

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA PRENATAL DÖNEMDE OLUŞTURULAN  
HİPERHOMOSİTEMİYEMİN NÖRAL PLASTİK VE  
BİLİSEL FONKSİYONLARA ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. SEMA TULAY KÖZ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. GİYASETTİN BAYDA**

**ELAZI –2008**

**DEKANLIK ONAYI**

**Prof. Dr. Ömer L. ERHAN**

**Dekan**

\_\_\_\_\_

**Bu tez Uzmanlık Tez standartlarına uygun bulunmu tur.**

**Prof. Dr. Haluk KELE T MUR**

\_\_\_\_\_

**Fizyoloji Anabilim Dalı Ba kanı**

Tez tarafımızdan okunmu , kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmi tir.

**Prof. Dr. Gıyasettin BAYDA**

**Danı man**

\_\_\_\_\_

**Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri**

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

*Anneme, Babama*

*E ime ve Çocuklarıma..*

## TE EKKÜR

Uzmanlık e itimim boyunca ve tez çalı malarım sırasında benden her türlü deste i ve yardımı esirgemeyen, de erli hocam Prof. Dr. Gıyasettin BAYDA 'a şükranlarımı sunarım.

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Haluk KELE T MUR'a te ekkür ederim. Anabilim dalımızın ö retim üyeleri Prof. Dr. Ahmet AYAR'a, Doç. Dr. Selim KUTLU'ya, Biyofizik Anabilim Dalı ö retim üyesi Yrd. Doç. Dr. O uz ÖZÇEL K'e, KTÜ Fizyoloji Anabilim Dalı ö retim üyesi Yrd. Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a, biyolog Abdullah YA AR'a, Tıbbi Biyoloji doktora ö rencisi Ebru ÖNALAN'a, Ara tırma görevlisi arkadaş larıma ve Fizyoloji Anabilim Dalında görevli bütün personele te ekkür ederim. Western Blot çalı malarında yardım ve tecrübesini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Viktor S. NEDZVETSK 'ye te ekkürlerimi sunarım.

Fırat Üniversitesi Deneysel Ara tırmal ar Merkezi (FÜDAM) çalı anlarına te ekkür ederim.

## Ç NDEK LER

	Sayfa No
<b>1. ÖZET</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	3
<b>3. G R</b> .....	5
3.1. HOMOS STE N .....	5
3.1.1. Homosistein Metabolizması .....	7
3.1.1.1. Transmetilasyon .....	8
3.1.1.2. Remetilasyon .....	9
3.1.1.3. Transsülfürasyon .....	10
3.1.2. Homosistein Metabolizmasının Regülasyonu .....	12
3.1.3. Plazmadaki Homosistein Formları .....	13
3.1.4. Beyinde Homosistein Metabolizması .....	15
3.1.5. Hiperhomosisteinemi .....	15
3.1.6. Hiperhomosisteinemi Nedenleri .....	16
3.1.6.1. Demografik Faktörler .....	18
3.1.6.2. Genetik Faktörler .....	18
3.1.6.2.1. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) Eksikli i/Defekti .....	18
3.1.6.2.2. Sistasyonin -sentaz (CBS) Eksikli i/Defekti .....	19
3.1.6.2.3. Metiyonin sentaz (MS) Eksikli i/Defekti .....	20
3.1.6.3. Edinsel Faktörler .....	20
3.1.6.3.1. Vitamin Eksiklikleri .....	20
3.1.6.3.2. Kronik Hastalıklar .....	21
3.1.6.3.3. laçlar .....	21
3.1.6.4. Beslenme ve Ya am ekli .....	22
3.1.7. Hiperhomosisteineminin Tedavisi .....	22

3.2. HOMOSİSTEİNİN NÖRAL HASAR OLUŞTURMA MEKANİZMALARI	
VE BİLİSEL FONKSİYONLAR	23
3.2.1. Genel bilgiler	23
3.2.2. Homosistein ve Oksidatif Stres ilişkisi	26
3.2.2.1. Oksidatif Stres	26
3.2.2.2. Lipid Peroksidasyonu (LPO)	27
3.2.2.3. Glutasyon (GSH)	29
3.2.2.4. Oksidatif Stres-Nörodegeneratif Hastalık ilişkisi	29
3.2.2.5. Homosistein ve Oksidatif Stres	30
3.2.3. Homosistein ve Apoptozis ilişkisi	31
3.2.3.1. Apoptozis	31
3.2.3.2. Apoptozis ve p53	34
3.2.3.3. Apoptozis ve Bcl-2	34
3.2.3.4. Homosistein ve Apoptozis	35
3.2.4. Homosisteinin Nöroplastisite ve Beyin Matürasyonu ile ilişkisi	36
3.2.4.1. Nöroplastisite	36
3.2.4.2. NCAM ve PSA-NCAM	37
3.2.4.3. Homosistein ve Nöroplastisite	40
3.2.4.4. Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)	41
3.2.4.5. S100B Proteini	41
3.2.5. Homosistein ve NMDA Reseptörleri	42
3.2.6. Homosistein ve DNA Sentezi	43
3.2.7. Homosistein ile ilişkili Diğer Nörotoksik Mekanizmalar	44
3.3. HOMOSİSTEİN VE GEBELİK	45
3.4. AMAÇ	49
<b>4. GEREKÇİ ve YÖNTEM</b>	<b>50</b>
4.1. Deney Hayvanları	50
4.2. Deneysel Uygulamalar	51
4.3. Sıçanlarda Reprodüktif Siklus Takibi	53

4.4. Serum Total Homosistein Analizi .....	54
4.5. Yenido an Sıçan Total Beyin Doku Örneklerinde Oksidatif Stres ve Apoptoz Belirlenmesi için Yapılan Analizler .....	54
4.5.1. Total Protein, LPO ve GSH Analizleri için Doku Örneklerinin Hazırlanması .....	54
4.5.2. Yenido an Total Beyin Örneklerinde Lipit Peroksidasyonu (LPO) Ölçüm Yöntemi .....	55
4.5.3. Yenido an Total Beyin Örneklerinde Glutasyon (GSH) Ölçüm Yöntemi .....	56
4.5.4. Yenido an Total Beyin Örneklerinde DNA Fragmentasyon Analizi ....	58
4.5.5. Yenido an Total Beyin Örneklerinde Bcl-2 Protein Ölçümü .....	58
4.5.6. Yenido an Total Beyin Dokusunda Semi-quantitatif PCR ile p53 mRNA'nın Ekspresyon Analizi .....	59
4.6. Morris Water Maze Ö renme Testi ve Probe Test .....	60
4.7. Yenido an Total Beyin Dokularının ve Genç Eri kin Yavruların Hipokampus Bölgesinin SDS-PAGE ve Western Blot ile Analizi .....	62
4.7.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması .....	62
4.7.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS -PAGE) .....	63
4.7.2.1. SDS-PAGE için Jellerin Hazırlanması .....	64
4.7.2.2. Örneklerinin SDS-PAGE ile Analizi .....	66
4.7.3. Western Blot .....	67
4.7.3.1. Yenido an Total Beyin Dokularının ve Genç Eri kin Yavruların Hipokampus Bölgesinin Western Blot ile Analizi .....	67
4.8. istatistiksel Analizler .....	69
<b>5. BULGULAR</b> .....	<b>70</b>
5.1. LPO De erleri .....	71
5.2. GSH De erleri .....	72
5.3. DNA Fragmentasyon De erleri .....	72
5.4. Bcl-2 Protein De erleri .....	73

5.5. p53 mRNA De erleri .....	74
5.6. Morris Water Maze Testi .....	75
5.7. GFAP De erleri .....	79
5.8. S100B De erleri .....	80
5.9. PSA-NCAM De erleri .....	81
5.10. NCAM De erleri .....	83
<b>6. TARTI MA</b> .....	<b>86</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>93</b>
<b>8. ÖZGEÇM</b> .....	<b>123</b>



## TABLO L STES

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b> Plazmadaki homosistein formları	14
<b>Tablo 2.</b> Plazma total homosistein düzeyleri	16
<b>Tablo 3.</b> Plazma homosistein düzeylerini etkileyen faktörler	17
<b>Tablo 4.</b> Apoptozis ve nekrozun genel özellikleri	33
<b>Tablo 5.</b> Anne ve fetus homosistein düzeylerinin karşılaştırılması	47
<b>Tablo 6.</b> Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi	50
<b>Tablo 7.</b> Semi kantitatif RT-PCR için kullanılan primer sırası	60
<b>Tablo 8.</b> Ayırma jelinin hazırlanması	65
<b>Tablo 9.</b> Yükleme jelinin hazırlanması	65
<b>Tablo 10.</b> Örnek solüsyonların hazırlanması	66
<b>Tablo 11.</b> PNG-1’de yavru sıçanların ortalama vücut ve beyin ağırlıkları	70
<b>Tablo 12.</b> PNG-82’de yavru sıçanların ortalama vücut ağırlıkları	70

## EK L L STES

	<b>Sayfa No</b>
<b>ekil 1.</b> Homosistein ve metiyoninin yapısı	5
<b>ekil 2.</b> Homosistein metabolizması	11
<b>ekil 3.</b> NCAM'ın moleküler özellikleri	38
<b>ekil 4.</b> Gebelik süresince homosistein düzeyindeki de i iklikler	46
<b>ekil 5.</b> PNG-1'de, Kontrol ve Hcy gruplarındaki yavru beyinlerinin subse llüler fraksiyonlardaki ortalama LPO düzeyleri	71
<b>ekil 6.</b> PNG-1'de, Kontrol ve Hcy gruplarındaki yavru total beyinlerinde GSH düzeyleri	72
<b>ekil 7.</b> Yavru beyinlerinde DNA fragmentasyonu	73
<b>ekil 8.</b> PNG-1'de, Kontrol ve Hcy gruplarındaki yavru total beyinlerinin mitokondri ve nükleer fraksiyonlardaki Bcl-2 proteinlerinin immünblot ve dansitometrik analizleri	74
<b>ekil 9.</b> Kontrol ve Hcy gruplarındaki yavru beyinlerinde p53 mRNA ekspresyon düzeyleri	75
<b>ekil 10.</b> Water maze testi; her iki grubun günle rdeki ortalama platformu bulma süreleri	76
<b>ekil 11.</b> Water maze testi; her iki grubun günlerdeki platformu bulmak için katedilen ortalama yüzme mesafeleri	77
<b>ekil 12.</b> Probe testi; her iki grubun, ba langıçta platformun lokalize oldu u hedef kuadranda geçirdikleri zamanın yüzdesi	78
<b>ekil 13.</b> Her iki grubun, ba langıçta platformun lokalize oldu u kuadrana giri sayıları	79
<b>ekil 14.</b> PNG-1 ve PNG-82'de GFAP protein ekspresyonunun immünblot (A) ve dansitometrik analizleri (B)	80

<b>ekil 15.</b> PNG-1 ve PNG-82’de S100B protein ekspresyonunun immünblot (A) ve dansitometrik analizleri (B)	81
<b>ekil 16.</b> Kontrol ve Hcy gruplarının PNG-1’deki total beyin homojenatlarındaki PSA-NCAM ekspresyonlarının western blot (A) ve dansitometrik analizleri (B)	82
<b>ekil 17.</b> Kontrol ve Hcy gruplarının PNG-82’deki hipokampus homojenatlarındaki PSA-NCAM ekspresyonlarının western blot (A) ve dansitometrik analizleri (B).	83
<b>ekil 18.</b> Kontrol ve Hcy gruplarının PNG-1’deki total beyin homojenatlarındaki NCAM protein ekspresyonlarının western blot (A) ve dansitometrik analizleri (B)	84
<b>ekil 19.</b> Kontrol ve Hcy gruplarının PNG-82’de hipokampus homojenatlarındaki NCAM protein ekspresyonlarının western blot (A) ve dansitometrik analizleri (B)	85

## KISALTMALAR L STES

<b>ADMA</b>	: Asimetrik dimetilarginin
<b>A</b>	: amiloid
<b>ALS</b>	: Amiyotrofik lateral skleroz
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BHMT</b>	: Betain-homosistein metil transferaz
<b>BOS</b>	: Beyin omurilik sıvısı
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>Ca<sup>++</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CBS</b>	: Sistasyonin $\beta$ -sentaz
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetikasit
<b>GFAP</b>	: Glial fibriler asidik protein
<b>GF</b>	: Glikosilfosfatidil inositol
<b>GR</b>	: Glutasyon redüktaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSSG</b>	: Glutasyon disülfid
<b>GST</b>	: Glutasyon-S-transferaz
<b>Hcy</b>	: Homosistein
<b>HHcy</b>	: Hiperhomosisteinemi
<b>HDA</b>	: Hidroksi alkenal
<b>HERP</b>	: Homosistein-responsive Endoplazmik Retikulum Protein
<b>HNE</b>	: 4-hidroksi-2-nonenal
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit

<b>Ig</b>	: immunoglobulin
<b>kDa</b>	: kilo Dalton
<b>LPO</b>	: Lipit peroksidasyon
<b>LTP</b>	: Uzun süreli potansiyasyon
<b>MAT</b>	: Metiyonin S-adenozil transferaz
<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>mRNA</b>	: Haberci ribonükleik asit
<b>MS</b>	: Metiyonin sentaz
<b>MSS</b>	: Merkezi sinir sistemi
<b>5,10-MTHF</b>	: 5,10-metilen tetrahidrofolat
<b>MTHFR</b>	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
<b>tMTHFR</b>	: Termolabil Metilentetrahidrofolat redüktaz varyantı
<b>MWM</b>	: Morris water maze
<b>NAC</b>	: N-asetil sistein
<b>NADP<sup>+</sup></b>	: Nikotin amid adenin dinükleotid (Okside form)
<b>NADPH</b>	: Nikotin amid adenin dinükleotid (Redükte form)
<b>NCAM</b>	: Nöral hücre adezyon molekülleri
<b>NMDA</b>	: N-Metil D-Aspartat
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	: Süperoksit anyon radikali
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet oksijen
<b>OH<sup>·</sup></b>	: Hidroksil radikali
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>PP2A</b>	: Protein fosfataz 2A
<b>PSA</b>	: Polisialik asit
<b>PUFA</b>	: Poliansature yağ asitleri

<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SAH</b>	: S-adenozil-L-homosistein
<b>SAM</b>	: S-adenozil metiyonin
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>tRNA</b>	: Ta ıyıcı ribonükleik asit
<b>THF</b>	: Tetrahidrofolat

## 1. ÖZET

Homosistein (Hcy) metiyonin metabolizması sırasında ortaya çıkan, sülfür içeren bir amino asittir. Hayvan çalışmalarında hiperhomosisteineminin oksidatif stres, apoptozis, nöroplastisite ve nöral gelişim bozukluğunda rolü olduğu ve bilişsel disfonksiyona yol açtığı bildirilmiştir. Hiperhomosisteineminin gebe sıçan yavrularının beyinlerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla çalışma gerçekleştirildi.

Çalışmada gebe Wistar albino sıçanlar Hcy ve kontrol grubu olarak ikiye ayrıldı. Gebelerden elde edilen yavruların yarısı doğumdan sonra (postnatal 1.gün; PNG-1) sakrifiye edilerek beyin dokularında lipit peroksidasyon ürünleri (LPO; Malondialdehit+4-hidroksi alkenal olarak), glutatyon (GSH), DNA fragmentasyonu, p53 mRNA ekspresyon düzeyi, Bcl-2 protein düzeyi, glial fibriler asidik protein (GFAP), S100B proteini, nöral hücre adezyon molekülleri (NCAM) ve polisialize NCAM (PSA-NCAM) ekspresyon düzeyleri tayin edildi. Geri kalan yavrular postnatal 82. güne (PNG-82) kadar normal beslenmeyle büyütüldü; bu erişkin yavrulara öğrenme testlerinden Morris water maze (MWM) testi uygulandıktan sonra sakrifiye edilerek hipokampusta NCAM, PSA-NCAM, GFAP, S100B düzeyleri tayin edildi.

Gebe sıçanların günlük içme sularına metiyonin konulması gebeliğin sonunda ölçülen plazma hcy seviyesini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı (Kontrol: 6 µM/L ve Hcy grup: 26 µM/L; P<0.001).

Hiperhomosisteinematik gebe sıçanların bir günlük yavrularının beyin homojenatlarında kontrole göre LPO ürünleri özellikle mitokondride daha belirgin olmak üzere artmıştı (mitokondrial fraksiyon için p<0.001, nükleer fraksiyon için

p<0.001, sitozolik fraksiyon için p<0.01). Homosistein grubunda DNA fragmentasyonu tespit edildi. Homosistein grubunda kontrole göre Bcl-2 protein düzeyinde azalma (mitokondrial fraksiyon için p<0.001, nükleer fraksiyon için p<0.05), ve p53 mRNA ekspresyonunda artış (p<0.001), GFAP protein ekspresyonunda azalma (p<0.01) ve S100B protein ekspresyonunda azalma (p<0.001), NCAM ve PSA-NCAM ekspresyon paterninde farklılık gözlemlendi. Hcy grubunda NCAM 140 ve PSA-NCAM ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak düşüktü (Her ikisi için p<0.001). Homosistein grubu genç erişkin yavrularında NCAM 180 ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak düşüktü (p<0.001), GFAP ve S100B düzeyleri farklı değildi. Erişkin yavrulara uygulanan MWM testinde ise Hcy grubunda kontrole göre uzaysal öğrenme ve hafıza konsolidasyonunda bozulma tespit edildi.

Sonuç olarak, bulgular, yüksek homosistein düzeyine maruz kalan gebe sıçan yavrularının beyinlerinde oksidatif stres, apoptozis ve nöroplastisitede bozukluklar oluştuğunu ve genç erişkin yavrularda gecikmiş beyin maturasyonuna bağlı bazı bilişsel bozukluklara yol açtığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Homosistein, gebelik, nöroplastisite, apoptozis, bilişsel fonksiyonlar.



## 2. ABSTRACT

### **Effects of Prenatal Exposure to Hyperhomocysteinemia on Neural Plasticity and Cognitive Functions in Rats**

Homocysteine (Hcy), a sulphur containing amino acid, is derived from the metabolism of methionine. Experimental data from animals implicate that hiperhomocysteinemia causes oxidative stres, apoptosis, defects in neuroplasticity and neural development and cognitive dysfunction. This study was performed to evaluate effects of maternal hyperhomocysteinemia on brain of offsprings.

Pregnant Wistar albino rats were randomly divided into Hcy and control groups. Half of pups from both groups were sacrificed on the first postnatal day (PND-1) to assay the levels of LPO products (LPO; as malondialdehyde + 4-hydroxyalkenals), glutathione (GSH), DNA fragmentation, p53 mRNA expression, Bcl-2 protein, gial fibrillary acidic protein (GFAP), S100B protein, neural cell adhesion molecules (NCAM) and polysialylated form of NCAM (PSA-NCAM) in the pup brain. The other half of pups from both groups were feeded with normal diet until they become 82 days old. Then a learning test, Morris water maze, was performed and the offsprings were sacrificed to analyze NCAM, PSA-NCAM, GFAP, S100B protein levels in the hippocampus.

Daily administration of methionine via drinking water to pregnant rats resulted in higher plasma level of hcy at the end of pregnancy compared to control group (Control: 6  $\mu\text{M/L}$  and Hcy group: 26  $\mu\text{M/L}$ ;  $P < 0.001$ ). Brain homogenates of Hcy group compared to controls had significantly higher LPO products especially in mitochondrial fraction (mitochondrial fraction  $p < 0.001$ , nuclear fraction  $p < 0.001$ , cytosolic fraction  $p < 0.01$ ). DNA fragmentation was observed in

Hcy group. Pups from hyperhomocysteinemic dams had significantly lower Bcl-2 protein level (mitochondrial fraction  $p < 0.001$ , nuclear fraction  $p < 0.05$ ); they had also increased p53 mRNA ( $p < 0.001$ ), decreased GFAP ( $p < 0.01$ ) and S100B ( $p < 0.001$ ) protein levels compared to control group. Expression of NCAM-140 and PSA-NCAM were lower in Hcy group ( $p < 0.001$ , for both). In comparison to control group, level of NCAM-180 expression was significantly lower in hippocampal homogenates from Hcy group ( $p < 0.001$ ). Levels of GFAP and S100B were not different in hippocampus of young adult offsprings from both groups. In Morris water maze task, spatial learning and memory consolidation were impaired in Hcy group.

As a result the data implicates that pups from pregnant rats exposed to the higher level of homocysteine show increased oxidative stress, apoptosis, defects in neuroplasticity. Young adult offspring from hyperhomocysteinemic rats also shown cognitive impairment due to delayed brain maturation.

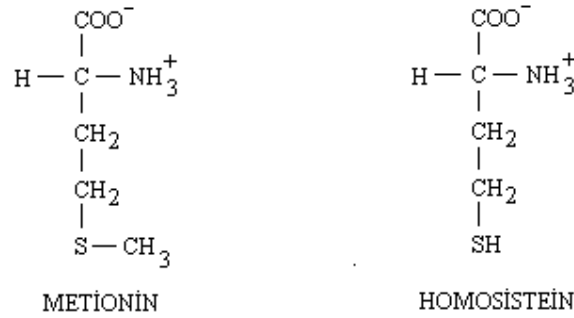
**Key words:** Homocysteine, pregnancy, neuroplasticity, apoptosis, cognitive functions.

### 3. GİRİŞ

#### 3.1. HOMOSİSTEİN

Homosistein (Hcy; HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H, 2-amino-4-merkaptobutirik asit), beslenme ile alınan metiyonin aminoasidinin metabolizması esnasında bir ara ürün olarak oluşan, proteinlerin yapısına katılmayan, sülfür içeren bir aminoasittir (1-3). İlk kez 1932 yılında Du Vigneaud tarafından insulin ile ilgili çalışmalar yapılırken elde edilmiştir (4,5).

Metiyoninin demetilasyonu ile oluşmuş bir tiol olan homosisteinin yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.** Homosistein ve metiyoninin yapısı

Homosistein metabolizmasında önemli bir yere sahip olan metiyonin; proteinlerin sentezinde, transmetilasyon reaksiyonlarında, poliaminlerin sentezinde, sistatyonin, sistein ve transsülfürasyon yolunun diğer ürünlerinin oluşumunda, hücre içi folat metabolizması ve kolin katabolizması için gerekli

olan homosisteinin sağlanması gibi biyolojik süreçlerde rol oynar ve memelilerin normal büyüme ve gelişimi için esansiyel bir aminoasittir (6).

Homosisteinin klinik önemi, 1962 yılında sistatyonin- $\beta$ -sentaz (CBS) eksikliğine bağlı olarak oluşan homosistinüri hastalığı dolayısıyla ortaya çıkmıştır. Bu hastalıkta trombotik olaylar, prematür ateroskleroz ve mental gerilik görülür (7,8). Homosistinürideki bu bulgular ile homosistein düzeyi arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır (8). Benzer şekilde tromboembolik olayların kobalamin eksikliği ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzim eksikliği gibi hiperhomosisteinemi oluşturan bozukluklarda da gözlenmesi, homosistein-vasküler hastalık bağlantısı üzerindeki düşünceleri pekiştirmiştir (4).

Homosistein; serebrovasküler, periferik vasküler, koroner kalp hastalığı ve tromboz için bağımsız bir risk faktörü olup (9-11); aterosklerotik damar hastalıkları ile hiperhomosisteinemi arasındaki ilişki yaş, hipertansiyon, dislipidemi, sigara ve şişmanlık gibi diğer risk faktörlerinden bağımsızdır (12).

Yapılan çalışmalarda, homosisteinin tromboz, merkezi sinir sistemi (MSS) gelişim bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklar, depresyon ve şizofreni gibi psikiyatrik bozukluklar ve bazı kanserlerle ilişkili olabileceği gösterilmiştir (9).

Gebelerde homosistein seviyesindeki artışın nöral tüp defektleri, preeklampsi, prematürite, düşük doğum ağırlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (13-17). Nöral tüp defektleri spina bifida, meningosel, ensefalosel ve anensefaliyi içerir ve bu bozuklukların tamamı hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümündeki anormalliklerle ilişkilidir (18).

Homosisteinin erişkin sıçanlarda oksidatif yükü arttırdığı, apoptozisi hızlandırdığı, nöral plastisitede defekt oluşturduğu ve sonuçta, kognitif

performansı kötüleştirdiği gösterilmiştir (19-25). Yaşlı insanlarda hafif kognitif disfonksiyon ve nörodejeneratif hastalıkların sık görülmesi, homosisteine olan ilgiyi arttırmaktadır.

Erişkin hayvan modellerinde hiperhomosisteineminin nöral etkileriyle ilgili literatür bolluğuna karşılık, gebe hayvan modellerinin yavrularındaki nöral ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkileriyle ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır.

### **3.1.1. Homosistein Metabolizması**

Homosistein, metiyonin metabolizmasının ayrılmaz bir bileşenidir. Metiyonin transmetilasyon yolu ile homosisteine dönüşür. Bir kez homosistein oluştuktan sonra ya remetilasyon yolu ile tekrar metiyonine dönüşür ya da transsülfürasyon yolu ile sistatyonin ve sisteine metabolize edilir (26).

Stabil izotopla işaretleme metodunun metiyonin metabolizmasına uygulanmasıyla transmetilasyon, remetilasyon ve transsülfürasyon yollarının insandaki dağılımı gösterilebilmiştir (27). Genç erişkinlerde 1-1.5 gr./kg/gün protein alındığında oluşan homosisteinin yaklaşık % 43 remetile olurken, % 57'si transsülfürasyon yoluyla metabolize edildiği gösterilmiştir (28).

Temel metiyonin döngüsü bütün normal memeli hücrelerinde aynı biçimde yer alır (4). Beyindeki homosistein-metiyonin metabolizmasının diğer organlardan farklı olduğu ileri sürülmüştür (29). Yapılan çalışmalarda betain-homosistein metiltransferaz (BHMT) enzimi beyinde belirlenememiştir (30,31). Ayrıca  $\gamma$ -sistatyonaz enziminin de beyinde mevcut olmadığı iddia edilmiştir (32). Konu transsülfürasyon başlığı altında daha detaylı tartışılmıştır.

### 3.1.1.1. Transmetilasyon

Metiyonin metabolizması, metiyonin adenozil transferaz (MAT) enzimi aracılığı ile kükürt atomuna ATP'den bir adenozil grubunun transferi sonucu S-adenozil-L-metiyonin (SAM) oluşması ile başlar. SAM metil grubunu kolaylıkla bir alıcıya vererek S-adenozil-L-homosisteine (SAH) dönüşmektedir. SAH ise reversible bir enzim olan SAH hidrolaz enzimi ile adenzin ve homosisteine metabolize edilir. Bu reaksiyonlar transmetilasyon olarak adlandırılır.

S-adenozil-L-metiyonin (SAM) metiyonin metabolizmasında anahtar bir ara üründür (33,34). Oluşumu için ATP gereklidir ve bu reaksiyonda ATP'nin üç fosforu da kullanıldığından yüksek enerjili bir bileşiktir (35). 1953'de Catoni (36) tarafından keşfedilen SAM çok yönlü bir koenzimdir. S-adenozil-L-metiyonin (SAM) sadece bir metil grup vericisi olmayıp siklopropil yağ asit sentezinde metilen grup vericisi, biotin sentezinde amino grup vericisi, poliamin ve etilen sentezinde aminoizopropil grup vericisi ve 5'-deoksiadenozil radikal vericisidir (35). Ayrıca biotin ve lipoik asit sentezinde sülfür kaynağıdır (37).

Memelilerde SAM'ın büyük çoğunluğu metil transferaz reaksiyonlarında kullanılır. Bu reaksiyonlarda pozitif yüklü sülfonyum iyonu kendisine bağlanan metil grubunu elektron fakir hale getirir ve böylece ortamda elektron zengin alıcılar bulunduğu reaksiyon kolaylıkla gerçekleşir (35). SAM bu metil grubunu birçok alıcıya verebilir (aminoasit, DNA, RNA, fosfatidil serin, kreatinin metalleri...); memelilerde en az 60 çeşit metil transferaz reaksiyonları tanımlanmıştır (35,38-40).

### 3.1.1.2. Remetilasyon

Homosisteinin remetilasyon ile metiyonine dönüşümü iki enzimden biri aracılığı ile olur:

- 1- Metiyonin sentaz (MS; 5-metiltetrahidrofolat-homosisteinmetiltransferaz)
- 2- Betain-homosistein metiltransferaz (BHMT)

Homosisteinin remetilasyonu, 5-metiltetrahidrofolatı metil vericisi ve vitamin B<sub>12</sub>'nin bir formu olan metilkobalamini ise kofaktör olarak kullanan metiyonin sentaz (MS) tarafından katalizlenmektedir. 5-metiltetrahidrofolatın oluşumu; tetrahidrofolattan (THF) elde edilen 5,10-metilentetrahidrofolatın redüksiyonunu katalizleyen 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaza (MTHFR) bağımlıdır. MTHFR enzimi ise kofaktör olarak vitamin B<sub>2</sub>'yi (riboflavin) kullanmaktadır. Bu remetilasyon yolunda folat hem koenzim hem de kofaktör olarak kullanılmakta ve bu olay döngü şeklinde devam etmektedir (5,41,42).

Betaini metil vericisi olarak kullanan ikinci bir homosistein metilaz sistemi memelilerin karaciğeri ve primatların böbreklerinde tespit edilmiştir (31). Yapılan çalışmalarda betain- homosistein metiltransferaz (BHMT) enzimi beyinde belirlenememiştir (30,31).

Bu yolu katalize eden BHMT, metil vericisi olarak kolinin oksidasyon ürünü olan betaini kullanarak N,N-dimetilglisin ve metiyonin oluşturmaktadır. Folat ve/veya kobalamin eksikliğinde bu yol SAM sentezi için gerekli metiyoninin doku konsantrasyonunu sürdürmektedir (42). Metiyonin döngüsü metiyonini katabolize etmez; metiyonin transsülfürasyon ile katabolize olur.

### 3.1.1.3. Transsülfürasyon

Transsülfürasyon homosistein katabolizması için önemli bir yoldur ve karaciğerdeki glutatyonun (GSH) da majör kaynağıdır (43). Homosisteini metiyonin siklusundan alıp geridonüştürsüz olarak önce sistatyonine daha sonra sırasıyla sistein ve glutatyona dönüştüren yolağa transsülfürasyon denir. Bu reaksiyonlar sırasında  $\alpha$ -ketobütirat,  $\text{NH}_4^+$ , taurin, piruvat, sülfat +  $\text{CO}_2$  de oluşur (18).

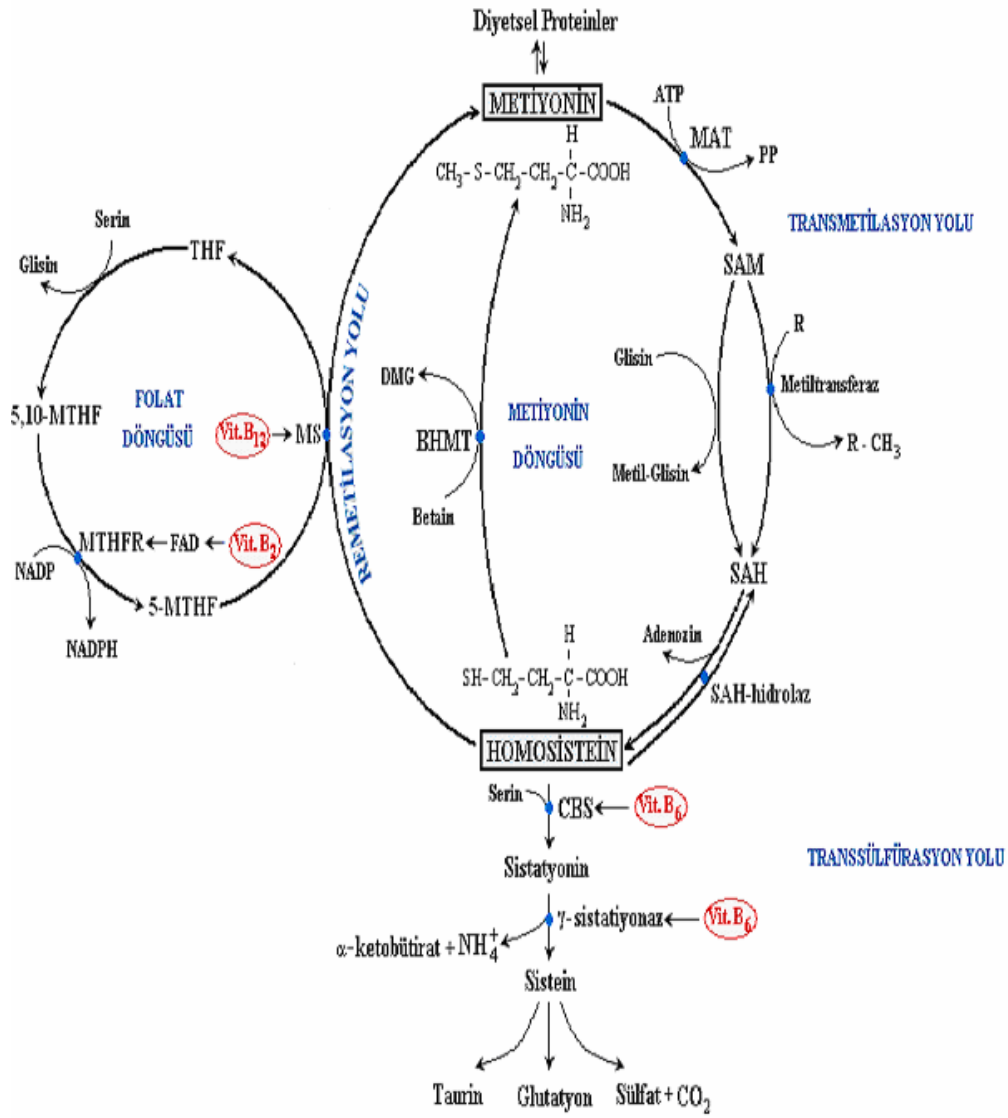
Transsülfürasyonun ilk basamağında homosistein ve serin amino asidi, CBS enzimi tarafından katalize edilerek sistatyonini oluşturmaktadır. Sistatyonin daha sonra  $\gamma$ -sistatyonaz enzimi ile  $\alpha$ -ketobütirat,  $\text{NH}_4^+$  ve sisteine metabolize edilir. Oluşan sistein, glutatyonun yapısına girmekte ya da sülfata dönüşerek glikozaminoglikanların yapısına katılmaktadır. Diğer yandan, homosistein ile birleşerek sistein-homosistein disülfid bileşiklerini de oluşturabilmektedir (32).

Sistatyonin- $\beta$ -sentaz (CBS) bir heme proteindir. Transsülfürasyonda rol alan her iki enzim de vitamin B<sub>6</sub>'nın aktif formu olan pridoksal-5-fosfatı kofaktör olarak kullanmaktadır (4,41,42).

Transsülfürasyon yolu memeli dokularında yaygın olarak bulunmaz; karaciğer, böbrek, barsak ve pankreasta bulunur (35). Beyinde ise CBS bulunurken (41)  $\gamma$ -sistatyonaz enziminin beyindeki varlığı ile ilgili çalışmalar kesin sonuç vermemiştir (45-47). Bu çalışmalarda  $\gamma$ -sistatyonazın beyindeki dağılımı bölgesel farklılıklar gösterebileceği de ileri sürülmüştür (46,47).

İn vitro şartlarda radyoizotop işaretleme ve enzim inhibitörleri kullanılarak yapılan bir çalışmada beyinde transsülfürasyon yolunun tam ve işlevsel olduğu; daha önce yapılan çalışmalardaki bazı çelişkili sonuçların ölçüm yöntemlerinin yetersizliğine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (48). Homosistein metabolizması Şekil 2'de gösterilmiştir.





Şekil 2. Homosistein Metabolizması

### 3.1.2. Homosistein Metabolizmasının Regülasyonu

Homosistein metabolizması esas olarak enzimlerin ekspresyonunda değişiklik ve SAM'ın oluşturduğu allosterik enzim regülasyonu ile olur (35). S-adenozil-L-metiyonin (SAM), CBS enziminin allosterik aktivatörü ve MTHFR enziminin allosterik inhibitörüdür (49). Bu yüzden artmış SAM transsülfürasyonu artırır ve remetilasyonu inhibe eder. Dolayısıyla dokulardaki SAM (bazı dokularda SAH) konsantrasyonları homosisteinin remetilasyon veya transsülfürasyon yönünde ilerleyeceğini belirler (4,33,50). Metiyonin adenzil transferaz (MAT) enziminin regülasyonunda endokrin ve nutrisyonel faktörlerin de rolü bildirilmiştir (51).

Transsülfürasyon yolu prooksidan-antioksidan dengesine duyarlıdır. Peroksitler transsülfürasyonu artırır, antioksidanlar azaltır (52). Bir heme proteini olan CBS enzimi okside durumda aktiftir (53,54). Tersine MS oksidasyonla inaktif hale gelir ve reaktivasyon için metilasyon ile redükte edilmesi gerekmektedir (55). Böylece oksidatif stres transsülfürasyonu artırabilir; bu da sistein ve glutatyon sentezi ile sonuçlanır (4). Glutatyon sentezi için gerekli olan sisteinin en az yarısı transsülfürasyondan elde edilir (56).

İzotop çalışmalarından elde edilen verilere göre ortamda sistein varsa homosistein transsülfürasyon yolağına değil, transmetilasyon yolağına girer; dolayısıyla sistein, metiyonin-homosistein metabolizmasında düzenleyici etkiye sahiptir (27).

Uzun süre yüksek metiyonin alımı remetilasyon yolunda inhibisyona neden olur ve transsülfürasyonda satürasyona yol açabilir. Bu durumda

homosistein hücrelerden dışarı atılarak plazma homosistein düzeylerinin yükselmesine yol açmaktadır (57).

### **3.1.3. Plazmadaki Homosistein Formları**

Plazmadaki homosistein ya plazma proteinlerine bağlı olarak ya da serbest halde bulunmaktadır (58).

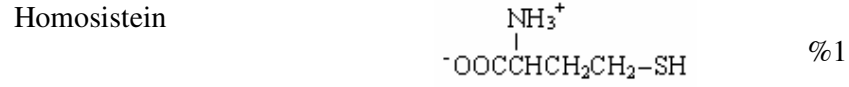
İnsan plazması hem indirgenmiş hemde yükseltgenmiş homosistein formlarını içerir. Plazma homosisteinin sadece %1 kadarı indirgenmiş formda bulunmaktadır. Homosistein oksidasyonu disülfid bağı aracılığıyla meydana gelir (59). Yükseltgenmiş homosisteinin % 80- 90 kadarı başlıca albumin olmak üzere plazma proteinlerine bağlanmıştır, serbest homosistein ise ya kendisiyle birleşerek dimer homosistein (homosistin) ya da başta sistein olmak üzere diğer tiyollerle birleşerek sistein-homosistein disülfidi oluşturmaktadır.

Total homosistein düzeyi hem bağlı olan kısmı hemde serbest olan kısmı yansıtmaktadır (58). Plazma homosistein formları tablo 1’de gösterilmiştir (59).

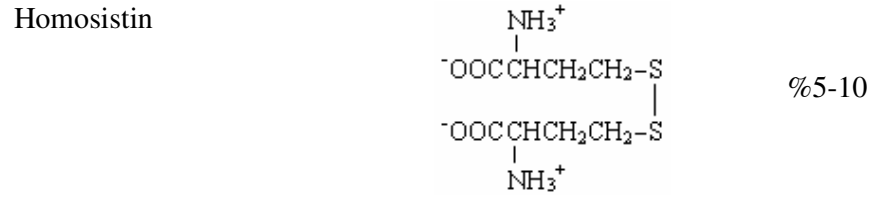
**Tablo 1.** Plazmadaki homosistein formları (59)

---

**Redükte (İndirgenmiş) Form**

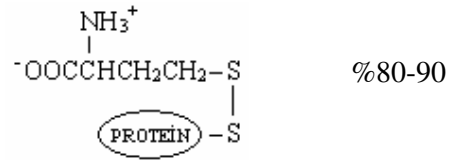


**Okside (Yükseltgenmiş) Form**

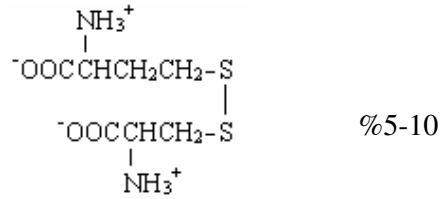


**Karışık disülfidler:**

Proteine-bağlı homosistein



Sistein-homosistein disülfid



### **3.1.4. Beyinde Homosistein Metabolizması**

Mevcut bulgulara göre homosistein plazma ile beyin arasında, muhtemelen spesifik çift yönlü hücresel taşıyıcılar vasıtasıyla geçebilmektedir (60). Beyin omurilik sıvısındaki (BOS) homosistein konsantrasyonu serumdaki ile paralel değişim gösterir, ancak serumdaki konsantrasyonu 20–100 kat daha fazladır (43,61,62). Plazma homosistein seviyesindeki artış beyinde de homosistein ve SAH artışına yol açar (63).

Homosisteinin beyin hücrelerine geçişi tam olarak açığa kavuşturulmamıştır; hayvan çalışmalarında basit difüzyona ilaveten özel, doyurulabilir reseptörler aracılığıyla transport edilebildiği bildirilmiştir (60,64,65). Normal şartlar altında insan nöral hücreleri homosistein üretebilme kapasitesine sahiptir ve beyinde homosisteinin üretilebildiği gösterilmiştir (66). Beyinde homosistein metabolizmasında bölgesel farklılık olup olmadığı araştırılmamıştır. Hiperhomosisteinemi fare modelinde, homosisteinin kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü bozduğu gösterilmiştir (67).

### **3.1.5. Hiperhomosisteinemi**

Homosistein plazma seviyesinin ölçümü ilk kez 1962 yılında bir tanı aracı olarak homosistinürlü hastalar araştırılırken kullanılmaya başlanmıştır (68,69).

İnsanda plazma total homosistein düzeylerinin 15  $\mu\text{mol/L}$ ' nin üzerinde olması hiperhomosisteinemi (HHcy) olarak kabul edilmektedir. Total plazma homosistein düzeyine göre hafif, orta ve ağır hiperhomosisteinemi olarak değerlendirilmektedir (59).

Konjenital homosistinüride plazma homosistein seviyesi 100 µmol/L civarındadır (70). Sağlıklı erişkinlerde 5-15 µmol/L olarak ölçülmüşse de, bunu normal olarak değerlendirirken dikkatli olunmalıdır; zira 10 µmol/L düzeyinden sonra homosistein ile ilişkili sağlık riskleri artmaktadır. Uygun beslenme ve tedavi ile homosisteinin 10 µmol/L düzeyinde tutulması mümkündür (59,71). Plazma total homosistein düzeyleri tablo 2’de gösterilmiştir (59).

**Tablo 2.** Plazma total homosistein düzeyleri (59)

---

Normal aralık	5-15 µmol/L
<b><u>Hiperhomosisteinemi</u></b>	
Hafif form	15-25 µmol/L
Orta form	25-50 µmol/L
Ağır form	50-500 µmol/L

---

### **3.1.6. Hiperhomosisteinemi Nedenleri**

Plazma homosistein düzeyi demografik, genetik, yaşam stili ve sağlık durumundan etkilenir. Ayrıca birçok ilaç homosistein düzeyini değiştirebilir (59). Plazma homosistein düzeylerini etkileyen faktörler tablo 3’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Plazma homosistein düzeylerini etkileyen faktörler

---

**Demografik**

Yaş

Cinsiyet

Etnik köken

**Genetik**

CBS eksikliği yada defekti

MTHFR eksikliği yada defekti

MS eksikliği yada defekti

**Edinsel**

B vitamin eksikliği (folat, vit. B<sub>12</sub> ve B<sub>6</sub>)

Sağlık durumu

- Renal fonksiyon bozukluğu
- Son dönem böbrek hastalığı
- Hipertansiyon, hiperlipidemi
- Çeşitli kanserler
- Kalp ve diğer organ transplantasyonları
- Kronik karaciğer hastalıkları
- Hipotroidizm

İlaçlar

**Yaşam biçimi**

Beslenme alışkanlığı

Sigara içimi

Alkol ( MS aktivitesini bozar)

Kahve ( günde 5 fincandan fazla)

Egzersiz azlığı

---

### **3.1.6.1. Demografik Faktörler**

Yaş, cinsiyet, gebelik gibi birçok fizyolojik faktör plazma homosistein düzeylerini etkilemektedir.

Yaş artışıyla beraber, vitamin düzeyinden bağımsız olarak homosistein seviyesi artar (72,73). Bu artışın renal fonksiyonlarda ve enzim aktivitelerindeki azalmayla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür.

Premenopozal kadınlarda homosistein düzeyleri, aynı yaştaki postmenopozal kadınlara ve erkeklere göre daha düşüktür. Homosistein ile östradiol arasında negatif bir korrelasyonun bulunduğu ortaya konulmuştur (41,42,74). Gebelikte total plazma homosistein düzeyi %30-50 oranında azalır (75-80). Normal gebelikte homosistein düzeyi 10 µmol/L den daha düşüktür (81). En düşük homosistein değerleri ikinci trimesterde oluşur (77).

### **3.1.6.2. Genetik Faktörler**

Homosistein metabolizmasındaki enzimlerin genetik defektleri veya eksiklikleri hiperhomosisteinemiye yol açmaktadır.

#### **3.1.6.2.1. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) Eksikliği/Defekti**

Remetilasyonda rol alan bir enzim olan MTHFR genini kodlayan bölgedeki 677. nükleotid pozisyonunda sitozin yerine timinin gelmesi ile oluşan bir nokta mutasyonunun (C677T) hafif hiperhomosisteinemi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonda fonksiyonel enzimde alaninin yerine valinin geçmesi sonucu termolabil bir varyantının (*t*MTHFR) oluşmasına ve aktivitesinde %55-65 azalmaya yol açtığı saptanmıştır (25,82-84). Beyaz popülasyonun %10-



13'ünde homozigot (TT genotipi) olan bu mutasyonun düşük folat alımında total homosisteinde yaklaşık %50 kadar artışa neden olduğu tespit edilmiştir (85).

MTHFR'deki 1298. nükleotid pozisyonunda (A1298C) glutamatın alanin ile yer değiştirmesi sonucu görülen polimorfizmde ise enzim aktivitesinde azalmaya yol açtığı ve hiperhomosisteinemiye neden olduğu gösterilmiştir (42,84). MTHFR enzim eksikliği olan infantlarda gecikmiş psikomotor gelişme, ağır mental retardasyon ve ağır psikiatrik semptomlar görülür (86).

### **3.1.6.2.2. Sistatyonin $\beta$ -sentaz (CBS) Eksikliği/Defekti**

CBS glutatyonun hız sınırlayıcı basamağıdır (87), homosisteini sistatyonine dönüştürür ve sonra sistein oluşur (88). CBS eksikliği, şiddetli hiperhomosisteinemiye neden olan bir genetik bozukluktur. Otozomal resesif geçiş gösterir ve 1/100.000 canlı doğumda bir rastlanır. Konjenital homosistinuri olarak adlandırılan klinik bozukluğa neden olan CBS eksikliğinin homozigot ve heterozigot formları vardır. Homozigot bireylerde homosistein konsantrasyonunun yaklaşık 40 kata (400  $\mu\text{mol/L}$ 'ye) kadar arttığı saptanmıştır. Ağır hiperhomosisteinemi, mental retardasyonu da içeren çoklu organ-sistem hasarı ile sonuçlanır (89). Çocuklarda CBS eksikliği sipinal sıvıda homosisteinin 10 kat artmasına ve beyin fonksiyonlarında anormalliklerin oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir (90). Glutatyon sentezinin engellenmesiyle kompensatuar oksidatif tampon kapasitenin muhtemel eş zamanlı azalmasıyla N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörlerinin aşırı uyarılması artmış eksitotoksositeye yol açar (91,92). Heterozigot bireylerin ise %30-50'si normal plazma homosistein düzeylerine sahiptir ve bu formda klinik bulguların daha az belirgin olduğu gösterilmiştir (85,88).

### **3.1.6.2.3. Metiyonin sentaz (MS) Eksikliği/Defekti**

Metiyonin sentazın kofaktörü olan metilkobalaminin sentezini etkileyen mutasyonların ve vitamin B<sub>12</sub> transportundaki değişikliklerinde hiperhomosisteinemi ye neden olduğu bildirilmiştir (25,41). Metiyonin sentaz eksikliği hiperhomosisteinemi, homosistinüri ve hücrel metiyoninde azalma ile sonuçlanır (93).

### **3.1.6.3. Edinsel Faktörler**

#### **3.1.6.3.1. Vitamin Eksiklikleri**

Homosistein metabolizmasında görevli vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> ve folik asitin besinsel olarak eksiklikleri veya malabsorbsiyonları hiperhomosisteinemi riskini artırmaktadır (94,95).

Folik asit eksikliğine besinle alınmada eksiklik, kullanım defektleri, malabsorbsiyon, kanser hastaları ve gebelerde artan ihtiyaç durumları, ilaçlar tarafından metabolik interferans, hemodiyalizde folat kayıpları ile aktif folik asit oluşumu için gerekli enzim veya kofaktör eksiklikleri gibi birçok faktör yol açmaktadır (6).

Vitamin B<sub>12</sub> nin diyetle alınımında eksiklik durumları, emilimi için gerekli olan intrinsik faktörün eksikliği, taşınmasını sağlayan transkobalaminin yokluğu ile ince barsak patolojileri veya ilaç kullanımı sonucu emiliminin bozulması gibi birçok faktör vitamin B<sub>12</sub> eksikliğine yol açmaktadır. Homosisteinin remetilasyonunda vitamin B<sub>12</sub> ve folik asit kofaktör olarak rol oynadıkları için, bu vitaminlerin eksikliği homosistein düzeylerinin yükselmesine yol açmaktadır (6,96).

Vitamin B<sub>6</sub> eksikliğinde hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır. Homosistein metabolizmasında transsülfürasyon yolundaki CBS ve  $\gamma$ -sistatinyonaz enzimleri kofaktör olarak vitamin B<sub>6</sub>'nın aktif formu olan pridoksal-5-fosfatı kullanmaktadır (41,42).

### **3.1.6.3.2. Kronik Hastalıklar**

Homosisteinin atılımı renal yoldan olduğu için, özellikle son dönem böbrek yetmezliğinde plazma homosistein düzeyleri oldukça yükselmektedir (97,98). Kalp transplantasyonu olmuş hastalarda kısmen böbrek yetmezliği ile ilişkili olarak plazma homosistein düzeylerinde artış olduğu saptanmış (99,100). Lösemi, lenfoma, over, meme, pankreas kanserleri gibi çeşitli malign hastalıklarda plazma homosistein seviyesinin yükseldiği, down sendromu ve hipertroidizmde ise homosistein düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (59).

Hipotiroidizm, diyabet, romatoid artrit, psöriazis, Alzheimer, inme, koroner arter hastalığı, derin ven trombozu, hipertansiyon, gastrointestinal cerrahiler, kronik atrofik gastrit, malabsorbsiyon sendromları, hipogonadizm gibi birçok durumda da hiperhomosisteinemi görülmektedir (41,42,101,102).

### **3.1.6.3.3. İlaçlar**

Siklosporin, diüretikler, kortikosteroidler, vitamin B<sub>12</sub> antagonistleri (Nitröz oksit), vitamin B<sub>6</sub> antagonistleri (teofilin, 6-aza-üridin triasetat), folik asit antagonistleri (fenitoin, karbamazepin), dihidrofolat redüktaz inhibitörleri (metotreksat), metiyonin sentaz inhibitörleri (Nitröz oksit), kolesterol düşürücü ilaçlar (kolestiramin, niasin) ve L-DOPA gibi pekçok ilaç homosistein düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte tamoxifen, oral

kontraseptifler, penisillamin ve N-asetilsistein (NAC) gibi bazı ilaçlar ise homosistein düzeylerini düşürmektedir (41,42). Baydaş ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda melatoninin sıçanlarda homosistein seviyesini azalttığını (103-105). ve balık yağının da homosistein düzeyini düşürdüğünü göstermişlerdir (105). Homosistein seviyesinin sıçanlarda diürinal ritme sahip olduğu gösterilmiştir (103).

#### **3.1.6.4. Beslenme ve Yaşam Şekli**

Beslenme alışkanlıkları ve yaşam şekli de homosistein düzeylerini etkilemektedir (25,41,42,59).

Metiyonin bakımından zengin hayvansal proteinlerin fazla tüketimi homosistein düzeylerinde artışa yol açarken; bitkisel ağırlıklı beslenme alışkanlıkları ve vitamin takviyeleri ise düşük homosistein düzeyleri ile ilişkilidir (41,74). Aşırı sigara, alkol ve kahve tüketimi de homosistein düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır. Sedanter yaşam homosistein düzeylerini artırırken, fiziksel aktivite ise azaltmaktadır (42,59,106).

#### **3.1.7. Hiperhomosisteinemi Tedavisi**

Hiperhomosisteinemi tedavisinde beslenme alışkanlıklarının düzeltilmesi ve homosistein metabolizmasında görevli vitaminlerin yeterli düzeyde alınması önemlidir. Folat, gerektiğinde vitamin B<sub>12</sub> ve pridoksal fosfat uygulamasıyla hemen her hastada hiperhomosisteinemi seviyesi düşürülebilmektedir.

Homosistein metabolizmasında genetik bozukluklarla ilişkili nörolojik bozuklukların doğrulanmasında ya da önlenmesinde folat desteğinin ötesinde ilave terapotik yaklaşımlar test edilmektedir. Eksik CBS polimorfizmini kapatmak

için diyet metiyonin alımının azaltılması homosistein üretimini azaltılır. Diyetle sistein veya N-asetilsistein (NAC) verilmesi glutatyon üretimini sürdürür ve alternatif bir yol olarak betain verilmesiyle homosisteinin metabolik yolu uyarılır (107). Betain tedavisi CBS eksikliği olan çocuklarda sipinal kord sıvısındaki homosisteini dramatik şekilde azaltır (86).

Önemli olarak betain folat eksikliği durumunda bile hiperhomosisteinemi azaltılabilir, MTHFR eksikliği olan kişilerde betain tedavisine cevap verir (89). Bununla beraber yapılan çalışmalarda betain-homosistein metiltransferaz enzimi beyinde belirlenememiştir (30,31), betain tedavisinin faydası sistemik homosisteinin azaltılmasıyla olabilir (31).

## **3.2. HOMOSİSTEİNİN NÖRAL HASAR OLUŞTURMA MEKANİZMALARI VE BİLİŞSEL FONKSİYONLAR**

### **3.2.1. Genel bilgiler**

Homosistein nöral hücreler için toksiktir (18-20,22,108-110).

Homosisteinin dejeneratif nörolojik hastalıklar ile ilişkisi, başlangıçta, yaşlılardaki plazma homosistein seviyesinin yüksekliği dolayısıyla gündeme gelmiştir (73,111). Hafif kognitif fonksiyon bozukluğu, demans, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı insanlarda sık görülen nörodejeneratif hastalıklardır. Bu hastalıkların homosisteinle ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar arada bir bağlantı olabileceğini gösteriyor (91,112-114). Depresyon ve şizofrenide de homosistein ile ilişkili bozukluklar ileri sürülmüştür. Homosistein ile nörodejeneratif bozukluklar arasındaki ilişki vitamin tedavisi çalışmalarıyla teyid edilememişse de, bu konuda kesin sonuçlara varmak için, geniş ölçekli kontrollü

çalışmalara ihtiyaç vardır. Vitaminlere başlama zamanı, vitamin dozu gibi faktörler göz önüne alınmalıdır. Hastalık oluştuktan sonraki girişimlerin yararı önleme girişimlerine göre daha az olabilir (43). Aslında gıdalara folat ilavesinden sonraki dönemde Kanada ve ABD’de inme mortalitesinin azaldığı bildirilmiştir (115). Folat ve vitamin B<sub>12</sub> eksikliği hiperhomosisteinemiye yol açtığından bu vitaminlerin eksiklikleri sırasında gözlenen nörolojik bulgular, dolaylı olarak hiperhomosisteinemi ile ilişkilendirilmekte ve kimi zaman çalışmalar iç içe sunulmaktadır (18). Bu türden çalışmalar değerlendirilirken bulguların doğrudan doğruya hiperhomosisteinemi ile ilgili olup olmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Artmış homosistein düzeyleri erişkinlerde olduğu kadar gelişmekte olan sinir sistemi üzerinde de olumsuz etkilere sahiptir (18). Mental retardasyon ve anormal beyin gelişimiyle karakterize bir hastalık olan Down sendromunda homosistein metabolizmasına katılan enzimlerde değişiklikler olması, homosisteinin nöral gelişim ile ilişkili olduğuna dair bir kanıt olarak değerlendirilebilir (116,117).

Homosisteine maruz kalan hayvanlarda homosistein beyinde birikir, gelişme geriliği oluşur, nöral ve kognitif disfonksiyon ve beyin enerji metabolizmasında bozulma meydana gelir (19,23,118-120). Folattan yoksun diyetle beslenen hiperhomosisteinematik erişkin sıçan modelinde düşük folat/hiperhomosisteinematik sıçanların beyin mikrovasküler yapısı elektron mikroskopu ile incelendiğinde endotelde sitoplazmik şişme ve mitokondrial dejenerasyon, perivasküler amorf fibrozis tespit edilmiştir (121).

Bozulmuş CBS aktivitesi ya da folat eksikliği beyin hücrelerinde intrasellüler homosistein düzeylerini arttırır (122). CBS enzim ekspresyonunun değiştirildiği fare modellerinde homosistein artışı ile birlikte nörolojik hasar olduğu bildirilmiştir (67,123,124). Yine CBS enzim eksikliği olan farelerde nöral plastisitede değişiklik, ağır gelişme geriliği ve erken ölüm bildirilmiştir (125).

Baydaş ve arkadaşları (19) hiperhomosisteineminin pasif sakınma ve Morris water maze (MWM) testleriyle ölçülen öğrenme ve hafızayı anlamlı şekilde bozduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada melatonin bulguları düzeltmiştir. Streck ve arkadaşları da (23) homosistein uygulamasının sıçanlarda hafızayı kötüleştirdiğini bildirmişlerdir. Algaidi ve arkadaşlarının (118) yaptığı çalışmada genç-erişkin sıçanlara homosistein uygulanması kognitif bozulmaya yol açmamış, tersine uzaysal öğrenmede kısmi bir iyileşme ile sonuçlanmıştır. Bu bulgu diğer bazı çalışmalardan farklıdır. Yazarlar bu durumu; gelişmekte olan ve yaşlı sıçan beyinlerinin homosistein hassasiyetinin kendilerinin kullandığı genç- erişkin sıçanlardan farklı olmasına bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Homosisteinin öğrenme üzerine bu olumlu etkisini NMDA ve metabotropik glutamat reseptörleri üzerinden sinaptik plastisiteyi ve transmisyonu arttırmalarına bağlı olabileceğini, ancak uzun dönemde bu artmış eksitabilitenin nöron kaybıyla sonuçlanabileceğini belirtmişlerdir. Troen ve arkadaşlarının (126) çalışmasında da MWM testiyle kognitif disfonksiyon tespit edilmiş, ancak beyinde histolojik düzeyde bir bozukluğa rastlanmamış, beyin ‘metilasyon potansiyelinde’ değişiklik saptanmıştır.

## 3.2.2 Homosistein ve Oksidatif Stres İlişkisi

### 3.2.2.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde prooksidan ve antioksidan dengesinin bozulması olarak tanımlanabilir. Bu denge bozulduğunda, serbest radikaller ve serbest radikallerden türeyen non-radikal reaktifler hücrelerdeki makromoleküllerde oksidatif hasar oluşturur; böylece genler, proteinler, yapısal karbonhidratlar ve lipidlerde yapı-fonksiyon bozulması meydana gelir. Oksidatif stres akut ve kronik birçok hastalığın patogenezinde asli rol oynar (127-129). Bu reaktiflerin yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkileri olsa da 'ılımlı' konsantrasyonlarda, fizyolojik anlamda önemli regülatuar rolleri vardır; nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS) bazı canlı sistemlerinde diğer fizyolojik fonksiyonlar için sinyal başlatıcı (signalling) özelliklere sahiptir. Nitrik oksitin vasküler tonus düzenlenmesindeki rolü, ROS'un doku oksijen durumunun (doku oksijen basıncının) bir göstergesi olarak ventilasyonun ve eritropoietin sentezinin kontrolü örnek olarak verilebilir (127).

Biyolojik sistemlerde oksidasyon daha çok serbest radikaller aracılığıyla oluşmaktadır. Serbest radikaller yörüngelerinde eşlenmemiş elektron taşıdıklarından unstabildirler; bu nedenle diğer moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler (128,130).

Süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen,  $CCl_4$ , NO ve fenilhidrazin radikali ( $C_6H_5N=N$ ), tiyol bileşikleri (R-SH), vücutta bulunan bazı metaller biyolojik sistemlerde oksidasyon reaksiyonlarında yer alırlar (129,131,132).



Biyolojik sistemdeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) en önemli kaynağı aerobik metabolizmadır. Reaktif oksijen türleri radikaller ve non-radikaller şeklinde gruplanabilir. Radikal olmayan oksijen türlerinin yörüngelerinde elektron eksikliği yoktur ve radikallere göre daha zayıf oksidanlardır (127).

Biyolojik sistemde oksidan maddelerin tehlikeli şekilde yükselmesini engelleyen ve oksidasyon-redüksiyon homeostazının sağlanmasına katkıda bulunan çeşitli enzim ve maddeler vardır: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST), mitokondrial sitokrom oksidaz, hidroperoksidaz, seruloplazmin, transferin, ferritin, hemoglobin, miyoglobin, vitamin E, C, A, melatonin, GSH, NAC, ubiquinon, selenyum. Burada belirtilenler dışında çok sayıda endojen ve eksojen antioksidan keşfedilmiştir (127,129,130).

### **3.2.2.2. Lipid Peroksidasyonu (LPO)**

Oksidatif hasara en duyarlı biyomoleküllerden biri de membran lipidleridir. Lipid oksidasyonu sonucunda lipid peroksidasyonu (LPO) oluşur. Lipid peroksidasyonu, membran yapısındaki poliansature yağ asitlerinin (PUFA), reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi sekonder ürünlere yıkılma reaksiyonudur (133). Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen, hedef sistemlerin yapı ve fonksiyonlarını bozan dejeneratif bir süreçtir (134).

Lipit peroksidasyonu ve peroksidasyon sonucu oluşan ürünler membran yapısına ve çeşitli hücre bileşenlerine zarar verir; membran geçirgenliği ve mikrovizkozitesi önemli şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid (MDA), membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna

neden olarak, deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. MDA, proteinlere, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. MDA bakteri ve memeli hücrelerinde mutajenik ve sıçanlarda karsinojeniktir (129,135-138). Lipid peroksidasyonunun diğer bir majör aldehit ürünü olan 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) hücresel strese cevap olarak ve pek çok kronik ve inflamatuvar hastalıkta artar (139). HNE daha zayıf mutajeniktir fakat lipit peroksidasyonunun major toksik ürünlerinden biridir (129).

Çeşitli çalışmalarda LPO artışına GSH-Px (19,22,140-142) ve diğer antioksidanlarda azalma eşlik etmiştir (143,144). Yapılan çalışmalarda HNE nin GSH ile kendiliğinden reaksiyona girdiği gösterilmiştir, ancak hücre içinde GSH-S transferazların reaksiyona katılmasıyla reaksiyon daha hızlı ilerler (145,146). GSH-Px HNE ile inkübe edildiğinde zaman ve konsantrasyona bağlı kompetitif inhibisyon nedeniyle enzimatik aktivite kaybolur (128). Hidroksinonenal (HNE) ile intrasellüler GSH konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, başlangıçtaki azalmayı takiben bir artış olduğunu bildirmektedir (147,148). Hidroksinonenal (HNE) bir yandan GSH'yi azaltırken diğer yandan sentezini de indüklemektedir (128,139). Folat eksikliği durumunda beyin hücrelerinde glutatyon düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (122). LPO ürünlerinin GSH sentezini arttırmaları bu durumu açıklayabilir.

LPO oksidatif stresin göstergelerinden biri olarak da değerlendirilebilir (128). Bu amaçla LPO ürünlerinden olan MDA ve 4-hidroksinonealin ölçümü yapılmaktadır (128,129).

### 3.2.2.3. Glutasyon (GSH)

GSH ( $\gamma$ -glutamil-sisteinil-glisin) memeli hücrelerinde en çok bulunan antioksidan ve GSH/glutasyon disülfid (GSSG) de hücrelerdeki majör redoks çiftidir. GSH antioksidan savunma sisteminde, besin metabolizmasında, gen ekspresyonu, DNA ve protein sentezi, hücre proliferasyonu ve apoptozis, sinyal transdüksiyonu ve daha başka hücrel olaylarda yer alır (149-151).

GSH, içerdığı sistein rezidüsü sayesinde elektrofilik maddelerin mevcudiyetinde (serbest radikaller, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi) non-enzimatik olarak glutasyon disülfide (GSSG) kolayca okside olur. Normal fizyolojik şartlar altında, hücre redoks durumunun bir göstergesi olarak değerlendirilen, GSH/GSSG oranı 10'dan büyüktür (151-153). GSH plazma konsantrasyonu 2-20 mol/L düzeyindedir (152,154). GSH'nın intrasellüler konsantrasyonu 0.5-10 mmol/L düzeyinde olup çoğunluğu (%85-90) sitozolde bulunur; geri kalanı mitokondri, nükleus ve peroksizom kompartmanlarında bulunur (155,156).

Hücrenin redoks durumu nükleusta çeşitli transkripsiyon faktörlerinin etkisini değiştirerek antioksidan gen ekspresyonunu değiştirebilir; benzer şekilde sitoplazmada bazı proteinleri aktive ederek veya inhibe ederek apoptozisi tetikleyebilir (157). Hiperhomosisteinemide GSH seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (19,22,140-142).

### 3.2.2.4. Oksidatif Stres-Nörodejeneratif Hastalık İlişkisi

İnsanda sık bir mental retardasyon nedeni olan Down sendromu (trizomi 21) erişkin dönemde Alzheimer hastalığıyla da ilişkilidir. Down sendromu olan embriyonik kortikal nöron kültürlerinde ROS üretiminin kontrole göre 3-4 kat

arttığı gözlenmiş ve antioksidan ajanlarla nöron dejenerasyonu önlenebilmiştir (158). Alzheimer hastalığında diğer bulguların yanı sıra beyinde kayda değer bir lipid peroksidasyonu ve serebrospinal sıvıda artmış 4-hidroksinonenal konsantrasyonu tespit edilmiştir (159-161). Dahası ROS'un  $\beta$ -amiloid (A $\beta$ ) hasarına aracılık ettiği de bildirilmiştir (162,163). Amiyotropik lateral skleroz (ALS) da bir dejeneratif nöron hastalığı olup %20 oranında SOD mutasyonu ile birlikte olması ROS'un rolünü gündeme getirmektedir. Transgenik fare çalışmalarında da SOD mutasyonu ALS hastalığına benzer bulgulara yol açmıştır. SOD mutasyonu nöral apoptozisi de tetiklemektedir (127,162-166).

### **3.2.2.5. Homosistein ve Oksidatif Stres**

Homosisteinin nörotoksik hasar mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar, daha önce de belirtildiği gibi, oksidatif hasar ve bununla bağlantılı olarak apoptozis ile nöroplastisitede meydana gelen değişikliklerin temel rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (18,20,43).

Homosisteinin oksidatif stres aracılığı ile nöronal disfonksiyona neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (18-20,89,167).

Homosistein, vücut antioksidan rezervlerini, glutatyon peroksidazı (GSH-Px) ve SOD'u inhibe ederek, doku vitamin A, C ve E düzeylerini düşürerek sekteye uğratar (168-170). Homosistein A $\beta$  bağlı nörotoksisteyi oksidatif stres aracılığıyla artırır (66). Homosistein sitotoksitesisi NAC, vitamin E ve C gibi antioksidanlarla azaltılabilmektedir (89,171,172). Vitamin A ve C aynı zamanda homosisteinin neden olduğu hafıza bozukluğunu düzeltebilmiştir (172).

Homosistein metabolizması hücrede redoks potansiyeli tarafından düzenlenir (54,173). Homosisteinin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayan MS ve

CBS gibi bazı enzimlerin aktivitesi hücredeki oksidatif duruma göre düzenlenir (56,173,174). Baydaş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, metiyoninden zengin diyetle oluşturulan hiperhomosisteinamik sıçan modelinde hipokampusta GSH-Px aktivitesi düşük bulunmuştur ve homosisteinin glutatyon aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (19).

Homosisteinin kendisi de otooksidasyona uğrar ve redoks sinyal yollarını nöral ve vasküler hücrelerde bozar (173,175,176).

Hiperhomosisteinemde SAM oranı SAH'a göre düşüktür (43,63). SAM antioksidan bir maddedir. SAM glutatyon sentezini artırır, LPO'yu yaklaşık %65 oranında azaltır (177), deneysel sıçan iskemi modelinde oksidatif stresle ilişkili nöral ölümü azaltır (178). Dahası uzun süreli SAM uygulaması sıçan beyinde glutatyon konsantrasyonunu arttırmış, LPO'yu azaltmıştır (179).

### **3.2.3. Homosistein ve Apoptozis İlişkisi**

#### **3.2.3.1. Apoptozis**

Apoptozis terimi ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmasından sorumlu olan, özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (180,181). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir. Biyolojik sistemlerde apoptozis ile mitoz arasındaki denge, homeostazın sağlanmasında önemli bir rol oynar. Apoptozis sürecinde komşu hücreler zarar görmeden hasarlı hücreler ortadan kaldırılır (181-184).

Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur (185,186). Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (187).

Nekroz, hücre şişmesi, hücre parçalanması ve inflamasyonla karakterize patolojik ve pasif bir süreçtir (188). Apoptozis ise yaşlı, hasarlı ya da anormal hücreleri ortadan kaldırarak hücreler arası dengeyi sağlar (189). Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (190). Apoptoziste, hücre büzülür, hücre yüzeyi pürüzlü olur ve daha az tanınır hale gelir, kromatin yoğunlaşır, DNA degradasyonu gelişir, protein fragmentasyonu olur, organeller parçalanmaya başlar, hücre kollaps olur ve fagositlerce alınır. Apoptozisin başlaması ve baskılanması karmaşık bir düzenleyici sinyal ağı tarafından kontrol edilir (181,188,189). Nekroz ve apoptozisin özellikleri tablo 4’de gösterilmiştir.

Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir (68). Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (191-194).

**Tablo 4:** Apoptozis ve nekrozun genel özellikleri

ÖZELLİK	APOPTOZİS	NEKROZ
Yol açan nedenler	Büyüme faktör eksikliği (NGF, IL-2) Hücre yaşlanması Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitokinler Lenfokinler Hormonlar Radyasyon Orta derecede iskemi Oksidanlar DNA hasarı	İskemi Hipertermi Hipoksi Toksik maddeler Litik viral enfeksiyonlar Radyasyon
<u>Patolojik</u>		
Ölüm şekli	Dokuda dağınık olarak tek tek hücrelerde	Komşu hücre gruplarında
Hücre büyüklüğü	Hücre küçülür Fragmanlara ayrılır	Hücre şişer
Hücre zarı	Hücre membranı sağlam, tomurcuklanma oluşumu, zar yüzeyinde fosfotidil serin erken parçalanma	Membran bütünlük kaybı Düzleşme
Mitokondri	Zar geçirgenliğinde artma Stoplazmaya sitokrom-c, Apaf-1 salınımı Mitokondri göreceli olarak korunur	Şişme Yapıda bozulma
Organel şekli	Hücrenin mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimlere parçalanması	Şişme ve bozulma
DNA	Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır, mono ve oligonükleozomlara ayrılır. Agaroz jel elektroforezinde merdiven görünümü =apoptozisin en önemli belirtisi Prelitik DNA fragmentasyonu Sitoplazmada DNA görülmesi	Kromatin flokulasyonu DNA rastele parçalanır Postlitik DNA fragmentasyonu
Hücresel Süreçler	Programlı reaksiyonlar dizisi, kaspaz aktivasyonu Yeni RNA transkripsiyonu, protein sentezi, ATP gereklidir Fagositoz (hücre temizlenmesi) İnflamasyon görülmez	Protein sentezi yok RNA transkripsiyonu yok Enerjiden bağımsız ATP azalır Lizozomal enzimler salınır İnflamasyon oluşur.

### **3.2.3.2. Apoptozis ve p53**

Tümör supresör ve nükleer transkripsiyon faktörü olan p53 tetramer bir fosfoproteindir; gen transkripsiyonu, DNA sentezi, DNA onarımı, hücre siklus regülasyonu, yaşlanma ve hücre ölümünü gibi hücreyel olayları düzenleyici özelliği vardır (195-197).

Hücre stresi ve DNA hasarıyla p53 aktive olur; stresin şiddeti ve hücre tipine bağlı olarak ya strese adaptif cevapların oluşmasına yardım eder ya da hücre siklusunun durmasını ve apoptozisi tetikler (198). Postmitotik nöronlarda p53, DNA hasarı, hipoglisemi, hipoksi, oksidatif stres ve viral enfeksiyon gibi olayların tetiklediği apoptozise aracılık eder (199). Nöronlarda DNA hasarı p53 den bağımsız apoptozis mekanizmalarını aktive etse de çoğunlukla p53 aktivitesi artmaktadır (195,200).

### **3.2.3.3. Apoptozis ve Bcl-2**

Bcl-2 (antiapoptotik protein) ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur ve bir düzineden fazla üyesi vardır (190,192). Bunlardan bazıları apoptotik aktivitenin öncüleri iken (bax ve bad), diğerleri antiapoptotik (hücre koruyucu) proteinlerdir (192). Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve bcl-2 güçlü bir anti-apoptotik özelliğe sahiptir (192). Mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membran dışında, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda bulunur. Bcl-2 mitokondri membran geçirgenliğini korumaya katkıda bulunur. Proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) inhibe ederek apoptozisi engeller. Bax ve bad proteinleri etkilerini kaspazlar üzerinden gerçekleştirir (192).



#### 3.2.3.4. Homosistein ve Apoptozis

Homosistein DNA hasarını ve nöral ölümü artırır (20,110).

Baydaş ve arkadaşları (20) tarafından sıçanlarda yapılan bir çalışmada hiperhomosisteineminin lipid peroksidasyonuna yol açtığı, mitokondriden caspas 3 ve caspas 9'u aktive ettiği, sitokrom c salınımına yol açtığı, poly(ADP-ribose) polimerazda kırılma ve DNA fragmentasyonu oluşturduğu, proapoptotik Bax seviyesinde artma, anti-apoptotik Bcl-2 seviyesinde azalma oluşturduğu bildirilmiştir. Melatonin uygulanması olumlu etkiler göstermiştir.

Kruman ve arkadaşları (110) homosisteinin p-53 seviyesini belirgin olarak arttırdığını bildirmişlerdir.

Homosistein nöron kültür ortamında DNA kırıkları oluşturarak apoptozisi indükler (110). Kültür ortamındaki nöronlar homosistein ile muamele edildiğinde homosistein ile indüklenmiş DNA hasarları onarılırken en sonunda ATP rezervleri tükenir ve hücre apoptozis yoluna girer. Homosisteinin oluşturduğu oksidatif hasar artmış hücrel  $Ca^{++}$  düzeyleri ve DNA hasarı ile ilişkili olabilir (110,201).

Hiperhomosisteinemi düşük SAM ve yüksek SAH durumu ile birlikte (43,63); SAM/SAH oranının azalması DNA da hasar meydana getirir ve homosistein nörotoksitesinin önemli bir mekanizması olan apoptozise yol açar (110). Yapılan bir çalışmada kültür ortamındaki kortikal nöronlara SAM verilmesiyle apoptozisin %50 oranında azalması bu bulguyu desteklemektedir (201). İskemik beyin hücrelerine SAM verilmesi kan-beyin bariyerini iyileştirir ve nöron sağ kalımını artırır (202).

Folat eksikliği durumunda SAM azalır; bu durum DNA sitozin metilasyonunda azalma ve DNA onarımında bozulma; dolayısıyla mutasyonlara

ve apoptozise yolaçabilir (203,204). Her ne kadar erişkindeki nöronların postmitotik hücreler olmasından dolayı folat eksikliğine eşlik eden DNA nükleotid misinkorporasyonundan daha az etkilenebileceği düşünülse de DNA onarımının post mitotik nöronlarda da önemli olduğu gösterilmiştir (205). Folat metabolizmasının bir inhibitörü olan metotreksat nöral progenitor hücrelerin proliferasyonunu engeller ve yeni oluşan nöronlarda apoptozisi indükler (205). Embriyonik beyin hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda nöral kök hücre ve astrositlerin folattan yoksun bırakılmasıyla bu hücrelerin proliferasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir (18).

N-asetil sistein, vitamin C ve E nöronal olmayan hücrelerde homosistein aracılı apoptozisi hidrojen peroksiti ortadan kaldırarak önler (206).

### **3.2.4. Homosisteinin Nöroplastisite ve Beyin Maturasyonu ile İlişkisi**

#### **3.2.4.1. Nöroplastisite**

Sinaptik devrelerin oluşumundan sonra yeni sinapsların oluşumu veya kaybı ya da varolan sinapsların modifikasyonu; kısacası bu nöronal devrelerin değişebilme kapasitesi sinaptik plastisite olarak adlandırılır. Sinir sisteminin bu değişebilme kapasitesi öğrenme ve hafıza ile yakından ilişkili olup sinir sisteminin çevresel değişikliklere cevabını temsil eder (207). Sinaptik plastisite sinir sistemi değişimindeki bir mekanizmayı anlatmaktan ziyade bir değişim fenomeni olarak tanımlanabilir (208).

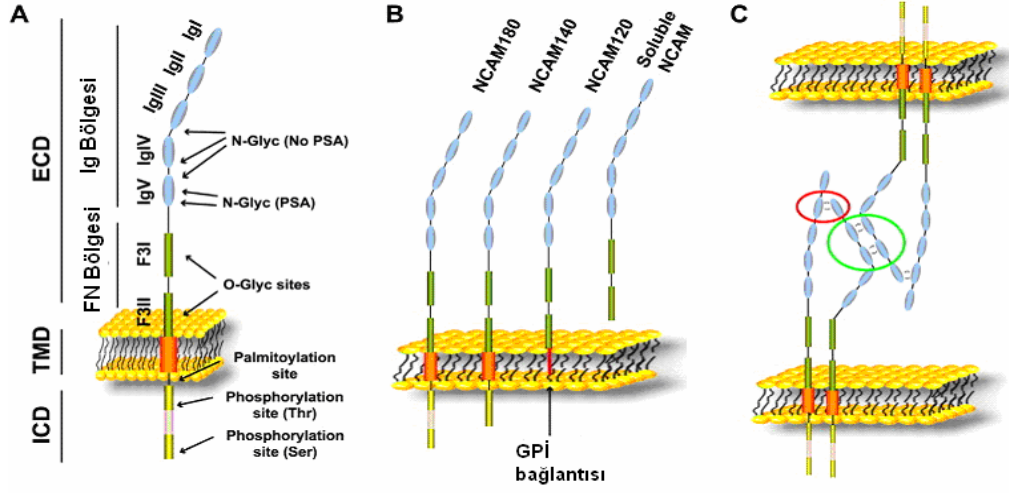
Nöral plastisite moleküler düzeyden, sinaptik, hücresel, nöronal ağ ve sisteme kadar her seviyede gözlemlenir. Örneğin, hem normal hem de yaralanmış hayvanlarda kortikal temsiliyet haritaları değişebilir, sinapslar morfolojilerini değiştirebilir, dentritler ve çıkıntılar büyüyüp büzülebilir, aksonlar yolunu

değiştirebilir, çeşitli transmitterler modüle edilebilir, sinapslar potansiyalize veya deprese olabilir, sınırlı da olsa yeni nöronlar oluşup farklılaşabilir (208).

#### **3.2.4.2. NCAM ve PSA-NCAM**

Nöral hücre adezyon molekülleri (NCAM), immünglobulin (Ig) üstailesinin bir üyesi olup homofilik ve heterofilik mekanizmalar aracılığıyla hücre-hücre ve hücre-substrat etkileşimlerinde rol alan nöron gelişiminde düzenleyici olarak hareket eden yüzey glikoproteinleridir. Genlerin alternatif birleşmesi nedeniyle çeşitli NCAM izoformları oluşur. Bunlar protein temel yapısı ve plazma membranına tutunma biçimi yönünden farklılık arzederler. Beyinde molekül ağırlıkları 120, 140, 180 kDa olan 3 majör NCAM izoformu bulunmuştur (209-211). NCAM-140 hem pre- hem de post-sinaptik membranda eksprese edilir ve hücre-hücre adezyonunda ve nörit büyümesinde önemli rolü vardır (212). NCAM-120'nin gelişim sırasında en son ortaya çıkan izoform olduğuna dair bulgular vardır (213,214). NCAM-180 sinaptik plastisitede ve sinaptik kuvvetin stabilizasyonunda belirleyici role sahiptir (215,216).

NCAM-120 sadece hücre membranına kadar uzanırken, NCAM-140 ve NCAM-180 formları hücre içine doğru COOH zincirleri ile uzanmış transmembran proteinleridir. NCAM-120 molekülü glikosilfosfatidil inositol (GFİ) vasıtasıyla membrana tutunurlar ve sitoplazmada ilerlerler (Şekil 3). Ayrıca tüm NCAM yapılarının ekstrasellüler kısmına tutunmuş uçlarında 5 adet Ig bölgesi (Ig-I) ve 2 adet fibronektin homolog bölgesi (Fn-III) bulunmaktadır (217). Bu moleküller hücresel göç, aksonal gelişme, sinaptik plastisite ve çevresel aksonların rejenerasyonunda önemli rol oynarlar (210,218-220).



**Şekil 3.** NCAM'ın moleküler özellikleri. (A) NCAM proteininde bulunan postraslasyonel modifikasyonlar. (B) NCAM izoformlarının moleküler yapısı ve hücre zarı ile ilişkisi. (C) Hücreler arası NCAM etkileşimleri; bu etkileşimin olabilmesi için öncelikle cis-dimer oluşumu gereklidir. ECD: Ekstrasellular domain; TMD: Transmembran domain; ICD: İntrasellular domain: IgI–V: Ig-benzer domain I–V; F3I/II: Fibronektin tip 3 homolog domain I/II.

NCAM ve PSA-NCAM gibi hücre adezyon molekülleri nöral ağ plastisitesine ve kortikal yeniden organizasyona katkıda bulunurlar (221). NCAM'ın nöral plastisite ve hafıza oluşumuna katkıda bulunduğu dair güçlü kanıtlar vardır. Uzun süreli potansiyasyon (LTP) elektrik stimülasyonu tarafından indüklenen sinaptik etkinlik artışı olarak tanımlanabilir ve hafıza oluşumunun temelinde yatan sinaptik plastisitenin bir modeli olarak değerlendirilmektedir

(222,223). NCAM'ın LTP oluşumunda (sinaptik plastisitede ) rolü vardır; NCAM bloke edici antikor uygulaması hipokampusta LTP oluşumunu engellemektedir (224). NCAM gen delesyonu yapılan sıçanlarda hafıza oluşumu ve LTP bozulmaktadır (225). Yine NCAM gen delesyonu yapılan fareler Morris water maze testinde kontrollere göre kötü performans göstermişler (226). Ayrıca diyabet oluşturulmuş sıçanlardaki öğrenme ve hafıza bozuklukları, hipokampusta değişmiş NCAM ekspresyon patterni ile ilişkili bulunmuştur (227).

Posttranslasyonel modifikasyonla NCAM lar arasındaki çeşitlilik daha da artar.  $\alpha$ -2-8 bağlı sialik asit rezidülerinin uzun polimerlerine PSA denir. PSA yüksek derecede sialize edilmiş NCAM formlarının % 30 unu oluşturur ve PSA-NCAM olarak adlandırılır. Vertebralılarda PSA rezidüsünün homofilik bağlanmayı azalttığı ve böylece hücre adezyonunu zayıflattığı düşünülüyor (228). NCAM'a bağlı PSA, membran temasını içeren hücre etkileşimlerinin kuvvetli bir regülatördür (229). Diğer bir deyişle PSA ile glikozilasyon NCAM'ın adhezif özelliklerini değiştirerek adhezif kuvvette azalmaya yol açar ve böylece sinapsların yeniden yapılanmasına izin verir (222).

PSA erişkinde öğrenme ve hafıza süreçlerinin yer aldığı yapı olan hippocampusta da eksprese olmaktadır. PSA-NCAM'ın yapısal ve fonksiyonel değişiklik yeteneğini devam ettiren erişkin SSS bölgelerinde ekspresyonun devam etmesi bu molekülün olgun beyinde de plastisitenin devamı için önemli olduğunu gösteriyor (230,231). PSA- NCAM'ın akson büyümesi, fasikülasyon regülasyonu (232,233) ve hücre migrasyonunda rolü vardır (234).

### 3.2.4.3. Homosistein ve Nöroplastisite

Homosistein ile ilgili olarak elde edilen bazı bulgular homosisteinin sinaptik fonksiyonları değiştirdiğini dūřündürmektedir (18,19,118). Sinaptik disfonksiyon ve dejenerasyon bazı nörolojik bozuklukların patogeneğinde yer almaktadır (235). İnsan çalışmalarında homosisteinin nöral plastisite ve nörodejeneratif bozukluklarda rolü olduğu belirtilmiştir (18).

Eriřkin sıçanlara kronik homosistein uygulamasından sonra hipokampus üzerinde yapılan incelemede temel sinaptik transmisyon hızının azaldığı ancak beklenenin tersine uzun süreli potansiasyonda (LTP) azalma değil artma oluştuğu bildirilmiştir (236). Yine aynı grubun yaptığı bir çalışmada erişkin sıçanlara 14 hafta boyunca homosistein uygulaması hipokampus CA1 alanında bazal sinaptik transmisyon ve LTP’de değişiklik meydana getirmiştir (118). Bu çalışmalardan daha önce yapılan bir çalışmada CBS eksikliği (knock out) olan sıçanlarda LTP artışı tespit edilmiş, ancak bu artışın hidrojen sūlfide bağlı olduğu ve CBS enziminin beyindeki hidrojen sūlfid oluşumunu katalize ettiği bildirilmiştir. CBS eksikliğinde aynı zamanda belirgin hiperhomosisteinemi oluşması LTP artışıyla homosistein arasında bir bađ olabileceğini de dūřündürmektedir (237). Bahsedilen çalışmalardaki bu sonuçlar, öğrenme ve plastisitede kritik rolleri olan NMDA ve glutamat reseptörleriyle ilişkilendirilmiştir (238). Öte yandan homosisteinin başlangıçta fizyolojik parametreler üzerindeki olumlu etkisinin zamanla eksitotoksisiteyle ilgili nöronal disfonksiyona yol açabileceği ileri sürülmüştür (118).

#### **3.2.4.4. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)**

İntermedier filaman proteinler beyin hücre iskeletini oluşturan ana unsurlardır (239). Bir hücre iskelet protein ailesi üyesi olarak GFAP'nin astrositlerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün sağlanmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Sıçan çalışmalarında GFAP eksikliğinin sinaptik fonksiyonlarda değişikliğe yol açtığı tespit edilmiştir (240).

Santral sinir sisteminde, travma, genetik bozukluk, kimyasal hasar gibi durumlarda astrositler reaktif hale gelir, astrogliazis denilen tarzda cevap verirler. Astrogliazis GFAP senteziyle karakterizedir (22,241,242).

Olgun olmayan astrositler esas olarak vimentin sentezlerler; bu hücreler matür hale geldiğinde vimentin yerine GFAP sentezine kayma olur; dolayısıyla GFAP sentezi beyin maturasyonunun bir göstergesi olarak da değerlendirilmektedir (243,244).

İnsanda GFAP gen mutasyonu erken yaşta ölümle sonuçlanan nörodejeneratif hastalıklara yol açmaktadır (245). GFAP ve S100B proteini santral sinir sistemi hasarını gösteren bir test olarak kullanılabilir (246).

#### **3.2.4.5. S100B Proteini**

Astrositlerde yoğun şekilde sentezlenen S100B calmodulin-troponin üst ailesinden bir protein olup kalsiyum bağlamasıyla diğer intrasellüler proteinlerin fonksiyonunu değiştirebilme özelliğine sahiptir. Oligodendrosit ve schwann hücreleri de S100B sentezler. Total beyin proteinlerinin %0,2'sini oluşturur. S100B; beyin hasarında beyin omurilik sıvısına ve daha sonra kana rahatlıkla geçmektedir. S100B hücrelerin büyümesi, farklılaşması, hücre şeklinin korunması

ve enerji metabolizmasında rolü vardır. Serebral immün sistem ve S100B etkileşimine dair bulgular vardır (247).

S100B'nin nörotropik özellikleri vardır ve astrositlerin proliferasyonunu uyarmaktadır. Bazı nörotoksik ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir (22,242,247-249). S100B nöral hücre farklılaşması ve matürasyonunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir (244).

### **3.2.5. Homosistein ve NMDA Reseptörleri**

Beyinde uyarıcı nörotransmitter işlevi olan glutamatın reseptörleri başlıca iki büyük sınıfa ayrılır: Metabotropik ve iyonotropik reseptörler. Metabotropik reseptörler G proteinleri aracılığı ile hücre içi ikincil habercilerle iş gören reseptörlerdir. İyonotropik reseptörler ise sodyum, kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) ve potasyum geçişinde hızlı değişimleri yöneten ligand kapılı iyon kanallarıdır. NMDA reseptörleri iyonotropik glutamat reseptörlerinin bir alt tipidir (250).

Glutamat reseptörlerinin nöroplastisite, sinaptogenez, öğrenme, hafıza ve nöral eksitotoksisite üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (251-254).

Glutamat reseptörlerinin stimülasyonu bazı nörodejeneratif ve psikiatrik hastalıkların oluşumunda rol aldığına dair kanıtlar vardır (18). Homosistein ve homosistein metabolitleri NMDA reseptörlerini stimüle etmektedir (108,255). Aynı zamanda NMDA reseptörleri vasıtasıyla homosistein, DNA hasarı oluşturarak nöronları eksitotoksisiteye duyarlı hale getirir (110).

Homosistein endojen glutamat reseptör agonistidir ve NMDA alt tip reseptörleri üzerine etki eder (108,256,257). Homosisteinin oksidatif ürünü olan homosisteik asit NMDA reseptörlerini aktive eder (258). Homosisteik asitin beyindeki nörotoksik etkisi NMDA antagonistleri tarafından bloke edilebilmiştir



(256). Homosistein NMDA reseptörlerine bağlanmasıyla hücre içine  $Ca^{++}$  girişini artırır (108,110,259). İlginç olarak glisin düşük konsantrasyonlarında, homosistein NMDA reseptörlerinin glisin tarafının parsiyel antagonisti gibi davranır ve reseptör aracılı aktiviteyi inhibe eder (108).

Homosistein glutamat nörotoksitesini artırır. Metabotropik glutamat reseptör antagonistleri homosistein'nin bu toksisitesini azaltır (89,110). Homosistein non-NMDA ve metabotropik glutamat reseptörleri aracılığıyla da hücre içi  $Ca^{++}$  düzeyini artırıp birkaç kinazı aktive ederek nörotoksite oluşturabilir (259,260).

### **3.2.6. Homosistein ve DNA Sentezi**

Homosisteinin gen ekspresyonu ve DNA sentezini etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (110,205,261,262). Bu konudaki çalışmalar bütünleştirici bir teori ortaya koymak için yetersizdir. Fakat nöroplastisite ve apoptozis gibi homosistein tarafından tetiklenen bozuklukların temelinde bu tür genetik değişikliklerin rolü olabilir.

Hiperhomosisteinemi; DNA hipometilasyonu, değişmiş gen ekspresyonu ve tau protein defosforilasyonu ile ilişkilidir (262-264). Hiperhomosisteinemi düşük SAM ve yüksek SAH durumu ile birliktedir (43,63); SAH, DNA ve histon metilasyonunu bozmak suretiyle homosistein toksisitesine aracılık edebilir. İn vitro deneyler göstermiştir ki SAH, DNA metiltransferazlar için güçlü bir kompetitif inhibitördür (43).

Daha önce bahsedilen çalışmada erişkin sıçanlarda DNA hipometilasyon bulgularının aksine, hiperhomosisteinemi oluşturan beslenme modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada sıçan embriyo karaciğer hücrelerinde DNA

hipermetilasyonu gözlenmiştir (265). Ancak burada vurgulamak istediğimiz nokta homosisteinin şu veya bu biçimde DNA sentezini ve gen ekspresyonunu etkilemesidir. Sıçanlarda anne beslenmesiyle fetal gen ekspresyonunun değiştiği, gelişme geriliği olduğu ve olumsuz etkilerinin yaşamın ileri dönemlerde de devam ettiğine dair başka çalışmalar da vardır (280-282).

### **3.2.7. Homositein İle İlişkili Diğer Nörotoksik Mekanizmaları**

Baydaş ve arkadaşları (22) hiperhomosisteineminin MSS'de reaktif gliozise yol açtığını göstermişlerdir.

Homosisteinin olası nörotoksikite mekanizmaları arasında Homosistein-responsive Endoplazmik Retikulum Protein (HERP) aracılığı ile  $\beta$  amiloid (A $\beta$ ) birikimine yol açabilir (266). Ayrıca homosistein maruziyeti nöronları amiloid toksisitesine duyarlı hale getirir (89,205,267).

Homosisteinin olası nörotoksikite mekanizmalarından bir diğeri ise, protein fosfataz 2A (PP2A) enziminin metilasyon durumunun değişmesi neticesinde tau proteinin (p-tau) fosforile durumda kalması ve bununla A $\beta$  toksisitesini arttırmasına yol açar (268,269). Yapılan bir çalışmada kültür ortamında nöroblastoma hücrelerinde folat eksikliği homosistein ve p-tau miktarında yükselmeye yol açmış ve ortama folat eklenmesiyle p-tau düzeyi azalmıştır (165).

Hiperhomosisteinemi plazmada asimetrik dimetil arjinin (ADMA) artışı yapar. ADMA güçlü bir endojen nitrik oksit (NO) sentez inhibitörüdür. Artmış NO üretimi  $\beta$  amiloid tarafından oluşturulan mitokondriyal disfonksiyonları ve apoptozisi arttırır (270,271).

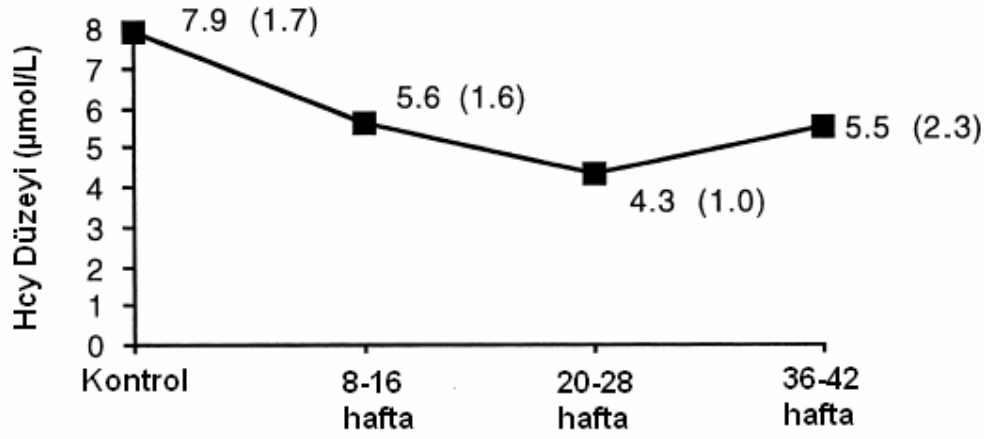
Beyin enerji metabolizmasının ve Na-K-ATP'az aktivitesinin inhibe edilmesi de hiperhomosisteineminin potansiyel nörotoksik mekanizmaları arasında sayılabilir (119,120).

Homosistein toksisitesini açıklamak için 'homosistein-tiolakton hipotezi' ileri sürülmüştür; bu hipoteze göre, metiyonil-tRNA sentetaz tarafından katalizlenen homosisteinin kimyasal olarak reaktif bir metabolit olan homosistein-tiolaktona dönüşümü homosistein toksisitesinde ilk basamaktır. Bu reaktif daha sonra çeşitli proteinlere bağlanarak N-homosistein-protein bileşiklerinin oluşumuna yol açar. Bu bağlanma moleküllerin yapı ve fonksiyonunu bozarak hastalıkların patogeneğinde rol oynar (272).

### **3.3. HOMOSİSTEİN VE GEBELİK**

Total plazma homosistein düzeyi gebelikte %30-50 oranında azalır, postpartum 2-4 hafta içinde normale döner (75,76,78-80,273,274). Normal gebelikte homosistein düzeyi 10 µmol/L den daha düşüktür (81,273). En düşük homosistein değerleri ikinci trimesterde oluşur (77). Gebelikte homosistein düzeyindeki değişiklikler Şekil 4'te gösterilmiştir (274).

Gebelikteki homosistein düşüşünün dilüsyon veya hipoalbuminemiden ziyade endokrin değişikliklere bağlı olduğu tespit edilmiştir ve bunun gebelikte homeostazın sağlanmasında rolü olabileceği ileri sürülmüştür (78). Ayar ve arkadaşlarının (80) yaptığı çalışmada homosisteinin doğum sırasında miyometriyum kontraksiyonlarını etkilemesi homeostaz teorisini destekleyen bir bulgu olarak değerlendirilmiştir (77). Gebelik sırasında homosistein düşüşünün fetal kullanıma bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (274).



**Şekil 4.** Gebelik süresince homosistein düzeyindeki değişiklikler (ortalama değer ve standart sapma) (274)

Fetal dolaşımında homosistein konsantrasyonu anneye göre daha düşük bulunmuş ancak aralarında lineer bir ilişki olduğu görülmüştür (274, tablo 5). Fetal homosistein düzeyini etkileyen en önemli faktörün maternal homosistein düzeyi olduğu tespit edilmiş; vitamin B<sub>12</sub> ve B<sub>6</sub> nın kısmi etkisi olduğu ancak folat düzeyinin ve MTHFR-677 C→T genotipinin fetal homosistein düzeyi üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir (275,276) ancak normal gebeler üzerinde yapılan başka bir çalışmada, folik asit verilmesiyle hem annede hem de fetüste homosistein düzeyi düşürülebilmektedir (277).

**Tablo 5.** Anne ve fetus homosistein düzeylerinin karşılaştırılması (274)

Örnek yeri	Homosistein Düzeyi ( $\mu\text{mol/L}$ )
Venöz anne kanı	5.43 (1.40)
Venöz kord kanı	4.49 (1,78)
Arteriel kord kanı	3.49 (1,53)
Kord kanında veno-arteriel fark	1.00 (1.09)

Folat eksikliği olan gebe kadınlarda nöral tüp defektlerine bağlı bozukluklar artmıştır; bu defektlerin nöral hücrelerin gelişimi, farklılaşması ve ölümündeki (apoptozis) anormalliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (18,278,279). Vitamin B<sub>12</sub> ve B<sub>6</sub> eksikliği sinir sisteminde gelişimsel defektlere neden olur (277). Bebeklerde vitamin B<sub>12</sub> eksikliği miyelinizasyon kusurlarından kaynaklanan psikomotor gerileme, duyuşal nöropati, ağır hipotoni, havale ve apatiye neden olmaktadır (280,281). Hayvan çalışmalarında da folat, vitamin B<sub>12</sub> ve B<sub>6</sub> eksiklikleri, gelişen insandaki bulgulara benzer sinir sistemi anormallikleri oluşturmuştur (282).

Homosistein çalışmalarından önce folat eksikliğinin özellikle nöral tüp defektleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18,283,284). Yüksek homosistein düzeyi sıklıkla folat düzeyinin bir göstergesi sayılmışsa da son çalışmalar homosisteinin kendisinin teratojenik olabileceğini gösteriyor (77,285).

Homosisteinin gebelik üzerine etkileriyle ilgili olarak yapılan epidemiyolojik çalışmalarda homosistein düzeyi ile hem gebelikte karşılaşılan komplikasyonlar hem de konjenital malformasyonlar arasında bir ilişki saptanmıştır (13-16,273,286,287). Norveç'te yapılan ve retrospektif bir çalışma

olan Hordaland Homosistein Çalışmasında homosistein düzeyi yüksek olan kadınların geçmiş dönemdeki gebeliklerinde preeklampsinin %32, düşük doğum ağırlığının %101 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda ölü doğum ve nöral tüp defektleri ile hiperhomosisteinemi arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (13).

Homosisteinin sıçan fetusu üzerindeki etkilerine dair çalışmalar nispeten azdır. Sıçanlarda oluşturulan bir hiperhomosisteinemi modelinde annede homosistein, glisin, serin ve treonin düzeylerinin yükseldiği, benzer aminoasit bileşiminin fetusta da daha hafif bir şekilde gözlemlendiği bildirilmiştir (288). Homosisteinin embriyotoksik olduğu sıçanlarda ve tavuklarda teyit edilmiştir (289,290). Başka bir çalışmada da tavuk embriyosunda homosisteinin transmetilasyon yolunu inhibe ederek nöral tüpün kapanmasını geciktirdiği bildirilmiştir (291).

Sıçanlarda anne beslenmesiyle fetal gen ekspresyonunun değiştiği, gelişme geriliği olduğu ve olumsuz etkilerinin yaşamın ileri dönemlerde de devam ettiğine dair başka çalışmalar da vardır (292-294).

Çalışmamızı tamamladıktan sonra yayınlanan bir çalışmada, Blaise ve arkadaşlarının (295) gebe sıçanlarda oluşturdukları hiperhomosisteinemi modelinde homosisteinin hipokampus, serebellum, striatum ve nörojenik zondaki nöron ve astrositlerde birikim gösterdiği tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada çoğu homosistein pozitif hücreler apoptozis göstergesi olan p53 gen ekspresyonu ve DNA fragmantasyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada deneklere çeşitli davranış ve öğrenme testleri uygulanmış; normal diyete dönülse bile hiperhomosisteinemi gruptaki bozuklukların kalıcı olduğu bildirilmiştir.

### **3.4. AMAÇ**

Bu çalışmada homosisteinin gebe sıçanlara uygulanmasının yavrularda nöron gelişimi, nöroplastisite, oksidatif stres, apoptozis ve bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık. Homosisteinin erişkin hayvan modellerinde nöroplastisite ve bilişsel fonksiyonlara etkisiyle ilgili olarak yapılan çok sayıda çalışmaya karşılık gebe hayvan yavrularındaki nöroplastisite ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkileriyle ilgili çalışmaların olmamasından dolayı çalışma planlandı.

## 4. GEREÇ ve YÖNTEM

### 4.1. Deney Hayvanları

Deneyleerde kullanılan Wistar-albino cinsi sıçanlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (FÜDAM) temin edildi ve deneysel çalışmalar FÜDAM'da gerçekleştirildi. Sıçanlar; havalandırma sistemi bulunan, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış, sıcaklığı 22- 25 °C arasında sabit tutulan bir ortamda standart plastik kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda ve suda paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan 8 mm'lik pelletler halindeki sıçan yemleriyle beslendi. Sıçanlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 6'de gösterilmiştir.

**Tablo 6.** Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi

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



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

\*\* Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit. D<sub>3</sub> (1000 IU/kg), Vit. E (60 mg/kg), Vit. B<sub>2</sub> (4 mg/kg).

#### **4.2. Deneysel Uygulamalar**

Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında F.Ü. Tıp Fakültesi Etik Kurulu (24.02.2005 / Toplantı: 3; Karar No: 10) onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Ortalama ağırlıkları 220 (220 ± 30) gr olan Wistar albino cinsi dişi sıçanlar alındı. Sıçanlardan reproduktif siklus bozukluğunun olup olmadığının tespiti ve çiftleşme zamanının tayini için her gün sabah aynı zaman diliminde vajinal smear yapıldı. Siklus bozukluğu göstermeyen sıçanların ovulasyon zamanları tespit edilerek proestrus safhalarında erkek sıçanla aynı kafese konularak çiftleştirildi. Smear incelemesinde spermatozoit görülen dişi sıçanlar gebe (döllenmiş) kabul edilerek gebeliğin 0. günü olarak kaydedildi.

Gebe sıçanlar rastgele 2 gruba (n=5) ayrıldı:

**1. Grup: Kontrol (Kont) grubu;** normal içme suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi.

**2. Grup: Homosistein (Hcy) grubu;** sıçanlara gebe kaldıkları günden itibaren gebelikleri süresince 1,5 gr/kg/gün dozunda metiyonin (Merck, Germany) içme sularına katılarak hiperhomosisteinemi oluşturuldu.

Bu çalışmada oral uygulanan metiyonin dozunun plazma homosistein düzeyini kontrole göre yaklaşık 3 ve 6 kat arttırdığı yayınlanan çalışmalarda gösterilmiştir (19,296). Bu kronik hiperhomosisteinemi oluşturmak için yeterli bir dozdur. Metiyonindeki sülfür grubunun özelliğinden dolayı sıçanlar ilk gün kontrole göre daha az su tükettiler ama sonraki günler kontrol grubuyla eşit miktarda su içtiler.

Bütün sıçanlar ayrı kafeslere konarak doğuma kadar takip edildi. Doğumdan sonra bir batında canlı doğan yavruların sayıları ve vücut ağırlıkları kaydedildi. Her iki gruptaki anne sıçanların kanları kuyruk veninden alınarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany) serumları ayrıldı, homosistein düzeylerinin ölçümü için analizler yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Postnatal 1.gün (PNG-1) de her batından 5'er tane olmak üzere her gruptan toplam 25 yavru total beyni disseke edildi ve kuru buzda donduruldu. Beyin dokusunun ağırlığı belirlenerek glial ve nöronal markır analizleri, apoptotik markırlar, oksidatif stres, lipid peroksidasyon ürünleri (Malondialdehit + 4-hidroksialkenal) ve GSH analizleri için -80 °C' de saklandı.

Geri kalan yavrular 21 günlük oluncaya kadar anne sütü ile beslenmelerine izin verildi. Emzirme döneminden sonra her iki gruptaki yavru sıçanlar cinsiyetlerine göre ayrılarak 5'erli gruplar halinde ayrı kafeslere kondu. Doğumdan sonra yaklaşık 82. günde her iki gruptaki genç yavru sıçanlara davranış testleri uygulandı. Davranış testleri olarak Morris water maze (Morris'in su tankı testi) ve probe testi uygulandı. Probe testi takiben görsel (visible task) test yapıldı.

Davranış testlerinden 24 saat sonra sıçanlar dekapite edilip total beyinleri çıkarıldı. Beynin hipokampus, frontal korteks ve serebellum bölgeleri ayrıldı. Kuru buzda şok etkisiyle dondurularak darası alınmış ependorf tüplere kondu. Hassas terazide ağırlıkları ölçülerek, postnatal 82. gündeki NCAM ve PSA-NCAM, S100B ve GFAP analizleri için -80 °C' de saklandı.

### **4.3. Sıçanlarda Reprodüktif Siklus Takibi**

Çalışma da kullanılan sıçanlarda reprodüktif siklus bozukluğunun olup olmadığının tespiti ve çiftleşme zamanının tayini için her gün sabah aynı zaman diliminde vajinal smear yapıldı. Smear için puara sabitlenmiş pipete 0,5 ml serum fizyolojik çekildi. Sıçana karnı üstte başı aşağı meyilli olacak şekilde pozisyon verilerek serum fizyolojik çekilmiş pipetin ucu vajinaya yerleştirilip, puar iki üç kez yavaşça sıkılarak vajinal sekresyon ve hücrelerin pipete alınması sağlandı. Pipetteki sıvıdan bir damla lam üzerine damlatılıp boyanmadan ışık mikroskopunda 10x ve 40x büyütmede incelendi. Mikroskopik incelemede sıçanların reprodüktif sikluslarının hangi safhada oldukları tespit edildi. Diestrus (bazal ve parabazal hücreler, polimorfonükleer lökositler), proestrus (çok sayıda intermedier, az sayıda parabazal ve süperfisial hücreler), estrus (karnifiye süperfisial hücre, keratinize hücre) safhaları her sıçan için ayrı ayrı kaydedildi. Üst üste iki kez normal reprodüktif siklus özelliği gösteren sıçanlar (ortalama 8-9 gün) üçüncü proestrus safhalarında erkek sıçanla aynı kafese konuldu. Günlük vajinal smear takibine devam edildi. Smear incelemesinde spermatozoit görülen dişi sıçanlar döllenmiş kabul edilerek smear takibine son verildi (298).

#### **4.4. Serum Total Homosistein Analizi**

Her iki gruptaki anne sıçanlar doğum yaptıktan sonra kanları kuyruk veninden alınarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany) serumları ayrıldı. Anne sıçanların serum total homosistein düzeyleri immünoassay enzim kitleleriyle belirlendi (Axis-Shield AS, Oslo, Norway).

#### **4.5. Yenidoğan Sıçan Total Beyin Doku Örneklerinde Oksidatif Stres ve Apoptoz Belirlenmesi İçin Yapılan Analizler**

##### **4.5.1. Total Protein, LPO ve GSH Analizleri İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması**

Yenidoğan (PNG-1) yavru total beyin doku örneklerinin hazırlanmasında Baydaş ve arkadaşları (297) tarafından uygulanan homojenizasyon yöntemi kullanıldı.

Her anneden alınan yavru sıçan total beyinleri birleştirilerek 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solusyonunda [10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1mM fenil metil sülfonil florid (PMSF), 5µM soybean (bir tripsin inhibitörü olarak)] cam bir homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar nükleer fraksiyon izolasyonu için +4 °C' de 15 dakika süreyle 900 x g' de santrifüj edildi. Süpernatant 12000 x g' de 15 dakika +4 °C' de tekrar santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant sitozolik fraksiyon olarak belirlendi ve pellet pH: 7.2 de 1 mM Tris HCL içeren ortamda süspanse edilerek beyin mitokondrial fraksiyonu olarak kullanıldı. Total protein tayini protein ölçüm kiti (Sigma, St Louis, MO, USA) kullanılarak Lowry prosedürüne göre yapıldı.

#### 4.5.2. Yenidoğan Total Beyin Örneklerinde Lipit Peroksidasyonu (LPO) Ölçüm Yöntemi

Lipit peroksidasyonu Malondialdehit (MDA) + 4-hidroksialkenals (HAE) LPO-586 kiti (Oxis, Int. Inc., OR, USA) kullanılarak belirlendi.

LPO-586 ölçüm yöntemi; +45°C’de, malondialdehit ve 4-hidroksi alkenallerin N-metil-2 fenilindol ile kromojenik reaksiyon temeline dayanır.

##### ***Kullanılan maddeler:***

1. Ayıraç I (R1); Asetonitrilde hazırlanmış 10.3 mM N-metil-2-fenil indol
2. Ayıraç II (R2); 16.5 ml metansülfonik asit (MSA).
3. 4-HNE standart solusyonu (S1); Asetonitrilde hazırlanmış 10 mM 4-hidroksinonenal
4. MDA standart solusyonu (S2); 20 mM Tris-HCl (pH: 7.4) solusyonu ile hazırlanmış 10 mM 1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMOP).

##### ***Yöntem:***

Standart solusyonlarının hazırlanması:

Standart konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ ):	0	2,5	5	10	15	20
(Kör)						
Standart 100 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{l}$ ):	0	25	50	100	150	200
Distile su ( $\mu\text{l}$ ):	200	175	150	100	50	0

1. Kör, standart ve örnekler için temiz polipropilen mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı.
2. Kör için hazırlanmış tüpe 200  $\mu\text{l}$  distile su ilave edildi.
3. Standartlar için hazırlanmış tüplere değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart solusyonlarından 200  $\mu\text{l}$  ilave edildi.
4. Örnekler için hazırlanmış tüplerin herbirine 200  $\mu\text{l}$  örnek ilave edildi.

5. K r, standart ve örnek tüplerinin herbirine asetonitrilde hazırlanmış 0.5 M B tilat hidroksitoluen (BHT) solusyonundan 10  l ilave edildi.
6. K r, standart ve örnek tüplerinin herbirine 650  l seyreltilmiş R1 ayıracından eklendi ve vorteksle karıştırıldı.
7. K r, standart ve örnek tüplerinin herbirine 150  l R2 ayıracından eklendi ve tüplerin ağzı kapatılarak vorteksle iyice karıştırıldı.
8. 45  C'ye ayarlanmış su banyosunda 60 dakika inkübasyon yapıldı.
9. Tüpler mikrosantrifüjde 15000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar elde edildi.
10. Süpernatantlar küvetlere aktarıldı ve spektrofotometrede absorbsansları 586 nm'de okundu.
11. Örneklerin okunan absorbsans değerleri kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı.

#### **4.5.3. Yenidoğan Total Beyin  rneklerinde Glutatyon (GSH)  l m Yöntemi**

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

##### ***Kullanılan maddeler:***

1. Ayıraç I (R1); 0.2 N HCl de hazırlanmış  $1.2 \times 10^{-2}$  M kromojenik ayıraç solusyonu
2. Ayıraç II (R2); % 30 NaOH
3. Tampon solusyonu (S3); 0.2 mM dietilen triamin penta asetik asit (DTPA) ve % 25 (w/v) lubrol içeren 20 mM potasyum fosfat (pH: 7.8) solusyonu

### **Yöntem:**

Standart solusyonlarının hazırlanması:

Standart konsantrasyonu ( $\mu\text{mol/L}$ ):	0	.20	40	.60	80	100
	(Kör)					
Tampon S3 ( $\mu\text{l}$ ):	900	860	820	780	740	700
GSH çalışma solusyonu (0.5 mmol) ( $\mu\text{l}$ ):	0	40	80	120	160	200

1. Kör, standart ve örnekler için temiz polipropilen mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı.
2. Kör için hazırlanmış tüpe 100  $\mu\text{l}$  kör solusyonu alındı ve 900  $\mu\text{l}$  tampon solusyonu ilave edildi.
3. Standartlar için hazırlanmış tüplere değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart solusyonlarından 100  $\mu\text{l}$  alındı ve 900  $\mu\text{l}$  tampon solusyonu ilave edildi.
4. Örnekler için hazırlanmış tüplerin herbirine 100  $\mu\text{l}$  örnek alındı ve 900  $\mu\text{l}$  tampon solusyonu ilave edildi.
5. Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 50  $\mu\text{l}$  R1 ayıracından eklendi ve vorteksle karıştırıldı.
6. Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 50  $\mu\text{l}$  R2 ayıracından ilave edilerek karanlık ortamda 25 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. Örnekler küvetlere aktarıldı ve absorbansları 400 nm'de spektrofotometrede okundu.
8. Örneklerin okunan absorbans değerleri kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı.

#### **4.5.4. Yenidoğan Total Beyin Örneklerinde DNA Fragmentasyon Analizi**

Apoptotik hücreler sıklıkla DNA agaroz jel elektroforezinde gözlemlenebilen fragmental DNA içerirler. Bundan dolayı apoptozis kriteri olarak DNA fragmentasyonu kullanıldı ve daha önceden tanımlanan prosedürün modifikasyonu ile belirlendi (299). Yeni doğan (PNG-1) yavru sıçanların total beyin dokusu, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 0.5% (w/v) SDS, 1% Triton X-100, 0.25 mg/ml RNase A and 100 µg/ml proteinase K (final konsantrasyonu 2.5 µg/µl) içeren lizis tamponunda homojenize edilerek 65 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 12,000 g'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant fenol ve kloroform ile muamele (extracte) edildi. DNA %100 lük etanolle çöktürüldü ve sonrasında % 70 lik etanolle yıkandı. DNA, tris-EDTA tamponunda tekrar suspanse edildi ve % 2 lik agaroz jel elektroforeziyle analiz yapıldı. Hazırlanan jel etidyum bromid ile boyandı ve UV ışık altında incelendi.

#### **4.5.5. Yenidoğan Total Beyin Örneklerinde Bcl-2 protein ölçümü:**

Yenidoğan (PNG-1) total beyin dokusu homejenatlarında subsellüler fraksiyonlardaki Bcl-2 protein düzeyindeki değişiklikleri inceledik. Kısaca, beyin dokusu 1:10 (w/v) oranında soğutulmuş homojenizasyon solusyonunda (20 mM HEPES-KOH pH: 7.5, 250 mM sukroz, 10 mM KCL, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM (EDTA), 1 mM etilenglikol-bis(b-aminoetil)-N,N,N', N' -tetraasetikasit (EGTA), 1 mM 1,4-ditiotreitol (DDT), 0.1 mM PMSF, 2 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 5 mg/ml pepstatin) homojenize edildi ve nükleer fraksiyon izolasyonu için 900 g'de 15 dk. 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar 12000 g'de 15 dk. 4°C



de tekrar santrifüj edildi ve pellet mitokondrial fraksiyonu temsil etti. Mitokondrial ve nükleer fraksiyonundan eşit miktarda proteinler sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıştırılarak nitrosellüloz membrana transfer edildi. Nitrosellüloz blotlar fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) içinde iki kez 5 dk. yıkandı. Daha sonra PBS içinde %1 lik bovin serum albumini ile 1 saat bloklama yapıldı. Bunu takiben blotlar 1/200 oranında dilue edilmiş primer antikorla (rabbit anti Bcl-2 antikor) tüm gece inkübe edildi. Blotlar yıkanarak sekonder antikorla (goat anti-rabbit) 1 saat inkübe edildi (1/500 dilüsyonunda). Spesifik bağlanma hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve diaminobenzidin (DAB) kullanılarak belirlendi. Elde edilen protein bantlarının yoğunlukları LabWorks 4.0 (UVP, Inc. Cambridge, UK) software programı kullanılarak belirlendi.

#### **4.5.6. Yenidoğan Total Beyin Dokusunda Semi-quantitatif PCR ile p53 mRNA'nın Ekspresyon Analizi**

Yenidoğan yavru total beyin dokusunda p53 mRNA ekspresyonu semi quantitatif RT-PCR la belirlendi. RNA izolasyonu üretici direktifine göre yapıldı (Biological Industries. Israel). RNA konsantrasyonu spektrofotometriyle 260 nm. de belirlendi. cDNA sentezi Optimax First Strand cDNA sentez kiti (Biochain. Ca, USA.) kullanılarak yapıldı. Reverse transkripsiyon için 6 mikrogram RNA kullanıldı (final hacmi 20 µL). İç standart olarak β-actin kullanılarak semi quantitatif analiz yapıldı. β-actin ve p53 için kullanılan primerler tablo 7'de gösterildi (300). Amplifikasyonlar Ependorf Master Gradient Thermal Cycler üzerinde yapıldı. β-actin ve p53 için amplifikasyon 35. döngüde elde edildi. PCR reaksiyon karışımı final hacmi 50 µl olan 0.5 U Sigma Tag DNA polimeraz ve 2

ng cDNA' da 1.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM deoksiribonükleozid trifosfaz ve 100 pM primerlerle termal konsantrasyon da oluşturuldu. Amplifikasyon ürünleri 4 °C de saklandı ve 15 µL reaksiyon ürünleri % 2 lik agaroz jelde elektroforez edildi. Jeldeki optik yoğunluk görüntüleri bilgisayarlı software programı kullanılarak analiz edildi (LabWorks 4.0; UVP, Inc. Cambridge, UK).

**Tablo 7:** Semi quantitative RT-PCR için kullanılan primer sıra

---

P53 Pu: 5'-GTCGGCTCCGACTATACCACTATC-3'

P53 Pd: 5'-CTCTCTTTGCACTCCCTGGGGG-3'

β-actin Pu: 5'- ACCACCATGTACCCAGGCAT-3'

β-actin Pd: 5'- CCGGACTCATCGTACTCCTG-3'

---

#### **4.6. Morris Water Maze Öğrenme Testi ve Probe Test**

Hiperhomosisteinemi ve kontrol grubu anne sıçanların yaklaşık 82 günlük genç erişkin yavrularına öğrenme testleri olarak daha önceden Baydaş ve arkadaşlarının (301) tanımladığı şekilde Morris'in su tankı testi uygulandı. Her iki gruptan toplam 8 yavru sıçan kullanıldı. Deney hayvanları günde 4 kez olmak üzere 5 gün süreyle ard arda bu teste tabi tutuldular.

Morris water maze (MWM) testi sıçan ve farelerde yaygın olarak kullanılan bir öğrenme ve bellek testidir. Laboratuvarımızda kullandığımız Morris'in su tankı, 120 cm çapında galvanizli, siyaha boyalı sirküler bir tank olup 50 cm yüksekliğindedir. Su tankı 30 cm kadar su ile dolduruldu ve suyun 1,5 cm altına bırakılan 10 cm çapındaki platformun görünmesi engellendi. Suyun ısı 25±1 °C dereceye ayarlandı. Deney süresince tankın konumu ve platformun yeri

sabit tutuldu. Deneklerin, bulunduğu yerin uzaysal konumunu algılayabilmeleri için floresan bir ampul tank dışına yerleştirildi (visual cues) ve deney süresince sabit tutuldu. Deney hayvanları bu görsel işaretlerin yardımıyla buldukları yerin uzaysal konumunu algılayabilmektedirler.

Su tankı sanal olarak 4 kısıma ayrıldı ve platform bu kuadranlardan birinin ortasına yerleştirildi. Sessiz ve sakin bir ortamda yapılan bu testte, sıçan bir araştırmacı tarafından nazikçe diğer 1/4 oranındaki alanlardan birinden suya bırakıldı ve yüzerek 60 sn. içinde platformu bulması beklendi. Platformu bulunca 30 sn. orada dinlenmesine izin verildi, sonra alınıp ayrı bir kafeste 30 sn. bekletildi. Sıçanlar su tankına her defasında ayrı bir başlama noktasından bırakılarak aynı işlem her hayvan için 4 kez tekrarlanıp platformu bulma süreleri kaydedildi. Platformu 60 sn içinde bulamayan sıçan araştırmacı tarafından alınıp platformun üzerine bırakıldı ve 30 sn dinlenmesine izin verildi. Her hayvan için 5 gün süreyle aynı denemeler yapıp sıçanların platformu bulma süreleri kaydedildi. Tüm deneklerin yüzme performansları video kamera sistemi ile bilgisayara aktarıldı. Veriler bilgisayarlı video kayıt sistemi ile analiz edildi (Boğaziçi Biyomedikal, İstanbul, Türkiye).

***Probe test:*** Belleğin pekiştirilme işlemini test etmek için, Morris water maze testinin 6. gününde her sıçana probe test uygulandı. Bu testte, platform tanktan alındı ve sıçanlar eğitim testindeki gibi suya bırakılarak 60 sn süresince yüzdürüldü. Sıçanların platformun önceden bulunduğu tankın dörtte birlik kısmında yüzdükleri süre ve bu kuadrana kaç kez girip çıktıkları kaydedildi. Sıçanların daha önceden platformun bulunduğu bu alanda daha çok arama yapması ve zaman geçirmesi beklenir. Hedef kuadrandaki harcanan zaman

hafızanın pekiştirilmesinin derecesini gösterir ve öğrenmeden sonraki yerini alır.

Probe testi takiben, muhtemel bir sensory motor bozuklukları test etmek için ve deneklerin görsel bozukluklarının olup olmadığını doğrulamak için visible test yapıldı. Platformun yeri değiştirilerek, tankın su seviyesi platformu görünür hale getirecek kadar azaltıldı. Her sıçanın bir denemede platformu bulma süresi kaydedildi.

#### **4.7. Yenidoğan Total Beyin Dokularının ve Genç Erişkin Yavruların Hipokampus Bölgesinin SDS-PAGE ve Western Blot ile Analizi**

##### **4.7.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması**

Örneklerinin hazırlanmasında Baydaş ve arkadaşları (297) tarafından uygulanan homojenizasyon yöntemi kullanıldı.

Yavru sıçan (PNG-1) total beyinleri ve genç erişkin yavru (PNG-82) hipokampusları 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solusyonunda [50mM Tris-HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, %1 Triton X-100, 2 mM EDTA, 0.1mM PMSF, 5µM soybean 10 µg/mL aprotinin ve 10 µg/mL leupeptin] cam bir homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Doku homojenatları soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 60 dakika süreyle 40000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar temiz ependorf tüplere alındı. Total protein tayini protein ölçüm kiti (Sigma, St. Louis, MO, USA) kullanılarak Lowry prosedürüne göre yapıldı.

Pelletler eşit hacimde ilave edilen homojenizasyon solusyonunda [25 mM Tris-HCl (pH= 7.4), 0.1mM PMSF, % 2'lik TritonX -100 ve % 1'lik SDS]

yeniden süspanse edildi, +4 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 60 dakika süreyle 60.000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen 2. süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak daha önceden hazırlanan örnek solüsyon ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 5 dakika kaynatıldı. SDS-PAGE ve western blot analizleri için -80 °C'de saklandı.

#### **4.7.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)**

Elektroforez, protein ve nükleik asitler gibi yüklü taneciklerin belirli bir pH' da elektriksel bir alanda ve iyonize ortamda molekül büyüklüğü veya yük farklarına göre ayrılması ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Elektroforez sırasında kullanılan jel matriksi çeşitli büyüklükteki makromoleküllerin göçünü engelleyen bir moleküler elek özelliği gösterir. Jel matriksi nispeten hareketsiz olup ayrılacak olan moleküllerle etkileşmez.

Jel ortamında biyolojik makromoleküllerin elektroforezi yapıldığında oluşan sürtünmeden dolayı büyük moleküller jel matriksi boyunca küçük moleküllerden daha yavaş göç edeceği için makromoleküllerin ayrılması sağlanır. Elektroforez cihazında direnç; tamponun iyonik kuvveti, jelin kesit alanı ve uzunluğu ile sağlanır. Elektroforez sırasında üretilen güç moleküllerin hareketinde kullanılır.

Poliakrilamid jel elektroforezinde proteinler, elektriksel bir alanda ve iyonize bir ortamda molekül büyüklüğü veya yük farklılığına göre ayrılmaktadırlar. SDS-PAGE, denatüre edici maddeler (örneğin; sodyum dodesil sülfat, β-merkaptotanol) kullanılarak proteinlerin poliakrilamid jelde ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu teknikte proteinler denatürasyona uğrayarak üç boyutlu

yapıdan linear yapıya dönüşerek poliakrilamid jelde ayrılırlar. Poliakrilamid jellerin moleküler elek özellikleri akrilamid konsantrasyonunun artması ile değişir. Poliakrilamid jellerin por büyüklüğü küçük moleküllerin ayrılmasını daha iyi sağlamaktadır. Bu yüzden poliakrilamid jeller, genellikle nükleik asitlerden daha küçük olan proteinlerin ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yük bakımından aynı özellikte olan fakat molekül ağırlığı farklı olan iki proteinin hareket hızı jeldeki mevcut pora bağlı olarak farklı olacaktır. Poliakrilamid jel üzerinde büyük molekül proteinler göç sırasında küçük molekül proteinlere göre daha fazla polimerde tutulur. Buna bağlı olarak büyük molekül yapısına sahip proteinin hızı küçük olana göre daha az olacaktır. Tamponun iyon konsantrasyonu arttıkça iyonik kuvveti de artar ve böylece protein moleküllerinin mobilitesi artar (302).

#### **4.7.2.1. SDS-PAGE İçin Jellerin Hazırlanması**

SDS-PAGE de kullanılan ayırma jeli (%12) ve yükleme jeli (%4) ayrı ayrı hazırlandı (tablo 8, 9). Örnek solüsyonların hazırlanması tablo 10'da gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Ayırma jelinin hazırlanması

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

**Tablo 9.** Yükleme jelin hazırlanması

<b>Yükleme (Stacking) jelin hazırlanması (%4)</b>	<b>Miktar</b>
Distile su	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml.
SDS (%10)	100 µl
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	10 µl
Toplam	10.0 ml

**Tablo 10.** Örnek solusyonların hazırlanması

<b>Örnek solusyonların(Sample Buffer) hazırlanması</b>	<b>Miktar</b>	<b>Son konsantrasyon</b>
1 M Tris-HCl (pH6.8)	1.25 ml	0.125 M
% 10 SDS	1.6 ml	%4
%0.05 bromofenol blue	0.2 ml	%0.002
Gliserol	0.8 ml	% 20
2-β-merkaptoethanol	0.4 ml	%10
Distile su	3.75 ml	-
Toplam	8.0 ml	-

#### **4.7.2.2. Örneklerinin SDS-PAGE ile Analizi**

Protein örnekleri Laemmli (302) tarafından belirtilen şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi.

Kaset haline getirilen cam plaklar arasına hazırlanan 10 ml' lik ayırma jeli solüsyonu uygun bir otomatik pipet ile aktarıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Protein örneklerini yükleme kuyusu oluşturmak için iki cam levhanın üst kısmına tarak yerleştirildi. Yükleme jeli solüsyonu 10 ml hazırlandıktan sonra ayırma jeli üstünde bulunan boşluğa tarak dişlerinin arasından iki camın en üst seviyesine kadar pastör pipeti ile döküldü. Yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Daha sonra tarak dikkatli bir şekilde yavaşça çıkartıldı.

Hazırlanan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Hazırlanan protein örnekleri ve molekül ağırlığı bilinen standart protein örnekler 10-20 µl kadar



yükleme jelindeki tarak dişlerinin oluşturduğu kuyulara yüklendi ve tanka yürütme solüsyonu eklendi. Tank kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlandı ve 250 V, 35mA akım verildi. Mavi boya bandı seperate jeli geçince akım 50 mA çıkarıldı. Örnekler cam kasetin altına geçtikten sonra NCAM için 40 dk, GFAP için 25 dakika, S-100B için 20 dakika daha beklenip elektroforez cihazı kapatıldı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı.

### **4.7.3. Western Blot**

Elektroforezde birbirinden ayrılan protein bantlarından herhangi birinin diğerlerinden spesifik antikor kullanılarak ayırt edilmesi tekniğine Western blot veya İmmünoblot adı verilmektedir.

Western blot tekniği, elektroforez işlemi takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenme aşamalarıdır (303,304).

#### **4.7.3.1. Yenidoğan Total Beyin Dokularının ve Genç Erişkin Yavruların Hipokampus Bölgesinin Western Blot ile Analizi**

Örneklerinin western blot analizi Baydaş ve arkadaşları (297) tarafından uygulanan metoda göre yapıldı.

SDS-PAGE tamamlandıktan sonra çıkarılan poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran (Schleicher and Schuell, Inc., USA) yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve filtre kağıtları eklenerek blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solusyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirildi ve 60 dakika boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar PBS çalışma solusyonuyla [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.025 M),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0.075 M),  $\text{NaCl}$  (1.45 M)] çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM  $\text{NaCl}$ , 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sığır serum albumini ile 37 °C'de 90 dakikalık inkübasyonla blokladı.

Primer antikor olarak poliklonal rabbit anti-rat NCAM antikorunu (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) kullanıldı. NCAM primer antikorunu % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Poliklonal rabbit anti-rat GFAP antikorunu (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) 1:2000 oranında dilue edilerek, poliklonal rabbit anti-rat S-100B antikorunu (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) 1:1500 oranında dilue edilerek kullanıldı. PSA-NCAM'a karşı monoklonal fare antikorunu (Chemicon Inc, USA) 1:500 oranında seyreltilerek kullanıldı. Nitroselüloz membranlar primer antikorlarla +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika PBS çalışma solusyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit

immünoglobulinle (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) 37 °C'de 90 dakika süreyle tekrar inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika PBS çalışma solusyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solusyonu kullanıldı. DAB'la renklendirilen bantlar 5-10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar çeşme suyuyla yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları Lab. Works 4.0 (Ultra Violet Products Ltd. Combridy, CD4 1TG UK) software programı kullanılarak analiz edildi.

#### **4.8. İstatistiksel Analizler**

Veriler Ortalama  $\pm$  Standart Hata (Ort  $\pm$  SH) olarak ifade edildi. Uzaysal öğrenme verileri tekrarlayan ölçümler için iki yönlü varyans analizi (ANOVAR) kullanılarak değerlendirildi, Tukey testi ile post hoc analizi yapıldı. Proteinlerin dansitometrik düzeylerindeki farklar ve Probe test Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. LPO, Hcy ve GSH düzeylerinin gruplar arası farklılıkları Student *t* testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

P değeri 0,05 den küçük ( $p \leq 0.05$ ) olan bulgular istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 5. BULGULAR

Gebe sıçanların günlük içme sularına metiyonin konulması gebeliğin sonunda ölçülen plazma Hcy seviyesini belirgin olarak arttırdı (Kontrol: 6  $\mu\text{M/L}$  ve Hcy grup: 26  $\mu\text{M/L}$ ;  $P<0.001$ ). Yavru sayısı bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu (Her batındaki ortalama yavru sayısı  $\pm$  Standart Hata: Kontrol grubu  $11.5\pm 1.0$  ve Hcy grubu:  $10.2\pm 0.6$ ). Hcy grubundaki yenidoğan (PNG-1) yavru sıçanların beyin ve vücut ağırlıkları kontrole göre, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, azalmış bulundu (tablo 11). Öğrenme testleri sırasında erişkin yavruların vücut ağırlıkları kontrol grubunda  $195\pm 10$  gram, Hcy grubunda ise  $188\pm 8$  gram bulundu (tablo 12). Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

**Tablo 11.** PNG-1’de yavru sıçanların ortalama vücut ve beyin ağırlıkları

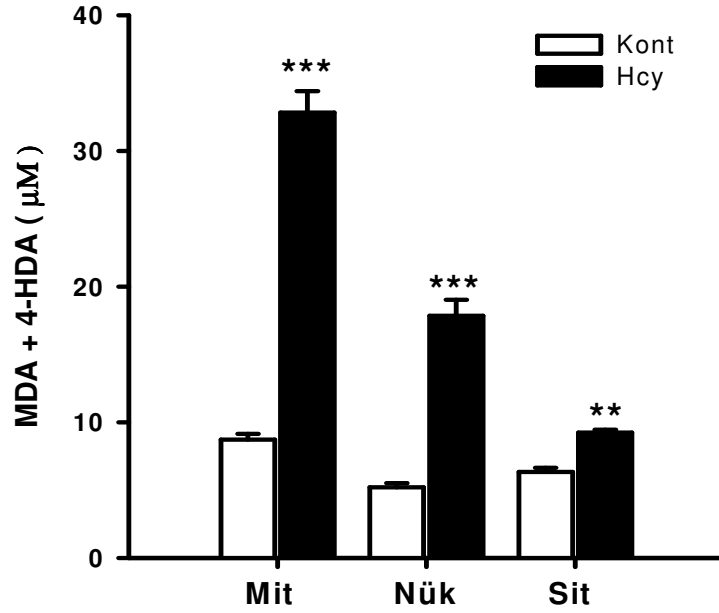
Grup	n	Beyin ağırlığı(gr)	Vücut ağırlığı (gr)
Kontrol	25	$0.293\pm 0.01$	$6.10\pm 0.07$
Hcy	25	$0.282\pm 0.01$	$5.90\pm 0.06$

**Tablo 12.** PNG-82’de yavru sıçanların ortalama vücut ağırlıkları

Grup	n	Vücut ağırlığı(gr)
Kontrol	25	$195\pm 10$
Hcy	25	$188\pm 8$

### 5.1. LPO Değerleri

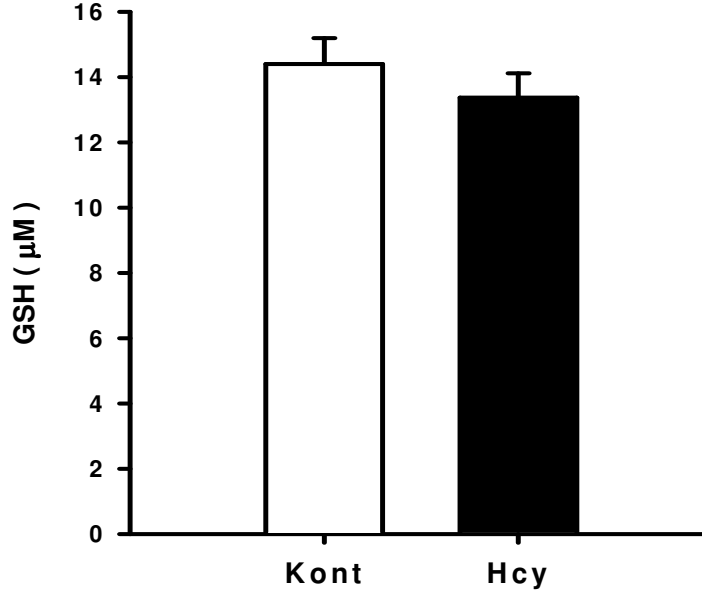
Metiyonin uygulanan grupta PNG-1'de yavru sıçanların total beyinlerindeki LPO düzeyleri her 3 subsellüler fraksiyonda da (mitokondri, nükleus, sitozol) belirgin olarak artmış bulundu (Kontrole göre sırasıyla 4, 3, 2 kat). Hcy'nin oksidatif etkilerine karşı mitokondrinin daha hassas olduğu gözlemlendi (Şekil 5).



**Şekil 5.** PNG-1'de, Kontrol ve Hcy gruplarındaki yavru beyinlerinin subsellüler fraksiyonlardaki ortalama LPO düzeyleri (\*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi; Mit: Mitokondrial; Nük: Nüklear; Sit: Sitozolik.

## 5.2. GSH Değerleri

Gebelik boyunca methionin uygulanmasının PNG-1'de yavru total beyinde GSH düzeyleri üzerinde belirgin etkisi olmadı (Şekil 6).



**Şekil 6.** PNG-1'de, Kontrol ve Hcy gruplarındaki yavru total beyinlerinde GSH düzeyleri. Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

## 5.3. DNA Fragmentasyonu

Apoptoz göstergesi olan DNA fragmentasyonu hiperhomosisteinemili anne sıçanların yavrularının beyinlerinde gözlemlendi (Şekil 7).

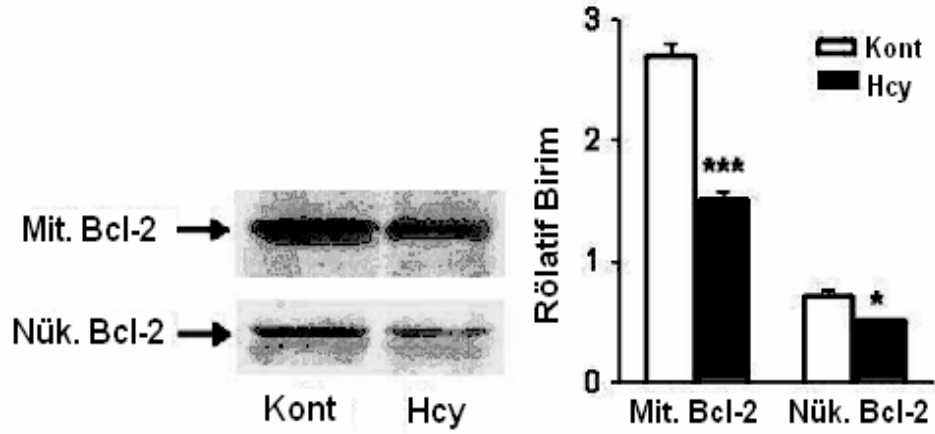
## MS Kont Hcy



**Şekil 7.** Yavru beyinlerinde DNA fragmentasyonu (oligonükleozomal merdiven görünümü). MS: Moleküler ağırlık standartları; Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

### 5.4. Bcl-2 Protein Değerleri

Bcl-2 ailesinin üyeleri, hücre ölüm-kalımını, mitokondrial membranın iyon geçirgenliğini ve sitokrom c salınımını kontrol ederek belirler. Bcl-2 antiapoptotik bir protein olup, azalması mitokondrilerde apoptozisi tetikler. Total beyinde Bcl-2 proteinini immünblotting ile belirledik. Bcl-2 protein düzeyleri Hcy grubu yavruların mitokondrial ( $p<0.001$ ) ve nükleer ( $p<0.05$ ) fraksiyonlarında belirgin olarak düşüktü (Şekil 8).

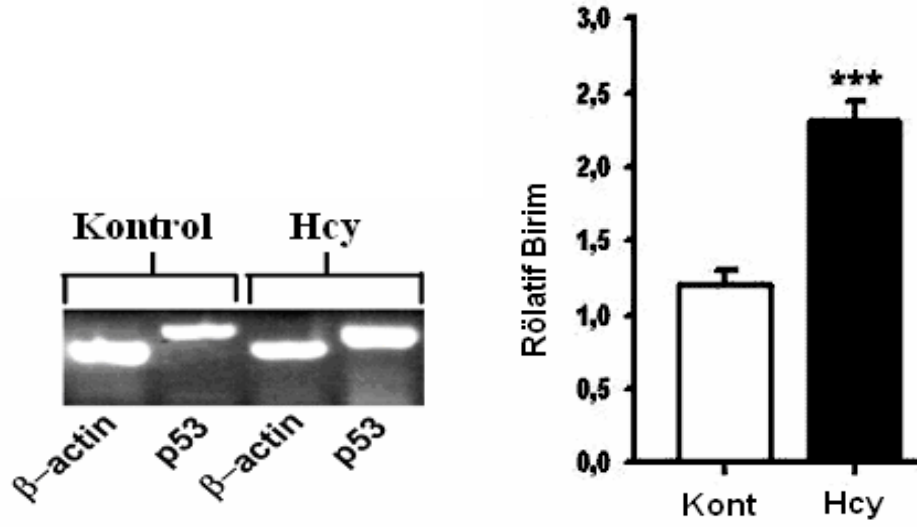


**Şekil 8.** PNG-1’de, Kontrol ve Hcy gruplarındaki yavru total beyinlerinin mitokondri ve nükleer fraksiyonlardaki Bcl-2 proteinlerinin immünblot ve dansitometrik analizleri. (\*\*p<0.001, \*p<0.05). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

### 5.5. p53 mRNA Değerleri

PNG-1’de alınan yavru total beyin homojenatlarında p53 mRNA düzeyleri semikuantitatif- PCR ile ölçüldü ve  $\beta$ -actin iç kontrol olarak kullanıldı (Şekil 9). Maternal hiperhomosisteinemi serebral p53 mRNA yı anlamlı olarak arttırdı (p<0.001).

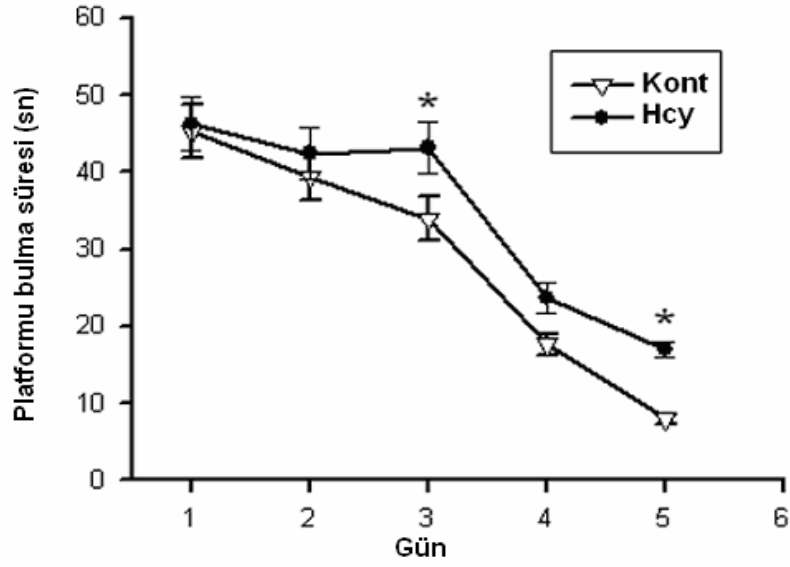




**Şekil 9.** Kontrol ve Hcy gruplarındaki yavru beyinlerinde p53 mRNA ekspresyon düzeyleri. Agorose jel elektroforezi ve dansitometrik analizi (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).  
Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

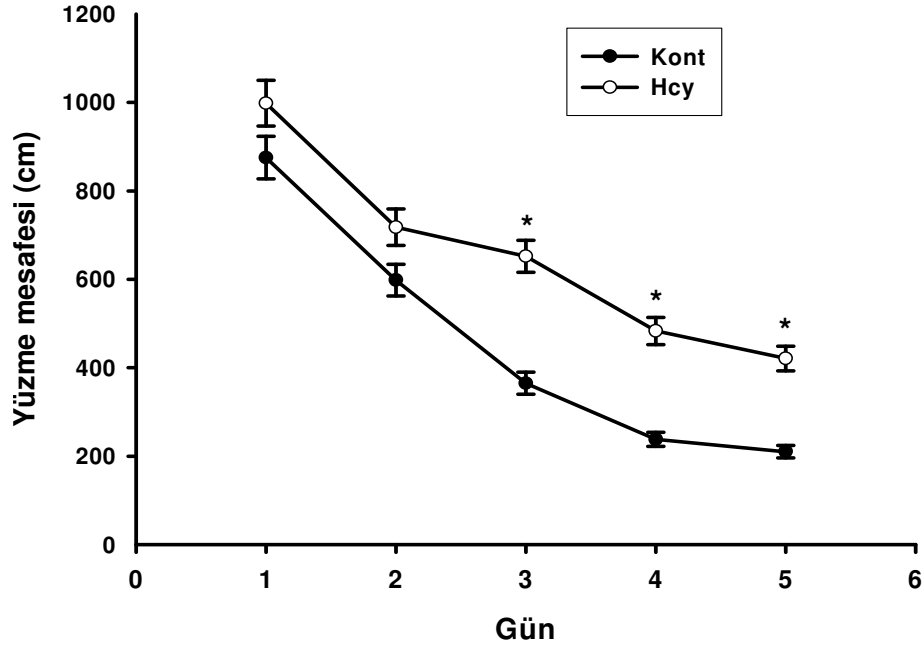
### 5.6. Morris Water Maze Testi

Dişi ve erkek sıçanlar arasında anlamlı farklılık oluşmadığı için veri analizi toplu yapıldı. MWM testinde, platformu bulma süresi 5 günlük deneme boyunca her iki grupta da azalmasına rağmen, maternal hiperhomosisteineminin öğrenmeyi bozduğunu düşündürecek şekilde, Hcy grubunda kontrole göre platformu lokalizasyon süresi anlamlı olarak uzundu (şekil 10). Gruplar arasındaki fark 3. ve 5. günlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde idi. Hcy grubunun yüzmeye süreleri de uzun bulundu. Her iki gruptaki sıçanların platformu bulma süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (ANOVA,  $P < 0.05$ ).



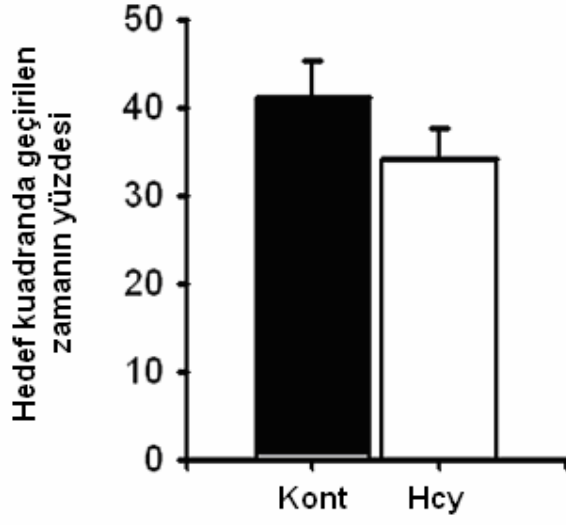
**Şekil 10.** Water maze testi; her iki grubun günlerdeki ortalama platformu bulma süreleri. Hcy grubunun platformu bulma süresi kontrole göre kötüydü. Gruplar arasındaki fark 3. ve 5. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bulundu (\* $p<0.05$ ). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

Hcy grubundaki sıçanlar platformu bulmak için kontrole göre daha uzun mesafe yüzdüler (şekil 11). Gruplar arasındaki fark 3., 4. ve 5. günlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde idi (ANOVA,  $P<0.05$ ).



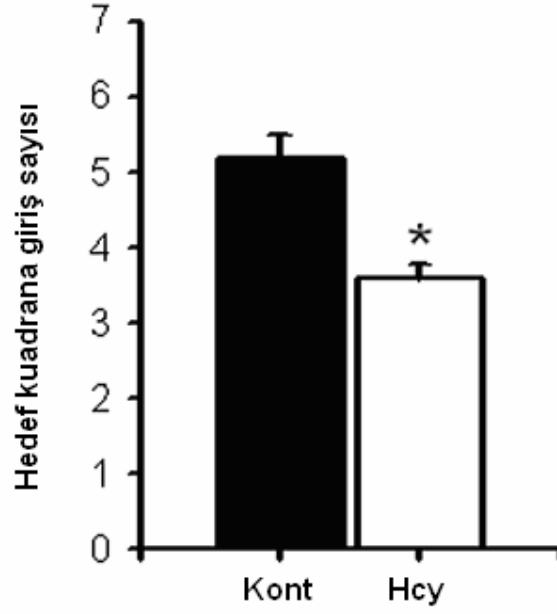
**Şekil 11.** Water maze testi; her iki grubun günlerdeki platformu bulmak için katedilen ortalama yüzme mesafeleri. Gruplar arasındaki fark 3., 4. ve 5. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

Probe denemeleri sırasında bütün sıçanlar zamanın çoğunu platformun daha önceden lokalize olduğu kuardanda arayış içinde geçirdiler (Şekil 12). Kontrollerle kıyaslandığında Hcy yavrularında uzaysal hafızada belirgin bozulma gözlenmedi. Kontrol yavruları platformun daha önceden lokalize olduğu kuardanda Hcy grubuna göre daha uzun süre yüzdüler; ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ). Bununla beraber hedef kuadrana giriş sayısı hiperhomosisteinematik anne yavrularında anlamlı olarak ( $P < 0.05$ ) daha azdı (Şekil 13).



**Şekil 12.** Probe testi; her iki grubun, başlangıçta platformun lokalize olduğu hedef kuadranda geçirdikleri zamanın yüzdesi. Gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

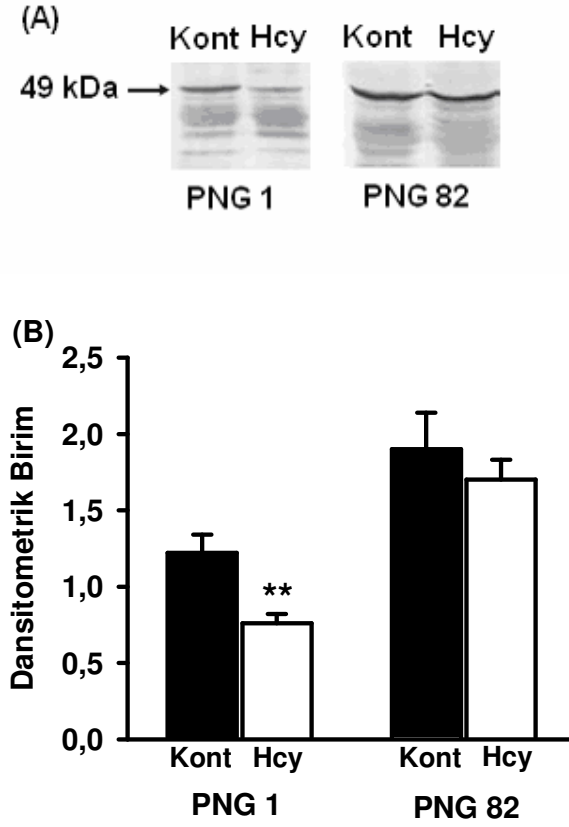
Platform görünür halde iken yapılan denemelerde kontrol ve Hcy grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Kontrol grubu:  $10.8 \pm 0.5$  sn, Hcy grubu:  $11 \pm 0.5$  sn). Bu sonuçlar gruplarda yüzme yeteneği ve motivasyonlarının benzer olduğunu, uzaysal performansta gözlenen farkın sensorimotor bozukluklara bağlı olmadığını gösteriyor.



**Şekil 13.** Her iki grubun, başlangıçta platformun lokalize olduğu kuadrana giriş sayıları. Hiperhomosisteinematik anne yavruları hedef kuadrana anlamlı olarak daha az giriş yaptı (\* $p < 0.05$ ). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

### 5.7. GFAP Değerleri

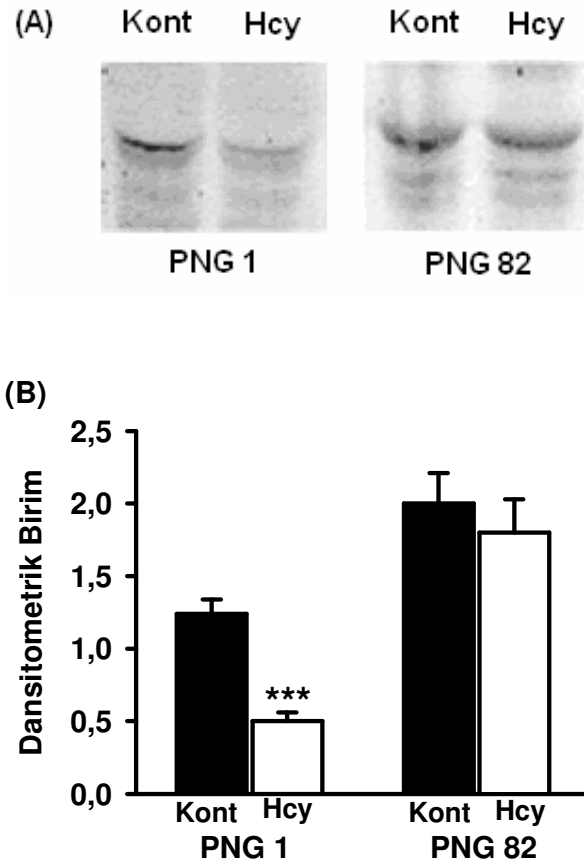
Olgun astrositlerin esas intermedier flamen proteini olan GFAP, Hcy grubu yenidoğan (PNG-1) total beyin homojenatlarında kontrole göre azalma tespit edildi (Şekil 14). GFAP' nin 49 kDa'lık esas bandı PNG-1'deki Hcy yavrularında çok düşük düzeyde eksprese edilmiştir ( $P < 0.01$ ). Bununla birlikte genç erişkin yavruların GFAP düzeylerinde gruplar arası fark yoktu.



**Şekil 14.** PNG-1 ve PNG-82’de GFAP protein ekspresyonunun immünblot (A) ve dansitometrik analizleri (B). GFAP’ nin 49 kDa’lık esas bandı PNG-1’deki Hcy yavrularının total beyinde çok düşük düzeyde eksprese edilmiştir (\*\*  $p<0.01$ ). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

### 5.8. S100B Değerleri

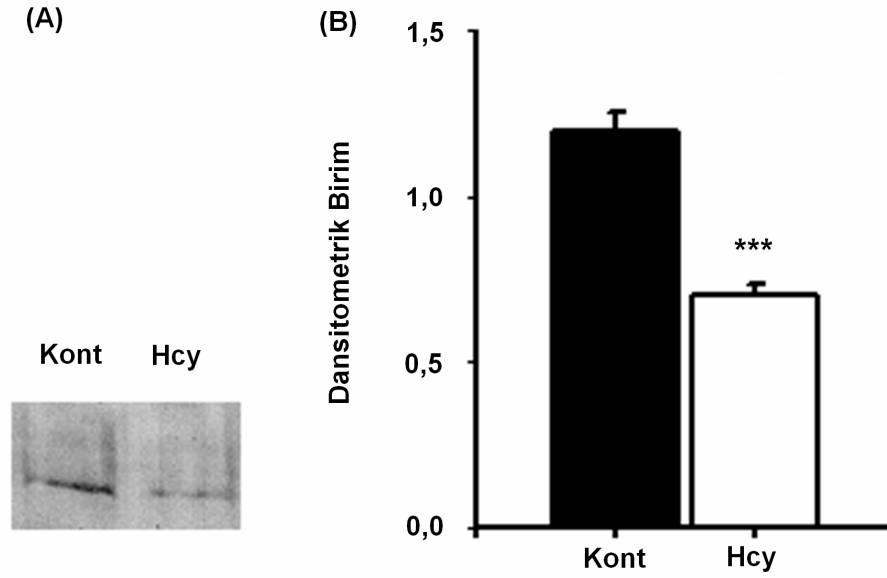
S100B protein ekspresyonunda da benzer sonuçlar tespit edildi. PNG-1’de yavru total beyin homojenatlarında S100B protein ekspresyonu Hcy grubunda kontrollere göre anlamlı olarak azalmış bulundu ( $p<0.001$ ), genç erişkin yavrularda ise anlamlı fark yoktu (şekil 15).



**Şekil 15.** PNG-1 ve PNG-82’de S100B protein ekspresyonunun immünblot (A) ve dansitometrik analizleri (B). S100B, PNG-1’deki Hcy yavrularının total beyinde çok düşük düzeyde eksprese edilmiştir (\*\* $p < 0.001$ ). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

### 5.9. PSA-NCAM Değerleri

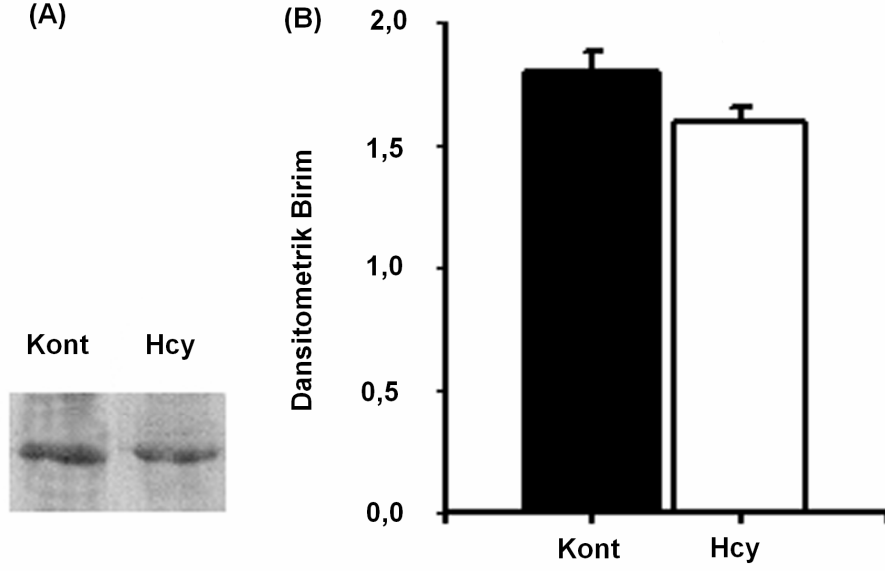
Kontrol ve Hcy gruplarının PNG-1’deki total beyin homojenatlarındaki western blot analizinde PSA-NCAM ekspresyonlarında farklılık olduğu tespit edildi (şekil 16). Hcy grubunda kontrole göre PNG-1’de PSA-NCAM ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ( $p < 0.001$ ).



**Şekil 16.** Kontrol ve Hcy gruplarının PNG-1'deki total beyin homojenatlarındaki PSA-NCAM ekspresyonlarının western blot (A) ve densitometrik analizleri (B). Hcy grubunda PSA-NCAM ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak düşüktü (Mann-Whitney U testi; \*\*\* $p<0.001$ ). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

PNG-82'de total beyinde ki PSA-NCAM düzeyi her iki grupta da tespit edilemedi (Testin duyarlılık sınırlarının altında olması nedeniyle). Bu yüzden PSA-NCAM hipokampus dokusunda ayrıca çalışıldı. İmmünblotlar densitometrik olarak karşılaştırıldığında Hcy grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma tespit edildi (şekil 17).

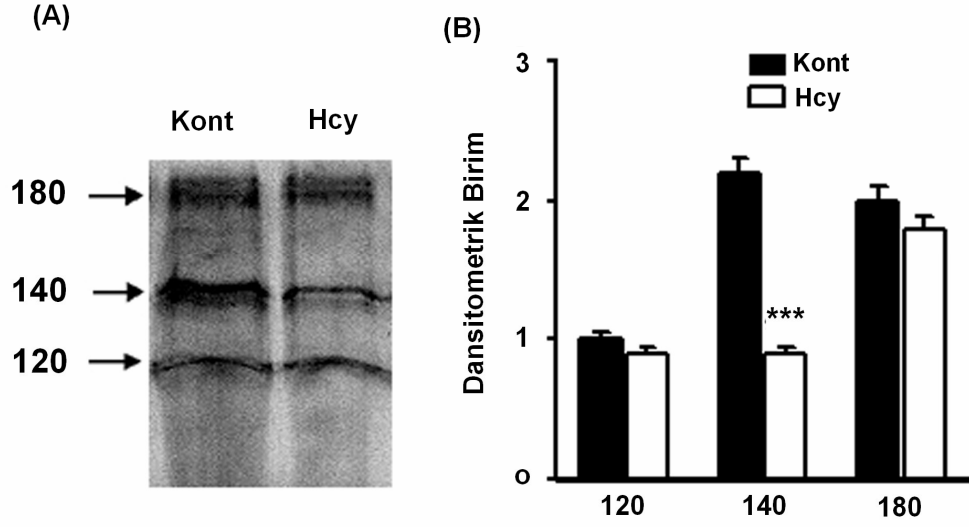




**Şekil 17.** Kontrol ve Hcy gruplarının PNG-82'deki hipokampus homojenatlarındaki PSA-NCAM ekspresyonlarının western blot (A) ve dansitometrik analizleri (B). (Mann-Whitney U testi;  $p>0.05$ ). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

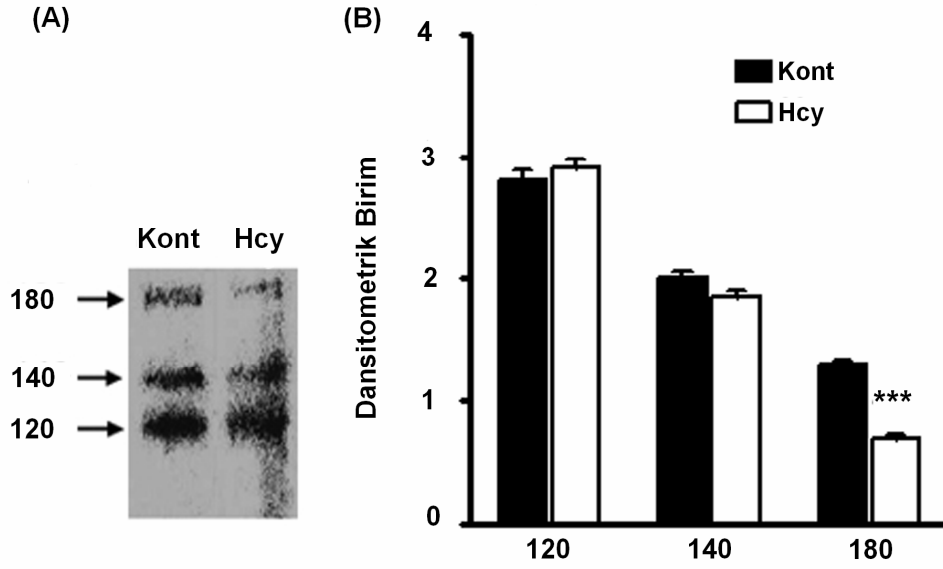
### 5.10. NCAM Değerleri

PNG-1'deki Hcy grubunun total beyin homojenatlarındaki NCAM blotlarına bakıldığında NCAM-140 ekspresyonunun kontrole göre belirgin olarak azaldığı tespit edildi ( $P<0.001$ ), (şekil 18).



**Şekil 18:** Kontrol ve Hcy gruplarının PNG-1'deki total beyin homojenatlarındaki NCAM protein ekspresyonlarının western blot (A) ve dansitometrik analizleri (B). Hcy grubunda NCAM-140 ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak düşüktü (Mann-Whitney U testi; \*\*\* $p<0.001$ ). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

PNG-82'de kontrolle kıyaslandığında Hcy grubunda hipokampusta NCAM-180 seviyesi belirgin olarak azalmıştı ( $P<0.001$ ). NCAM-120 ve NCAM-140 izoformlarının ekspresyonları açısından her iki grup arasında belirgin fark tespit edilmedi (şekil 19).



**Şekil 19.** Kontrol ve Hcy gruplarının PNG-82’de hipokampus homojenatlarındaki NCAM protein ekspresyonlarının western blot (A) ve dansitometrik analizleri (B). Hcy grubu genç erişkin yavrularında NCAM-180 ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak düşüktü (Mann-Whitney U testi; \*\*\* p<0.001). Kont: Kontrol; Hcy: Hiperhomosisteinemi.

## 6. TARTIŞMA

Çalışmada maternal hiperhomosisteineminin fetal beyin gelişimini ve dolayısıyla kognitif fonksiyonları bozacağı varsayıldı. Bu hipotezi denemek için hiperhomosisteinematik gebe sıçan modeli geliştirildi. Metiyonin uygulamasının plazma hcy seviyesini anlamlı olarak yükselttiği iyi bilinmektedir (19,22,296,305). Maternal hiperhomosisteineminin fetal hcy konsantrasyonunda yükselmeye yol açtığı bildirilmiştir (263,264,306). Çalışmada maternal hiperhomosisteineminin fetal hiperhomosisteinemiye yol açacağını varsayıldı. Homosistein beyin dokusunda metiyonin metabolizmasından üretildiği gibi, kandan beyine difüzyon ve özel doyurulabilir reseptörler aracılığıyla da taşınabilir (60,64). Streck ve arkadaşları (120) serebrumda maksimum hcy konsantrasyonunun hcy enjeksiyonundan 15 dakika sonra ulaşıldığını bildirmiştir. Rees ve arkadaşları (307) diyetteki aşırı metiyoninin hcy üretimi vasıtasıyla fetal gelişmeyi etkilediğini bildirmiştir.

Hiperhomosisteinematik gebe sıçanların bir günlük yavrularının beyin homojenatlarında LPO artışı, DNA fragmantasyonu, bcl-2 protein düzeyinde azalma ve p53 protein ekspresyonunda artış, GFAP ve S100B protein ekspresyonunda azalma bulunmuştur. Nörogenezis ve nöronal plastisitede önemli bir protein olan NCAM ekspresyon paterninde farklılık gözlemlendi. Kognitif fonksiyonları değerlendirmek için yapılan MWM testinde ise Hcy grubunda uzaysal öğrenme ve hafıza konsolidasyonunda bozulma tespit edildi.

Hiperhomosisteinemide lipid peroksidasyonunda artış daha önce de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada yeni olan taraf; hiperhomosisteinemide LPO artışının hiperhomosisteinematik gebe sıçan

yavrularında gösterilmesidir. Çalışmada hiperhomosisteinamik gebe sıçan yavrularının beyinlerinde LPO artışı tespit edildi; sitozolik, nükleer ve mitokondrial subfraksiyonlarının tümünde anlamlı LPO artışı olmakla birlikte mitokondrial subfraksiyondaki LPO artışı çok daha çarpıcıydı. Esasında beyin mitokondrilerinin oksidatif hasara daha duyarlı olduğu da bildirilmiştir (38,39). Bu çalışmadaki bulgulara göre, aynı dozda metiyonin fetus beyinde erişkinlere göre daha belirgin LPO artışı yapmaktadır (19,22). Bu durum, fetal dokulardaki antioksidan savunma sisteminin daha zayıf olmasından kaynaklanabilir (310,311). Embriyonik gelişim sırasında antioksidan enzim ya da yolların yetersizliğiyle birlikte hcy ile oluşturulmuş oksidan stres artışı DNA hasarını daha da arttırabilir ve ciddi nörodejeneratif bozukluklara yol açabilir. Artmış oksidatif stres (mitokondrial fraksiyonda kontrole göre 4 kat LPO artışı) nöral gelişim bozukluklarının temelinde yatan ana faktörlerden biri olabilir. Baydaş ve arkadaşları (19) antioksidan bir madde olan melatonini hiperhomosisteinamik sıçanlara uyguladıklarında oksidatif stres (LPO artışı) ve kognitif disfonksiyonların engellenebildiğini göstermişlerdir.

Homosistein erişkin sıçanlarda antioksidan enzim düzeyini değiştirebilmektedir; oksidatif stres artışına karşılık antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın hcy nörotoksitesini potansiyalize ettiği belirtilmektedir (19,21,89). Bu bulgularla uyumlu olarak hiperhomosisteinemide antioksidan bir enzim olan GSH-Px'in hipokampusta azaldığı bildirilmiştir (19). Ancak mevcut çalışmada hiperhomosisteinamik gebe yavrularında, erişkinden farklı olarak GSH düzeyinde bir değişiklik tespit edilmedi. Bu durumun olası nedenlerinden biri fetusta GSH regülasyonunun erişkinden farklı olması olabilir.

Ayrıca Hcy etkisinin santral sinir sisteminde bölgesel farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir; paralel bir durum GSH içinde ileri sürülebilir. Mevcut çalışmada GSH ölçümünü tüm beyinde gerçekleştirildiği için, sadece hipokampustaki GSH azalması total beyindeki ölçüm sonucuna yansımamış olabilir.

Bu çalışmada artmış hcy seviyesinin sıçan embriyosunda DNA hasarına yol açtığı da tespit edildi. DNA hasarı kalıcı nöral gelişim kusurlarına yol açabilir. Bulgular hiperhomosisteineminin beyinde tipik apoptotik değişikliklere yol açtığını düşündürmektedir. Beyinde, agaroz jel elektroforeziyle apoptozisin karakteristik özelliği olan oligonükleozomal uzunluktaki DNA fragmanlarını tespit edildi. Buradaki apoptozisin oksidatif stres tarafından indüklendiği ileri sürülebilir. Daha önce yapılan çalışmalarda da erişkin sıçan hipokampus ve serebral korteksinde oksidatif stres ile birlikte DNA hasarı tespit edilmiştir (20,201,299).

Hiperhomosisteinematik yavru beyinlerinde gözlemlenen Bcl-2 seviyesindeki azalma; DNA fragmentasyonunu dahada arttırabilir. Apoptoziste regulatuar bir protein olan Bcl-2 mitokondrial membrandan sitokrom-c salınmasını engeller ve hücreleri apoptozise karşı koruyucu etkileri vardır (192,312). Baydaş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (20) homosisteinin apoptozisi intrinsik mitokondrial yollar üzerinden tetikliyebildiği gösterilmiştir. Çalışmada mitokondrial Bcl-2 ekspresyonundaki azalma homosisteinin apoptozisi intrinsik mitokondrial yollar üzerinden tetiklediği düşüncesi ile uyumludur. Homosisteinin oto-oksidasyonu sonucu ROS oluşur. ROS mitokondride hasar ve bunun neticesinde de sitokrom salınımına yolaçarak apoptozisi başlatabilir. Diğer yandan spesifik membran taşıyıcıları, nöronlar içerisinde yüksek hcy

konsantrasyonuna yol açabilir (60). Bu artış DNA metilasyonunu bozarak DNA kırıkları oluşturabilir (110). Nükleer fraksiyonda bcl-2 azalması nöronlarda hcy artışıyla metilasyon siklusunun bozulmasının göstergesi sayılabilir.

Hcy tarafından tetiklenen başka bir apoptotik yol da p53 aktivasyonudur. Hcy'nin p53 seviyesini erişkinlerde belirgin olarak arttırdığı bildirilmiştir (110). Çalışmamızda hiperhomosisteineminin sıçan yavru beyinlerinde de p53 düzeyini arttırdığı tespit edildi. Oksidatif stres, muhtemelen p53 gen ürününün birikimine yol açarak apoptozisi tetikleyen olaylar dizisini başlatmaktadır (313,314).

Sonuç olarak maternal hiperhomosisteineminin fetal beyinde nöral apoptotik hücre ölümünü hızlandırdığı ileri sürülebilir.

Mevcut çalışmada, hcy-oksidatif stres-apoptozis teorisini destekleyen bulgulara ilaveten hcy-nöroplastisite ve beyin maturasyon bozukluğu- kognitif disfonksiyon teorisini destekleyen bulgular da elde edildi.

Öğrenme ve hafıza bozukluğu, beyin maturasyonunda ve nörogenezisteki bozukluklardan kaynaklanabilir. Bu olasılığı test etmek için astrosit maturasyon belirteci olan GFAP protein düzeyine bakıldı. Astrositik hücrelerden başlangıçta vimentin sentezlenir, ancak astrositler olgunlaştıkça GFAP sentezi ağırlık kazanır (243,244). S100B proteini de nöral maturasyonun bir göstergesidir (244). Çalışmamızda bu iki protein sentezinin de hiperhomosisteinemi gurubunda kontrole göre azalması, kognitif disfonksiyona beyin maturasyonundaki gecikmenin katkıda bulunabileceğini düşündürüyor.

Sinir sisteminin gelişiminde rolü olan başka bir molekül de NCAM'dır. (210,211,213). NCAM'ın, erişkinde ve sinir sisteminin gelişimi döneminde hücre

migrasyonu, nörit gelişimi, hipokampal nöroplastisitede rolü vardır (218,219,230,232).

Çalışmamızda genç erişkin yavrularında ( PNG-82) NCAM izoformlarının ekspresyon patternlerini, yenidoğan (PNG-1) yavrulardan farklı olduğu tespit edildi. PNG-1'de yenidoğan total beyinde NCAM 180 düzeyi diğer izoformlardan daha yüksekken PNG-82'de olgun beyinde NCAM 120 düzeyi daha yüksek bulundu. Bu bulgular NCAM 120'nin gelişim sırasında en son ortaya çıkan izoform olduğuna dair ortaya çıkan bulgularla uyumludur (213,214).

Çalışmamızda, yenidoğan (PNG-1) total beyinlerinde NCAM 140 düzeyinin kontrole göre belirgin şekilde azaldığı tespit edildi. NCAM-140 hem pre- hem de post-sinaptik membranda eksprese edilir ve hücre-hücre adezyonunda ve nörit büyümesinde önemli rolü vardır (212). Arada kesin nedensel ilişki kurulamasa da NCAM-140 azalması beyin gelişimi sırasındaki yapısal değişikliklerden sorumlu olabilir.

Hiperhomosisteinematik annelerin erişkin yavrularının (PNG-82'de) hipokampus homojenatlarında NCAM-180 ekspresyonunun kontrole göre azaldığı tespit edildi. NCAM-180 sinaptik plastisitede ve sinaptik kuvvetin stabilizasyonunda belirleyici role sahiptir (215,216). NCAM-180 ekspresyonunun hipokampusta azalmasının bilişsel fonksiyonu olan nöral devrelerde sinaptik destabilizasyona yol açabileceği ileri sürülebilir.

Beyindeki gelişimsel olaylardan biri PSA-NCAM ekspresyon paternindeki değişikliktir. PSA-NCAM beyin gelişimi sırasında aksonal gelişme ve fasikülasyonda kritik rol oynar (232,233). Çalışmamızda yenidoğan (PNG-1) total beyin homojenatlarında her iki grupta da PSA-NCAM ekspresyonu oldukça



yüksekti. Ancak hcy grubundaki PSA-NCAM ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak daha düşüktü. Genç erişkin yavruların (PNG-82) total beyin homojenatlarında PSA-NCAM tespit edilemedi; erişkin yavruların (PNG-82) sadece hipokampus homojenatlarında PSA-NCAM ekspresyonu belirlenebildi. (Hcy ve kontrol grupları arasında fark yoktu). Erişkinde, PSA-NCAM ekspresyonu, sinaptik plastisitenin yoğun olarak devam ettiği hipokampus gibi bölgelerde devam etmektedir (315). Bulgularımız bununla uyumludur. Bulgularımız maternal hiperhomosisteinemi ile PNG-1'de total beyinde ve PNG-82'de hipokampusta PSA-NCAM ekspresyonu arasında bir ilişki olduğunu düşündürüyor.

NCAM'ın polisializasyonu, NCAM aracılı hücre-hücre etkileşimi ve fonksiyonunun gerçekleşmesinde kritik öneme sahiptir. Erken gelişim aşamasında yüksek düzeyde PSA-NCAM ekspresyonunun kolaylaştırıcı rolü olduğu düşünülmektedir; NCAM'ın oluşturduğu hücre adezyonunu azaltarak yapısal yeniden yapılanmaya (remodelling) izin verir, nöronal ve glial prekürsörlerin migrasyonu ve akson ilerlemesinde NCAM'ın hücre adezyonunu azaltarak kolaylaştırıcı rol oynar (222,229,316). Gelişen beyinde NCAM sializasyonunun azalması, aksonal büyümenin bozulmasına yol açabilir (316). Böylece hiperhomosisteinemi NCAM polisializasyonunda azalmaya yol açarak kalıcı nöroplastisite bozuklukları, dolayısıyla öğrenme ve hafıza bozuklukları oluşturabilir.

Hiperhomosisteinemide GFAP, S100B, NCAM, PSA-NCAM ekspresyonlarının değişmesi, homosisteinin gen düzeyindeki etkileriyle açıklanabilir. Rees ve arkadaşlarının (307) yaptığı bir çalışmada maternal diyetin

manüplasyonunun fetusta gen ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Henüz hcy için bu tür çalışmalar yapılmamıştır. Homosistein-gen etkileşimi konusundaki çalışmalar yararlı olabilir.

Hiperhomosisteineminin erişkin sıçanlarda kognitif performansı bozduğuna dair çalışmalar daha önce yayınlanmıştır (19,23,25) Ancak hiperhomosisteinematik gebe sıçan yavrularında kognitif fonksiyonların bozulduğuna dair, çalışmamızdan sonra yayınlanan, tek bir çalışmaya rastlandı (283). Çalışmamızda, hiperhomosisteinematik gebe sıçanların 82 günlük yavrularının Water maze testinde platformu bulma zamanları ve yüzme mesafeleri kontrole göre daha uzundu (uzaysal öğrenme). Probe testinde (uzaysal hafıza) Hcy grubu, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, kontrole göre daha kötü performans gösterdi.

Hiperhomosisteinemi ile bağlantılı olarak NCAM, PSA-NCAM, GFAP, S100B'de meydana gelen değişiklikler beyin maturasyonundaki ve sinaptik plastisitedeki bozuklukların hiperhomosisteinemi ile ilişkili kognitif bozuklukların oluşumunda rolü olduğu düşüncesini destekler niteliktedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Guilliams TG. Homocysteine - a risk factor for vascular diseases: Guidelines for the clinical practice. JANA 2004; 7:11-24.
2. Cooper AJ. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. Annu Rev Biochem 1983; 52:187-222. Review.
3. Kalikiri PC. Hyperhomocysteinaemia - a risk factor worth considering. JIACM 2003; 4:147-151.
4. Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 2000; 32:385-389.
5. Challem J. and Dolby V. Homocysteine: The Secret Killer. Keats Publishing: New Canaan, CT, 1997.
6. Miller AL, Kelly GS. Methionine and homocysteine metabolism and the nutritional prevention of certain birth defects and complications of pregnancy. Alt Med Rev 1996;1:220-235.
7. 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. 1279-1328.
8. 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; 37:175-178.
9. Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. Ageing Res Rev. 2002; 1:95-111. Review.
10. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 1996; 27:517-527.
11. Selhub J. Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr 1999; 19:217-246.

12. Fallest-Strobl PC, Koch DD, Stein JH, McBride PE. Homocysteine: a new risk factor for atherosclerosis. *Am Fam Physician* 1997; 56:1607-1610.
13. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:962-968.
14. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995; 345:149-151.
15. Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I. Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. *N Engl J Med* 1992; 326:69-70 (letter).
16. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Eskes TK. Hyperhomocysteinaemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. *Lancet* 1992; 339:1122-1123 (letter).
17. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993; 60:820-825.
18. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003; 26:137-146. Review.
19. Baydas G, Ozer M, Yasar A, Tuzcu M, Koz ST. Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. *Brain Res* 2005; 1046:187-194.
20. 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; 135:879-886.
21. Baydas G, Kutlu S, Naziroglu M, Canpolat S, Sandal S, Ozcan M, Kelestimur H. Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine. *J Pineal Res* 2003; 34:36-39.

22. Baydas G, Ozer M, Yasar A, Koz ST, Tuzcu M. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Biochem Moscow* 2006; 71:91-95.
23. Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav Brain Res* 2004;153:377-381.
24. Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 2003; 18:147-154.
25. Miller AL. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern Med Rev* 2003; 8:7-19.
26. Mineer SE, Evrovski J, Cole D. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism. An Update. *Clin Bioch* 1997; 30:189-201.
27. 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; 133:733–739.
28. MacCoss MJ, Fukagawa NK, Matthews DE. Measurement of intracellular amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:E947–955.
29. JM Scott. Folate-vitamin B12 interrelationships in the central nervous system. *Proc Nutr Soc* 1992: 219–224.
30. Chadwick LH, McCandless SE, Silverman GL, Schwartz S, Westaway D, Nadeau JH. Betaine-homocysteine methyltransferase-2: cDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes. *Genomics* 2000; 70:66-73.
31. McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM. Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin Sci (Lond)* 1991; 81:551-556.

32. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine, pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157(Suppl. 2):40–44
33. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1:228-237.
34. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: Interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992; 55:131-138.
35. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* 2006; 136(6 Suppl):1636-1640. Review.
36. Catoni GL. S-Adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 1953; 204:403–416.
37. Fontecave M, Atta M, Mulliez E. S-Adenosyl methionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* 2004; 29:243–249.
38. Clarke S, Banfield K. S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In: Carmel R, Jacobsen DW, (editors). *Homocysteine in health and disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001:63–78.
39. Aposhian HV. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:397–419.
40. Moat SJ, Lang D, Mcdowell IFW, Clarke ZL, Madhavan AK, Lewis MJ, Goodfellow J. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2004; 15:64-79.
41. Langman LJ, Cole DE. Homocysteine. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999; 36:365-406.
42. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B vitamins and coronary artery disease. *Med Clin North Am* 2000; 84:215-237.
43. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 2006; 580:2994-3005. Review.

44. Ichinohe A, Kanaumi T, Takashima S, Enokido Y, Nagai Y, Kimura H. Cystathionine beta-synthase is enriched in the brains of Down's patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:1547–1550.
45. Heinonen K. Studies on cystathionase activity in rat liver and brain during development. Effects of hormones and amino acids in vivo. *Biochem J* 1973; 136:1011–1015.
46. Griffiths R. and Tudball N. Observations on the fate of cystathionine in rat brain. *Life Sci* 1976; 19:1217–1224.
47. Awata S, Nakayama K, Suzuki I, Sugahara K, Kodama H. Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35:1331–1338.
48. Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman HE, Banerjee R. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem* 2006; 281:35785-35793.
49. Finkelstein JD. Regulation of homocysteine metabolism. In: Carmel R, Jacobsen DW (editors). *Homocysteine in health and disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001:92–99.
50. Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:1694-9. Review.
51. 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(8 Suppl):2377-2381.
52. Vitvitsky V, Moshasov E, Tritt M, Ataulakhanov F, Banerjee R. Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep* 2003; 8:57–63.
53. S. Taoka, S. Ohja, X. Shan, W.D. Kruger and R. Banerjee. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine  $\beta$ -synthase activity. *J Biol Chem* 1998; 273:25179–25184.

54. Banerjee R, Zou CG. Redox regulation and reaction mechanisms of human cystathionine beta-synthase: a PLP-dependent hemosensor protein. *Arch Biochem Biophys* 2005; 433:144–156.
55. Chen Z. and Banerjee R. Purification of soluble cytochrome b<sub>5</sub> as a component of the reductive activation of porcine methionine synthase. *J. Biol Chem* 1998; 273:26248-26255.
56. Mosharov E, Crawford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000; 39:13005–13011.
57. 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.
58. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39:1764-1779. Review.
59. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry*. 1998; 44:1833-1843.
60. Grieve A, Butcher SP, Griffiths R. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. *J Neurosci Res* 1992; 32:60–68.
61. Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Arning E, Winick NJ. Effects of intraventricular methotrexate on folate, adenosine, and homocysteine metabolism in cerebrospinal fluid. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26:386–388.
62. Surtees R, Bowron A, Leonard J. Cerebrospinal fluid and plasma total homocysteine and related metabolites in children with cystathionine beta-synthase deficiency: the effect of treatment. *Pediatr Res* 1997; 42:577–582.
63. Gharib A, Chabannes B, Sarda N, Pacheco H. In vivo elevation of mouse brain S-adenosyl-l-homocysteine after treatment with l-homocysteine. *J Neurochem* 1983; 40:1110–1112.



64. 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-*p*-chlorophenylglutamate. *Neurosci Lett* 1992; 147:175–178.
65. 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; 443:373–376.
66. 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.
67. Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, Dole VS, Loscalzo J, Handy DE, Wagner DD. Elevated levels of homocysteine compromise blood–brain barrier integrity in mice. *Blood* 2006; 107:591–593.
68. Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA. The identification of homocystine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; 9:493-496.
69. Carson NA, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; 37:505-513.
70. Refsum H, Ueland PM. Recent data are not in conflict with homocysteine as a cardiovascular risk factor. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9:533-539. Review.
71. 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; 92:2825-2830.
72. Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:614-620. Review.
73. Obeid R, Schorr H, Eckert R, Herrmann W. Vitamin B12 status in the elderly as judged by available biochemical markers. *Clin Chem* 2004; 50:238–241.
74. Perry DJ. Hyperhomocysteinaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12:451-477.

75. Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Cook HY. Total homocyst(e)ine in plasma and amniotic fluid of pregnant women. *Metabolism* 1986; 35:889-891.
76. Andersson A, Hultberg B, Brattström L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30:377-379.
77. Ueland PM, Vollset SE. Homocysteine and folate in pregnancy. *Clin Chem* 2004; 50:1293-1295.
78. Holmes VA. Changes in haemostasis during normal pregnancy: does homocysteine play a role in maintaining homeostasis?. *Proc Nutr Soc* 2003; 62:479-493.
79. Murphy MM, Scott JM, McPartlin JM, Fernandez-Ballart JD. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:614-619.
80. Ayar A, Celik H, Ozcelik O, Kelestimur H. Homocysteine-induced enhancement of spontaneous contractions of myometrium isolated from pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82:789-793.
81. Ingec M, Borekci B, Kadanali S. Elevated plasma homocysteine concentrations in severe preeclampsia and eclampsia. *Tohoku J Exp Med* 2005; 206:225-231.
82. Chai AU, Abrams J. Homocysteine: a new cardiac risk factor? *Clin Cardiol* 2001; 24:80-84.
83. Guilliams TG. Homocysteine - a risk factor for vascular diseases: Guidelines for the clinical practice. *JANA* 2004; 7:11-24.
84. Medina MA, Amores-Sanchez MI. Genetic basis of hyperhomocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000; 71:478-480.
85. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *The Lancet* 1999; 354:407-412.
86. Haworth JC, Dilling LA, Surtees RA, Seargeant LE, Lue-Shing H, Cooper BA, Rosenblatt DS. Symptomatic and asymptomatic methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in two adult brothers. *Am J Med Genet* 1993; 45:572-576.

87. Djurhuus R, Svardal AM, Ueland PM. Differential effects on growth, homocysteine, and related compounds of two inhibitors of *S*-adenosylhomocysteine catabolism, 3-deazaadenosine, and 3-deazaaristeromycin, in C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res* 1989; 49:324–330.
88. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37:1-31.
89. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem* 2001; 78:249–253.
90. Al-Gazali LI, Padmanabhan R, Melnyk S, Yi P, Pogribny IP, Pogribna M, et al. Abnormal folate metabolism and genetic polymorphism of the folate pathway in a child with Down syndrome and neural tube defect. *Am J Med Genet* 2001; 103:128–132.
91. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques P F, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346:476–483.
92. Takanaga H, Mackenzie B, Peng JB, Hediger MA. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2005; 337:892–900.
93. Watkins D, Rosenblatt DS. Functional methionine synthase deficiency (cb1E and cb1G), clinical and biochemical heterogeneity. *Am J Med Genet* 1989; 34:427–434.
94. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, Perkins LL, Go PCP, Alvarez JO, et al. Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B<sub>12</sub> concentrations and risk for early onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 1994; 59:940-948.
95. Rimm EB, Willet WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, et al. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998; 279:359-364.
96. Moretti R, Torre P, Antonello RM, Cattaruzza T, Cazzato G, Bava A. Vitamin B12 and folate depletion in cognition: A review. *Neurol India* 2004; 52: 310-318.

97. Dennis VW, Robinson K. Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1996; 50(Suppl 57):11-17.
98. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997; 52:10-20.
99. Berger PB, Jones JD, Olson LJ, Edwards BS, Frantz RP, Rodeheffer RJ, et al. Increase in total plasma homocysteine concentration after cardiac transplantation. *Mayo Clin Proc* 1995; 70:125-131.
100. Gupta A, Moustapha A, Jacobsen DW, Goormastic M, Tuzcu EM, Hobbs R, et al. Hyperhomocysteinemia and vascular complications in heart transplant recipients: relationships with folate and vitamin B6. *Transplantation* 1998; 65:544-550.
101. Hultberg B, Andersson A, Sterner G. Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol* 1993; 40:230-235.
102. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991; 51:828-835.
103. Baydas G, Gursu MF, Cikim G, Canpolat S, Yasar A, Canatan H, Kelestimur H. Effects of pinealectomy on the levels and the circadian rhythm of plasma homocysteine in rats. *J Pineal Res* 2002; 33:151-155.
104. Baydas G, Gursu MF, Cikim G, Canatan H. Homocysteine levels are increased due to lack of melatonin in pinealectomized rats: is there a link between melatonin and homocysteine? *J Pineal Res* 2002; 32:63-4.
105. Baydas G, Yilmaz O, Celik S, Yasar A, Gursu MF. Effects of certain micronutrients and melatonin on plasma lipid, lipid peroxidation, and homocysteine levels in rats. *Arch Med Res* 2002; 33:515-519.
106. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49:31-62.
107. E. Ronge and B. Kjellman. Long term treatment with betaine in methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Arch Dis Child* 1996; 74:239-241.

108. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-d-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:5923–5928.
109. Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. *Neurotoxicology* 1998; 19:599–603.
110. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000; 20:6920–6926.
111. Herrmann W, Quast S, Ullrich M, Schultze H, Bodis M, Geisel J. Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Atherosclerosis* 1999; 144:91–101.
112. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:636–643.
113. McCaddon A, Hudson P, Davies G, Hughes A, Williams JH, Wilkinson C. Homocysteine and cognitive decline in healthy elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001; 12:309–313.
114. Karaman Y. Alzheimer hastalığı, vasküler demans ve hafif kognitif etkilenmede plazma homosistein, vitamin B12 ve folat seviyeleri. *J Neurol Sci (Turk).* 2006; 23:175-184.
115. Yang Q, Botto LD, Erickson JD, Berry RJ, Sambell C, Johansen H, Friedman JM. Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation* 2006; 113:1335–1343.
116. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:495–501.

117. Walter JH, Wraith JE, White FJ, Bridge C, Till J. Strategies for the treatment of cystathionine beta-synthase deficiency, The experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30 years. *Eur J Pediatr* 1998; 157 (Suppl. 2.):71–76.
118. Algaidi SA, Christie LA, Jenkinson AM, Whalley L, Riedel G, Platt B. Long-term homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signalling and synaptic plasticity. *Exp Neurol* 2006; 197:8-21.
119. Streck EL, Delwing D, Tagliari B, Matte C, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Neurochem Int* 2003; 43:597–602.
120. Streck EL, Zugno AI, Tagliari B, Wannmacher C, Wajner M, Wyse AT. Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Metab. Brain Dis.* 2002; 17:83–91.
121. Kim JM, Lee H, Chang N. Hyperhomocysteinemia due to short-term folate deprivation is related to electron microscopic changes in the rat brain. *J Nutr* 2002; 132:3418-3421.
122. Shea TB, Rogers E, Ashline D, Ortiz D, Sheu MS. Apolipoprotein E deficiency promotes increased oxidative stress and compensatory increases in antioxidants in brain tissue. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:1115–1120.
123. Vitvitsky V, Dayal S, Stabler S, Zhou Y, Wang H, Lentz SR, Banerjee R. Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287:39–46.
124. Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2005; 29:1140–1151.
125. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda N. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:1585–1589.
126. Troen AM, Shukitt-Hale B, Chao WH, Albuquerque B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg J. The cognitive impact of nutritional homocysteinemia in apolipoprotein-E deficient mice. *J Alzheimers Dis* 2006; 9:381-92.

127. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47–95. Review.
128. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect* 1998; 106 (Suppl 5):1229-1234. Review.
129. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84. Review.
130. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 1993; 49:481-493.
131. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160:1–40.
132. Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayıroğlu F. Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücrel Antioksidan Savunma YYÜ Sağ Bil Derg 1995; 2:137-142.
133. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:9748-9752.
134. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid Research* 1998; 39:1529-1542.
135. Fink SP, Reddy GR, Marnett LJ. Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8652–8657.
136. Mao H, Schnetz-Boutaud NC, Weisenseel JP, Marnett LJ, Stone MP. Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6615–6620.
137. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde, *Mut Res-Fund Mol Mech Mutagen* 1999; 424:83–95.

138. Wang MY, Dhingra K, Hittelman WN, Liehr JG, deAndrade M, Li DH. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde–DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1996; 5:705–710.
139. Iles KE, Liu RM. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:547-556. Review.
140. Hermenegildo C, Raya A, Romá J, Romero FJ. Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem Res* 1993; 18:893–896.
141. Bosch-Morell F, Martínez-Soriano F, Colell A, Fernández-Checa JC, Romero FJ. Chronic ethanol feeding induces cellular antioxidants decrease and oxidative stress in rat peripheral nerves. Effect of S-adenosyl-L-methionine and N-acetyl-L-cysteine. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:365–368.
142. Martínez-Blasco A, Bosch-Morell F, Trenor C, Romero FJ. Experimental diabetic neuropathy: role of oxidative stress and mechanisms involved. *Biofactors* 1998; 8:41–43.
143. Low PA, Nickander KK. Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes* 1991; 40:873–877.
144. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, Low PA. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995; 18:1160–1167.
145. Jensson H, Guthenberg C, Alin P, Mannervik B. Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals. *FEBS Lett* 1986; 203:207–209.
146. Danielson UH, Esterbauer H, Mannervik B. Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. *Biochem J* 198; 247:707–713.
147. Dickinson DA, Iles KE, Watanabe N, Iwamoto T, Zhang H, Krzywanski DM, Forman HJ. 4-hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:974.



148. Liu RM, Gao L, Choi J, Forman HJ. gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 1):861-869.
149. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134:489-492. Review.
150. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16:577-586.
151. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; 104:6255-6285.
152. Griffith, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:922-935.
153. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai JY, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:625-635.
154. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.* 2002; 348:93-112.
155. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul* 2000; 36:95-116.
156. Shen D, Dalton TP, Nebert DW, Shertzer HG. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *J Biol Chem* 2005; 280:25305-25312.
157. Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291:1-7. Review.
158. Busciglio J and Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 1995; 378:776-779.
159. Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, and Markesbery WR. Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18:457-461.

160. Praticò D, Lee VMY, Trojanowski JQ, Rokach J, and Fitzgerald GA. Increased F<sub>2</sub>-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J* 1998; 12:1777-1783.
161. Sayre LM, Zelasko DA, Harris PLR, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1997; 68:2092-2097.
162. Behl C, Davis JB, Lesley R, and Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 1994; 77:817-827.
163. Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, Hesse L, Beher D, Masters CL, and Beyreuther K. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 1997; 54:533-539.
164. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn SOD gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362:59-62.
165. Tu P, Gurney ME, Julien JP, Lee VMY, Trojanowski JQ. Oxidative stress, mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease. *Lab Invest* 1997; 76:441-456.
166. Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH Jr, and Cleveland DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:13901-13906.
167. James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, Neubrandner JA. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1611-1617
168. Huang RF, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 2001; 131:33-88.
169. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1997; 272:17012-17017.

170. Henning SM Swendseid ME, Ivandic BT, Liao F. Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free Radic Biol Med* 1997; 23:936–942.
171. Reis EA, Zugno AI, Franzon R, Tagliari B, Matte C, Lammers ML, Netto CA, Wyse AT. Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. *Metab Brain Dis* 2002; 17:211–217.
172. Wyse AT, Zugno AI, Streck EL, Matte C, Calcagnotto T, Wannmacher CM, Wajner M. Inhibition of Na(+), K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 2002; 27:1685–1689.
173. Zou CG and Banerjee R. Homocysteine and redox signaling, *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:547–559.
174. Maclean KN, Janosik M, Kraus E, Kozich V, Allen RH, Raab BK, Kraus JP. Cystathionine beta-synthase is coordinately regulated with proliferation through a redox-sensitive mechanism in cultured human cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Physiol* 2002; 192:81–92.
175. Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG. Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids* 2003; 25:409–417.
176. Weiss N, Heydrick SJ, Postea O, Keller C, Keaney Jr JF, Loscalzo J. Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state—impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1455–1461.
177. Villalobos MA, De La Cruz JP, Cuerda MA, Ortiz P, Smith-Agreda JM, Sanchez DLC. Effect of S-adenosyl-l-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia–reperfusion. *Brain Res* 2000; 883:31–40.
178. Matsui Y, Kubo Y, Iwata N. S-adenosyl-l-methionine prevents ischemic neuronal death. *Eur J Pharmacol* 1987; 144:211–216.

179. De La Cruz JP, Pavia J, Gonzalez-Correa JA, Ortiz P, Sanchez De La CF. Effects of chronic administration of S-adenosyl-L-methionine on brain oxidative stress in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 361:47-52.
180. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-245.
181. Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997; 21:88-101
182. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 1995; 6:3-16.
183. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995; 146:3-15.
184. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 1993; 14:133-144.
185. Ameisen JS. The origin of programmed cell death. *Science* 1996; 272:1278.
186. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.
187. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin* 1998; 18:482-491.
188. Kane AB. Redefining cell death. *Am J Pathol* 1995; 146:1-2.
189. Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995; 146:16-9.
190. Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 2000; 25:1859-1866.
191. Choi WS, Lee EH, Chung CW. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *J Neurochem* 2001; 77:1531-1541.
192. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:68-75.
193. Nakano R. Apoptosis: Gene directed cell death. *Horm Res* 1997; 48:2-4.

194. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5:97-104.
195. Culmsee C, Mattson MP. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331:761-77. Review.
196. Sherr CJ and McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2:103–112.
197. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25:177–181.
198. Joers A, Jaks V, Kase J, Toivo M. p53-dependent transcription can exhibit both on/off and graded response after genotoxic stress. *Oncogene* 2004; 23:6175–6185.
199. Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Guo W, Garden GA. p53-dependent cell death signaling in neurons, *Neurochem Res* 2003; 28:15–27.
200. Lee AF, Ho DK, Zanassi P, Walsh GS, Kaplan DR, Miller FD. Evidence that DeltaNp73 promotes neuronal survival by p53-dependent and p53-independent mechanisms. *J Neurosci* 2004; 24:9174–9184.
201. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res* 2002; 70:694–702.
202. Rao AM, Baskaya MK, Maley ME, Kindy MS, Dempsey RJ. Beneficial effects of S-adenosyl-l-methionine on blood–brain barrier breakdown and neuronal survival after transient cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 44:134–138.
203. Wainfan E and Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992; 52:2071–2077.
204. Pogribny IP, Basnakian AG, Miller BJ, Lopatina NG, Poirier LA, James SJ. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. *Cancer Res* 1995; 55:1894–1901.
205. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons

and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002; 22:1752–1762.

206. Huang HY, Appel LJ, Croft KD, Miller ER 3rd, Mori TA, Puddey IB. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:549–555.
207. Schuman EM, Murase S. Cadherins and synaptic plasticity: activity dependent cyclin-dependent kinase 5 regulation of synaptic beta-catenin-cadherin interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358:749-756.
208. Nudo RJ. Plasticity. *NeuroRx* 2006; 3:420-427. Review.
209. Murray BA, Hemperly JJ, Prediger EA, Edelman GM, Cunningham BA. Alternatively spliced mRNAs code for different polypeptide chains of the chicken neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J Cell Biol* 1986; 102:189-193.
210. Rønn LC, Hartz BP, Bock E. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp Gerontol* 1998; 33:853-864. Review.
211. Walmod PS, Kolkova K, Berezin V, Bock E. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res* 2004; 29:2015–2035.
212. Schachner M. Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:627-634. Review.
213. Chuong CM, Edelman GM. Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system. *J Neurosci* 1984; 4:2354-2368.
214. Nagata I, Schachner M. Conversion of embryonic to adult form of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) does not correlate with pre- and postmigratory states of mouse cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 1986; 63:153-158.
215. Schuster T, Krug M, Hassan H, Schachner M. Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation. *J Neurobiol* 1998; 37:359-372.

216. Dityatev A, Dityateva G, Schachner M. Synaptic strength as a function of post-versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron* 2000; 26:207-217.
217. Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev* 2007; 56:101-118. Review.
218. Yamagata M, Sanes JR, Weiner JA. Synaptic adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:621-632. Review.
219. Doherty P, Walsh FS. Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Current Opinion in Neurobiology* 1994; 4:49-55.
220. Frei T, von Bohlen und Halbach F, Wille W, Schachner M. Different extracellular domains of the neural cell adhesion molecule (NCAM) are involved in different functions. *Journal of Cell Biology* 1992; 118:177-194.
221. Kiss JZ. A role of adhesion molecules in neuroglial plasticity. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 140:89-94. Review.
222. Welzl H, Stork O. Cell adhesion molecules: key players in memory consolidation? *News Physiol Sci* 2003; 18:147-150. Review.
223. Benson DL, Schnapp LM, Shapiro L, Huntley GW. Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol* 2000; 10:473-82. Review.
224. Lüthi A, Laurent SP, Figurov A, Müller D, Schachner M. Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 1994; 372:777-779.
225. Müller G, Wang C, Skibo G, Toni N, Cremer H, Calaora V, et al. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 1996; 17:413-422.
226. Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 1994; 367:455-459.

227. Baydas G, Nedzvetskii VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Yoldas T. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life Sci* 2003; 73:1907-1916.
228. Sadoul R, Hirn M, Deagostini-Barin H, Rougon G, Goridis C. Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature* 1983; 304:347-349.
229. Rutishauser U, Acheson A, Hall AK, Mann D, Sunshine J. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 1988; 240:53-57.
230. Seki T and Arai Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 1993; 17:265-290.
231. Theodosis DT, Rougon G, Poulain DA. Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: embryonic NCAM in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1991; 88:5494-5498.
232. Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A. NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 1997; 8:323-335.
233. Cremer H, Chazal G, Carleton A, Goridis C, Vincent JD, Lledo PM. Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc Natl Sci USA* 1998; 95:13242-13247.
234. Yoshida K, Rutishauser U, Crandall JE, Schwarting GA. Polysialic acid facilitates migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons on vomeronasal axons. *J Neurosci* 1999; 19:794-801.
235. Mattson MP. Apoptotic and anti-apoptotic synaptic signaling mechanisms. *Brain Pathol* 2000; 10:300-312.
236. Christie LA, Riedel G, Algaidi SA, Whalley LJ, Platt B. Enhanced hippocampal long-term potentiation in rats after chronic exposure to homocysteine. *Neurosci Lett* 2005; 373:119-24.
237. Eto K, Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *J Neurosci* 2002; 22:3386-3391.



238. Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 2003; 140:1-47. Review.
239. Hutchins JBand Casagrande V.A. Vimentin: changes in distribution during brain development. *Glia* 1989; 2:55-56.
240. McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, et al. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6361-6366.
241. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 2000; 25:1439-1451. Review.
242. Baydas G, Reiter RJ, Yasar A, Tuzcu M, Akdemir I, Nedzvetskii VS. Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 2003 ;35:797-804.
243. Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:619-631.
244. Yang Q, Hamberger A, Wang S, Haglid KG. Appearance of neuronal S-100 beta during development of the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; 91:181-189.
245. Quinlan RA, Brenner M, Goldman JE, Messing A. GFAP and its role in Alexander disease. *Exp Cell Res* 2007; 313:2077-2087. Review.
246. Bloomfield SM, McKinney J, Smith L, Brisman J. Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury. *Neurocrit Care* 2007; 6:121-138. Review.
247. Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 2003; 60:614-632. Review.
248. Baydas G, Nedzvetskii VS, Tuzcu M, Yasar A, Kirichenko SV. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 2003; 462:67-71.
249. Schmidt S. S100B: pathogenetic and pathophysiologic significance in neurology *Nervenarzt*. 1998; 69:639-646. Review.

250. Görgülü A, Kırış T. Eksitator aminoasitler ve eksitotoksisite. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2005; 15:33-38.
251. Remy S, Spruston N. Dendritic spikes induce single-burst long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:17192-17197.
252. Waxman EA, Lynch DR. N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* 2005; 11:37-49.
253. Said SI, Pakbaz H, Berisha HI, Raza S. NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Radic Biol Med* 2000 ; 28:1300-1302.
254. Nicholls DG, Budd SL, Castilho RF, Ward MW. Glutamate excitotoxicity and neuronal energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893:1-912.
255. Flott-Rahmel B, Schürmann M, Schluff P, Fingerhut R, Musshoff U, Fowler B, Ullrich K. Homocysteic and homocysteine sulphinic acid exhibit excitotoxicity in organotypic cultures from rat brain. *Eur J Pediatr* 1998; 157:112–117.
256. Olney JW, Price MT, Salles KS, Labruyere J, Ryerson R, Mahan K, et al. l-homocysteic acid: an endogenous excitotoxic ligand of the NMDA receptor. *Brain Res Bull* 1987; 19:597–602.
257. Zhang D and Lipton SA. l-homocysteic acid selectively activates N-methyl-d-aspartate receptors of rat retinal ganglion cells. *Neurosci Lett* 1992, 139:173–177.
258. Cuenod M, Do KQ, Streit P. Homocysteic acid as an endogenous excitatory amino acid. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11:477–478.
259. Robert K, Pages C, Ledru A, Delabar J, Caboche J, Janel N. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by homocysteine in hippocampus. *Neuroscience* 2005; 133:925–935.
260. Zieminska E, Stafiej A, Lazarewicz JW. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochem Int* 2003; 43:481–492.

261. Jiang Y, Sun T, Xiong J, Cao J, Li G, Wang S. Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; 39:657-67.
262. Scarpa S, Fusco A, D'Anselmi F, Cavallaro RA. Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? *FEBS Lett* 2003; 541:145-148.
263. Fusco A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci* 2005; 28:195-204.
264. Leulliot N, Quevillon-Cheruel S, Sorel I, de La Sierra-Gallay IL, Collinet B, Graille M, et al. Structure of protein phosphatase methyltransferase 1 (PPM1), a leucine carboxyl methyltransferase involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 2004; 279:8351-8358.
265. Rees WD, Hay SM, Brown DS, Antipatis C, Palmer RM. Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses. *J Nutr* 2000; 130:1821-1826.
266. Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, et al. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 2002; 277:12915-12920.
267. Hasegawa T, Ukai W, Jo DG, Xu X, Mattson MP, Nakagawa M, et al. Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic Abeta42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease *J Neurosci Res* 2005; 80:869-876.
268. Vafai SB and Stock JB. Protein phosphatase 2A methylation: a link between elevated plasma homocysteine and Alzheimer's Disease. *FEBS Lett* 2002; 518:1-4.
269. Tolstykh T, Lee J, Vafai S, Stock JB. Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *EMBO J* 2000; 19:5682-5691.

270. Keil U, Bonert A, Marques CA, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, Muller WE, Eckert A. Elevated nitric oxide production mediates beta-amyloid-induced mitochondria failure. *Pol J Pharmacol* 2004; 56:631–634.
271. Dayal S, Lentz SR. ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2005; 10 (Suppl 1):27-33.
272. Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006; 136 (6 Suppl):1741-1749.
273. Kılıççı Ç. Erken Gebelik Kayıplarında Homosistein Düzeyinin Rolü. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, 2004.
274. Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy--review of our present understanding and therapeutic implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 93:157-165. Review.
275. Molloy AM, Mills JL, McPartlin J, Kirke PN, Scott JM, Daly S. Maternal and fetal plasma homocysteine concentrations at birth: the influence of folate, vitamin B12, and the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T variant. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:499-503.
276. Guerr-Shinohar EM, Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. *Br J Obstet Gynaecol* 2002; 109:784–791.
277. Murphy MM, Scott JM, Arija V, Molloy AM, Fernandez-Ballart JD. Fetal homocysteine and birth weight are affected by maternal homocysteine before conception and throughout pregnancy. *Clin Chem* 2004; 50:1406-1412.
278. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976; 51:944–950.
279. van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226:243-270.

280. Hall CA. Function of vitamin B12 in the central nervous system as revealed by congenital defects. *Am J Hematol* 1990; 34:121–127.
281. Lövblad K, Ramelli G, Remonda L, Nirkko AC, Ozdoba C, Schroth G. Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. *Pediatr Radiol* 1997; 27:155–158.
282. Zhao Q, Behringer RR, de Crombrughe B. Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the *Cart1* homeobox gene. *Nat Genet* 1996;13:275–283.
283. MRC. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338:131-137.
284. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327:1832-1835.
285. Daly S, Cotter A, Molloy AE, Scott J. Homocysteine and folic acid: implications for pregnancy. *Semin Vasc Med* 2005; 5:190–200.
286. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17:459-469. Review.
287. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. *Placenta* 1999; 20:519-529.
288. Maloney CA, Hay SM, Rees WD. Folate deficiency during pregnancy impacts on methyl metabolism without affecting global DNA methylation in the rat fetus. *Br J Nutr* 2007; 97:1090-1098.
289. Vanaerts LA, Blom HJ, Deabreu RA, Trijbels FJ, Eskes TK, Copius Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology* 1994; 50:348-360.
290. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:15227-15232.

291. Afman LA, Blom HJ, Drittij MJ, Brouns MR., van Straaten HW. Inhibition of transmethylation disturbs neurulation in chick embryos. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 158:59–65.
292. Rees WD, Hay SM, Cruickshank M. An imbalance in the methionine content of the maternal diet reduces postnatal growth in the rat. *Metabolism* 2006; 55:763-770.
293. Petrie L, Duthie SJ, Rees WD, McConnell JM. Serum concentrations of homocysteine are elevated during early pregnancy in rodent models of fetal programming. *Br J Nutr* 2002; 88:471–477.
294. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005; 135:1382–1386.
295. Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Guéant JL, Daval JL. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 2007; 170:667-679.
296. Bagi Z, Cseko C, Toth E, Koller A. Oxidative stress-induced dysregulation of arteriolar wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 2003; 285:2277–2283.
297. Baydas G, Nedzvetsky VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Demchenko HM, Reiter RJ. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex. *Neurosci Lett* 2002; 326:109-112.
298. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62(4A):609-614.
299. Wang JY, Shum AY, Ho YJ, Wang JY. Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons synergistic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *J Neurosci Res* 2003; 72:508–519.

300. Deng WG, Fu Y, Li YL, Sugiyama T. Potential role of p53 mutation in chemical hepatocarcinogenesis of rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10:46–52.
301. Baydas G, Ozveren F, Tuzcu M, Yasar A. Effects of thinner exposure on the expression pattern of neural cell adhesion molecules, level of lipid peroxidation in the brain and cognitive function in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 512:181–187.
302. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.
303. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 1981; 112:195-203.
304. Harlow E, Lane D. *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988: 471-504.
305. McAuley DF, Hanratty CG, McGurk C, Nugent AG, JohnstonGD. Effect of methionine supplementation on endothelial function, plasma homocysteine, and lipid peroxidation. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999; 37:435–440.
306. Bohles H, Arndt S, Ohlenschlager U, Beeg T, Gebhardt B, Sewell AC. Maternal plasma homocysteine, placenta status and docosahexaenoic acid concentration in erythrocyte phospholipids of the newborn. *Eur J Pediatr* 1999; 158:243–246.
307. Rees WD, Wilson FA, Maloney CA. Sulfur amino acid metabolism in pregnancy: the impact of methionine in the maternal diet. *J Nutr* 2006; 136:1701–1705.
308. Crawford DR, Wang Y, Schools GP, Kochheiser J, Davies KJ. Down-regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1997; 22:551–559.
309. Shay JW, Werbin H. Are mitochondrial DNA mutations involved in the carcinogenic process? *Mutat Res* 1987; 186:149–160.

310. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Anti-oxidant enzymes in fetal guinea pig brain during development and the effect of maternal hypoxia. *Dev Brain Res* 1988; 42:173–179.
311. Mover H, Ar A. Antioxidant enzymatic activity in embryos and placenta of rats chronically exposed to hypoxia and hyperoxia. *Comp Biochem Physiol* 1997; 117:151–157.
312. Shabnam MS, Srinivasan R, Wali A, Majumdar S, Joshi K, Behera D. Expression of p53 protein and the apoptotic regulatory molecules Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, and Bax in locally advanced squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2004; 45:181-188.
313. Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, cochrane CG. Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest* 1988; 82:1040–1050.
314. Lu X, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 1993; 75:765–778.
315. Hoffman KB, Murray BA, Lynch G, Munirathinam S, Bahr BA. Delayed and isoform-specific effect of NMDA exposure on neural cell adhesion molecules in hippocampus. *Neurosci Res* 2001; 39:167–173.
316. Minana R, Climent E, Baretino D, Segui JM, Renau-Piqueras J, Guerri C. Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. *J Neurochem* 2000; 75:954–964.



## **8. ÖZGEÇMİŞ**

1970 yılında Tarsus'ta doğdum. 1996 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. 1997- 2004 yılları arasında Sağlık Bakanlığı'na bağlı çeşitli kurumlarda hekim olarak çalıştım. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında 2004 yılında başladığım uzmanlık eğitimimi halen sürdürmekteyim.