein ve Sülfite Molekülünün Nörotoksik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması gün 05/05/2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim/Bilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof.Dr. Günfer TURGUT

ÜYE : Prof.Dr.Saadettin ÇALIŞKAN

ÜYE: Prof.Dr. Vural KÜÇÜKATAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım 09/05/2014

Prof. Dr. Hasan Herken

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Başta uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bana her türlü destek ve yardımını esirgemeyen, tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY' a şükranlarımı sunarım. Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr.Günfer TURGUT'a ve Fizyoloji Anabilim dalı öğretim üyelerimiz Sayın Prof.Dr. Saadettin Çalışkan'a, Sayın Prof.Dr. Sebahat TURGUT'a, Sayın Prof.Dr. Melek Bor KÜÇÜKATAY'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmalarım da yardımlarını gördüğüm Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Esat ADIGÜZEL'e, Yrd.Doç.Dr.Gökşin Nilüfer Yonguç'a, Fizyoloji Anabilim Dalındaki bütün çalışma arkadaşlarıma, Deneysel Araştırma Biriminde görevli veteriner hekim Barbaros Şahin'e ve bana mutluluk veren biricik kızım İrem'e de teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLolar DİZİNİ	XIII
ÖZET	XIV
SUMMARY	XV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
HOMOSİSTEİN	3
Homosistein Metabolizması	3
Transmetilasyon	3
Remetilasyon	3
Transsülfürasyon	4
Hcy Metabolizmasının Regülasyonu	4
Hcy'nin Plazmada Yeralan Formları	6
Beyinde Hcy Metabolizması	6
Hcy' nin Kan Seviyeleri	6
Met yükleme Testi	7

HHcy Oluşturan Faktörler	7
Hcy'nin Nörotoksik Etkileri	8
Hcy ve Oksidatif Stres.....	9
Hcy ve Apoptozis	9
SÜLFİT (SO=3).....	10
SO=3 Kaynakları	10
Eksojen SO=3 kaynakları.....	10
Endojen SO=3 kaynakları	10
Met Katabolizması Sırasında SO=3 Oluşumu.....	11
Cys Katabolizması Sırasında SO=3 Oluşumu.....	11
Hipotaurin Metabolizması Sırasında SO=3 Oluşumu	11
Hidrojen Sülfidin (H ₂ S) Oksidasyonu Sırasında SO=3 Oluşumu	11
SO=3 'in Hücrel Sıvılardaki Temel Kimyasal Reaksiyonu.....	11
SO=3 METABOLİZMASI	12
Oksidatif Olmayan SO=3 Metabolizması.....	12
Oksidatif SO=3 Metabolizması.....	12
SO=3' in Nörotoksik Etkileri	13
ÖĞRENME ve BELLEK.....	14
Uzun Süreli Bellek	14
Eksplisit Bellek.....	14
Eksplisit Belleğin Oluşumu ve Uzun Süreli Potansiyalizasyon (LTP)	15
LTP ' nin Oluşum Fazları	16

İmplicit Bellek.....	18
Non-asosiyatif İmplicit Bellekte Hücresel Mekanizmalar.....	19
İmplicit Belleğin Asosiyatif Formları	20
İmplicit Belleğin Uzun Süreli Depolanması.....	20
Kısa Süreli İşleyen Bellek	21
Öğrenme ve Belleğin Test Edilmesi	22
GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
Deney Hayvanlarının Bakım Şartları ve Gruplara Ayrılması.....	23
Deneysel Hayvan Modellerinin Oluşturulması.....	24
Deneysel Uygulamadaki Çalışma Parametreleri	25
Morris Su Tankında Öğrenme ve Bellek Testleri.....	25
Deney Hayvanlarından Doku örneklerinin Alınması	27
Doku Homojenizasyonu	27
Karaciğer SOX Aktivitesinin Ölçümü	28
Protein Miktarının Ölçümü	29
Serum homosistein ve sülfid ölçümü.....	30
Total Antioksidan Düzey (TAD) ve Total Oksidan Düzey (TOD) Ölçümü	31
Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	32
BULGULAR	33
TARTIŞMA	39
SONUÇ	49
KAYNAKLAR.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	:2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AHS	:Adenozil HomoSisteinaz
AMP	:Adenozin Mono Fosfat
AMPA	: α -amino-3-hidroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
AS	:Adenil Siklaz
ATP	:Adenozil Trifosfat
BHMT	:Betain Homosistein Metil Transferaz
BOS	:Beyin omurilik Sıvısı
Ca⁺²	:Kalsiyum
cAMP	:Siklik AMP
CBS	:Sistasyonin Beta Sentez
CA	:Cornu Ammonis
CREB	:Siklik AMP yanıt elementi bağlayan protein
Cys	:Sistein
DNA	:Deoksiribo nükleik asit
DNA-MT	:DNA-Metil Transferaz
EDTA	:Etilendiamin tetraasetikasit
GPx	:Glutasyon Peroksidaz
Hcy	:Homosistein

HHcy	:Hiper homosisteinemi
HSO₃⁻	:Bisüfit
H₂SO₃	:Sülfüröz asit
K	:SOX enzimi normal grup
KM	:SOX enzimi normal ancak homosisteini yüksek olan grup
kDa	:kilo Dalton
LPO	:Lipit peroksidasyon
LTP	:Uzun süreli sinaptik etkinlikte artma
MAT	:Metyonin Adenozil Transferaz
Met	:Metyonin
Mg⁺²	:Mağnezyum
Mo	:Molibden
MOCO	:Molibdenyum kofaktör
MTHFR	:Metilen Tetra Hidro Folat Redüktaz
MS	:Metyonin Sentaz
MWM	:Morris Su Tankı
NADPH	:Nikotin amid adenin dinukleotid (Redükte form)
NMDA	:N-Metil- D-Aspartat
N-5-MTHF	:N-5-metiltetrahidrofolat
N-5-MTHF-HMT	:N-5-metiltetrahidrofolat-homosistein metil transferaz
NO	:Nitrik Oksit
RM	:Remetilasyon

ROS	:Radikal Oksijen Türevleri
SAM	:S-Adenozil Metiyonin
SAH	:S-Adenozil- L- Homosistein
SOD	:Süper oksit dismutaz
SO₂	:Kükürt dioksit
SO=4	:Sülfat
SO=3	:Sülfid
SOX	:Sülfid Oksidaz Enzimi
SOXD	:Sülfid Oksidaz enzimi eksik olan grup
SOXDM	:Sülfid oksidaz enzimi olmayan v homosisteini yüksek olan grup
SSS	:Santral Sinir Sistemi
TAD	:Total antioksidan seviye
TOD	:Total oksidan seviye
THF	:Tetra Hidro Folat
TS	:Trans sülfürasyon
W	:Tungsten

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.Homosistein metabolizması.....	5
Şekil 2.Hippokampusun Organizasyonu	15
Şekil 3. Öğrenme ve bellek testinde kullanılan su tankının özellikleri	26
Şekil 4.Deney gruplarında karaciğer SOX enzim düzeyleri	33
Şekil 5.Serum Homosistein Seviyeleri.....	34
Şekil 6.Serum Sülfid Seviyeleri	34
Şekil 7.Acquisition fazına ilişkin latens süreleri	35
Şekil 8.Acquisition fazına ilişkin yüzme mesafeleri.....	35
Şekil 9.Probe fazındaki hedef kadranda geçirilen süre	36
Şekil 10.Acquisition fazına ilişkin Yüzme hızları	36
Şekil 11.Hippocampal Total Oksidan Düzey	37
Şekil 12.Hippokampal Total Antioksidan Düzey	38
Şekil 13.Hippokampal Oksidatif stres indeksi.....	38

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Plazma Hcy ve HHcy seviyeleri.....	7
Tablo 2. Karaciğer SOX aktivitesi ölçümü için gerekli reaktifler	28
Tablo 3. Kromotografik Yöntem Şartları	29

ÖZET

Normal ve Sülfite Oksidaz Yetersizlikli Sıçanlarda Homosistein ve Sülfite Molekülünün Nörotoksik Etkilerinin Araştırılması

Dr.Tonguç Olgun Özcan

Hiperhomosisteinemi nörodegeneratif hastalıklarda önemli bir belirteçdir. Sülfite ise homosistein metabolizmasında yer alan nörotoksik bir moleküldür. Bu çalışmada her-iki nörotoksik molekülün sinerjistik etkisini araştırmak için 60 adet erkek sıçan ile aşağıdaki gruplar oluşturuldu; kontrol (K), metiyonin verilen kontrol (KM), sülfite oksidaz yetersizlikli (SOXD) ve sülfite oksidaz yetersizlikli methionin verilen grup (SOXDM). 8 haftalık deney süresi sonunda öğrenme ve bellek testi ile kanda homosistein, sülfite seviyesi, beyinde ise hippokampus dokusunda total antioksidan ve oksidan seviyeler ölçüldü. Deney gruplarında öğrenmenin etkilenmediği, hafızanın ise tüm gruplarda kontrole göre bozulduğu saptandı. Normal gruplarda methionin verilmesinin bellek üzerine olumsuz etkili olduğu izlenirken, yetersizlikli grupta methionin verilmesinin bellek üzerine olumlu etki ortaya çıkardığı izlendi. Bellek üzerine olan bu etki kalıbı sülfite oksidaz normal grupta artmış oksidan stres ile ilişkili iken, sülfite oksidaz yetersizlikli grupta ise oksidatif stres ile ilişkili olmadığı izlenmiştir. Bu sonuçlar, homosistein ve sülfite ile ilgili detaylı araştırmaların yapılması gerektiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler; Sülfite, hiperhomosisteinemi, hippokampus, MWM

SUMMARY

Investigation of Neurotoxic Effect of Sulfite and Homocystein Molecules in Normal and Sulfite Oxidase Deficient Rats.

Dr.Tonguç Olgun zcan

Neurodegenerative diseases are highly associated with hyperhomocysteinemia. Sulfite, another neurotoxic molecule, locates in homocystein metabolism. In the present study, we investigated the role of sulphite on homocystein in terms of neurotoxic effects. For this purpose, 60 male rats were divided into four groups of 15 in each; control (C), Methionine (KM) for SOXC normal groups and sulfite oxidase deficient (SOXD), deficient + methionine (SOXDM) for SOXD groups. At the end of the 8 week experimental period, learning and memory, homocysteine and sulfite levels in the blood and hippocampus total antioxidant and oxidant levels were measured. While learning performance in the experimental group was not affected, memory was impaired in all experimental groups compared to the control. Administration of methionine to the normal groups were found to be negative effects on memory. Methionine revealed were observed positive effects on memory in the deficient group. While this pattern on memory was associated with increased oxidative stress in sulfite oxidase normal group, was not associated with oxidative stress in sulfite oxidase deficient group These results show that should be made of detailed research on sulfite and homocysteine.

Key words; Sulfite, hyperhomocysteinemia, hippocampus, MWM

GİRİŞ

Homosistein (Hcy; HSCH₂CH₂CH(NH₂)CO₂H, 2-amino -4-merkaptobütirik asit) dışarıdan besinle alınamayan, metiyonin (Met) aminoasidinin metabolizması esnasında bir ara ürün olarak oluşan, proteinlerin yapısına katılmayan, sülfür içeren bir amino asittir (1,2). Homosistein (Hcy), sentezi ilk olarak, 1932 yılında Vincent Du Vigneaud tarafından insülinin sülfür ile ilgili çalışmaları sırasında elde edilmiştir (2). Hcy oluşumuna katılan Met ise insan vücudunda de novo olarak sentezi yapılamayan, kükürt içeren esansiyel bir amino asittir (1). Hcy'nin ilk defa klinik önemi 1962 yılında sistasyonin β sentaz (CBS) enzim eksikliğinde gelişen ve mental gerilik, prematür ateroskleroz ve trombotik olayları içeren homosistinüri hastalığında görülmüş ve bu bulguların Hcy'nin plazma düzeylerindeki artışına paralel olduğu saptanmıştır (3,4). Hcy, periferik vasküler ve serebrovasküler hastalık, koroner kalp hastalığı ve tromboz oluşumu için bağımsız bir risk faktörüdür (5-7). Yüksek homosistein (HHcy)'nin nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıklara, santral sinir sistemi (SSS) gelişim bozukluklarına, yaşlılarda bilinç azalmasına, ilerleyici beyin atrofisine, beyinde hippokampal bölge, korteks ve toplam beyin hacminde azalmaya, gebelik komplikasyonlarına, psöriazise yol açtığı, bazı kanserlerle de ilişkili olabileceği gösterilmiştir (5,8,9). Son zamanlardaki çalışma verilerine dayanarak potansiyel bir biyomarker özelliği gösteren Hcy' nin bilinç bozukluğu ile bir ilişki göstermesine rağmen bunun nedensel rolü doğrulanamamıştır. Bununla birlikte plazma Hcy seviyesindeki her 5µmol/L artışın, demansta % 40 oranında bir artışa yol açtığı bildirilmektedir (10). Hcy oksidatif stres ve apoptoz artışına, nöron ölümlerine, sinaptik plastisite değişikliklerine yol açabilmektedir (11). Hcy düzeyin artışı ile karakterize çeşitli patolojilerde, artmış plazma Hcy ile hastalık arasındaki ilişkinin henüz açıklanmamış pek çok yönü vardır. Örneğin, Hcy' in nörotoksik etkileri ve bunların mekanizmaları in vitro olarak laboratuvar ortamında gösterilmişse de, bazı çalışmalarda in vivo olarak Hcy' in direkt olarak nörotoksositeye sebep olmadığı bulunmuştur (12-14). Örneğin, in vitro olarak toksik etkili bulunan Hcy' in normal plazma düzeyinin 3 katı dozda farelerin dorsal hipokampusüne infüze edilmesi, herhangi bir nörotoksik etki oluşturmamıştır (14). Bir başka çalışmada, diyetlerinden folat çıkarılan farelerde, plazma Hcy düzeyi diyetten öncekinin 10 katına çıkmış, benzer şekilde bu hayvanlarda da herhangi bir nörotoksosite izlenmemiştir (15). Bu ve benzeri çalışmalarda Hcy' in direkt değil de kainat, 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropridin (MPTP) ve beta amiloid gibi çeşitli nörotoksinlerin etkisini potansiyelize ettiği

gösterilmiştir (14-16). Bu bulgular Hcy' in hastalık patogenezinin katkıının nöronları herhangi bir nedenle oluşabilecek toksik etkilere karşı daha dayanıksız kılmak sureti ile olabileceğini düşündürmüştür.

Güçlü bir nörotoksik bileşik olan SO_3^- 'in direkt veya dolaylı olarak pek çok etkisi bildirilmiştir (17,18,19-24). Örneğin, motor nöron hastalığı, Parkinson ve Alzheimer gibi çeşitli nörolojik hastalıklarda bozulmuş kükürt metabolizması rapor edilmiştir. Bu hastalarda, sistein (Cys) amino asidinin plazma düzeyinin arttığı bulunmuştur. Bu amino asit, endojen SO_3^- oluşumunda üretilen SO_3^- 'in ana kaynağıdır. Yine aynı hastalarda ksenobiyotiklerin sülfat (SO_4^-) ile konjugasyonunda bir bozukluk ve artmış sistein/ SO_4^- oranı saptanmıştır (24). Bunun anlamı, organizmanın hem SO_3^- 'in hem de SO_4^- 'la detoksifiye edilecek olan çeşitli ksenobiyotiklerin zararlı etkisine karşı savunmasız kalmasıdır. SO_4^- oluşumunun önemli bir kaynağı, daha önce tarif ettiğimiz gibi SO_3^- 'in SOX ile katabolizmasıdır (25). Bu hastalarda SOX aktivitesi ve SO_3^- düzeyinin ne olduğu bilinmese de, hastalıklarının patogenezinde SO_3^- metabolizmasındaki bir defektin rol alabileceği bildirilmiştir (24).

Bu durumda başta nörodejeneratif hastalıklarda olmak üzere pek çok hastalıkta artan Hcy düzeylerine, (Cys) katabolizmasındaki bir bozukluk ve/veya yetersizlik sonucu güçlü bir nörotoksik molekül olan SO_3^- ' in de eşlik etmesi, gözlenen toksisitede önemli bir mekanizma olabilir. Bu çalışmadaki temel amaç; literatürdeki nörodejeneratif hastalıklarda izlenen artmış Cys azalmış sülfat SO_4^- düzeylerinden yola çıkarak, SO_3^- ' in detoksifikasyonundaki olası bir bozukluğun, Hcy'ne atfedilen nörodejenerasyona katkıda bulunabileceği hipotezinin araştırılmasıdır. Bu durum SO_3^- ' in metabolizmasındaki olası bozukluğun vücut sıvılarında SO_3^- miktarının artışı ile yüksek Hcy varlığında bilinen nörotoksik etkisinin değerlendirilmesini içerir. Bunun için nörotoksisite gelişiminde Hcy ve SO_3^- 'in tek başlarına olan etkilerine ilave olarak literatürde bulunmayan birlikteki etkilerine ait olası nörotoksik etkilerini belirlemek için endojen SO_3^- ' in artışını taklit eden SOX enzim eksikliği olan sıçan modeli oluşturuldu. Deneklerin kanlarında Hcy ve SO_3^- düzeyleri ölçülerek öğrenme bellek süreçlerindeki değişiklikler Morris su tankı (MWM) testi ile değerlendirildi . Ayrıca hippokampal bölgede total oksidan düzey (TOD) ve total antioksidan düzey (TAD) belirlenerek değişikliklerin oksidatif stres ile olan ilişkisi gösterilmeye çalışıldı.

GENEL BİLGİLER

HOMOSİSTEİN (Hcy)

Hcy, sistatyonin ve Cys prekürsörü olup, doku folatının resiklusundaki esansiyel bir substrattır. Kolin metabolizmasında zorunlu bir tepkime olan betain homosistein metil transferaz (BHMT) reaksiyonunda metil alıcısı olarak görev yapar ve Met' ninin korunmasına aracılık eder (1). Folat ve betainin Hcy'nin metabolizmasında substrat olarak kullanılması Hcy'nin toksik düzeylere ulaşmasını engellemektedir (26).

Hcy Metabolizması

Met amino asitinden transmetilasyon ile oluşan Hcy, remetilasyon (RM) ile tekrar metiyonine, transsülfürasyon (TS) yolu ile de sistatyonin ve Cys' e dönüşerek metabolize olur (2). Hücre içine giren Met' ninin ise % 58' i plasmadaki Hcy' nin RM'nu ile %42'si ise proteinlerin yıkımından oluşurken, proteinlerden gelen Hcy'nin yaklaşık % 43'nün RM, % 57'sinin ise TS yolu ile metabolize olduğu gösterilmiştir (27).

Transmetilasyon

Met metabolizmasında metil grublarının transferi ile Hcy oluşumudur. Bunun için metiyonin adenzil transferaz (MAT) enzimi ile Adenzin Trifosfat(ATP) tan bir adenzil grubunun kükürt atomuna transferi sonucu S-Adenzil-L-metiyonin (SAM) oluşur. Bu oluşumda ATP kullanılır. Yüksek enerjili bir bileşik olan SAM, ilk defa Catoni tarafından 1953 yılında belirlenmiştir. SAM çoğunlukla metil transferaz reaksiyonlarında yer almakla birlikte bu reaksiyonlarda kolay bir metil vericisi olması, pozitif yüklü sülfonyum iyonundan kaynaklanır. SAM, SSS'de DNA, RNA, fosfolipitler ve nörotransmitterlerde gerçekleşen, nöronları koruyan ve fonksiyon görmelerini sağlayan 35 kadar transmetilasyon reaksiyonunda metil donörü olarak görev yapmaktadır. SAM 'ı metil vericisi olarak kullanan metilasyon reaksiyonlarında SAM'ın metil grubu, DNA metil transferaz enzimi ile kopartılarak, S-Adenzil-L Homosistein (SAH) oluşur. SAH ise geri dönüşümlü bir enzim olan SAH hidrolaz ile adenzin ve Hcy' e ayrılır (28-30).

Remetilasyon

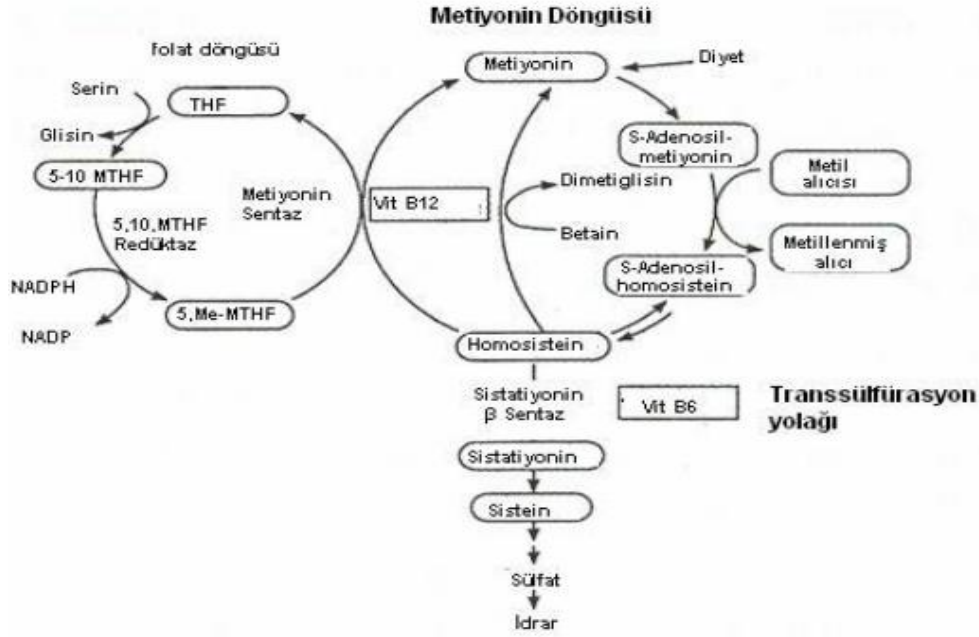
RM, Hcy' den Met aminoasidinin yeniden oluşumudur. Bu reaksiyon uzun ve kısa yoldan oluşur (29). Uzun yol, metiyonin sentaz (MS) veya N-5-metiltetrahydrofolat-homosistein metiltransferaz (N-5-MTHF-HMT) enzimlerinin katalizörlüğünde ve B12 vitamini kofaktörlüğünde N-5-metiltetrahydrofolattan (N-5-MTHF) metil grubunun transferi ile Met oluşumudur. Aktiflenen metil siklusunun bu son noktası folat siklusu ile paylaşılır. Serinden gelen tek karbon grubunun transferi ile glisin ve N5-N10 metilentetrahydrofolat üretilir. Bu folat siklusu metilentetrahydrofolat redüktaz (MTHFR) enziminin katalizlediği reaksiyon ile N-5-MTHF üretilir (8). 5-MTHF metabolizması, B12 vitamini eksikliğinde tetrahydrofolat (THF) halinde kalır ve tekrar siklusa giremez (8,29). Kısa yol ise Hcy' nin önemli bir kısmının remetilasyonundaki yol olup, sıçan karaciğer ve böbreklerinde BHMT enziminin katalizlediği, betainin metil vericisi olduğu reaksiyondur. Bu reaksiyon B12 vitamini ve/veya folik asit eksikliği durumunda SAM sentezinin gerekli olduğu dokularda Met oluşumunu sağlar. Bu yolda dimetilglisin haline gelen betain, kolin metabolizması sonucu oluşmaktadır (8,26,29).

Transsülfürasyon

TS yolu geri dönüşümsüz bir yol olup, Hcy katabolizması ile başlar ve sistasyonin, sistein, glutatyon ile birlikte NH_4 , piruvat, taurin, α -keto bütirat, CO_2 ve SO_4^{2-} oluşur (11). Bu yolda ilk oluşan sistasyonin sentezi olup, serin amino asidinin Hcy ile birlikte kofaktörü, B6 vitamininin aktif bir şekli olan 5-pridoksal fosfat sayesinde etki gösteren sistasyonin beta sentaz enziminin (CBS) katalizörlüğünde gerçekleşir. Bu enzim ise bir hem proteindir. Oluşan sistasyonin daha sonra γ -sistasyonaz enziminin etkisi ile α -keto bütirat, NH_4 ve Cys' e metabolize olur. Cys ise Hcy ile birleşerek sistein-Hcy disülfid bileşiklerini oluşturur. Bundan başka glutatyon sentezini sağlar ve SO_4^{2-} üzerinden de glikoz amino glikanların yapısına girer. TS yolu, memeli dokularında böbrek, barsak, karaciğer ve pankreasta bulunmakta olup, bu dokular Cys' i hızlı glutatyon dönüşümüne sokan bir siklusa sahiptirler (26). Transsülfürasyon yolunu içermeyen hücreler ise eksojen bir Cys kaynağına ihtiyaç gösterirler (31). Hcy metabolizması şekil 1' de yer almaktadır.

Hcy Metabolizmasının Regülasyonu

Hcy metabolizmasını düzenleyen temel mekanizma, iki önemli metabolik alanda bulunan yarışmalı reaksiyonlardaki substratların dağılımıdır. Bu düzenlemedeki ilk yarışmalı basamak Met' den protein sentezi ve SAM oluşumu arasındadır. Son basamak ise Hcy'nin kullanıldığı reaksiyonlardır. Bu iki basamakta yer alan enzimlerin etkinliği ise enzimlerin doku konsantrasyonları ile doğal kinetik özellikleri tarafından belirlenir. Hcy metabolizmasını düzenleyen enzimler ise Met katabolizasyonunu ve korunmasını sağlarlar. Met'i katabolize eden enzimler, hepatic (MAT), sistatyonin sentaz, sistatyonaz ve adenozilhomosisteinaz (AHS) olup, metabolitleri tarafından aktive edilirler.



Şekil 1. Homosistein metabolizması. Hcy vücutta TS ve RM sikluslarına girer (6).

Diyet ile alınan Met artışı, karaciğer enzim düzeylerini artırır. Met' ni koruyan gruba ait enzimler ise ekstrahepatik MAT izoenzimleri, büyük çoğunluğu SAM bağımlı transmetilazlar, BHMT ve Met sentazı (MS) kapsamakla birlikte kendi metabolitleri ve ürünleri tarafından inhibe edilmektedir. Bu enzimler ile birlikte AHS enzimi Met döngüsünü tamamlar. Met alımındaki artışın sıçanlarda bu gruptaki karaciğer enzim düzeylerinde azalmaya yol açtığı bildirilmektedir (2,26). Bununla birlikte SAM, CBS enziminin allosterik aktivatörü, MTHFR enziminin ise allosterik

inhibitörüdür (8,32). Bu nedenle dokulardaki SAM konsantrasyonu (bazı dokularda SAH) Hcy'nin RM veya TS yolunu belirler. SAM düzeyindeki artış, TS da arttırırken, remetilasyonu ise inhibe eder (2,31,33). MAT enziminin düzenlenmesinde ise hormonal ve besinsel faktörler yeralmaktadır (34). TS yolu aynı zamanda antioksidanlar ve peroksidanlar arasındaki dengeye bağlı olup, antioksidanlar TS'ü azaltırken, peroksidanlar ise artmasına yol açar (35). Met-Hcy metabolizmasının düzenlenmesinde Cys, önemli bir etki gösterir. Diyet ile fazlaca alınan Met birikmesi, TS artışına neden olur. Yüksek miktarda ve uzun süreli Met alımı, RM yolunu inhibe ederken, TS yolunun saturasyonuna neden olur. Bunun yerine Cys alımındaki artış ise TS'ye rağmen RM artışına yol açar (36,37).

Hcy'nin Plazmada Yeralan Formları

Hcy, plazmada okside ve redükte formlarda bulunur. Okside Hcy, disülfid ve redükte Hcy ise sülfidril şeklindedir. Redükte Hcy, plazma Hcy' nin % 1 kadarını oluşturur. Okside Hcy' nin bir formu olan homosistin ise plazma Hcy'nin % 5-10'luk bölümünü oluşturur. Ayrıca plazma Hcy'si, plazma proteinlerine bağlı veya serbest olarak bulunur. Plazma proteinlerine bağlı olan Hcy, okside formdaki karışık disülfitlerden oluşup, plazma Hcy'sinin %80-90'lık kısmını kapsar ve en fazla albümine bağlıdır. Bu form reaktif Cys kalıntıları içeren proteinleri ve mevcut Cys' i içerir. Karışık disülfitlerden olan Cys-Hcy disülfid formu ise plazma Hcy'nin %5-10'luk kısmını oluşturur. Serbest Hcy ise fizyolojik pH' da oksidasyona duyarlı olmakla birlikte, kendisi ile birleşerek dimer Hcy (diğer adıyla homosistin) veya Cys başta olmak üzere tiyollerle birleşerek sistein-Hcy disülfidi oluşturur. (38,39).

Beyinde Hcy Metabolizması

Beyinde üretilen Hcy' nin beyindeki metabolizması ile ilgili bölgesel farklılıkları tam olarak belirlenememiştir. Bu metabolizmadaki en önemli metilasyon kaynağı RM reaksiyonu olup, BHMT yolunun beyinde bulunmadığı belirtilmektedir. Beyinde TS yolunda yer alan CBS enziminin ise sistasyonaz enzim etkinliği ile uyumsuz olup, bölgesel değişiklikler gösterdiği belirtilmektedir. Beyinde, Met ve Hcy' nin TS yoluna giremediği, astroglial hücre kültürü çalışmalarında ise glutatyon sentezine giren sistasyonin ve Cys oranının çok düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca beyinde, glutatyon sentezinde yer alan Cys substratının sınırlı bir oranda olduğu ve astrositlere Na⁺ bağımlı glutamat taşıyıcıları ile iletiği gösterilmiştir. HHcy'nin kan beyin bariyerini bozabildiği fare çalışmalarında rapor edilmiştir (40-42). Deneysel hayvan

çalışmalarında Hcy'nin, plasmadan beyine iletilmesinin iki yönlü özel taşıyıcılarla gerçekleştiği, beyin hücrelerine girişinde ise basit difüzyon ve sature olabilen özel reseptörler aracılığı ile transport edilebildiği düşünülmektedir (43-45). Serumdaki Hcy miktarı, beyin omurilik sıvısındaki (BOS) Hcy miktarının 20-100 katı olup, bu iki bölümdaki miktar değişiklikleri aynı seviyede birbirine yansıma gösterir. Artan plazma Hcy miktarına paralel olarak beyindeki Hcy ve SAH miktarı da artar (43,46-48).

Hcy' nin Kan Seviyeleri

Hcy' nin kandaki seviyeleri, plazma veya serumdaki total Hcy miktarına bağlıdır. Bu ölçümlerdeki total Hcy' nin normal değerleri, yetişkinlerde plasmada 5-15 $\mu\text{mol/L}$, serumda ise 13-18 $\mu\text{mol/L}$ olarak kabul edilirken; pediatrik dönemde 3.7-10.3 $\mu\text{mol/L}$ 'dir. Ancak Hcy' nin normal seviyeleri yaş, cinsiyet ve kadınlardaki postmenapozal dönemlerden etkilenmektedir. Hcy'nin plasmada 10 $\mu\text{mol/L}$ seviyesinde olması gerektiği ve bu değerdeki artışların sağlık risklerini de arttırabileceği bildirilmektedir (38,48,50). Plazmadaki total Hcy seviyeleri Tablo 1'de yer almaktadır (38).

Tablo 1. Plazma Hcy ve HHcy seviyeleri

Hcy

Normal aralık	5-15 $\mu\text{mol/L}$
Arzu edilen değer	<10 $\mu\text{mol/L}$

HHcy

Hafif form	15-25 $\mu\text{mol/L}$
Orta form	25-50 $\mu\text{mol/L}$
Şiddetli form	50-500 $\mu\text{mol/L}$

Met Yükleme Testi

Hcy' nin metabolik yollarını yansıtan bir testtir. Özellikle açlık plazma Hcy seviyesinin normal olduğu ve HHcy'den şüphe edilen durumlarda uygulanabilir (51). Vitamin B6 ve CBS eksikliğinin neden olduğu TS yolundaki hafif bozukluklarda açlık Hcy ölçümlerinden çok daha duyarlıdır. Çünkü Hcy seviyesindeki geçici geri dönüşlü postprandial artışlardan TS yolundaki enzimler sorumludur. RM yolundaki bozuklukları göstermede ise duyarlı değildir (52).

HHcy Oluşturan Faktörler

Plazma Hcy seviyesi, genetik ve sonradan kazanılmış etkenlerden dolayı değişebilmektedir. Genetik faktörlere bağlı CBS, MTHFR ve MS enzim eksiklikleri veya defekti bulunur. HHcy nedenleri arasında ileri yaş, erkek cinsiyet, menapoz, folik asit, B6 ve B12 vitaminlerinin eksikliği, renal yetmezlik, kanserler, bağ dokusu hastalıkları, psöriasis ve hipotroidizm içeren hastalıklar yer almaktadır. İlaçlardan kolestiramin, metformin folat ve kobalamin emilimini etkileyerek, metotreksat ise DHFR enzim inhibisyonuyla, antikonvülzan ilaçlar folat antagonizmasıyla, L-Dopa transmetilasyon artışıyla, niasin ve teofilin B6 vitamini eksikliği ile plasmada HHcy oluşturur. HHcy seviyesini azaltan ilaçlardan penisilamin ve N-asetil sistein, disülfid değişimi ile plazma biyoyararlanımını etkileyerek, betain ise RM artışı ile etki gösterir. Ayrıca sigara, alkol, kahve tüketimi, sedanter yaşam HHcy gelişimine yol açar (38,53).

Hcy'nin Nörotoksik Etkileri

Redoks reaksiyonlarına kolayca katılan Hcy' nin otooksidasyonu sonucu kan dolaşımında homosisteik asit artışı ile hücre içi iyonize Ca^{+2} ve radikal oksijen türevleri (ROS)' nin artışına ve bunların nöronlarda birikmesine bağlı toksik etkilere yol açar. Ayrıca süper oksit dismutaz (SOD) ile katalaz (CAT) aktivitesinin baskılanmasına ve nöronlarda sinyal ileti mekanizmalarının bozulmasına neden olur (54,55). Hcy, GABAerjik nöronlarda presinaptik disinhibisyonla hippokampus nöron devrelerinin uyarılabilirliğini arttırmaktadır(11). Hcy'nin nörotoksik etkileri N-Metil D-Aspartat (NMDA) ve grup 1 metabotropik glutamat reseptörü (mGluR1)'nün aktivasyonu sonucu oluşur. mGluR1 aktivasyonu ise fosfolipaz A2 ve fosfotidilinositol 3 fosfat stimülasyonu ile endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımına yol açarak, Hcy'nin toksik etkilerini kısmi olarak indüklemektedir. HHcy, in vitro

olarak uzun süreli sinaptik etkinlik artışı (LTP) ile in vivo spasyal öğrenmeyi inhibe etmektedir. HHcy' nin sıçan hippocampusunda LTP indüksiyonunu inhibe etmesi, invivo LTP için bir parametrik ölçüm olan eksitatör postsinaptik potansiyel (EPSP) eğim değişimleri ile gösterilmiştir (54,56,57). Kısa süreli, düşük folat/ HHcy' e bağlı sıçanların beyin mikrovasküler yapısında elektron mikroskobu ile incelemesinde endotel hücrelerinde sitoplazmik şişme, mitokondriyal dejenerasyon, perivasküler amorf fibrosis, perisit dejenerasyonu tesbit edilmiştir (58). Uzun süreli HHcy'nin etkilerine ilişkin sıçanlarda yapılan in vivo bir çalışmada HHcynin beyinde mikro kanamalara neden olduğu bunun da kolinerjik nöronlarda sinaptik hasar yarattığı, beyin korteksinde oluşturduğu ağır mikro kanamaların uzun süreli bellek kayıplarına yol açtığı ileri sürülmektedir (59). Ayrıca HHcy, nöral stem hücre siklusunun durması, sinaptik disgenezis, miyelinizasyonun bozulması, nöron ve glial hücrelerin ölümü, sinaptik fonksiyon bozukluğu, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarının oluşumu, hücrede enerjinin tükenmesi, oksidatif stresin artması ve apoptotik kaskad aktivasyonu ile mitokondri dinamiğinin bozulması yer almaktadır (11,60).

Hcy ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde bulunan prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan serbest radikallerin ve bunlardan da oluşan serbest olmayan radikallerin hücrelerde hasara yol açmasıdır (61). Beyin hücreleri ve özellikle nöronların vücudun diğer dokularına göre 10 kat daha fazla O₂ kullanması, bölünemeyen bu hücrelerin uzun bir yaşam sürelerinin bulunması ve beyinde önemli bir role sahip olan nitrik oksit (NO), peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türevlerini oluşturabilmesinden dolayı antioksidan bir savunmaya gerek duyarlar (60). Bunun ile birlikte Hcy metabolizması, hücrelerdeki redoks potansiyeli ile düzenlenir ve metabolizmadaki çeşitli enzim aktiviteleri ise oksidasyon ile belirlenir. TS yolunun bozulması ile redoks homoestazı ve redükte Cys seviyesi olumsuz etkilenerek, nöron hasarının oluşumuna katkıda bulunur (40). Hcy metabolizmasında yer alan ve bir antioksidan olan SAM, HHcy durumlarında SAH' a göre daha düşük bulunur (40). Hcy' ne bağlı mitokondri fonksiyonlarındaki bozulmalar ROS üretiminin artmasına ve Hcy metabolizmasındaki MS aktivitesinin azalmasına yol açar (40). Ayrıca Hcy' nin asimetrik dimetil arginin(ADMA) birikimi ile endotelial ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (NOS) enzim blokajına neden olduğu, bu yolla ROS'u arttırdığını ve NO' in bazal seviyesini etkilemeden biyoyararlanımını azalttığı bildirilmektedir (62). Plazmada Hcy'nin tiyol gruplarının kolayca oksitlenmesi

sonucu ROS üretimindeki artış ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve SOD gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu inhibe etmektedir (63). Hcy, nöronların eksitotoksisite ve oksidatif strese karşı korunmasını belirgin olarak azaltır. Bununla ilgili sıçanlarda yapılan bir çalışmada Hcy'nin beyinde lipid peroksidasyonunu indüklediği, Malondialdehit (MDA) ve Süper Oksit Anyon (SOA) seviyelerini arttırdığı, pasif kaçınmadaki öğrenme testlerinde bellek bozukluğuna yol açtığı, hippocampus bölgesindeki hücrelerde apoptozisi ve hücre ölümünü indüklediği bildirilmektedir (63). Uzun aksonları ve çoklu sinapsları olan nöronlar, biyoenerji gereksinim fazlalığından dolayı oksidatif strese çok daha duyarlıdır (60). Farklı nöron gruplarında farklı düzeyde oksidatif stres oluşur. Hippokampus'un CA1 bölgesindeki nöronların CA3 bölgesindeki nöronlara göre oksidatif strese daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (64).

Hcy ve Apoptozis

Apoptozis, programlanmış hücre ölümüdür (65). HHcy, antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-xL) seviyelerini belirgin olarak azaltırken, pro-apoptotik proteinlerin (Bax, Bcl-xS) seviyelerinde de belirgin biçimde artışına yol açabilmektedir (65). HHcy' nin kısa süreli etkisinde (1-3 hafta) nöronlarda apoptozisi indüklediği ve uzun süreli HHcy' nin ise nöronlarda hücre membran rüptürüne nekrotik hücre ölümüne, mitokondride permeabilite geçiş porlarının açık kalmasına ve böylece sitokrom c' nin de mitokondriden sitoplazmaya salınımına yol açtığı; bu durumu önleyen Bcl-2 protein seviyesinin ise azaldığı belirtilmektedir (54,65). Sitoplazmaya geçen sitokrom c, apoptotik proteaz aktivatör faktör-1'e (Apaf-1) bağlanır ve kaspaz 9'un kaspaz 3'e dönüşümünü aktifleyerek, apoptozun başlamasında anahtar rol oynar. Kaspaz 3 aktivasyonu ise nöronları apoptoza karşı koruyan glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesini azaltmaktadır (65).

SÜLFİT (SO_3^-)

Hcy metabolizmasında Cys' den oluşan nörotoksik bir anyondur (66).

SO_3^{-2} Kaynakları

Eksojen SO_3^{-2} kaynaklar

SO_2 ' li kirli hava ile alınan SO_3^- , solunum yollarında bronkokonstrüksiyon, alveol hiperplazisi, alveol kalınlaşması, akciğer ödemi ve akciğer kanserinin

gelişimine yol açabilmektedir (54). SO_3^- , ilaç endüstrisinde de ilaç etkinliğini azaltan oksidasyonu önleyebilmesi ve suda eriyemeyen ilaçların eriyebilirliği için 0.01mg/ml-3,2mg/ml aralığında kullanılmaktadır. SO_3^- , total parenteral beslenme sıvıları ve periton dializ sıvılarında da bulunmaktadır (67,68). 10 litrelik periton dializ sıvısı ile vücuda giren SO_3^- miktarının yaklaşık 500 mg olduğu bildirilmektedir (56). SO_3^- 'in gıda sanayindeki kullanımı ise antimikrobik etkisinin yanında renk ve kıvam koruyucu olması ile renk ağartıcı özelliklerini içerir (69). SO_3^- , gıda maddelerinin kararmasına neden olan melanin oluşumunu, fenollerin oksidasyonunu sağlayan polifenol oksidaz enzimini inhibe ederek gösterir (70). Dünya Sağlık Örgütü tarafından kabul edilebilir günlük SO_3^- alım miktarı ise 0,7 mg/kg olarak belirlenmiştir (71). SO_3^{2-} li gıdaların barsaktan %70-95 oranında emildiği deney hayvanlarında gösterilmiştir (71).

Endojen SO_3^- Kaynakları

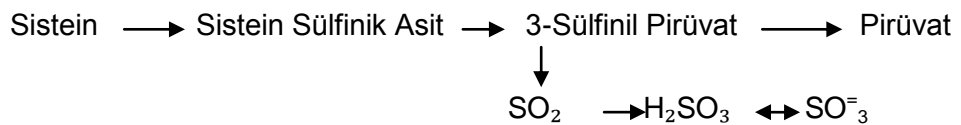
SO_3^- , insan vücudunda sülfür içeren amino asitlerin ve diğer sülfürlü bileşiklerin normal katabolizmaları sırasında önemli miktarlarda üretilir. Normalde SO_3^- ' in hücre içi kararlı konsantrasyonu, mitokondriyal bir enzim olan SOX tarafından sülfata oksitlendiği için düşüktür (66).

Met Katabolizması Sırasında SO_3^- Oluşumu

Met katabolizmasındaki SO_3^- oluşumunun kaynağı Cys olup, MAT, SAM transferaz, SAH hidrolaz, CBS, sistatyonin γ -liyaz enzimleri ile sitoplasmada gerçekleşen reaksiyonlar sonucu oluşur (66).

Cys Katabolizması Sırasında SO_3^- Oluşumu

SO_3^- üretiminde en çok kullanılan yol Cys katabolizmasından oluşur. Aşağıda yer alan reaksiyonda gösterildiği gibi Cys' in, sistein sülfirik asite oksidasyonu ile başlamaktadır. Cys, invivo SO_3^- ' in predominant prekürsörü olarak görünmesine rağmen hücre içi konsantrasyonu oldukça düşük olup, çeşitli dokularda 10-100 pM düzeyindedir (66).



Bu reaksiyonda sistein sülfirik asit oluşumunda yer alan sistein dioksijenaz enzimi sitoplâzmadâ oksijen tüketimine yol açar. 3-Sülfiril pirüvat ise mitokondride transaminasyonla meydana gelir ve daha sonra kendiliğinden desülfirasyona uğrar. Oluşan SO₂, hidrasyon ve protonun ayrılması ile SO₃⁻' e dönüşür (66).

Hipotaurin Metabolizması Sırasında SO₃⁻ Oluşumu

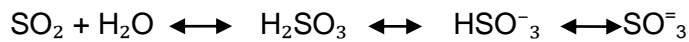
Hipotaurin, sistein sülfirik asitin dekarboksilasyonundan üretilir ve α-keto asitlerle transaminasyona uğrayarak süksinil aset aldehit oluşturur. Daha sonra kendiliğinden desülfirasyon ile SO₂, SO₃⁻ ve aset aldehit oluşur (66).

Hidrojen Sülfidin (H₂S) Oksidasyonu Sırasında SO₃⁻ Oluşumu

Sistin, Cys, tiyosistein,3-merkaptopirüvat ve 2-keto-4-tiyo metil bütiratın yer aldığı reaksiyonlarla oluşan H₂S'in oksidasyonu sırasında da SO₃⁻ oluşmaktadır (66).

SO₃⁻'in Hücresel Sıvılardaki Temel Kimyasal Reaksiyonu

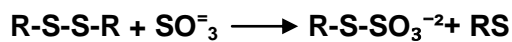
Besinlerle alınan SO₃⁻ tuzları, ağız ve midedeki asit ortamda hızla ve kolay bir şekilde aşağıda yer alan reaksiyonda gösterildiği gibi sülfüröz aside (H₂SO₃) dönüşmektedir. H₂SO₃ özellikle yüksek pH ve 37 C°de kolayca bisülfid (HSO₃⁻) iyonuna ve sonrada SO₃⁻ iyonuna dönüşür. SO₂, H₂SO₃, bisülfid anyonu (HSO₃⁻) ve sülfid anyonu (SO₃⁻) , sulu çözeltilerde kolaylıkla birbirlerine dönüşebilmektedir (66).



SO₃⁻ METABOLİZMASI

Oksidatif Olmayan SO₃⁻ Metabolizması

SO₃⁻' in detoksifikasyonunda sülfitolizis olarak adlandırılan bir süreçte S-sülfonat oluşturmak için aşağıda gösterildiği gibi sistin, okside glutatyon (GSSG) gibi küçük veya daha büyük molekül ağırlıklı proteinlerle disülfid bağları aracılığı ile reaksiyona girer (66).



Oksidatif olmayan bir diğeri SO_3^- metabolizması yolağı tiyosülfattır. Tiyosülfat, bir SO_3^- metaboliti olup, idrar ile düşük oranda atılmasına rağmen tesbit edilebilir düzeydedir ($32 \pm 13 \mu\text{mol/gün}$). Tiyosülfat ve glutatyon, SO_3^- ve sülfür oluşumunu katalizleyen tiyosülfat redüktaz enziminin substratlarıdır. Rodanez ve tiyosülfat redüktaz, tiyosülfat döngüsünün ayrılmaz parçalarıdır. Bu siklusun metabolizma ile ilgisi eksojen SO_3^- kalıntılarının belirlenmesidir (66).

Oksidatif SO_3^- Metabolizması

SO_3^- ' in detoksifikasyonundaki temel mekanizma oksidatif metabolizmayı içerir. Bu metabolizmada yer alan olan SOX enzimi eksojen ve endojen SO_3^- ' in SO_4^- ' a oksidasyonunu sağlayan son basamakta görev alır. Molibdenyum kofaktör (MOCO)' ü olan bu enzim, molekül ağırlığı 104 kilodalton (kDa) olan bir molibdohemoproteindir (25,71,73). SOX, mitokondri membran aralığına lokalize olmuş, birbirine benzeyen ve her birisi 52 kDa'luk 2 adet subüniteden oluşan bir dimer yapısı içerir (66,74). Enzim, molibden (Mo) içeren ve 42 kDa ağırlığındaki C-terminal ile sitokrom b_5 (cit b_5) içeren 10 kDa ağırlığındaki N-terminal bölümlerine sahiptir (74). Normalde idrar ile atılan inorganik sülfatın yaklaşık % 90'ı SOX enzim aktivitesinden kaynaklanır. SO_3^- enzimin aktif bölümüne bağlanarak Mo' un iki elektron kaybetmesi ile SO_4^- ' a dönüşür (75). Enzimin aktivasyonu, SO_3^- ' ten elektronların Mo (VI) bölümüne, sonra da enzimin sitokrom b_5 bölümüne ve en sonunda da solunum zincirindeki ferrisitokrom c'ye aktarımını içerir (66). Bununla birlikte SOX enzim aktivitesi tungsten(W) ile inhibe edilebilmektedir. Tungsten, etkisini molibdenyum ile birleşmiş sülfid oksidaz apoenzimi üzerinde gösterir (67). Kararlı enzim aktivitesi ise alınan W ve Mo oranlarına bağlıdır (66). SOX enzimi, memeli dokusunda çok geniş bir dağılım sergilemekte ve aynı türde bile belirgin farklılıklar göstermekte olup, karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda SOX aktivitesi yüksek iken beyin, dalak ve testis dokusunda ise çok düşük oranda bulunmaktadır (76). Bununla birlikte sıçan karaciğerindeki SOX aktivitesi insanlarınkine göre 10-20 kat daha yüksektir (66). SOX enzim eksikliği izole enzim bozukluğu şeklinde veya MOCO eksikliğine sekonder olarak ortaya çıkabilir. İzole SOX eksikliği, MOCO eksikliğinden daha nadir görülmekle beraber ilk kez 1967 yılında Mudd ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra başka araştırmacılar tarafından da SOX geninde çok sayıda mutasyon saptanmış ve hastalığın otozomal resesif geçişli olduğu belirtilmiştir (73).

SO₃⁼' in Nörotoksik Etkileri

Güçlü bir nükleofil olan SO₃⁼ ve metabolizmasındaki ara ürünlerden oluşan serbest radikaller hücredeki nükleik asitler, protein ve lipitleri de kapsayan çeşitli sıvısal ve hücresele bileşenlerle reaksiyona girerek toksisiteye neden olabilmektedir. SO₃⁼' in detoksifikasyonunda yer alan SOX enziminin genetiksel eksikliğinin ise ölümlerle sonuçlanan ciddi nörolojik hasarlara yol açtığı ve etkin tedavisinin bulunmadığı belirtilmektedir (77). SO₃⁼' in nörotoksik etkileri nöronlarda çok düşük dozlardaki birikimi ile oluşabilmektedir (78). Beyinde SO₃⁼ nörotoksitesine bağlı hipopokampal CA1 ve (CA3-2) bölgelerinde piramidal nöron kayıpları gösterilmiştir (79). SO₃⁼' in Na-K-ATP az aktivitesini değıştirmedığı ve lipit peroksidasyonunda artışa, antioksidan enzimlerin etkisinde azalışa, oksidatif stresin indüklenmesine, beyin beyaz cevherinde miyelinizasyon kaybına ve nöron ölümlerine yol açtığı bildirilmektedir (78). SO₃⁼' in toksik etkilerinden non enzimatik otooksidasyonu veya peroksidaz katalizi ile oksidasyonu sonucu oluşan sülfür trioksit radikallerinin sorumlu olabileceğı belirtilmektedir. Ayrıca SO₃⁼' in ROS üretimine yol açabildiğı, oksidatif stresten bağımsız olarak, doz artışı ile direk glutamat dehidrojenaz enzim inhibisyonuna ve beyin hücresi mitokondrisinde ATP düzeyinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (78,79). SOX enzim eksikliğinde serbest Cys' den oluşan sistein-S-sülfat metabolitinin eksitotoksik amino asit gruplarına yapıcı benzediğı ve beyine hasar verdiğı belirtilmektedir (79). Bütün bunlara rağmen memelilerde SO₃⁼' in kronik nörotoksik etkilerine ait kanıtlar yoktur (79).

ÖĞRENME ve BELLEK

Canlılarda davranış çevre ile genler arasındaki etkileşimin bir sonucudur. Öğrenme, çevre hakkında bilgi kazanılması süreci iken bellek kazanılan bilginin kayıt edildiği, saklandığı ve sonradan geri çağırıldığı bir süreç olup, beyin korteksinde birbirinden farklı bilgi içeren bellek depoları vardır. Bellek **uzun süreli** ve **kısa süreli (işlek Bellek)** olmak üzere 2 grupta toplanabilir (80,81).

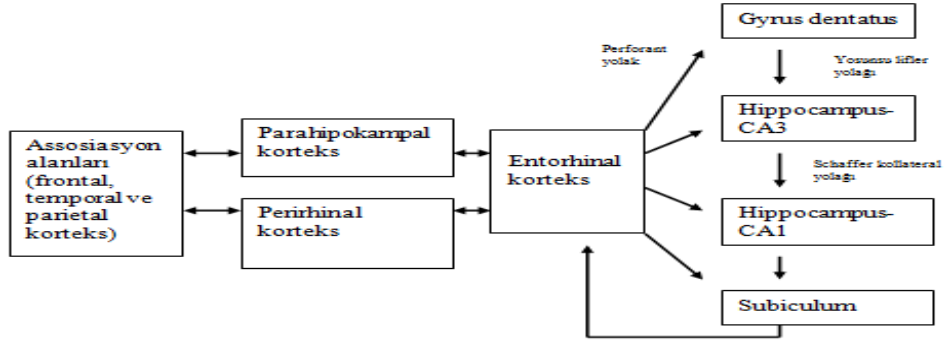
Uzun Süreli Bellek

Uzun süreli bellek, bilgilerin depolanması ve geri çağırılması esasına dayanarak **eksplicit** ve **implicit** şeklinde 2 grupta toplanmıştır (80,81).

Eksplisit Bellek

Eksplisit bellek, bilinçli olarak ve açık bir şekilde ifade edilebilen bellektir. **Episodik** (olaylar ve kişisel tecrübeler) ve **semantik** (gerçekler ile ilgili) bellek olarak sınıflandırılabilir. Eksplisit bellek oldukça esnek olup, mediyal temporal lopta hippokampal bölgeye bağlıdır. Görsel,işitsel ve somatik bilgilerin ilk kazanımlarına ait eksplisit belleğin depolanmasının bir veya daha fazla polimodal asosiasyon kortekslerinde (prefrontal, limbik ve paryetookspitotemporal korteks) te olduğu ileri sürülmektedir. Buralardan gelen bilginin seri olarak akışı şekil 2' de yer almaktadır. Eksplisit belleğin depolanması için bilginin işlenmesinde entorinal korteks, perforan yolla dentat girusa olan projeksiyonu ile polimodal bilgilerin asosiasyon korteksinden hippokampusa ulaşması sağlayan önemli giriş yolunu oluşturur. Hippokampus için esas çıkış yolunu sağlayan entorinal korteks, polimodal asosiyasyon korteksinden gelen bilgiler ile hippokampusa gelen bilgileri birleştirir. Semantik (gerçek) bilgiler ise neokortekste dağılılarak depolanır; nesnelere, kavramlar ve kelimeler de olduğu gibi anlamlarını içerir. Episodik bilgiler prefrontal kortekste yer ve zaman olarak görünmekte olup, uzun süreli belleğe aktarılmasında ise özelleşmiş görünen neokorteks alanları frontal lobe alanları ile ilişkilidir. Episodik bellek kaybı olan hastaların semantik bilgileri hatırlayabilmesi ise dikkat çekicidir. Eksplisit bellek birbiriyle ilişkili fakat birbirinden ayrı olan kodlama, pekiştirme, depolama ve geri çağırmayı içeren dört sürecin sonucunda meydana gelir. **Kodlama;** Duyu organları ile algılanan bilginin farkına varıldığı ve işlendiği bir süreçtir. **Pekiştirme;** Yeni edinilmiş bilginin uzun süreli saklanması için gen ekspresyonunu, yeni proteinlerin sentezini içeren yapısal değişikliklerin meydana geldiği bir süreçtir. **Depolama;**

Belleğin uzun süre bekletildiği mekanizmaları ve yerleri içeren bir süreçtir. Uzun süreli belleğin kapasitesi sınırsız iken kısa süreli belleğin ise çok sınırlıdır. **Geri çağırma**; Farklı yerlerde depolanmış birbirinden farklı tür bilgileri bir araya getirebilmeyi içerir. Eksplisit belleğin geri çağırılması ise işlek belleğe bağlıdır (80,81).



Şekil -2. Hippocampusun organizasyonu. (kaynak 97'den alınmıştır)

Eksplisit Belleğin Oluşumu ve Uzun Süreli Potansiyalizasyon (LTP)

Algılama şeklimize bağlı bir süreç ile oluşur. Prefrontal kortekste çevredeki spesifik olaylara aktif bir şekilde algısal olarak odaklanan dikkat kontrol sistemine veya merkezi yönetime ait bir yerin olduğu düşünülmektedir. Yüksek memelilerde eksplisit belleğin depolanmasında mediyal temporal sistemin önemli bir bileşeni olan hippokampusun 3 önemli yolağı vardır. Bunlardan **perforan yolak**; entorhinal korteksten başlar ve dentat girusun granüler hücrelerine uzanırken, **yosunsu lif yolağı**; granül hücrelerinin aksonlarını içerir ve hippokampusun CA3 bölgesindeki piramidal hücrelere uzanır. **Schaffer kollateral yolağı** ise CA3 bölgesindeki piramidal hücrelerin eksitator kollaterallerinden oluşur ve CA1 bölgesindeki piramidal hücrelerde sonlanır. Bu 3 yolun yüksek frekanslı uyarımı (tetanus) hippokampal hedef nöronlarında eksitator postsinaptik potansiyel amplitütlerini artırır. Bu fasilitasyon uzun süreli potansiyalizasyon (LTP) olarak isimlendirilir. LTP' in altında yatan mekanizması bu 3 yolakta aynı değildir ve yosunsu lif yolağı uzun süreli potansiyalizasyon ile ilişkilendirilememektedir. Yosunsu liflerin terminalinden salınan glutamat nörotransmitteri piramidal hedef hücrelerin hem NMDA hem de non NMDA reseptörlerine bağlanır. Ancak bu yoldaki NMDA reseptörleri çoğu durumda sinaptik plastisitede çok küçük bir etki göstermekte olup NMDA reseptörlerinin blokajı ve CA3 bölgesindeki post sinaptik piramidal hücrelere Ca^{+2} akışının

engellenmesi LTP' yi etkilememektedir. Bu yolaktaki LTP oluşumu tetanik uyarı ile presinaptik bölgeden hücreye Ca^{+2} akışı ve aktiflenen Ca^{+2} -Kalmodülün sonrası cAMP ve PKA etkinliğinin bir sonucudur. Ayrıca modulatör girdiler ile (noradrenerjik- β -adrenerjik reseptöre bağlanma sonucu cAMP artışı) de düzenlenmektedir. Schaffer kollaterali ve perforan yolları ise LTP oluşumuna etkin bir şekilde katılırlar. CA1 bölgesindeki hücrelerde LTP oluşumunda ise bu bölge ile ilişkili Schaffer kollaterali terminalinden salınan glutamat nörotransmitterinin NMDA tipi reseptörünün aktivasyonu ile düzenlenmekte ve depolarizasyon için çok sayıda afferent akson bağlantısı gereklidir. Post sinaptik hücreye Ca^{+2} akışı için kanal ağzındaki Mg^{+2} uzaklaştırıldıktan sonra Ca^{+2} ' a bağlı serin-treonin protein kinazların (Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinaz ve protein kinaz C) hem de PKA ve tirozin protein kinaz fyn aktivasyonu ile sinaptik iletideki kalıcı artışı başlatır. Bu yoldaki LTP' nin oluşumu eş zamanlı pre ve post sinaptik ateşlemeyi gerektirir. Bu ateşlemedeki tekrarlamalar veya kalıcılık hücrelerin birisinde veya her ikisinde de büyüme sürecinde metabolik değişiklikler gösterir. Ancak LTP oluşumundaki mekanizmalar hala belirsiz olup, post sinaptik bölgede non NMDA (AMPA) reseptör sayısında ve glutamat duyarlılığı yanında presinaptik glutamat sekresyonundaki artış düşünülmektedir. Bununla birlikte LTP, geçici erken ve kalıcı geç faza sahiptir. LTP' nin erken fazı (kısa süreli faz); sadece tek bir alıştırma ile oluşur, 1-3 saat sürer ve yeni protein sentezine ihtiyaç göstermez. LTP' nin geç fazı (kalıcı faz) ise 4 ve daha fazla alıştırma ile oluşup en az 24 saat sürer ve yeni protein ile RNA sentezine ihtiyaç gösterir. Schaffer kollateral ve yosunsu lif yollarında erken (kısa süreli) fazın mekanizmaları oldukça farklıdır. Oysa ki bu 2 yoldaki geç (uzun süreli) fazın mekanizmaları benzer olup cAMP-PKA-MAPK-CREB sinyal yolu ile yeni mRNA ve protein sentezi oluşumunu içerir(80-83).

LTP' nin Oluşum Fazları

LTP' nin erken fazının oluşum modeli

Bu modele göre dentritik sinapslarda NMDA ve non NMDA reseptör kanalları birbirine yakın bulunmaktadır. Normalde düşük frekanslı sinaptik geçişte presinaptik sonlanmadan salınan glutamat hem NMDA hem de non NMDA (AMPA) reseptörlerini etkiler. LTP oluşumu, yüksek frekanslı uyarı ile post sinaptik membran non NMDA (AMPA) reseptör kanalları ile depolarize olurken ve Mg^{+} bloğunun kalkması sonucu NMDA reseptör kanallarından da hücreye Ca^{+2} akışı sonucu Ca^{+2}

bağımlı kinazları (Ca^{+2} / Kalmodülün bağımlı kinaz ve PKC) ve tirozin kinaz Fyn' yi tetikler. Ca^{+2} / Kalmodülün kinaz non NMDA kanallarını fosforlar ve glutamat duyarlılığını artırır ve aynı zamanda diğer sessiz reseptör kanallarının aktivasyonu ile de LTP oluşumuna katkı sağlar. LTP' nin bir kez oluştuktan sonraki devamlılığında post sinaptik bölgeden geri dönüşümlü (retrograt) olarak salınan ve presinaptik bölgeden glutamat sekresyonunu sürekli kılan NO gibi ileticilerin olabileceği düşünülmektedir. Schaffer kollateral ve perforan yoldaki LTP oluşumunda eş zamanlı pre ve post sinaptik hücrelerin ateşlenmesi ile aktiviteye bağlı presinaptik fasilitasyon yer alır (80-82,84).

LTP'nin geç fazının özellikleri

Geç fazın aktivasyonunun gelişmesinin presinaptik transmitter salınımı ve post sinaptik bölgedeki reseptörlerin kümelenmesi ile oluştuğu ileri sürülmektedir. Erken faz LTP' de sinaps sayısı, aktif alan sayısı ve her bir aksiyon potansiyelindeki salınım yapan maksimum vesikül sayısını da içeren yapısal değişiklikler olmadan fonksiyonel (olasılıkla transmitter sekresyonunun artması) değişiklikler görülür. Geç faz LTP' de ise yeni presinaptik salınım alanlarının geliştiğini ve post sinaptik bölgede ise yeni reseptör kümelerinin oluştuğu, yeni protein sentezinin gerektiği düşünülmektedir. LTP' deki genetik girişimler hippocampal yer hücrelerinin özelliklerini yansıtmaktadır. Belirli bir çevre ortamının kognitif mekan haritasının hippocampal ayrı piramidal hücrelerce kodlandığı ve bunların potansiyel yer hücresi olduğu, çevre hareketinde ise lokalizasyona ilişkin olarak farklı yer hücresinin aktiflendiği bildirilmektedir. LTP oluşumuna ait NMDA reseptörüne ilişkin mutasyonların piramidal yer hücrelerinin önceki kodlanmış yer haritalarının aynı mekanda olmasına rağmen değişimine spasyal belleğin kaybına, LTP anormalliklerine ve Schaffer kollateral yolunda LTP eksikliklerine, MWM ' de latensi sürelerinin, öğrenmelerin gecikmesine yol açabildiği mutant fare deneyleri ile gösterilmiştir (80,81,85,86). LTP oluşturulan spasyal haritanın zamanla korunmasını sağlayan sinaptik bir mekanizma olup, eksikliklerinde spasyal bellek olumsuz etkilenmektedir. Morris su tankındaki spasyal bellek testinde su altında gizlenmiş platformun bulunması için spasyal ip uçlarının kullanılması hippocampusu gerektirirken, su üstünde belirgin şekilde görülen platforma ulaşabilmek için gerekli olmadığı belirtilmekte ve bu durum R. Morris tarafından NMDA reseptörünün farmakolojik ajanla blokajında gösterilmiştir. Mutant genlerle hippocampusun CA 1 bölgesindeki piramidal hücrelerin NMDA-R 1 reseptör eksikliğinde bazal iletinin

normal olmasına rağmen LTP bozulmaktadır. Bu bozulma Schaffer kollateral yolu ile sınırlı olsa da MWM testlerinde farelerde spasyal bellek kayıpları oluşmakta ve Schaffer kollateral yolundaki NMDA aracılı sinaptik plastisite ve NMDA kanallarının spasyal bellek için önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca mutant genlere bağlı olarak Ca^{+2} / Kalmodülin bağımlı protein kinazın kalıcı aktifliğinin, hippocampal yer hücrelerinde kalıcılığın kalkmasına ve mekansal bellek yeteneğinin kaybolmasına yol açabileceği bildirilmektedir. LTP' nin çeşitli faz defekleri, belleğin depolanması fazlarındaki defeklere yansımaktadır. Hippokampusta mutant gene bağlı cAMP bağımlı protein kinazın bloklanması ile Schaffer kollateral yolunda LTP' nin geç fazının seçici olarak bozulduğu, bu defekti olan hayvanların öğrenme ve kısa süreli belleklerinin normal olmasına karşın kısa süreli belleklerini uzun süreli kalıcı belleğe dönüştüremediği ve 24 saat sonraki uzun süreli bellek testlerinde kayıplar olduğu ve buna benzer sonuçlar CREB-1 isoformları çıkarılmış farelerde hatta protein sentezinin veya cAMP bağımlı protein kinazın farmakolojik inhibitörlerine maruz kalan farelerde de gösterilmiştir (80,81,83,85,86).

İmplicit Bellek ve Formları

İfade edilemeyen ve bilinç süreçlerine bağlı olmayan, bir çok denemenin tekrarı yolu ile performansa bağlı olarak yavaş bir şekilde oluşan bellektir. Algılama, motor beceriler ile kural ve prosedürlere bağlı belirli öğrenme tiplerini içerir. İmplicit belleğin farklı biçimleri, beyinin farklı bölgelerini içeren farklı öğrenme şekilleri ile kazanılır. **Asosiyatif** ve **non-asosiyatif** olarak iki grupta toplanır (80,81).

İmplicit Belleğin Non-Asosiyatif Formu

Habitüasyon ve **sensitizasyon** olarak 2 gruba ayrılır.

Habitüasyon

Tekrarlı zararsız bir uyarana verilen yanıtın azalmasıdır. Tekrarlanan uyarılarla habitüasyon gelişiminde duysal nöronların ateşlenmesine ve ara nöron ile motor hücrelerde eksitator sinaptik potansiyeli oluşmaktadır. Bu potansiyelin duysal ve ara nöronlarda hem spasyal hem de temporal birikimi motor hücrelerin tekrarlı boşalmalarına yol açar. Ancak duysal nöronların oluşturduğu monosinaptik eksitator potansiyel, ara nöronlarda ve motor nöronlarda gittikçe azalmasına, daha az ateşlenmesi ile refleks yanıtların zayıflamasına neden olur. Duyusal nöronlara bağlı

sinaptik geçiş etkinliğinin azalması, duysal nöronlardaki presinaptik terminalindeki glutamat transmitterinin vesikllerinin sayısında azalma olmasına rağmen nedeni tam olarak belirli değildir. Ancak duysal reseptörlerde ise bir değişiklik oluşmamaktadır. Habitsyondaki kısa süreli bellek oluşumunda yer alan selüler mekanizma, sinaptik bağlantıların fonksiyonel gücündeki kalıcı plastik değişiklikleri içerir. Sinaptik bağlantıların zayıflaması duysal ve ara nöronlar tarafından oluşturulmakta veya her ikisinin habitsyon için ortak bir mekanizmasının bulunduğu düşünülmektedir. Habitsyonun altında yatan mekanizmalar iki şekilde değişebilir. Bunlar sinaptik zayıflama herhangi bir sinaptik alanda yer alabilmesi olup, refleksin motor nöronları ile ilişkili belirli ara nöronlarda bulunduğu düşünülmektedir. Homosinaptik zayıflamadan başka diğer mekanizmalar, sinaptik inhibisyon artışında olduğu gibi habitsyon oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Aralıksız yapılan toplu alıştırma çalışmalardaki uyarılar kısa süreli bellek oluşumuna yol açarken, aralıklı yapılanların ise uzun süreli bellek oluşumunda daha etkili olduğu bildirilmektedir (80,81,87,88).

Sensitizasyon

Tekrarlı zararsız uyarılara karşı alışarak renmedir. Sinaptik iletideki presinaptik fasilitasyonu içerir. Bunun aksine, renmek için zararlı bir uyarana verilen şiddetli tepki aynı anda diğer zararsız uyarılara karşı da uygulanmış olur. Sensitizasyonda zararlı bir uyarana karşı sinaptik iletkenlik artışı olurken, habitsyonda ise aynı sinapslarda azalma görülür (80,81,84,88).

Non-asosiyatif İmplit Bellekte Hüresel Mekanizmalar

Habitsyon ve sensitizasyonda sinaptik değişikliklerin oluşumunda farklı hüresel mekanizmalar kullanılır. Kısa süreli habitsyon homosinaptik bir süreç olup sinaptik gücün azalması ise duysal nöronların ve onların refleks yollarındaki merkezi bağlantılarının direk aktivasyonunun bir sonucudur. Bunun aksine sensitizasyon ise heterosinaptik bir süreç olup, sinaptik gücün artması ara nöron aktivasyonunun düzenlemesine bağlıdır. Ara nöronlarda düzenleyici gruplardan en iyi incelenmiş olanı serotonin salınımıdır. Serotonin ve duysal nöronlardaki diğer ara nöron düzenleyici sinapslar presinaptik terminalindeki akso-aksonal sinapsları içerir. Tek bir uyarı ile ara nöronlardan serotonin ve diğer düzenleyici transmitterlerin sekresyonu ile heterotrimetrik GTP bağımlı proteinin aktivasyonuna yol açar. Bu ise adenilat siklaz (AS) ile ikincil haberci siklik adenosin mono fosfat

(cAMP) oluşumu ve protein kinaz A (PKA) aktivasyonu oluşur. PKA, protein kinaz C (PKC) ile birlikte çok sayıda substrat proteinin fosforilasyonu sırasında birkaç dakika süre ile duyuşal nöronların terminalinden transmitter sekresyonunu arttırmaktadır. Sensitizasyon uyarısının tekrarlanması günlerce süren bağlantıların güçlenmesine yol açar (80,81,88).

İmpilisit Belleğin Asosiyatif Formları

Klasik ve operan koşullanma şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Klasik Koşullanma

Etkisiz bir uyarana duyarlı olma şekli olup, koşullu ve koşulsuz uyarının eşleştirilmesini içermektedir. Koşulsuz uyarılar, doğuştan veya öğrenilmeden oluşturulurken (tükrüğün gelmesi gibi) koşullu uyarı ise yeni veya farklı bir tepki oluşturur. Koşullu uyarıyı koşulsuz uyarı izlerken, tekrarlı eşleşmeleri, koşulsuz uyarı için ileriye dönük bir sinyal beklentisine yol açar. Klasik koşullanma, sinaptik iletkenlikte presinaptik fasilitasyonu içermekle birlikte hem presinaptik hem de post sinaptik aktivasyona bağlıdır. Koşullu uyarıda, her bir potansiyel aktivasyon ile presinaptik duyuşal nöron içine Ca^{+2} akışı ile Ca^{+2} -kalmodülin protein aktiflenirken aynı zamanda koşulsuz uyarana bağlı serotoninin reseptörüne bağlanması ile de G protein aktivatörü (Gas) aktiflenir. Ayrıca AS ile cAMP artışı, serotonin yanıtının güçlenmesine yol açar. Klasik koşullanmanın post sinaptik bileşeni duyuşal nöronuna geri dönen sinyaldir. Klasik koşullanmadaki refleks yolun post sinaptik motor hücreleri Non-NMDA ve NMDA tipi glutamat reseptörlerini içerir. Aksiyon potansiyeli ile NMDA tipi reseptör kanalından Mg^{+2} uzaklaştırılarak hücreye Ca^{+2} akışı ile motor hücrede sinyal yollarını aktive etmesi ile oluşan sinyalin duyuşal nöronlara geri dönüşünün presinaptik bölgeden daha fazla nörotransmitter sekresyonunu arttırdığı düşünülmektedir (80,81)

Operan Koşullanma

Pekiştirilmiş bir olay ile belirli bir davranışın ilişkilendirilmesini içermekte olup davranışlar belirli bir uyarı olmadan veya spontan olarak meydana gelir ve seçicilikten daha yaygındır (ödüllendirmeye bağlı davranışların tekrarlanması) (80,81).

İmplicit Belleğin Uzun Süreli Depolanması

Uzun süreli implicit bellek kalıcı sinaptik bir artıştır. Klasik koşullanma ve sensitizasyondaki implicit belleğin uzun süreli depolanması cAMP-PKA-mitojenik aktivasyonlu protein kinaz (MAPK) – cAMP' ye yanıt elementini bağlayan protein (CREB) yolağını içermektedir. Tekrarlanmış deneyimlerin kısa süreli biçimden uzun süreli biçime dönüşmesi ile bellek konsolide hale gelir. Bu fizyolojik sonuçlar sensitizasyon için tekrarlanmış denemelerle en iyi çalışılanı olup tek bir deneme ile birkaç dakika süren kısa süreli sensitizasyon oluşur ve yeni bir protein sentezi gerektirmezken daha fazla denemeler ise günlerce süren uzun süreli sensitizasyona yol açar ve yeni bir protein sentezi oluşumunun yanında PKA' nın kalıcı aktivasyonu ile yeni sinaptik bağlantıların gelişim şekillerindeki yapısal değişiklikleri içerir (80,81,84,87,88). Kısa süreli fasilitasyonda serotonin ile AS–cAMP-PKA aktiflenmesi sonucu hedef proteinlerin kovalent modifikasyonu transmitter sekresyonu ve kullanımında artışa yol açmaktadır. Uzun süreli fasilitasyonda ise cAMP-PKA-MAPK-CREB yolu aktiflenir. CREB ise ubiquitin hidrolaz ve transkripsiyon faktörü güçlendirici bağlayıcı protein (C/EBP)' i kodlayarak DNA yanıt elementine (CAAT)' a bağlanma sonucunda yeni sinaptik bağlantıların gelişmesinde yer alan proteinleri kodlayan genleri aktive eder. Buradaki fasilitasyonun ilk basamağında aktivatör CREB-1 ve inhibitör CREB-2 transkripsiyonunun olması, bilgilerin uzun süreli belleğe alınma eşliğinde yüksek bir düzenlemenin olduğu ileri sürülmektedir (80,81,85,86). cAMP aktiviteli gen ekspresyonunun önlenerek, öğrenme ve kısa süreli belleği etkilemeden uzun süreli belleğin selektif bir şekilde bloke edilebildiği aksine aktivatör CREB' in aşırı ekspresyonunun ise anında uzun süreli bellek oluşumuna yol açabildiği bildirilmektedir (84,85,86). Uzun süreli sensitizasyonda sadece duysal nöronlarla sınırlı olmayan presinaptik terminal sayılarının arttığı, motor nöronların dentritlerinde ise sinaptik girişlere uyumlu yapısal değişiklikler olduğu ve bunların kısa süreli sensitizasyonda oluşmadığı bildirilmektedir. Uzun süreli habitüasyon ise bunun aksine sinaptik bağlantıların azalmasına yol açar (80,81,84). Duyusal ve motor nöronlar arasındaki fonksiyonel bağlantıların uzun süreki inaktivasyonun ise presinaptik terminal sayılarının 1/3 oranında azalmasına ve aktif zondaki terminallerinin oranının ise % 40 ' dan % 10' a düşmesine yol açtığı belirtilmektedir (84,85).

Kısa süreli bellek (işleyen bellek)

Eksplisit bilgilerin kodlanması ve geri çağırılması için gereklidir. Dorsal prefrontal korteks santral sulkusa uygun şekilde sulkus çevresindeki korteks, ön ve arka sulkus olmak üzere bölgelere ayrılmış olup, her bir bölge işleyen bellek ve motor planlama ile ilişkilidir. Bununla birlikte nesnelerin şekil ve renklerine ait işleyen bellek bilgileri santral sulkusun ön bölgelerinde depolanır. Sulkusun arka bölgesi ise nesnelerin mekansal yeri hakkındaki bilgileri depolar. Prefrontal kortekste bazı nöronların ise nesnelerin şekli ve mekansal konumuna ait bilgileri birleştirebildiği ileri sürülmekte olup bu nöronların prefrontal korteksin hem dorsolateral hem de ventrolateral bölgesinden girdiler aldığı ve bu bölgelerin görsel ve mekansal bellek ile ilişkili olduğu PET (pozitron emisyon tomografisi) ile gösterilmiştir. Posterior pariyetal asosiyasyon korteksinin mekansal algılama ile ilgili olup, prefrontal korteks ile olan bağlantılarında ise işleyen bellek, el ve göz hareketlerinin sürdürülmesinde motor planlama ile motor alanlarının ilişkisini kapsamaktadır (80,81,89,90).

Öğrenmenin ve Belleğin Test Edilmesi

Morris Su Tankı Modeli (MWM)

Richard Morris tarafından geliştirilmiş, laboratuvar ortamında kemirgenlerin hipokampus bağımlı spasyal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesinde tanımlanmış bir modeldir. Su ile doldurulmuş ve dört kadrana ayrılmış geniş bir havuz ve içinde bulunan bir platformdan oluşmaktadır. Havuzun çevresinde hayvanın görebileceği ipuçları vardır. Platform görünür ve gizlenmiş şekillerde yerleştirilir. Test modern otomatik monitorizasyon sistemleri ile kayıt edilir. Deneme blokları ile platformun yerinin saptanması sağlanarak çalışma belleği test edilir. Platformun kaldırılması ile serbestçe yüzerek platformun bulunduğu önceki kadranı bulması ile referans belleği ölçülür. Doğru kadrana için alınan yol miktarı, bu kadrandan geçiş sayısı ve kadranda kalma süresi değerlendirilir (91).

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Hayvanlarının Bakım Şartları ve Gruplara Ayrılması

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Deney Hayvanları Ünitesi laboratuvarında gerçekleştirilmiş olan in vivo çalışmalarda 2,5-3 aylık ortalama 200-250 gr 60 adet genç erkek Wistar albino türü sıçan kullanılmıştır. Deney süresi boyunca hayvanlar ortam ısısı $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ olan ve %60-70 nem oranında havalandırılan, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü otomasyonuna sahip olan Deney Hayvanları Ünitesi Laboratuvarında barındırılmıştır.

Hipotezimizi test etmek için SOX yetersizlikli ve HHcy' li sıçan modeli oluşturuldu. Deney Hayvanları Ünitesi'nden alınan toplam 60 adet genç erkek sıçan, önce SOX enzimi açısından normal ve yetersizlikli oluşturulmak üzere her bir grupta 30'ar adet olacak şekilde 2 büyük gruba ayrılmıştır. Bu iki ana gruptaki hayvanlar da rastgele olarak her bir grupta 15'şer adet sıçan olacak şekilde dağıtılarak aşağıda belirtilen 4 alt grup oluşturulmuştur.

1) SOX enzim aktivitesi normal gruplar

a) Kontrol grubu: SOX enzim aktivitesi normal kontrol grubu (K)

b) Homosisteinemik grup: SOX enzim aktivitesi normal endojen homosistein düzeyi arttırılmış grup (KM) (1 g/kg Methionin)

2) SOX enzim yetersizliği oluşturulan gruplar

a) Kontrol grubu: SOX enzim aktivitesi olmayan kontrol grubu (SOXD)

b) Homosisteinemik grup: SOX enzim aktivitesi olmayan endojen SO_3^- ve Hcy düzeyi arttırılmış grup (SOXDM) (1 g/kg Methionin)

SOX enzimi normal gruplarda tek başına endojen olarak artan Hcy düzeyinin olası nörotoksitesisi incelenirken, SOX enzim yetersizliği oluşturulan gruplarda Hcy ve SO_3^- 'in birlikte endojen artışının olası toksitesisi incelenmiştir. Daha önceki bizim ve diğer araştırmacıların çalışmalarında SOX yetersizlikli sıçan modelinin oluşturulması ile hayvanların genel sağlığının bozulmadığı ve gerek endojen gerekse de eksojen SO_3^- 'in etkilerinin incelenmesi için uygun bir model olduğu görülmüştür. Buna uygun olarak 15'şer adet sıçandan oluşan 4 ayrı gruba (K, KM,

SOXD, SOXDM) beslenme programı düzenlenmiştir. K grubuna 8 haftalık beslenme süresince normal yem ve içme suyu verilmiştir.

Deneysel Hayvan Modellerinin Oluşturulması

SOX Yetersizliği Olan Sıçan Modeli

Gunnison ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu metod ile yetersizliğin oluşturulması, enzimin kofaktörü ve esansiyel bir element olan molidenyum'un (Mo) diyetten çıkarılması ile birlikte dışarıdan tungsten (W) verilerek Mo'un yerine W'in geçmesi esasına dayanır (92). Bu çalışmada diyetten Mo çıkarılması işlemi sıçanlar için oluşturulmuş ve Amerikan Gıda Enstitüsü (American Institute of Nutrition) tarafından 1976 yılında kabul edilmiş özel bir yem kullanarak gerçekleştirilmiştir. Literatürde bu diyetin adı American Institute of Nutrition'ın baş harflerinin kısaltmaları ve yine bu enstitü tarafından kabul edildiği yıla (1976) atfen AIN-76 olarak geçmektedir ve teorik olarak hiç Mo içermemektedir. Hayvanların içme sularına 200 ppm dozunda W ilave etmek sureti ile yeni SOX enzimi sentezi esnasında W'in enzimin aktif bölgesi için Mo ile yarışmaya girerek onun yerine bağlanması amaçlanmıştır. SOX yetersizliğinin gelişip gelişmediği, hayvanların 3 hafta boyunca yukarıdaki gibi beslenmesini takiben karaciğer SOX enzim aktivitesinin ölçümü ile kontrol edilmiştir. Yetersizliğin teyidini takiben 3. haftadan sonra hayvanlar 8 haftalık deney süresince yine yukarıda tarif edildiği şekilde beslenmesi sağlanmıştır.

HHcy'li Sıçan Modeli

Bu uygulamada sıçanların içme suyu takibi yapıp günlük su tüketim miktarı ölçülmüştür. Deney süresince günlük içme su miktarlarının sıçan başına 15-30 ml/gün olduğu görüldü. Bağı ve arkadaşları sıçanların içme suyuna 1 g/kg/gün dozda methionin amino asidinin ilave edilmesi ile ortalama olarak 6 µM olan Hcy düzeyinin yaklaşık 5 kat artarak 30 µM düzeyine yükseldiğini göstermişlerdir (93). Aynı metodoloji ile HHcy'li sıçanlar oluşturulmuştur. Ancak SOX enzim yetersizlikli HHcy'li sıçan modeli oluşumuna ait gruptaki sıçanlardan 2 adetinin başka nedenlerden dolayı öldüğü görüldü ve SOXDM grubunda kalan 13 sıçan ile çalışmalar sürdürülmüştür.

Deneysel Uygulamadaki Çalışma Parametreleri

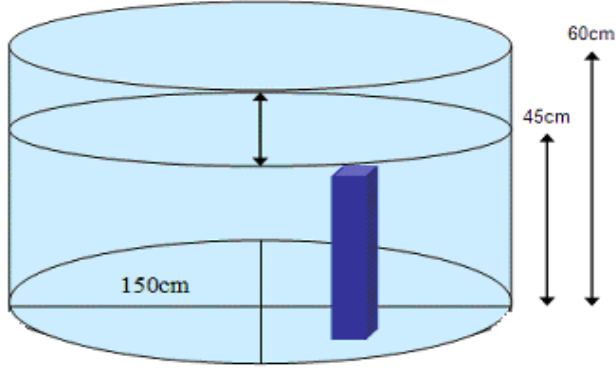
Morris Su Tankında Öğrenme ve Bellek Testleri

Tüm öğrenme deneylerinde doğru sonuçlara varmak deneklerin sağlam motor fonksiyonları varsa mümkün olmaktadır. Araştırmamızda motor fonksiyon değerlendirmesi Morris Su Tankında velosite ölçümü yapılarak kontrol edildi. Spasyal öğrenme deneyleri Morris su tankında yapıldı. Bu denemeler günün aynı saatinde gerçekleştirildi. Bu tank 150 cm çapında ve 60 cm derinliğinde Morris tarafından tanımlanmış dairesel bir yapıdır (94). Koyu siyah renkte olan tank, yönlerle ifade edilen (kuzey, güney doğu ve batı) 4 eşit kadrana bölünerek içerisine 45 cm yüksekliğe ulaşana kadar çeşme suyu ile dolduruldu. Denemeler süresince su ısısu tankın dibinde bulunan bir termostat sistemi ile 22°C'de sabit tutuldu Pleksiglas materyalden yapılmış 12 cm × 12 cm boyutlarında ve 45 cm yüksekliğindeki platform, yüzeyi su yüzeyinden 1.5 cm kadar yüksek olacak şekilde su tankının belirlenen güneydoğu kadranınin merkezi bölümüne yerleştirildi (Bkz.Şekil 4). Tankın merkezi noktasında tavanda bulunan bir kamera ile aşağıda belirtilen parametrelerin ölçümü için kaydedilen görüntü bilgisayara gönderilerek ve Ethovision 3.1 bilgisayar programıyla bilgisayarda analiz edildi. Su tankındaki deneysel aşamalar bilginin kazanıldığı (Acquisition phase) ve hatırlandığı (probe trial) fazların ölçüldüğü kısımlardan oluşmaktadır.

Bilginin Kazanılması (Acquisition) Fazı

Bilginin kazanılmasını içeren öğrenme performansının ölçüldüğü bu fazda platform olmadan sıçanların sırası ile her kadrandan bırakılmak sureti ile günde 1 kez olmak üzere 2 gün süre ile günün aynı saatinde serbest yüzmesi sağlandı.

Gruplardaki tüm sıçanlar deneme çalışmaları süresince aynı kadrana sırasına göre yüzü tank duvarının iç yüzüne bakacak şekilde sırası ile dönüşümlü olmak üzere yönleri belirten noktalardan kadrana bırakıldı



Şekil 3. Öğrenme ve bellek testinde kullanılan su tankının özellikleri

Serbest yüzme sonrası platform aynı kadranda 5 günlük süre ile su seviyesinin 2 cm. altında gizlenmiş (hidden) olarak GD kadranın ortasına yerleştirildi. Bu fazda sıçanlar 5 gün boyunca her gün aynı saatte olmak üzere ve günde bir kez 3 ayrı yönden tanka bırakılarak tankın içinde sabit kadrandaki platforma ulaşmaları için 120 saniye boyunca beklendi. Platforma ulaşan denek 30 sn boyunca orada tutulduktan sonra tanktan alınarak kafesine kondu. Her deneme sıçan platforma tırmandığında sona erdi. Sıçan 120 sn içinde platformu bulamadı ise sudan alınarak platformun üzerine bırakılarak 15 sn bekletildi. Her sıçanın, 5 gün boyunca süren denemelerdeki performansları, deneğin platforma ulaşması için geçen zaman (Escape Latency; EL), platforma ulaşmak için kullandığı yol uzunluğu (Path Length; PL) ve hızı (Velocity; V) olmak üzere üç parametre ile değerlendirildi.

Kazanılan Bilginin Hatırlanması(Probe Trial) Fazı

Bilginin kazanıldığı (Acquisition) fazının bitimini izleyen 1.gün ve 5.gün olmak üzere kazanılan bilginin hatırlanması(Probe Trial) fazı 2 kez gerçekleştirildi. Bu fazda ise tank içerisindeki gizli platform kaldırıldı. Tüm gruptaki sıçanlar günün aynı saatinde aynı kadrana sıralamasına göre yüzleri su tankının iç yüzüne dönük şekilde tanka bırakılarak 120 sn.süre ile yüzdürüldüler. Daha önceden gizli platformun bulunduğu GD kadranda geçirdikleri süre (Güney Doğu Escape Latency; GDEL), GD kadranda aldıkları yol (Güney Doğu Path Length; GDPL), güney doğu kadranda kaç kez görüldükleri (Güney Doğu Frekans; GD frekans), platformun bulunduğu alanda kaç kez görüldüklerine (Platform Frekans; PLT frekans) ait verileri kaydedilerek değerlendirildi.

Deney Hayvanlarından Doku örneklerinin Alınması

Morris su tankındaki yüzdürülen ve öğrenme ile bellek performans testleri gerçekleştirilen sıçanların ölçülen vücut ağırlıklarına uygun olarak ketamine hydrochloride (100 mg/ml) ve xylazine hydrochloride (20 mg/ml) anestezi preparatlarının karışımından 0.75 ml/kg dozunda intrperitoneal enjeksiyonla anestezisi sağlandı. Hemen sonra orta hat kesisi yapılarak abdominal aortalarından tüm kanları alınarak ötenaziye uğratıldı. Alınan kan örnekleri santrifüj edilerek (1400 x g, 6 dakika, Hettich Universal 320) total antioksidan düzey (TAD), total oksidan düzey (TOD), homosistein ve sülfid düzeylerinin ölçümü için serumlarının ayrılması sağlandı ve ölçüme dek -80°C da (Nuair Ultralow Freezer, Spain) muhafaza edildi. Bu şekilde ötanaziye uğratılan hayvanların karaciğer ve beyin dokuları zaman kaybedilmeden hızla çıkartılarak hippokampus dokusunda TAD ve TOD düzeyleri için karaciğerleri de SOX enzim aktivitesinin ölçülmesi için kullanılıncaya kadar yine -80°C de muhafaza edildi.

Doku Homojenizasyonu

Deneklerden çıkarılan beyin ve karaciğer dokusunda homojenizasyon işlemleri hazırlanan EDTA'lı (etilendiamintetraasetikasit)fosfat tamponunda gerçekleştirildi. Bu tampon için; Stok A: 24 gr. NaH_2PO_4 (M.A;120 gr.) tartılarak 100 ml. distile su içinde çözüldü. (2 M) Stok B: 28.4 gr. Na_2HPO_4 (M.A; 141.96 gr.) tartılarak 100 ml. distile su içinde çözüldü (2 M). 19 ml. Stok A ve 81 ml. Stok B den olacak şekilde 200 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde 1 M.lık fosfat tamponu hazırlandı. 50 µM.fosfat tamponu için 50 ml. alınarak pH' sı 7,4 olacak şekilde 1000 ml'ye tamamlandı. 3.72 gr. EDTA tartıldı ve 10 ml. de çözülerek 1 M' lık çözeltiden fosfat tamponu için 1000 ml'sine 100 ml't koyularak içinde 0,1 µM EDTA olan çözelti oluşturuldu. 50 µmol fosfat tamponunda her 50 µl'te. 1 adet EDTA tableti konuldu.

Hippokampus Homojenatının Hazırlanması

Deney hayvanlarının çıkarılan beyin dokularından alınan sağ hippokampusları homojenize edildi. Bunun için her 50 µl'te. 1 adet EDTA tableti içeren 50µmol fosfat tamponundan alınan 2 ml.sıvı içinde homojenizasyon aletinde 10 kez karıştırılarak homojenizasyon sağlandı. Daha sonra +4°C'de 12.000 rpm' de 15 dk.süre ile santrifüj edilerek süpernatant oluşturuldu. Hippokampus homojenatında TAS ve TOS düzeyleri ölçülünceye kadar -80°C de muhafaza edildi.

Karaciğer Homojenatının Hazırlanması

Bunun için karaciğer doku örneklerinden 0.5 gramı tartıldı ve homojenizasyon için hazırlanan 50µmol fosfat tamponu için her 50 µlt.ye 1 adet EDTA tableti konuldu.Daha sonra 4,5 ml fosfat tamponu içinde 15 kez homojenize edildi. Homojenat +4°C de santrifüj edilerek (2100 g, 10 dakika) süpernatant elde edildi ve karaciğer SOX aktivitesinin ölçümüne kadar -80 °C de muhafaza edildi.

Karaciğer SOX Aktivitesinin Ölçümü

Cohen ve Fridovich'in tarif ettiği şekilde ölçüldü (25). Ölçümün prensibi, SOX aktivitesi ile SO_3^- e bir oksijen daha eklenerek sülfat (SO_4^{-2}) oluşması ve bu esnada açığa çıkan bir elektronun, sitokrom C'de bulunan okside demir (Fe^{+2}) tarafından alınarak redüksiyona uğramasıdır. Okside formdan redükte forma geçen demirin yaptığı absorpsiyon artışı SOX aktivitesi ile doğru orantılıdır. Karaciğer dokusundan elde edilen süpernatantın 900 µL' sine 100 µL Triton X 100 eklendikten sonra fosfat tamponu ile 10 ml'ye tamamlandı. Enzim ekstraktı hazırlamak için yapılan bu ön işlemlerden sonra spektrofotometre kuvetine aşağıdaki tabloda belirtilen sıra ve miktarlarda reaktifler ilave edilerek ilk 3 dakikası otooksidasyon olmak üzere toplam 9 dakika boyunca spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda oda sıcaklığında SOX aktivitesi kaydedildi. Karaciğer SOX aktivitesinde kullanılan reaksiyon karışımının bileşenleri tablo 2.de gösterilmiştir.

Tablo 2. Wistar Albino cinsi sıçanların karaciğer homojenatındaki SOX aktivitesinin tayini için gerekli reaktifleri

İçerik Stok Solusyonlar	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
Tris-HCl (pH:8,50, 50 mM)	1,6	80m
Sitokrom c (0,2 mM)	0,5	1mM
Süpernatant	0,2	
KCN(10 mM)	0,1	1 mM
Na ₂ SO ₃ (0,01 mM)	0,1 (3.dakikadan sonra)	0,001mM
Distile Su	3 ml'ye tamamlama	
Toplam hacim	3ml	

Enzim aktivitesinin ölçümünde gerekli olan sitokrom c'nin hazırlanması işleminde 0,2 µM.sitokrom c (M.Ağırlığı:12380 gram)den 0,025 gr.tartılarak 10 ml. 0,1M.Tris HCL içinde çözüldü. Sonuçlar karaciğerden elde edilen süpernatandan Lowry yöntemine göre protein ölçümü yapılarak ünite/mg protein olarak ifade edildi. Absorbanstaki 0.100 birimlik artış 1 ünite SOX aktivitesi olarak belirtildi (96).

Protein Miktarının Ölçümü

Wistar Albino sıçanlara ait dokulardan elde edilen homojenatların protein miktarı tayini, BSA (sığır serum albumin) standart olarak kullanılarak Lowry(1951)'nin metoduyla yapıldı. Bu metod, alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tinosin artıklarının bakır ile kompleks oluşturması prensibine dayanır (96). 1:10 veya 1:20 oranında seyreltilmiş olan fraksiyonlar test tüplerine 50µl hacimde alındı. Sonra %2'lik bakır sulfat, %2'lik sodyum potasyum tartarat ve %2'lik sodyum karbonat içeren 0,1 N NaOH'in 1:1:100 oranında karışmasıyla oluşan 200µl alkali bakır reaktifi ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, deiyonize distile su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) reaktifinden her bir tupe 20µl ilave edildi. Folin reaktifini koyar koymaz hemen karıştırıldı ve 10 dakika daha inkübe edildi. Oluşan rengin şiddeti her bir tüp için 660 nm'de köre karşı ölçüldü. Protein miktarları elde edilen eğim değeri kullanılarak hesaplandı.

Serum homosistein ve sülfid Ölçümü

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC-FD) Yöntem Şartları

Tablo 3. HPLC-FD çalışmasında, homosistein ve sülfid için uygulanan kromatografik yöntem şartları sırasıyla aşağıda verildi.

YÖNTEM ŞARTLARI	
Kolon	C ₈ (250x4.6 mm,5µm)
Dedektör	Floresans
Dalga boyu	480 (Emisyon) 392 (Uyarma)
Mobil faz	A: metanol B: metanol,asetonitril ve su(5:0.25: 94.75; h/h/h, pH:3.4) %90A-%10 B izokratikelüsyon
Kolon sıcaklığı	Değişken
Kolon akış hızı	1ml/dak
Enjeksiyon hacmi	20µl

Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Homosistein ve Sodyum Sülfid Stok Çözeltisi

Sodyum sülfid stok çözeltisi (1 mmol/L) için 12 mg tartıldı ve 100mL'lik balon jøjeye koyuldu. Bir miktar su ile madde çözülüp 100mL'yedeiyonizesu ile tamamlandı. L-homosisteinstok çözeltisi (1 mmol/L) için 6.76 mg g tartıldı ve 50mL'lik balon jøjeye koyuldu. Bir miktar deiyonizesu ile madde çözülüp 50mL'yesu ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti -20°C'de saklandı.

0.05 M Tris (pH: 8.5) ve 2M Tris Çözeltisi

0.05 M için 0.394 g 2M için 15.76 g tris tartıldı ve 50 mL'lik balon jöjeye koyuldu. Bir miktar deiyonize su ile madde çözüldü. pH-metre kullanılarak pH'sı 8.5'e ayarlandı ve 50 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı

0.212 M NaBH₄ Çözeltisi

0.4 g NaBH₄ tartıldı ve 50 mL'lik balon jöjeye koyuldu. Bir miktar 0.05 M tris (pH:8.5) çözeltisi ile madde çözüldü ve 50 mL'ye aynı çözelti ile tamamlandı.

46 mM Monobromobiman Çözeltisi

25 mg monobromobiman tartıldı ve 2 mL'lik balon jöjeye koyuldu. Bir miktar asetonitril ile madde çözüldü ve 2 mL'ye asetonitril ile tamamlandı.

M HClO₄ Çözeltisi

4.51 mL HClO₄ alındı ve 50 mL'lik balon jöjeye koyuldu. 50 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

Homosistein-biman ve Sülfid-biman Komplekslerin kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması

Eppendorf tüpüne 100 µL blank plazma örneği koyuldu ve homosistein ve sülfid için final derişimi 0.2-30 µmol/L (nihayi derişim homosistein için 0.65-30.45 µg/mL ve sülfid için 0.5- 30.5, çünkü çalışılan boş plazma 0.45 µg/mL endojen homosistein ve 0.3 µg/mL endojen sülfid içermektedir) olacak şekilde uygun derişimlerde 20 µL homosistein ve 20 µL sülfid çözeltileri eklendi ve karıştırıldı. Bu karışıma 70 µL 0.212 M NaBH₄ ve 15 µL 46 mM monobromobiman eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra elde edilen çözelti 7 dakika 80°C de inkube edildi. Daha sonra karışım soğutuldu ve 50 µL HClO₄ çözeltisi ilave edildi. Ağız kapatılarak 25 °C'de 12400 g de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çözelti 20 µL 2 M tris ile nötrale edildiikten sonra tekrar 12400 g de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant viallere koyuldu ve HPLC-FD sistemine 20 µL enjeksiyon yapıldı.

Örnek Hazırlama

Eppendorftüpüne 100 µL plazma örneği koyuldu ve 40 µL deiyonize su eklendi ve karıştırıldı. Bu karışıma 70 µL 0.212 M NaBH₄ ve 15 µL 46 mM monobromobimane eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra elde edilen çözelti 7 dakika 80°C de inkube edildi. Daha sonra karışım soğutuldu ve 50µL HClO₄ çözeltisi ilave edildi. Ağzı kapatılarak 25 °C'de 12400 g de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çözelti 20 µL 2 M tris ile nötralize edildikten sonra tekrar 12400 g de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant viallere koyuldu ve HPLC-FD sistemine 20 µL enjeksiyon yapıldı.

Total Antioksidan Düzey (TAD) ve Total Oksidan Düzey (TOD) Ölçümü

TAD ölçümü

Ölçümün prensibi örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi-yeşil ABTS radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Örneğin absorbansındaki değişiklik onun antioksidan düzeyi ile orantılıdır. Deney sonunda elde edilen hippocampus homojenatlarında ticari bir kit aracılığıyla (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) çalışıldı. Deneklerin hippocampus ve plazma total antioksidan kapasite düzeyleri 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar µmol Trolox Equiv/mg protein başına ifade edildi.

TOD ölçümü

Ölçümün prensibi örneğin içindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyonla dönüşümünün sağlanması ve bunun da asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girerek absorbans artışına sebep olmasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak izlenen absorbans artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır. Deney sonunda hippocampus homojenatlarında ticari bir kit aracılığıyla (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) çalışıldı. Örnekte bulunan oksidanların (lipidler, proteinler vb) miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti 492 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar µmol H₂O₂ Equiv./mg protein başına ifade edildi. Proteinler Lowry yöntemine göre ölçüldü (96).

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Oksidatif stres düzeyinin bir diğer göstergesi hesapla elde edilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'dir. Bu indeks çalışmamızda elde edilen TAS ve TOS değerleri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{OSİ} = \text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv/L}) / \text{TAS } (\mu\text{mol Trolox Eqv/L}) \times 100$$

İstatiksel Analiz

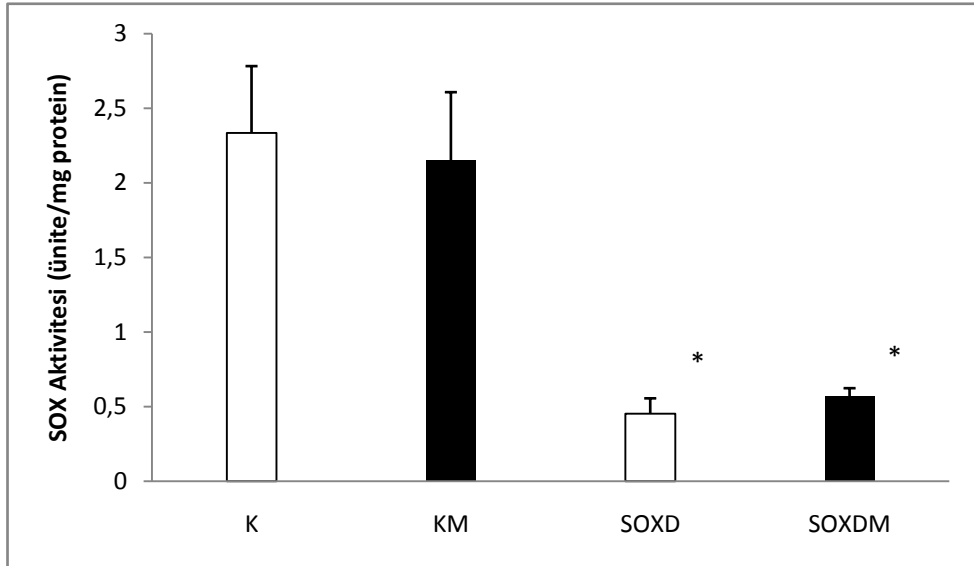
Veriler Ortalama \pm Standart Hata (Ort \pm SH) olarak ifade edildi. Tekrarlayan ölçümler için gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar SPSS paket istatistik programı kullanılarak "repeated measures ANOVA" ve onu izleyen "Tukey" testi ile, ortalamalar arasındaki fark ise "one way ANOVA" ve onu izleyen "Tukey" testiyle değerlendirildi. P değeri 0,05 den küçük veya eşit ($p \leq 0.05$) olan bulgular istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Gruplarda yeralan sıçanların 8 haftalık deney süresince maruz kaldıkları Hcy ve SO_3^- e ait görülebilir toksik etkiler oluşmamıştır. Bu süreçte SOXDM grubuna ait 2 adet sıçan ise farklı nedenlerden dolayı ölmüştür.

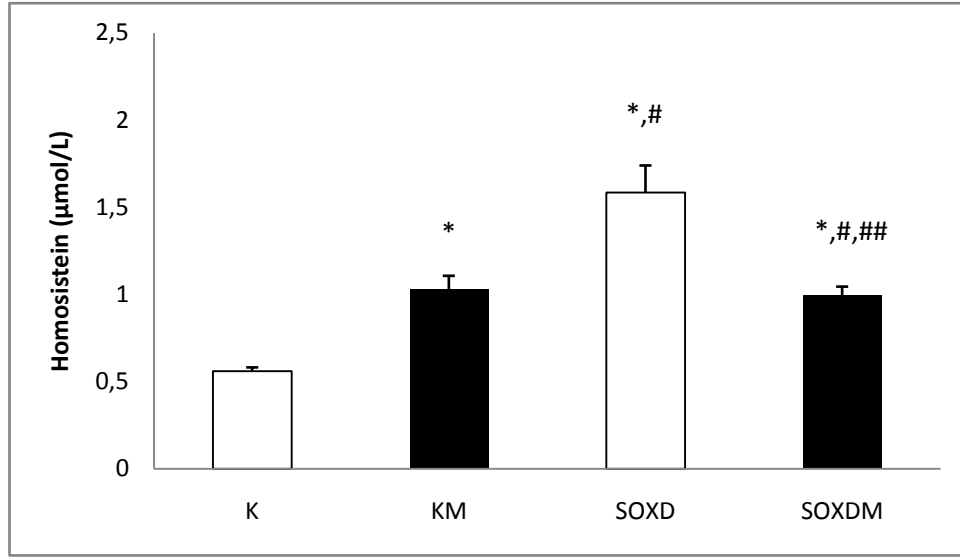
SOX enzim eksikliği verileri

K ve KM grubu hariç SOXD ve SOXDM gruplarına yönelik SOXD enzim eksikliği oluşumundaki deneysel çalışma süresince sıçanların içme sularına tungsten (W) konulması yanında molibdenyum içermeyen beslenme diyeti ile 3 haftalık bir süre sonunda SOX enzim eksikliği sağlandı. Daha sonra 8 haftalık deneme sürecinde bu beslenme şekline devam edildi. Bu süre sonunda karaciğer SOX enzim aktivitesi K grubuna göre, KM grubunda düşük görülmesine rağmen anlamlı olmadığı, SOXD ve SOXDM gruplarının ise anlamlı olarak düşük olduğu bulundu ($p \leq 0.05$). (şekil 5). KM grubuna göre SOXD ve SOXDM gruplarında ise anlamlı olarak düşük bulundu. ($p \leq 0.05$). SOXD ve SOXDM grupları arasında ise SOXD grubunda daha düşük görülmesine rağmen anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$).

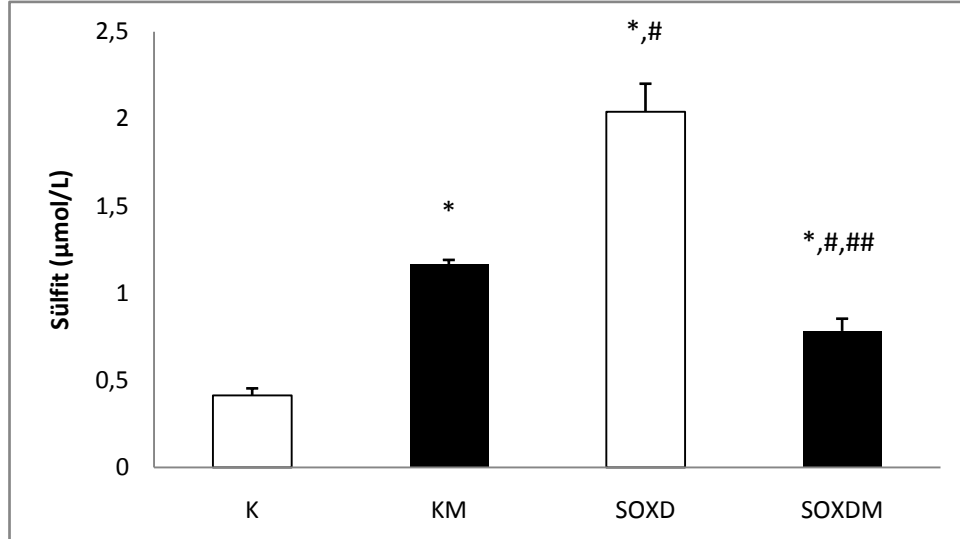


Şekil 4. SOX enzimi normal ve yetersizlikli grupların 8 haftalık deney süresi sonunda ölçülen karaciğer SOX enzim düzeyleri. *: $p < 0,0001$ düzeyinde sülfat oksidaz normal gruplardan fark. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama \pm standart hata; $n=15$, K, KM, SOXD grupları için, $n=13$, SOXDM grubu).

Deney sonunda elde edilen serumlarda, homosistein düzeyinin methionin verilen normal grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. SOX yetersizlikli grupta, homosistein düzeyinin normal gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış, methionin verilmesinin ise bu artışı istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde tersine çevirdiği görülmüştür. Serum sülfid düzeylerinin ise gruplardaki homosistein artış ve azalış kalıbının aynısı olduğu izlenmiştir. (Şekil 5,6)

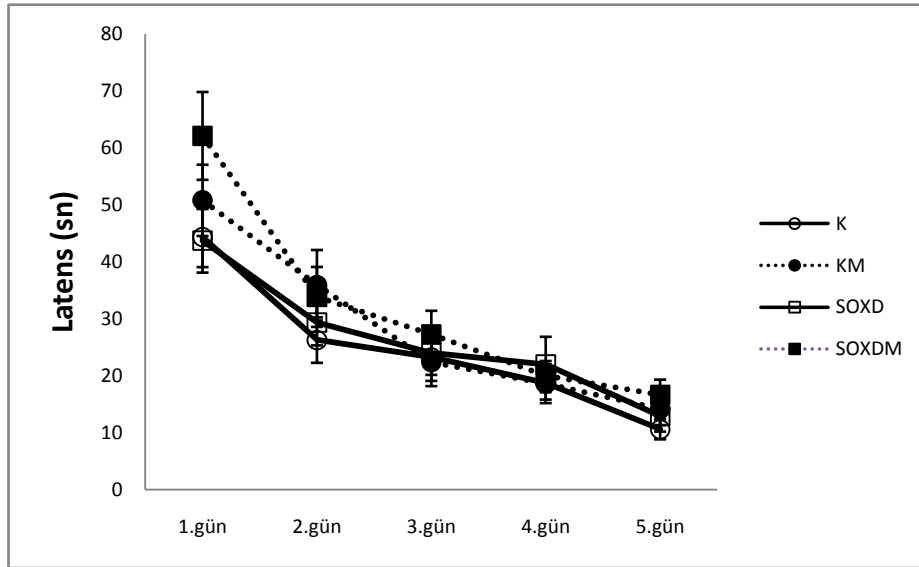


Şekil 5. SOX enzimi normal ve yetersizlikli grupların 8 haftalık deney süresi sonunda ölçülen serum homosistein düzeyleri. *: $p < 0,0001$ düzeyinde sülfid oksidaz normal gruplardan fark, #: $p < 0,05$ düzeyinde KM grubundan fark. ##: $p < 0,05$ düzeyinde SOXD grubundan fark. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama \pm standart hata; $n=15$, K, KM, SOXD grupları için, $n=13$, SOXDM grubu).



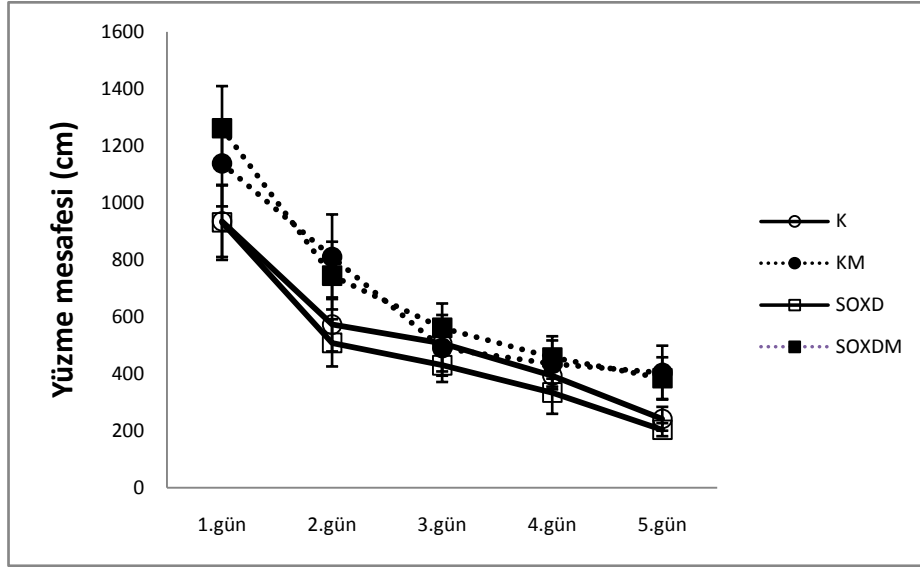
Şekil 6. SOX enzimi normal ve yetersizlikli grupların 8 haftalık deney süresi sonunda ölçülen serum sülfidit düzeyleri. *: $p < 0,0001$ düzeyinde sülfidit oksidaz normal gruplardan fark, #: $p < 0,05$ düzeyinde KM grubundan fark. ###: $p < 0,05$ düzeyinde SOXD grubundan fark. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama \pm standart hata; $n=15$, K, KM, SOXD grupları için, $n=13$, SOXDM grubu).

Sıçanların 8 haftalık deney sonunda bilginin kazanılması (Acquisition) fazına ilişkin 5 günlük periyot boyunca platforma ulaşma (latens) ve yüzme mesafesinde süreleri Şekil 7 ve 8 de sırasıyla verilmiştir. Her iki parametre açısından deney boyunca azalan ölçülen nicelik (latens için süre, yüzme mesafesi için yol), deney gruplarının her birinde sıçanların verilen işi öğrendikleri ve bu öğrenme performansları açısından gruplar arasında bir fark olmadığını göstermiştir.



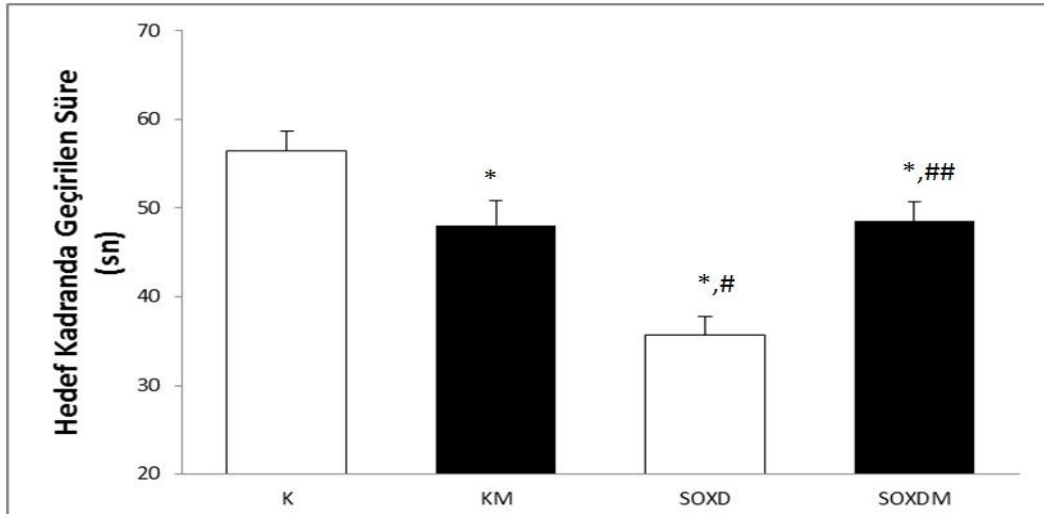
Şekil 7. Grupların 8 haftalık deney süresi sonunda spasyal öğrenmede MWM'deki yüzmeleri sırasında gizlenmiş platforma ulaşmadaki latens sürelerinin durumu. Günlere bağlı olarak azalan sürenin

istatistiksel olarak anlamlı olduğu, gruplar arasında ise azalış kalıbı açısından bir fark olmadığı tesbit edilmiştir. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama \pm standart hata; n=15, K, KM, SOXD grupları için, n=13, SOXDM grubu)



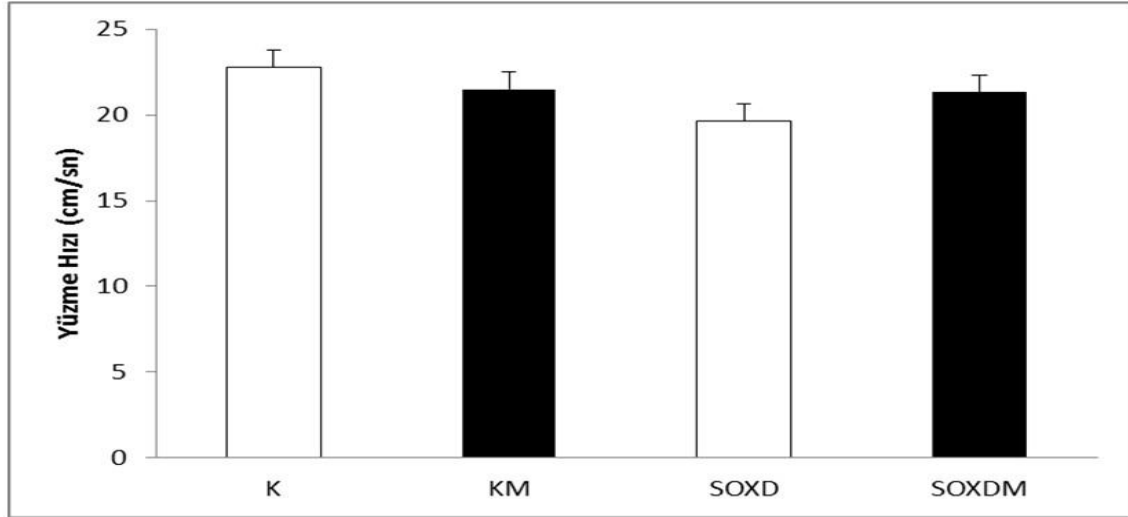
Şekil 8. Grupların 8 haftalık deney süresi sonunda MWM'deki yüzmeleri sırasındaki gizlenmiş platforma ulaşmaları için aldıkları toplam yol miktarlarının durumu. Günlere bağlı olarak azalan mesafenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu, gruplar arasında ise azalış kalıbı açısından bir fark olmadığı tesbit edilmiştir. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama \pm standart hata; n=15, K, KM, SOXD grupları için, n=13, SOXDM grubu)

Grupların kazanılan bilginin hatırlanması (Probe Trial) fazında hedef kadranda geçirilen sürenin, tüm deney gruplarında K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha kısa olduğu görüldü (şekil 9). İstatistiksel olarak anlamlı etki SOXD grubunda izlendi. Bu grupta hem K hemde KM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azalış izlendi. SOXDM grubunda ise ilave bir azalış gözükmediği gibi SOXD grubuna ait hedef kadranda kalma süresine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. KM grubu ile SOXDM grubu arasında ise anlamlı bir fark yoktu.



Şekil 9. Gruplarının 8 haftalık deney süresi sonunda spasyal bellek ile ilişkili kazanılan bilginin hatırlanması (Probe Trial) fazına ait hedef kadrandaki geçirilen süre. *: Kontrolden fark, #: KM den fark, ##: SOXD den fark $p \leq 0.05$. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama \pm standart hata; n=15, K, KM, SOXD grupları için, n=13, SOXDM grubu için)

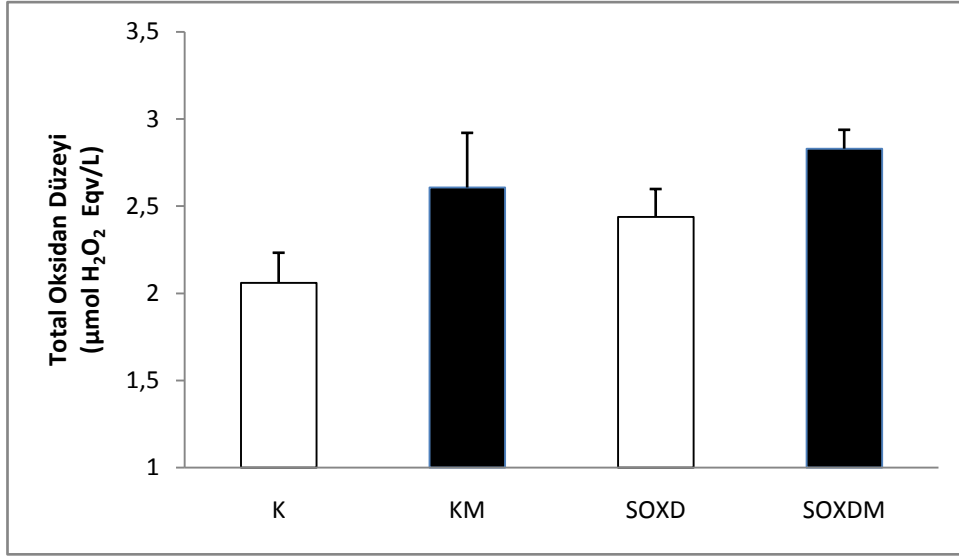
Grupların 8 haftalık deney sonunda Morris su tankında bilginin kazanımı fazında 1. ve 5. günleri arasında ölçülen velosite değerlerinde gruplar arasında bir fark olmadığı bulunmuştur (şekil 10).



Şekil 10. Grupların 8 haftalık deney süresi sonunda Morris su tankındaki bilginin kazanılması (Acquisition) fazındaki yüzme hızlarına ait durum. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama \pm standart hata; n=15, K, KM, SOXD grupları için, n=13, SOXDM grubu)

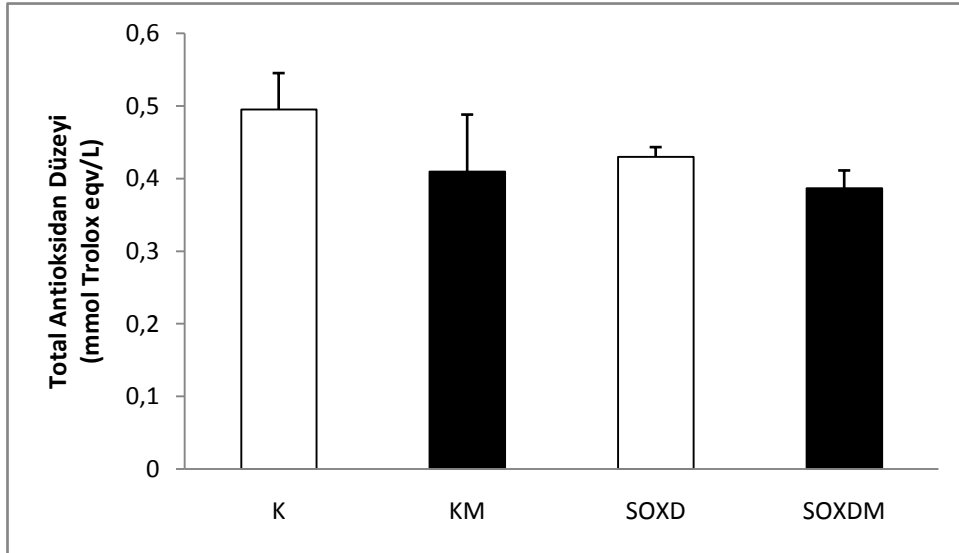
Sıçanların 8 haftalık deney süresi sonunda ölçülen hipokampüs TOD değerlerinde K grubuna göre KM ve SOXD grubunda bir artış görünmesine rağmen

anlamli bir farkin olmadigi, sadece SOXDM grubunda K grubuna gore anlamli bir sekilde yuksek olduğu goruldu (Şekil 11).



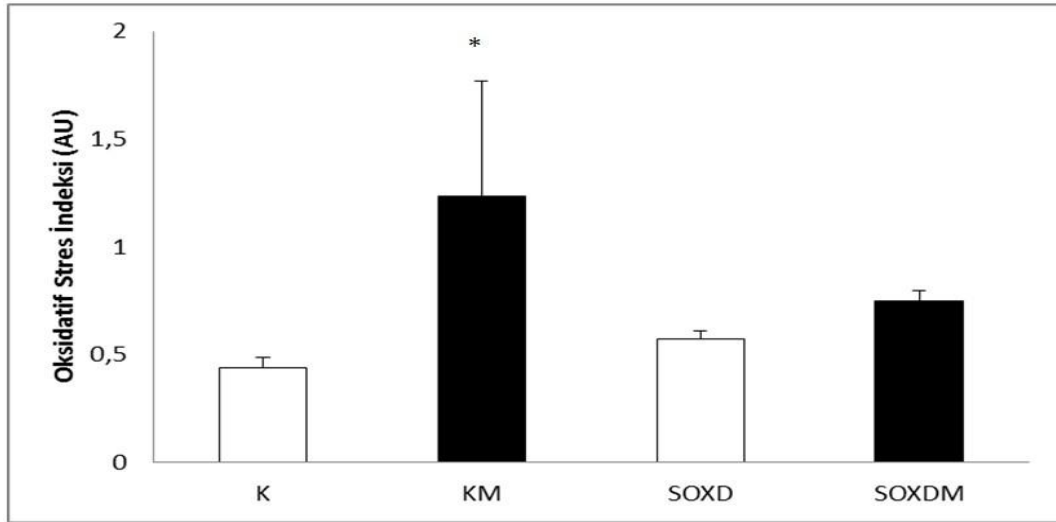
Şekil 11. Gruplarda yer alan Őiçanların 8 haftalık deney süresi sonunda ölçülen hippocampus TOD durumu. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama ± standart hata; n=15, K, KM, SOXD grupları için, n=13, SOXDM grubu)

Őiçanların 8 haftalık deney süresi sonunda ölçülen hippocampus total antioksidan düzeyleri açısından gruplar arasında anlamli bir fark bulunamamıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Grupların 8 haftalık deney sonunda ölçülen hippocampus TAD durumları. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama ± standart hata; n=15, K, KM, SOXD grupları için, n=13, SOXDM grubu)

8 haftalık deney süresi sonunda değerlendirilen sıçanların hippocampus oksidatif stres indeksi (OSİ)'ne ait ortalama değerlerinde KM grubunda K grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. K grubuna göre SOXD ve SOXDM gruplarında yüksek gözükmesine rağmen anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir. KM grubunun OSİ değeri ise SOXD ve SOXDM gruplarından yüksek görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. SOXD ve SOXDM grupları arasında ise SOXDM grubunda daha yüksek bir OSİ değeri saptanmışsa da anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Gruplara ait 8 haftalık deney süresi sonunda değerlendirilen hippocampus oksidatif stres indeksleri (OSİ)'nin durumu. *: Kontrolde fark, $p \leq 0.05$. K: Kontrol, KM: Metiyonin verilen grup, SOXD: SOX enzim eksiklikli grup, SOXDM: SOX enzim eksikliği olan ve metiyonin verilen grup. (Ortalama \pm standart hata; n=15, K, KM, SOXD grupları için, n=13, SOXDM grubu)

TARTIŞMA

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda yüksek homosisteinemi ve sülfiteminin ciddi nörotoksik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Ancak uzun süreli hipersülfitemi ve hiperhomosisteineminin birlikte oluşturduğu nörotoksik etkiler incelenmemiştir

Çalışmamız SOX enzimi normal ve yetersizlikli erkek sıçanlarda uzun süreli yüksek sülfitemi ve sülfitemi ile birlikte homosisteineminide oluşan nörotoksik etkileri ve bunların uzun süreli öğrenme-bellek fonksiyonlarına etkisini içermektedir. Verilerimize göre 8 haftalık uzun süreli deney sonunda tüm gruplarda serum homosistein ve sülfid seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu, anlamlı bir şekilde bellek kaybının olduğu ve bu kaybın en fazla da enzimi eksik metiyonin verilmeyen grupta olduğu, sülfidin homosisteinemi ile birlikteki etkisinde bu gruba göre bellek kaybının daha az oluşturduğu, spasyal öğrenme performanslarında ise anlamlı bir fark oluşturmadığı, kısa süreli işleyen belleği anlamlı olarak etkilemediği ancak tüm gruplarda beyinin sağ hipokampus dokusunda total oksidan ve antioksidan seviyelerde anlamlı bir farkın oluşmadığı, oksidatif stresin en fazla enzimi normal hiperhomosisteinematik grupta olduğu ve diğer gruplarda ise anlamlı bir fark göstermediği, deney süresi sonundaki serum homosistein ve sülfid seviyelerinin kontrol grubuna göre ileri düzeyde yüksek olduğu görülmüştür.

Bilindiği gibi homosistein, dışarıdan besinle alınamayan, metiyonin aminoasidinin metabolizması esnasında bir ara ürün olarak oluşan, proteinlerin yapısına katılmayan, sülfür içeren bir amino asittir (1,2). Plasmada HHcy gelişimi ise demografik (yaş, cinsiyet, etnik ırk),genetik faktörler (MTHFR, CBS, MS enzim eksiklikleri),sonradan kazanılmış nedenler (B vitaminleri eksikliği, renal fonksiyon bozuklukları, organ nakilleri, hipotiroidizm) ve yaşam şekli (alkol, sigara, kahve, egzersiz eksikliği) ile bağlantılıdır (26). Sülfid ise homosistein metabolizmasındaki transsülfürasyon yolağında sisteinden oluşan nükleofilik nörotoksik bir potansiyeldir (66). Ayrıca sülfid eksojen yolla da kirli hava, içecek ve yiyeğin yanında ilaç sanayi gibi bir çok alandaki kullanımı ile vücudumuza alınmaktadır (54,67-70). Alınan sülfid ise SOX enzimi ile detoksifiye edilmektedir.Bu enzim mitokondri membran aralığında bulunan bir molibdohemoproteindir (25,66,73). Çalışmamızdaki SOX enzim eksiklikli modeli Gunnison ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde gerçekleştirdik (92). Bu uygulama için enzimin kofaktörü ve esansiyel bir element olan molibdenyum'un (Mo) diyetten çıkarılması ile birlikte dışarıdan içme suyuna

konulan 200 ppm tungsteni (W) vererek 3 haftalık bir süre sonunda SOX enzim eksikliği oluşturduk ve 8 hafta boyunca devam ettik. Enzim aktivitesinin azaltılmasında Tungsten (W), etkisini molibdenyum ile birleşmiş sülfid oksidaz apoenzimi üzerinde göstermektedir (67). Kararlı enzim aktivitesi ise alınan W ve Mo oranlarına bağlıdır (66). SOX enzimi, memeli dokusunda çok geniş bir dağılım sergilemekte ve aynı türde bile belirgin farklılıklar göstermekte olup, karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda SOX aktivitesi yüksek iken beyin, dalak ve testis dokusunda ise çok düşük oranda bulunmaktadır (76). Bununla birlikte sıçan karaciğerindeki SOX aktivitesi insanlarınkine göre 10-20 kat daha yüksektir (66).

Çalışmamızda Cohen ve Fridovich'in tarif ettiği şekilde karaciğerde SOX enzim aktivitesini ölçtük (93). Deney gruplarımızdaki SOX enzim aktivitesine ait ölçümlerde enzimi normal gruplara göre (K,KM) enzim eksikliği olan gruplarda (SOXD, SOXDM) ileri düzeyde anlamlı olarak düşük bulunmuştur. SOXDM grubunda SOXD grubuna göre hafif bir yükselme görülse de anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. Yine bu uygulamamıza benzer şekilde Küçükatay ve arkadaşlarının yetişkin erkek sıçanlarda yaptıkları SO_3^- 'in nörotoksik etkileri ile ilgili bir çalışmada da uyguladıkları düşük molibdenyumlu yem (AIN 76, Research Dyets Inc USA) ve içme sularına ilave ettikleri 200 ppm tungsten (W) ile 3 hafta sonra SOX enzim aktivitesinin K grubuna göre anlamlı şekilde düştüğünü göstermişlerdir (12). Kocamaz ve arkadaşlarının Wistar cinsi erkek sıçanlarda SO_3^{-2} 'in hippokampal nöron hücrelerine olan etkisini içeren bir başka çalışmada da düşük molibdenyumlu yem (AIN 76, Research Dyets Inc USA) ve içme sularına ilave ettikleri 200 ppm tungsten (W) ile 3 hafta sonra SOX enzim aktivitesinin K grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulmuşlardır (79).

Hiperhomosisteinemi modelinde ise Bagi ve arkadaşları sıçanların içme suyuna 1 g/kg/gün dozda methionin amino asidini ilave ederek ile kan homosistein seviyelerinin ortalama 5 kat arttığını göstermişlerdir (93). Bu tarife göre yaptığımız uygulama sonucunda oluşan serum homosistein seviyeleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile ölçülmüş olup, kontrol grubuna göre enzimi normal ve eksik gruplardaki serum homosistein seviyelerinin ileri düzeyde anlamlı bir artış gösterdiğini bulduk. Gruplar arasında ise SOXD grubunda KM grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bulduk. Ancak bu güne kadar uzun süreli SOX enzim eksikliğine ait serum homosistein seviyesine ait bir çalışma görülmemektedir. SOX enzim eksikliğine bağlı hücreye girişi ile hücre içi Hcy metabolizmasının

yavaşlayabileceğini ve/veya metabolizma yollarının sınırlı hale gelebileceği düşünülebilir. Buna karşılık SOXDM grubunda ise serum homosistein seviyesi KM grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu durum transsülfürasyon yolağındaki sistein-sülfat yolunun kapanması ile artan nörotoksiste etkisi ile endojen homosisteinin bu yolaktaki antioksidan oluşumuna yönelik diğer ara metabolik yollara girişinin artması söz konusu olabilir. SOXDM grubunda SOXD grubuna göre serum homosistein seviyesi anlamlı olarak bulunmuştur. Bilindiği gibi Met-Hcy metabolizmasının düzenlenmesinde Cys, önemli bir etki gösterir. Diyet ile fazlaca alınan Met birikmesi, TS artışına neden olur. Yüksek miktarda ve uzun süreli Met alımı, remetilasyon yolunu inhibe ederken, transsülfürasyon yolunun saturasyonuna neden olur. Ayrıca bu yol Cys' i hızlı glutatyon dönüşümüne sokan bir sıklusa sahip dokularda da yer almaktadır (26). Oysa ki, Cys alımındaki artış ise TS'ye rağmen RM artışına yol açmaktadır (36,37). Yani SOX enzim blokajı ile sistein artışının gelişebilmesi ile eksojen metiyonin alımına bağlı artan Hcy ara metabolitinin RM yoluna girmesi ve metabolizasyonunun hızlanması ile de SOXDM grubunda Hcy seviyesi SOX grubuna göre azalma göstermiş olabilir. Ayrıca Met alımındaki artışın sıçanlarda metiyonini koruyan karaciğer enzim düzeylerinde azalmaya yol açtığı bildirilmektedir (2,26). Belki de uzun süreli hiperhomosisteinemi ve sülfitemiye bağlı etkileri karaciğerde bu gruptaki enzim değişiklikleri ile ilişkili olabilir.

8 haftalık deney sonunda gruptaki serum sülfid düzeyleri yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemi ile ölçülmüş olup, görülen değişiklikler homosistein seviyesine paralellik göstermektedir. Kontrol grubuna göre tüm grupta ileri düzeyde anlamlı bir artış görülmektedir. Gruplar içinde en fazla sülfid artışı SOXD grubunda olmuştur. SOXD grubu KM grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. SOXDM grubunda ise SOXD grubuna göre anlamlı bir azalış sergilemektedir. Bununla birlikte SOXDM grubundaki sülfid seviyesi KM grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bilindiği gibi transsülfürasyon yolu geri dönüşümsüz bir yol olup, Hcy katabolizması ile başlar ve sistatyonin, sistein, glutatyon ile birlikte NH₄, piruvat, taurin, α-keto bütirat, CO₂ ve SO₄²⁻ oluşur(11). Transsülfürasyon yolu aynı zamanda antioksidanlar ve peroksidanlar arasındaki dengeye bağlı olup, antioksidanlar bu yolu azaltırken, peroksidanlar ise artmasına yol açar (35). SOXDM grubundaki eksojen metiyonin alımına bağlı oluşan hiperhomosisteinemide uzun süre sonunda peroksidanların artışı ve antioksidanların azalmasını kompanzasyon için antioksidan taurin ve glutatyon yollarının hızlanması nedeniyle SOXD

grubuna göre homosisteine paralel sülfid seviyesinin de azalma görülmüş olabilir (99).

8 haftalık deney süresi sonunda spasyal öğrenme dönemine ait Morris su tankındaki gizlenmiş platforma ulaşma süreleri açısından bütün gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır. Bu döneme ait kısa süreli bir bellek olan işleyen bellek performanslarında farklılık görülmemiştir. Bu konuda uzun süreli hiperhomosisteinemi ve hipersülfideminin birlikteki etkilerine ait bir çalışma yoktur.

Stefanello ve arkadaşları Wistar cinsi erkek sıçanlarda hiper metiyoneminin kısa ve uzun süreli etkilerine ait çalışma yapmışlar ve uzun süreli hiper metiyoneminin etkisine bağlı olarak referans belleğinde bilginin kazanıldığı (acquisition) fazını etkilemediğini; kontrol grupları ile birlikte platformun yerinin öğrenilmesi ve platforma ulaşılmasında anlamlı bir fark olmadığını göstermişlerdir (100).

Baydaş ve arkadaşları ise yaptığı bir çalışmada wistar cinsi erkek sıçanların oluşturulan HHcy' nin 2 aylık uzun süreli etkileri incelenmiştir. MWM' de spasyal öğrenmedeki bilginin kazanıldığı (acquisition) fazında 5 gün süre ile günde 4 kez uygulanan yuzdürmede gizlenmiş platforma ulaşmadaki latensi süresinin HHcy grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak daha da uzun olduğunu, öğrenme eksikliklerine yol açtığını ve öğrenme performanslarının daha kötü olduğu göstermişlerdir (98).

Pirchl ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı invitro bir çalışmada ise kısa ve uzun süreli HHcy' nin kolinerjik nöronlar, spasyal bellek ve beyinde mikrokanama ile ilgili etkilerini araştırmışlardır. Kısa süreli HHcy etkisinin spasyal öğrenme eksikliklerine yol açmasına rağmen uzun süreli belleği etkilemediği, buna karşılık uzun süreli HHcy etkisinin ise spasyal öğrenmeyi bozmadığı gösterilmiştir (101).

Chiarani ve arkadaşlarının MWM' de erkek cinsi genç yetişkin sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada ise düşük ve yüksek doz Hcy' nin uzun süreli nörotoksik etkilerinde bilinç fonksiyonlarının hızla bozulmadığı, motor performanslarını gösteren yüzme hızlarında kontrol grubuna göre bir değişme olmadığı ve spasyal öğrenme dönemindeki latens sürelerinin azaldığı ve kısa süreli belleği olumsuz etkilemediği bildirilmektedir (102).

Noorafshan ve arkadaşlarının yetişkin erkek sıçanlar üzerinde gavaj yolu ile 8 hafta süre ile verdikleri metabisülfite bağlı öğrenme ve bellek değişikliklerini içeren radyal kollu labirentteki çalışmalarında bilginin kazanıldığı fazda referans ve işleyen bellek hatalarının K grubuna göre anlamlı şekilde fazla olduğunu göstermişlerdir (103).

8 haftalık deney süresi sonunda spasyal öğrenme döneminde tüm gruplarda MWM'deki yüzmeleri sırasındaki gizlenmiş platforma ulaşmaları için aldıkları toplam yol miktarları açısından anlamlı bir fark oluşmamıştır.

Streck ve arkadaşlarının yapmış olduğu HHcy' nin uzun süreli etkilerine ait MWM' de spasyal öğrenme ve bellek ile ilgili çalışmalarında ise acquisition fazında platformu bulma ve yerini öğrenme açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulmamışlardır (104).

8 haftalık deney süresi sonunda Morris su tankında probe fazında bütün grupların hedef kadranda geçirdikleri süre kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde kısa bulunmuştur. Hedef kadranda kalma süresi belleğin korunmasına paraleldir. Bu çalışmada grup içerisinde hedef kadranda kalma süresi en az olan SOXD grubu olmuştur. Enzim eksikliği olan metiyonin grubunda ise SOXD grubuna göre bellek kaybı anlamlı şekilde azalma göstermiş ancak enzimi normal olan metiyonin grubu ile anlamlı bir fark göstermemiştir. SOXDM grubuna ait verileri karşılaştırabilecek bir çalışma henüz yoktur. Uzun süreli hipersülfitemiye ait bu tür çalışmalar da bulunmamaktadır.

Uzun süreli homosisteinin etkisine bağlı Morris su tankında yapılan uzun süreli bellek testi çalışmaları bulunmaktadır.

Streck ve arkadaşlarının sıçanlarda HHcy' nin uzun süreli bellek üzerindeki etkilerine ait çalışmalarında probe fazında platform kaldırılmış, hedef kadrana ulaşılma süresi ve bu kadrandan geçme sayısı, hedef kadrana ve diğer kadrarlarda geçirilen süre ölçülmüştür. Hedef kadrana ve diğer kadrarlarda geçirilen sürenin ve önceden platformun bulunduğu hedef kadrana ulaşılmasına ait latensi süresinin kontrol grubuna anlamlı bir farkının olmadığı ancak hedef kadrandan geçme sayısının anlamlı olarak azaldığı ve bu durumun da spasyal navigasyon kaybına işaret ettiği bildirilmiştir. Uzun süreli HHcy' nin etkisine bağlı olarak bilinçte disfonksiyona yol açtığı, spasyal navigasyon ve işleyen spasyal belleği bozduğu,

hem kısa süreli hem de uzun süreli belleği etkilediği belirtilmiştir. HHcy' nin beyinde hippokampal bölgede uzun süreli oluşturduğu metabolik etkilerinin bir sonucu olarak spasyal navigasyon ve işleyen bellek bozukluğuna yol açabileceği bildirilmektedir (104).

Baydaş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise wistar cinsi erkek sıçanlarda HHcy' nin 2 aylık uzun süreli etkileri incelenmiştir. . Gizlenmiş platformun kaldırıldığı kazanılan bilginin hatırlanması safhası olan probe fazında ise HHcy grubundaki sıçanların kontrol grubuna göre hedef kadranda kaldıkları sürenin anlamlı olarak daha az olduğu bulunmuştur (98)

Koz ve arkadaşları sıçanlar üzerinde yaptıkları Wistar cinsi dişi sıçanlarda oluşturdukları HHcy' nin doğan yavrularındaki uzun süreli etkilerine bağlı öğrenme ve bellek fonksiyonları hamilelikleri boyunca uyguladıkları doğum sonrası 75. günde MWM' de test etmişlerdir. probe trial fazında ise HHcy grubunun hedef kadranda geçirdiği sürenin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada doğum sonrası yeni doğan yavrulardan alınan beyin dokusu örneklerinde HHcy grubunun beyin homojenatlarındaki subselüler fraksiyonlarında (nükleer, sitoplazmik ve mitokondriyal) lipid peroksidasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gösterilmiş ve mitokondrinin oksidatif strese çok duyarlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca glial fibriler asidik protein (GFAP) ölçümünün kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük çıktığı ve bu durumun nöron-nöron ve nöron-glia bağlantılarını bozduğu ve düşük seviyedeki GFAP' nin astrositlerin maturasyonunun gecikmesine neden olduğu gösterilmiştir. Uzun süreli HHcy' nin oluşturduğu toksisiteye bağlı oksidatif stresin ve astrosit maturasyonunun gecikmesinin ise öğrenme ve bellek kayıplarına yol açabileceği bildirilmiştir (105).

Gao ve arkadaşlarının 6 hafta süre ile erkek sıçanlarda yüksek metiyonin diyet uygulaması ile oluşan HHcy' nin uzun süreli etkilerine bağlı bilinç performanslarına ilişkin MWM'de probe trial fazına ilişkin platform bulma sürelerinin belirgin şekilde uzadığı, hedef kadranda kalma sürelerinin kısaldığı gösterilmiştir. Yine bu çalışmada prefrontal kortekste ve hippokampal bölgede HHcy' nin etkilerine bağlı olarak mediyal prefrontal kortekste dopamin(DA), 5-Hidroksi triptamin(5-HT), 5-Hidroksi İndol Asetik Asit(5-HIAA), dopamin ve 3,4-Dihidroksi Fenil Asetik Asit (DOPAC) ile hippokampus bölgesindeki 5-HIAA ve DOPAC düzeylerinin düştüğü saptanmıştır. Bu çalışmada PFC-hippokampal bağlantıların spasyal bellek için çok önemli olduğu

ve yapılan çok sayıdaki çalışmalarda dopaminerjik sistem lezyonları veya serotonerjik iletinin blokajında water maze performanslarının bozulduğu bildirilmiştir. Ayrıca sinaptik monoamin üretim miktarındaki bu değişimlerin translasyon ve transkripsiyonu içeren sekonder nöroplastik değişiklikleri düşündürdüğü dolayısı ile HHcy ile bilinç bozukluğu arasındaki ilişkinin altında yatan mekanizmalardan birisi olabileceği belirtilmektedir. Yine bu çalışmada nöron hücrelerinin onarılması, plastisitesi, büyümesi ve ölümünde etkili bir protein olan Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF) ün HHcy' li sıçanlarda hippokampal bölgede azaldığı gösterilmiştir (106).

Pirchl ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı in vivo bir çalışmada ise kısa ve uzun süreli HHcy' nin kolinerjik nöronlar, spasyal bellek ve beyinde mikrokanama ile ilgili etkilerini araştırmışlardır. HHcynin beyinde mikro kanamalara neden olduğu bunun da kolinerjik nöronlarda sinaptik hasar yarattığı, beyin korteksinde oluşturduğu ağır mikro kanamaların uzun süreli bellek kayıplarına yol açtığı ileri sürülmektedir (59). Uzun süreli HHcy etkisinin uzun süreli bellekte ise gittikçe artan belirgin kayıpların olduğu gösterilmiştir (59).

Noorafshan ve arkadaşlarının yetişkin erkek sıçanlar üzerinde gavaj yolu ile 8 hafta süre ile verdikleri metabisülfite bağlı öğrenme ve bellek değişikliklerini içeren radyal kollu labirentteki çalışmalarında uzun süreli belleğin bozulduğunu göstermişlerdir (103).

Beyinde üretilen Hcy' nin beyindeki metabolizması ile ilgili bölgesel farklılıkları tam olarak belirlenememiştir. Bu metabolizmadaki en önemli metilasyon kaynağı RM reaksiyonu olup, BHMT yolunun beyinde bulunmadığı belirtilmektedir. Beyinde TS yolunda yer alan CBS enziminin ise sistatyonaz enzim etkinliği ile uyumsuz olup, bölgesel değişiklikler gösterdiği belirtilmektedir. Beyinde, Met ve Hcy' nin TS yoluna giremediği, astroglial hücre kültürü çalışmalarında ise glutatyon sentezine giren sistatyonin ve Cys oranının çok düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca beyinde, glutatyon sentezinde yer alan Cys substratının sınırlı bir oranda olduğu ve astrositlere Na⁺ bağımlı glutamat taşıyıcıları ile iletildiği gösterilmiştir (43,46-48). cAMP aktiviteli gen ekspresyonunun önlenerek, öğrenme ve kısa süreli belleği etkilemeden uzun süreli belleğin selektif bir şekilde bloke edilebildiği aksine aktivatör CREB' in aşırı ekspresyonunun ise anında uzun süreli bellek oluşumuna yol açabildiği bildirilmektedir (5,6,7). SO₃⁼' in değişen koşullara bağlı olarak pro-oksidan etkisinin

yanında antioksidan özellik gösterebilmesi de etkili olabilir (102). Üstelik eksojen metiyonin alımındaki artan homosisteinin nörotoksik etkilerinde sülfitin antioksidan özellik göstermiş olabilmesi ile SOXDM grubunda hem süfit hem de homosisteinin azalmasına dahası bellek kaybının da azalmasına yol açmış olabilir. Bir başka durum beyinin farklı anatomik bölgelerinde oksidan ve antioksidan sistemler arasında farklılıkların olabileceğidir (102). Sülfitin nükleofilik nörotoksik potansiyelde olması CREB gen ekspresyonunun bozulmasına yol açmış olabilir. SOXDM grubunda ise eksojen metiyonin alımına bağlı homosistein metabolizmasındaki enzimatik değişimler transsülfürasyon yolundaki sistein-sülfat yolunun kapanması ile artan diğer metabolik yolak aktivasyonu sonucu hem homosistein düzeyi hem de buna bağlı oluşan süfit düzeyinin düşmesine ve bellek kaybının daha az olmasına yol açmış olabilir. KM grubunda ise homosisteinin irreversible olan ve transsülfürasyon yolunun belirli bir doyumlukta işlemesine bağlı toksik etkilerinin azalmasına bağlanabilir. Bir başka durum toksisteye bağlı öğrenme ve bellekle ilişkili nörotransmitter yapımındaki değişiklikler etken olabilir.

8 haftalık deney süresi sonunda Morris su tankında spasyal öğrenme dönemine ait yüzme hızlarında gruplarda anlamlı bir fark oluşmamış ve motor fonksiyonları olumsuz etkilememiştir. Chiarani ve arkadaşları MWM' de erkek cinsi genç yetişkin sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada yüksek doz Hcy' nin uzun süreli nörotoksik etkilerinde spasyal öğrenme dönemindeki öğrenme performanslarının olumsuz etkilenmediğini bildirmekte-dirler (102).

8 haftalık deney süresi sonunda gruplarda yer alan sıçanların ölçülen hipokampus total oksidan düzey kontrol grubuna göre bütün gruplarda yüksek görülse de anlamlı bir fark oluşmamıştır. Yine SOXDM grubunda TOD en yüksek görülüyor olsa da anlamlı değildir. Uzun süreli metiyoninin alımına bağlı HHcy' deki toksisitenin enzim eksikliğine bağlı toksisiteden anlamlı olmasa da daha güçlü olabildiğini yani HHcy' neminin süfit birikimine bağlı toksisitesinden daha toksik etkili olduğunu düşündürmektedir. Sülfitin homosisteina ait TS yolundaki bir metaboliti olmasına karşılık Hcy' nin ise metabolik yolları daha fazla bir ara metabolik ürün konumunda bulunması toksisite kapsamını genişletmiş olabilir.

SO_3^- in toksik etkilerinden non enzimatik otooksidasyonu veya peroksidaz katalizi ile oksidasyonu sonucu oluşan sülfür trioksit radikallerinin sorumlu olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca SO_3^- in ROS üretimine yol açabildiği, oksidatif

stresten bağımsız olarak, doz artışı ile direk glutamat dehidrojenaz enzim inhibisyonuna ve beyin hücresi mitokondrisinde ATP düzeyinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (79,80). SOX enzim eksikliğinde serbest sisteinden oluşan sistein-S-sülfat metabolitinin eksitotoksik amino asit gruplarına yapıcı benzediği ve beyine hasar verdiği belirtilmektedir (79).Bütün bunlara rağmen memelilerde SO_3^{-2} in kronik nörotoksik etkilerine ait kanıtlar yoktur (79).

Hcy, nöronların eksitotoksiste ve oksidatif strese karşı korunmasını belirgin olarak azaltır. Bununla ilgili Dudman ve arkadaşlarının sıçanlarda yapılan bir çalışmada Hcy'nin beyinde lipit peroksidasyonunu indüklediği, Malondialdehit (MDA) ve Süper Oksit Anyon (SOA) seviyelerini arttırdığı, pasif kaçınmadaki öğrenme testlerinde bellek bozukluğuna yol açtığı, hippocampus bölgesindeki hücrelerde apopitozisi ve hücre ölümünü indüklediği bildirilmektedir (51).

Uzun süreli hipersülfitemi ve hiperhomosisteineminin birlikteki oksidatif etkisine ait bir çalışma verisi bulunmamaktadır.

Baydaş ve arkadaşlarının bir çalışmada wistar cinsi erkek sıçanlarda HHcy'nin 2 aylık uzun süreli etkilerini incelemişlerdir. Sıçanların hippocampus bölgesinde lipit peroksidasyonunun HHcy grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha da artmış olduğu gösterilmiştir (98).

8 haftalık deney sonunda ölçülen hipokampüs total antioksidan değerler kontrol grubuna göre düşük görülsede anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. anlamlı bir fark bulunmamıştır. Uzun süreli hipersülfitemi ve hiperhomosisteineminin birlikteki etkisine ait bir çalışma verisi bulunmamaktadır.

Gruplarda uzun süreye bağlı bu etkiler diğer antioksidanların yapımını uyarmış olabilir. SO_3^{-2} in değişen koşullara bağlı olarak pro-oksidan etkisinin yanında antioksidan özellik gösterebilmesi de etkili olabilir (103). Glutasyon, diğer antioksidan sistemlerin (CAT, SOD enzimleri gibi) aktivitelerinin azalması durumunda beyin oksidatif hasardan korunması sağlar. Ancak oksidatif stres durumlarında glutasyon deposu tükenmektedir (93,98).

8 haftalık deney süresi sonunda değerlendirilen hipokampüs oksidatif stres indeksleri (OSİ) açısından bakıldığında KM grubunun kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme göstermiş ve bu artış gruplar arasında en fazla olanı durumundadır.

Enzim eksikliği bulunan SOXD ve SOXDM grubu K grubuna göre anlamlı olmayan bir artış göstermektedir. SOX enzim eksikliğine metiyonin verilmesi ise OSİ düzeyini anlamlı olmasa da arttırmaktadır. Bilindiği gibi oksidatif stres düzeyinin bir diğer göstergesi hesapla elde edilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'dir. Bu indeks çalışmamızda elde edilen TAD ve TOD değerleri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{OSİ} = \text{TOD} (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv/L}) / \text{TAD} (\mu\text{mol Trolox Eqv/L}) \times 100$$

Bu formüle göre total oksidan düzeyin artması veya total antioksidan düzeyin azalması oksidatif stres artışına yol açmaktadır. Uzun süreli yüksek sülfitemi ve homosisteineminin birlikteliğine ilişkin bu 2 parametreye ait bir çalışma olmadığı için SOXDM grubuna ait verilerin karşılaştırılması yapılamamaktadır.

SONUÇLAR

Bu çalışmamızda 8 hafta süre ile hipersülfitemi ve hiperhomosisteineminin nörotoksik etkileri incelenmiştir. Morris su tankında öğrenme ve bellek testleri ile karaciğer SOX enzim aktivitesi, beyin hippokampus dokusunda total oksidan ve antioksidan düzeyler, oksidatif stres ve serumda homosistein ile sülfid seviyeleri ölçülmüştür. Bu süre sonunda oluşan sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1- Karaciğerde SOX enzim aktivitesinin enzim eksiklikli gruplarda kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.

2- Serum homosistein düzeyleri bütün gruplarda kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek bulundu. SOX yetersizlikli grupta homosistein düzeyinin normal gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış, metiyonin verilmesinin ise bu artışı istatistiksel olarak tersine çevirdiği görülmüştür. Serum sülfid düzeylerinin gruplardaki homosistein artış ve azalışına paralel olduğu izlenmiştir.

3- Morris su tankında spasyal öğrenme döneminde gizlenmiş platforma ulaşmalarındaki latens sürelerinin Günlere bağlı olarak azalmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu, gruplar arasında ise azalış açısından bir fark olmadığı görülmüştür.

4- MWM'deki yüzmeleri sırasındaki gizlenmiş platforma ulaşmaları için aldıkları toplam yol miktarlarının günlere bağlı olarak azalan mesafenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu, gruplar arasında ise azalış kalıbı açısından bir fark olmadığı tesbit edilmiştir.

5- Spasyal bellek ile ilişkili kazanılan bilginin hatırlanması (Probe Trial) fazına ait hedef kadranda geçirilen sürenin methionin verilen normal grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı, SOX yetersizlikli grupta bu sürenin normal gruplara göre istatistiksel olarak azalmış olduğu, metiyonin ilavesi ile bu sürenin arttığı ve belek kaybının azaldığı görülmüştür.

6- Morris su tankındaki bilginin kazanılması (Acquisition) fazındaki yüzmeye hızlarına ait anlamlı bir fark oluşmamıştır.

7- Hippokampüs TOD değerlerinde K grubuna göre KM ve SOXD grubunda bir artış görünmesine rağmen anlamlı bir farkın olmadığı, sadece SOXDM grubunda K grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür.

8- Hippokampüs total antioksidan düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

9- Hippokampüs oksidatif stres indeksi (OSİ)'ne ait ortalama değerlerinde KM grubunda K grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. K grubuna göre SOXD ve SOXDM gruplarında yüksek gözükmesine rağmen anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir. KM grubunun OSİ değeri ise SOXD ve SOXDM gruplarından yüksek görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. SOXD ve SOXDM grupları arasında ise SOXDM grubunda daha yüksek bir OSİ değeri saptanmışsa da anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Buradan çıkan sonuçlara göre uzun süreli yüksek sülfiteminin ve homosisteineminin tüm gruplarda öğrenmeyi olumsuz etkilemediği, belleği ise kontrol gruplarına göre bozduğu görülmüştür. Metiyoninin normal gruplarda belleği artmış oksidatif strese bağlı şekilde olumsuz etkilerken; enzim eksiklikli gruplarda ise bellek kaybını azalttığı ancak bu durumun oksidatif stres ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir.

Uzun süreli hiperhomosisteineminin anlamlı olmasa da hipersülfiteminin etkisine göre daha toksik etkili olduğu ve bu toksik etkisinin sülfitle birlikte arttığı ve uzun süreli bellek kaybını ise anlamlı olarak azalttığını söyleyebiliriz.

Bunun ile birlikte oldukça bilinmeyen karmaşık mekanizmaların yer alabildiği uzun süreli hipersülfitemi ve hiperhomosisteineminin etkilerinin daha fazla araştırılmasına gerek vardır.

KAYNAKLAR

1. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry (3rd ed.), (2000), New York: W. H. Freeman, ISBN 1-57259-153-6.
2. Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology ,2000; 32:385-89.
3. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of trans-sulfuration, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease, McGraw-Hill, New York, 1995; pp. 1279-327.
4. Brattström L, Israelsson B, Lindgärde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Metabolism 1988;37:175-78.
5. Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. Ageing Res Rev 2002;1:95-111.
6. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol ,1996; 27:517-27.
7. Selhub J. Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr ,1999;19:217-46.
8. Medina MA, Urdiales JL, Amores-Sánchez MI. Roles of homocysteine in cell metabolism old and new functions. Eur J Biochem, 2001;268:3871-82.
9. Jochemsen HM, Homocysteine, progression of ventricular enlargement, and cognitive decline. The Second Manifestations of ARTERial disease-Magnetic Resonance study, Alzheimer's & Dementia, 2013; 9:302-9.
10. Herrmann W, Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. Clin Chem Lab Med, 2011; 49:435–41.

11. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003;26:137-46.
12. Cooper A.J. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:187-222.
13. Yamaguchi K, Sakakibara S, Asamizu J, Ueda I. Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver. II. The measurement of cysteine metabolism in vivo and the activation of in vivo activity of cysteine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1973;297:48-59.
14. Benevenga NJ. Evidence for alternative pathways of methionine catabolism. *Adv Nutr Res* 1984;6:1-18.
15. Amdur MO. Toxicologic appraisal of particulate matter, oxides of sulfur, and sulfuric acid. *J Air Pollut Control Assoc* 1969;19:638-44.
16. Lee WJ, Teschke K., Kauppinen T, Andersen A, Jappinen P, Szadkowska Stanczyk I, et al. Mortality from lung cancer in workers exposed to sulfur dioxide in the pulp and paper industry. *Environ Health Perspect* 2002;110:991-5.
17. Mudd SH, Irreverre F, Laster L. Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. *Science* 1967;156:1599-602.
18. McFadden SA. Phenotypic variation in xenobiotic metabolism and adverse environmental response: focus on sulfur-dependent detoxification pathways. *Toxicology* 1996 111(1-3):43-65.
19. Agar A, Kucukatay V, Yargicoglu P, Aktekin B, Kipmen-Korgun D, Gumuslu S, Apaydin C. The effect of sulfur dioxide inhalation on visual evoked potentials, antioxidant status and lipid peroxidation in Alloxan-induced diabetic rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 2000;39: 257-264.

20. Kucukatay V, Agar A, Yargicoglu P, Gumuslu S, Aktekin B. Changes in somatosensory evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in experimental diabetes: effect of sulfur dioxide. *Arch Environ Health* 2003;58:14-22.
21. Reist M, Marshall KA, Jenner P, Halliwell B.. Toxic Effects of Sulphite in Combination with Peroxynitrite on Neuronal Cells. *J Neurochem* 1998;71:2431-2438.
22. Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. Toxicity of cysteine and cysteine sulphinic acid to human neuronal cell-lines. *J Neurol Sci* 1997;152: 62-6.
23. Marshall KA, Reist M, Jenner P, Halliwell B The Neuronal activity of sulfite plus peroxynitrite is enhanced by glutathione depletion: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 1999;27: 515-520.
24. Heafield MT, Fearn S, Steventon GB, Waring RH, Williams AC, Sturman SG. Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1990;110: 216-220.
25. Cohen HJ, Fridovich I, Rajagopalan KV. Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J Biol Chem* 1971;246:374-82.
26. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine, pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157:40-44.
27. MacCoss MJ, Fukagawa NK, Matthews DE. Measurement of intracellular amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E947-55.
28. Cantoni GL. S-Adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 1953;204:403-16.

29. Şen S, Durat G, Atasoy I. Vitamin B 12 ve Folik Asit Eksikliğinin Psikiyatrik ve Nörolojik Bozukluklarla İlişkisi, Türk Klinik Biyokimya Derg 2009;7: 31-6.
30. Fontecave M, Atta M, Mulliez E. S-Adenosyl methionine: nothing goes to waste Trends Biochem Sci 2004; 29:243–49.
31. Finkelstein JD, Methionine metabolism in mammals. J Nutr Biochem,1990;(1):228-37.
32. Finkelstein JD. Regulation of homocysteine metabolism. In: Carmel R, Jacobsen DW (editors). Homocysteine in health and disease. Cambridge: Cambridge University Press; 2001;92–9.
33. Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S adenosylhomocysteine. Clin Chem Lab Med 2007;45:1694-99.
34. Corrales FJ, Pérez-Mato I, Sánchez Del Pino MM, Ruiz F, Castro C, García-Trevijano ER, et al. Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. J Nutr 2002;132:2377-81.
35. Brosnan JT, Brosnan ME, The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview, J Nutr 2006;136:1636-40.
36. 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.
37. Di Buono M, Wykes LJ, Cole DEC, Ball RO, Pencharz PB. Regulation of sulfur amino acid metabolism in men in response to changes in sulfur amino acid intakes. J Nutr 2003;133:733–39.
38. Jacobsen DW, Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease, Clinical Chemistry 1998;44:1833-43.

39. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. I Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications, *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
40. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 2006;580:2994-3005.
41. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 2003;14:32–42.
42. Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, Dole VS, Loscalzo J, Handy DE et al, Elevated levels of homocysteine compromise blood–brain barrier integrity in mice. *Blood* 2006;107:591–93.
43. 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;32:60–8.
44. Zeise ML, Knopfel T, Zieglgansberger 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;443:373–76.
45. 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;147:175–78.
46. 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;42:577–82.

47. 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;26:386–88.
48. Gharib A, Chabannes B, Sarda N, Pacheco H. In vivo elevation of mouse brain S-adenosyl-homocysteine after treatment with L-homocysteine. *J Neurochem*, 1983;40:1110–12.
49. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, et al. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995;92:2825-30.
50. Langman LJ, Cole DE., Homocysteine. *Crit Rev Clin Lab Sci.* (1999);36(4): 365-406.
51. Dudman NP, Wilcken DE, Wang J, Lynch JF, Maccey LP. Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease: its occurrence cofactor therapy and enzymology. *Atheroscler Thromb* 1993;13:1253-60.
52. Refsum H, Fiskerstrand T, Gnttormsen AB, Ueland PM: Assessment of homocysteine status. *J Inher Metab Dis* 1997;20:286-94.
53. Seshadri N, Robinson K., Homocysteine, B vitamins, and coronary artery disease, *Med Clin North Am* 2000;84:215-37.
54. Boldyrev AA. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. Review *Biochemistry (Mosc)* 2009;74(6):589-98.
55. Böhmer AE, Pochmann D, Sarkis JJ. In vitro effect of homocysteine on nucleotide hydrolysis by blood serum from adult rats. 2006;160:159-64.

56. Hölscher C, Gigg J, O'Mara SM. Metabotropic glutamate receptor activation and blockade: their role in long-term potentiation, learning and neurotoxicity. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23(3):399-410.
57. Chai GS, Jiang X, Ni ZF, Ma ZW, Xie AJ, Cheng XS, Wang Q, et al. Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine. *J Neurochem* 2013;124:388-96.
58. 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;132:3418-21.
59. Pirchl M, Ullrich C, Humpel C, Differential effects of short- and long-term Hyperhomocysteinaemia on cholinergic neurons, spatial memory and Microbleedings in vivo in rats. *Eur J Neurosci* 2010;32:1516–27.
60. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2012;1-1
61. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, et al, Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect.* 1998;106:1229-34.
62. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:2649-56.
63. Ataie A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Hajizadeh Moghaddam A, Ataie R, Nasiraei Moghaddam Sh. An investigation of the neuroprotective effects of Curcumin in a model of Homocysteine - induced oxidative stress in the rat's brain, *Daru.* 2010;18: 128–36.
64. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci* 2010;2:1-13.

65. 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 anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience* 2005;135:879-86.
66. Gunnison AF, Jacobsen DW. Sulfite Hypersensitivity, A Critical Review. *CRC Crit Rev Toxicol* 1987;17:185-214.
67. Golembiewski JA, Allergic reactions to drugs: implications for perioperative care. *J Perianesth Nurs* 2002;17:393-08.
68. Halaby SF, Mattocks AM. Absorption of Sodium Bisulfide from Peritoneal Dialysis Solutions. *J Pharm Sci* 1965;54:52-5.
69. Fazio T, Warner CR. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Addit Contam* 1990;7:433-54.
70. Nicolas JJ, Richard-Forget FC, Goupy PM, Amiot MJ, Aubert SY. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1994;34:109-57.
71. Gibson WB, Strong FB. Metabolism and elimination of sulphite by rats, mice and monkeys. *Fd Cosmet Toxicol* 1973;11:185-98.
72. Johnson JL, Rajagopalan KV, Cohen HJ. Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of tungsten on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat. *J Biol Chem* 1974;249:859-66.
73. Şenbil N, Tosun MS, Ezgü FS, Gürer YKY. İzole sülfiteksikliği Türk Pediatri Arşivi 2005; 40: 105- 08.

74. Kisker C, Schindelin H, Pacheco A, Wehbi WA, Garrett RM, Rajagopalan KV et al. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 1997;91:973-83.
75. Garrett RM, Johnson JL, Graf TN, Feigenbaum A, Rajagopalan KV et al. Human sulfite oxidase R160Q: identification of the mutation in a sulfite oxidase-deficient patient and expression and characterization of the mutant enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6394-98.
76. Cabre F, Marin C, Cascante M, Canela EI. Occurrence and comparison of sulfite oxidase activity in mammalian tissues. *Biochem Med Metab Biol* 1990;43:159–62.
77. Küçükatay V, Savcıoğlu F, Hacıoğlu G., Yargıçoğlu P, Açar A. Effect of sulfite on cognitive function in normal and sulfite oxidase deficient rats. *Neurotoxicol Teratol* 2005;27:47-54.
78. Zhang X, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 2004;279:43035–45.
79. Kocamaz E, Adiguzel E, Er B, Gundogdu G. Sulfite leads to neuron loss in the hippocampus of both normal and SOX-deficient rats. *Neurochem Int* 2012;61:341-6.
80. Squire LR, Kandel ER. 1999. *Memory: mind to molecules*. New York: Sci Am Lib 12.
81. Dudai Y. 1989. *The Neurobiology of Memory: Concepts, Findings, Trends*. Oxford: Oxford Univ. Press.
82. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973;232:331-56.

83. Hawkins RD, Kandel ER, Siegelbaum SA. Learning to modulate transmitter release: themes and variations in synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1993;16:625-65.
84. Castellucci VF, Carew TJ, Kandel ER. Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia California*, *Science*. 1978;202:1306-8.
85. Bourtchouladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*. 1994;79:59-68
86. Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*. 1997;88:615-26.
87. Bolshakov VY, Golan H, Kandel ER, Siegelbaum SA. Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP-dependent late phase of LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus. *Neuron*. 1997;19:635-51.
88. Frost WN, Castellucci VF, Hawkins RD, Kandel ER. Monosynaptic connections made by the sensory neurons of the gill- and siphon-withdrawal reflex in *Aplysia* participate in the storage of long-term memory for sensitization, *Proc Natl Acad Sc U S A*. 1985; 82(23):8266-9.
89. Goldman-Rakic PS. 1992. Working memory and the mind. *Sci Am* 267:111–117.
90. Friston KJ, Frith CD, Liddle PF, Frackowiak RS. Comparing functional (PET) images: the assessment of significant change. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11:690-9.
91. Sweatt JD. *Mechanisms of memory*. 2003 San Diego, CA: Academic Press.

92. Gunnison AF, Farruggella TJ, Chiang G, Dulak L, Zaccardi J, Birkner J. A Sulphite-Oxidase-Deficient Rat Model: Metabolic Characterization. *Fd Cosmet Toxicol* 1981;19: 209-20.
93. Bagi Z, Cseko C, Tóth 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: H2277-83.
94. Morris RGM. Development of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Neurosci Methods* 1984;11:47–60.
95. Mills PB, Footitt EJ, Ceyhan S, Waters PJ, Jakobs C, Clayton PT, Struys EA.. Urinary AASA excretion is elevated in patients with molybdenum cofactor deficiency and isolated sulphite oxidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2012;35:1031-36.
96. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AS, Randall RJ. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-73.
97. Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. Learning and Memory. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of Neural Science*. International Edition: McGraw-Hill Companies, 2000: 1227-1246.
98. Baydas G, Ozer M, Yasar A, Tuzcu M, Koz ST. Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. *Brain Res* 2005;1046:187-94.
99. El Idrissi A. Taurine improves learning and retention in aged mice. *Neurosci Lett*. 2008;436:19-22.
100. Stefanello FM, Monteiro SC, Matté C, Scherer EB, Netto CA, Wyse AT. Hypermethioninemia increases cerebral acetylcholinesterase activity and impairs memory in rats. *Neurochem Res* 2007;32:1868-74.

- 101.Pirchl M, Ullrich C, Humpel C. Differential effects of short- and long-term hyperhomocysteinaemia on cholinergic neurons, spatial memory and microbleedings in vivo in rats. *Eur J Neurosci.* 2010;32:1516-27.
- 102.Chiarani F,Bavaresco CS, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wyse AT. Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in brain of rats. *Metab Brain Dis.* 2008;23:123–32.
- 103.Noorafshan A, Asadi-Golshan R, Karbalay-Doust S, Abdollahifar MA, Rashidiani-Rashidabadi A. Curcumin, the main part of turmeric, prevents learning and memory changes induced by sodium metabisulfite, a preservative agent, in rats. *Exp Neurobiol.* 2013;22:23-30.
- 104.Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse ATS. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav Brain Res* 2004;153:377-81.
- 105.Koz ST, Baydas G, Koz S, Demir N, Nedzvetsky VS. Ginkgo biloba extract inhibits oxidative stress and ameliorates impaired glial fibrillary acidic protein expression, but can not improve spatial learning in offspring from hyperhomocysteinemic rat dams. *Phytother Res* 2012;26:949-55.
- 106.Gao L, Zeng XN, Guo HM, Wu XM, Chen HJ, Di RK, Wu Y. Cognitive and neurochemical alterations in hyperhomocysteinemic rat. *Neurol Sci* 2012;33:39-43.