

**T. C.**

**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN HİPERHOMOSİSTEİNEMİNİN  
FARKLI BEYİN BÖLGELERİNDEKİ NÖRONAL VE GLİAL  
MARKIRLARA ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mehmet ÖZER**

**ELAZIĞ-2005**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ \_\_\_\_\_

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ \_\_\_\_\_

Doç. Dr. Ahmet AYAR \_\_\_\_\_

Doç. Dr. Tahir YOLDAŞ \_\_\_\_\_

Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU \_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan, Tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ'a ve Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim elemanlarına ve katkılarından dolayı Biyoloji Bölümü Öğretim elemanı Dr. Mehmet TUZCU'ya teşekkürü borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

1	ÖZET.....	1
2	ABSTRACT .....	3
3	GİRİŞ.....	5
3.1	Homosistein.....	5
3.2	Homosistein metabolizması .....	6
3.2.1	Remetilasyon .....	7
3.2.2	Transsülfürasyon .....	7
3.2.3	Regülasyonu .....	11
3.3	Plazma homosisteini .....	11
3.4	Homosistein düzeyleri ve ölçümü .....	11
3.5	Hiperhomosisteinemi ve nedenleri .....	13
3.5.1	Edinsel nedenler .....	14
3.5.1.1	Folik asit eksikliği ve metabolizması .....	14
3.5.2	Genetik nedenler .....	16
3.5.3	Kronik hastalıklar .....	17
3.5.4	Fizyolojik nedenler .....	18
3.5.5	Hiperhomosisteinemide ilaçların etkisi.....	18
3.6	Hiperhomosisteinemi ve mekanizması .....	19
3.7	Hiperhomosisteineminin tedavisi.....	21
3.8	Melatonin sentezi ve salgılanması .....	22
3.8.1	Melatoninin etkileri.....	23

3.9	S100 Proteini.....	24
3.9.1	S100B .....	26
3.10	Nöron spesifik enolaz.....	26
3.11	Glial fibriler asidik protein.....	31
4	GEREÇ VE YÖNTEM .....	32
4.1	Deneyisel uygulamalar .....	32
4.2	Doku ve plazmada lipid peroksidasyon tayini .....	33
4.3	Doku ve plazmada glutasyon peroksidaz (GSH-Px) tayini .....	34
4.4	Plazma homosistein düzeyinin tayini.....	34
4.5.	ELİSA (Enzyme linked –immunosorbentn assay).....	34
4.6	Western blot.....	34
4.7	İstatistik .....	35
5	BULGULAR .....	36
6	TARTIŞMA .....	40
7.	KAYNAKLAR .....	42
8	ÖZ GEÇMİŞ .....	56

## TABLO LİSTESİ

**Tablo 3.1.** Total plazma homosistein komponentler ve yüzdeleri.

**Tablo 3.2.** S100 Proteinlerinin hastalıklarla ilişkisi.

**Tablo 3.3.** Santral sinir sisteminde bulunan izoenzimlerin özellikleri.

**Tablo 3.4.** NSE ve NNE'in fonksiyonel özelliklerinin karşılaştırılması.

**Tablo 3.5.** NSE ve NNE nin beyin dokusundaki dağılımı.

**Tablo 5.1.** Farklı beyin bölgelerindeki LPO ,GSH-Px ve serum homosistein düzeyleri.

## ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 3.1.** Metiyonin metabolizmasının kükürtlü aminoasitleri.

**Şekil 3.2.** Total plazma homosistein komponentleri.

**Şekil .3.3.** Homosistein formları.

**Şekil 5.1.** Farklı beyin bölgelerindeki GFAP düzeyleri.

**Şekil 5.2.** Farklı beyin bölgelerindeki S100B düzeyleri.

**Şekil 5.3.** Farklı beyin bölgelerindeki NSE düzeyleri.

## KISALTIMA LİSTESİ

<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>IG</b>	: İmmünoglobulin
<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>MSS</b>	: Merkezi sinir sistemi
<b>LPO</b>	: Lipid Peroksidasyonu
<b>GFAP</b>	: Glial Fibriler Asidik Protein
<b>NSE</b>	: Nöron Spesifik Enolaz
<b>NNE</b>	: Non Noronal Enolaz
<b>KAH</b>	: Koroner Arter Hastalığı
<b>MS</b>	: Metiyonin Sentaz
<b>BHMT</b>	: Betain-homosisteinmetiltransferaz
<b>MTHFR</b>	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
<b>SAH</b>	: S-Adenozil homosistein
<b>SAM</b>	: S-Adenozil Metiyonin
<b>FAD</b>	: Flavinadenin dinükleotid



**LDL** : Düşük Dansiteli Lipoprotein (Low Density Lipoprotein)

**BOS** : Beyin Omurilik Sıvısı

**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate Poliy Acrylamide Gel  
Electrophoresis

**CBS** : Sistatyonin  $\beta$ -sentaz

**CYS** :  $\gamma$ -sistatyonaz

**MS** : Metiyonin sentaz

**NAT** : N-asetil transferaz

**HIOMT** : İndol-O-metiltransferaz

**APUD** : Amin precursor uptake and decarboxylation

**SOD** : Süperoksit dismutaz

T.C  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİMDALI

SIÇANLARDA OLUŞTURULAR HİPERHOMOSİSTEİNEMİNİN FARKLI BEYİN  
BÖLGELERİNDEKİ NÖRONAL VE GLİAL MARKIRLARA ETKESİ

Mehmet ÖZER

**Danışman**

Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ

**ÖZET**

Homosistein; esansiyel amino asit olan methioninin metabolizması esnasında oluşan sülfür içeren bir amino asittir. Homosisteinin en önemli etkilerinden birinin oksidan stresi provoke ederek hatta antioksidan savunmayı azaltarak gerçekleştirdiği savunulmaktadır. Homosisteinin uygulanması beyin dokusunda serbest radikal oluşumunu hızlandırarak lipid peroksidasyonuna neden olduğu saptanmıştır. Beyin disfonksiyonu ve hiperhomosisteinemi arasındaki nedensel bağlantı konusunda bilgiler azdır. Total plazma homosistein seviyesinin metabolizmadaki kofaktörlerin doku seviyesinde eksiklikleri yansıtmada hem de yaşlılardaki bilişsel performansı değerlendirmede tutarlı bir gösterge olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Hiperhomosisteinemi eksikliği durumunda nöral kök hücre proliferasyonunda bozulma, sitozolik kalsiyum artışı, DNA sentezinde bozulma yoluyla apoptozisi indüklemeye, glutamat reseptörlerinin aşırı stimülasyonu yoluyla nörotoksosite, sinaptik disfonksiyon, nöronal enerji metabolizmasında bozulmaya neden olduğunu gösteren bazı çalışmalar vardır. Bu çalışma; sıçanlarda hiperhomosisteinemi oluşturarak hipokampus ve kortekste nöronal

marker olan nöron spesifik enolaz (NSE), glial markerlar olan glial fibriler asedik protein (GFAP) ve S100B'nin western blot yöntemi kullanılarak homosisteinin yüksek konsantrasyonlarda nöronal toksisiteyi nasıl etkilediği gösterilmiştir. Nöral plastisite ve bilişsel fonksiyonlara etkisini, ayrıca kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olan homosisteinin lipid peroksidasyonu (LPO) ve glutatyon (GSH) düzeylerinde meydana gelen değişiklikleri ve bu değişiklikleri önlemede melatoninin etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla kontrol, homosistein, melatonin uygulanmış homosistein grubu ratların hipokampus ve korteksinde S100B, GFAP ve NSE miktarları ölçülmüştür. Gruplar arasındaki farklılıklar çift yönlü varyans analizi kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar homosistein grubunun hipokampus ve korteksinde kontrole göre GFAP yüksek bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Melatonin uygulaması GFAP seviyesinin yükselmesini engellemiştir ( $P<0.05$ ). Homosistein uygulaması ile kortekste S100B protein seviyesinde kontrol grubuna göre belirgin yüksek olduğu gözlenmiştir ( $P<0.01$ ). Buna karşılık hipokampusta S100B protein seviyesinde belirgin bir artış gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Melatonin uygulaması belirgin olarak hiperhomosisteinemi sonucu uyarılan S100B artışını engellemiştir ( $P<0.01$ ).

Kontrol, homosistein ve homosistein+melatonin gruplarındaki NSE miktarlarında önemli bir değişiklik görülmemiştir.

Sonuç olarak bu çalışmamızda artan glial markırların LPO miktarı ile orantılı olduğu, glial reaktivitenin homosistein uygulanmasıyla meydana gelen oksidan stres ile ilişkili olabileceği tesbit edilmiştir. Homosisteinin LPO'yu artırdığı plazma ve dokulardaki anti oksidan enzim düzeylerini azaltıcı yönde bir etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Homosistein, hipokampus, korteks, S100B, GFAP, NSE, melatonin

T.C  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİMDALI

**THE EFFECT OF HYPERHOMOCYSTEINEMIO ON NOROAL AND GLIAL  
MARKERS IN RAT BRAIN**

Mehmet ÖZER

**Danışman**

Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ

**ABSTRACT**

Homocysteine; is an amino acid with a sulphure-containing methionin. One of the major effects of homocystein is to provacate the oksidan stres and reduce deffence of the body. Research showed that injection of homocystein induces the free radicals production in brain tissue and leads to lipid peroxidation. There are few information about the relation between the brain disfonction and hyperhomocysteinemia. Reseaches mentioned that total plasma homocystein level is a suitable symptom to show the decrease of cofactor level in tissues and to eveluate the cognitive performance of old people. Increases in homocysteine levels leads to inhibition of neuronal cell proliferation, increase in Ca concentrstion induce apoptosis by pragmestation of DNA . Furthermore, homocystein causes neurotoxicity by over stimulation of glutamat receptors, snaptic dysfunction and inhibits neuronal energy metabolism.

The aim of this investigale was to study the effects of high level of homocysteine on neuronal toxicity, neuronal plasticity and cognitive performans glial marker S100B and GFAP in hyppocampus and cortex by using western blot on the levels of methods.İn addition

effects of homocystein on the level of lipid peroxidation (LOP) and Glutation (GSH) . Protective effects of melatonin against hyperhomocysteinemia were studied as well.

For this purpose the level of S100B, GFAP, MDA and GSH measured in hippocampus and cortex of control group, homocystein and melatonin given rats. The differences between groups were measured by using ANOVA. For Post-Hoc estimation t-test of Bonferroni's test was used. P value was accepted as  $<0.05$  and the lower value from  $<0.005$  was accepted as significant.

There was, a significant increase in GFAP contents of hippocampus and cortex of homocystein group comparing with control ( $P<0.001$ ). Administration of melatonin prevented the increase in the levels of GFAP level ( $P<0.05$ ). A significant increase in S100B level in cortex of homocystein groups was found comparing with control group ( $P<0.001$ ). But there was no significant increase in S100B protein level in hippocampus of homocystein found ( $P>0.05$ ). Administration of melatonin prevented the increase in the levels of S100B ( $P<0.01$ ) induced by hypohomocysteinemia.

There was no difference between NSE levels in control, to and homocystein+to groups.

During this study we found that glial markers increase with LPO increasing of level. Glial reactivity occurs due to oxidant stress because of homocystein exposure. Homocystein increase LPO level and decrease antioxidant enzyme levels in tissues and plasma. However, melatonin decrease LPO level and increase antioxidant enzyme levels in tissues and plasma.

**Key Words:** Homocystein, hippocampus, cortex, S100B, GFAP, NSE, melatonin

### 3. GİRİŞ

#### 3.1. Homosistein

Homosistein, metiyonin metabolizması sırasında ortaya çıkan sülfürlü bir aminoasittir. İlk kez 1932 yılında tanımlanmıştır (26). Homosistein sülfür içeren bir aminoasit olmakla birlikte, bütün proteinlerin yapısal bileşenler olarak görev yapan yirmi aminoasit arasında yer almayan diğer aminoasitlerin aksine diyetle birlikte alınan metiyoninin metabolizması sonucu oluşan bir metabolik ara üründür (28).

Normal diyetle alınmayıp, metiyonin metabolizması sırasında bir ara ürün oluşmaktadır. Homosisteinin metabolize olmasında başlıca transsülfürasyon ve remetilasyon olmak üzere iki yol vardır. Her iki metabolik yol da çeşitli vitaminler ile aktive edilmektedir (48). Metiyonin metabolizması sırasında oluşan sülfür içeren bir aminoasittir. Enzim eksikliğinde kanda ve idrarda hem metiyonin hemde homosistein düzeyleri artarak kardiyovasküler risk oluşturur. Homosisteinürili hastalarda mortalitesi yüksek tromboembolik komplikasyonlar ve hipoglisemi sık görülmektedir (15).

Metiyonin metabolizması sırasında bir ara ürün olarak oluşan homosistein plazmada % 70-80'i albumine bağlı diğer kısmı ise serbest halde bulunmaktadır(142). Serbest halde bulunan kısmı stabil değildir, hemen homosistein ve sistein- homosisteine dönüşmektedir(126).

Homosistein günümüzde kardiyovasküler serebrovasküler ve periferik vasküler hastalıklar için doza bağımlı bir tarzda etkili olan diğer risk faktörlerinden bağımsız majör bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (34). 1995 yılında Boushey ve arkadaşları 27 prospektif ve retrospektif çalışmanın meta analizini yayınlamışlar ve koroner arter hastalığı (KAH) ile hiperhomosisteinemi arasında güçlü bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir

(17). Hiperhomosisteinemi son yıllarda kalp damar hastalıkları için sigara hipertansiyon, şişmanlık ve dislipidemi gibi risk faktörleri üzerine bağımsız bir risk faktörü olarak eklenmiştir (95). Araştırmacılar, homosistinüride mevcut olan homosistein ile hastalığın kliniği arasında ilişki olup olmadığını araştırdıklarında bu hastalarda tromboembolizm, prematür ateroskleroz, mental retardasyon gibi bulguların ortaya çıktığını ve bu bulgular ile serum homosistein seviyesi arasında bir ilişki olduğunu saptamışlardır (20).

### **3.2. Homosistein metabolizması**

Homosistein metabolizmasında B grubu vitaminler olan folat, piridoksin ve riboflavin rol oynar (15-38). Homosistein, metiyoninden metabolize olan thiol'lü bir aminoasittir. Homosistein, kofaktör olarak vitamin B12 kullanırsa remetilasyonla tekrar metiyonine veya vitamin B6 kullanırsa transsülfürasyonla sistine metabolize olur. İnsan plazmasında homosistein birkaç formda bulunur. Yaklaşık % 70-80'i temel olarak albumine olmak üzere proteinlere disülfid bağları ile bağlıdır. Geri kalan homosistein oksitlenerek homosistin veya sistinle birleşerek mikst disülfümler oluşturur (131). Metiyonin esansiyel aminoasit olduğundan vücutla metiyoninden sentez edilen homosistein de kaynağı itibarı ile esansiyel aminoasitler arasında sayılmaktadır. Homosistein metabolizmasında remetilasyon ve transsülfürasyon olmak üzere başlıca iki yol vardır (85).

Plazmadaki, vitamin B12, B6 (pidoksalfosfat) ve özellikle folat düzeyi ile plazma homosistein arasında zıt bir ilişki tespit edilmiş ve nütrisyonel faktörlerin de homosistein seviyesini etkilediği anlaşılmıştır (121).

Homosistein metabolizmasında her iki yol aynı öneme sahip olup bu yollar yarı yarıya kullanılmaktadır. Diyetle alınan metiyoninin, metiyonin adenosil transferaz enzimi ile demetile olarak metil vericisi olan S-Adenosilmetiyonin (SAM) , S-Adenosilmetiyonin ise yapısında

bulunan metili glisin gibi metil alıcılarına vererek çoklu transferaz enzimi ile S-Adenisilhomosisteine (SAH) dönüştürmektedir. S- Adenisilhomosistein hidrolaz enzimi tarafından homosistein ve adenosine ayrılmakta, meydana gelen homosistein hem remetilasyona girerek hem de serin ile birleşerek sistatyonine dönüşmektedir (46).

### **3.2.1. Remetilasyon**

Remetilasyonda görevli olan enzimler betain-homosisteinmetiltransferaz (BHMT) enzimi ile metionin sentaz (5-metiltetrahidrofolat-homosisteinmetiltransferaz) enzimidir. BHMT temel olarak karaciğerde bulunmasına rağmen az miktarda da böbrekte bulunmaktadır. Metil vericisi olarak betaini kullanılmaktadır. Metionin sentaz enzimi ise dokularda yaygın olarak bulunmakta, 5-metiltetrahidrofolatı metil vericisi vitamin B12'yi ise kofaktör olarak kullanılmaktadır (125).

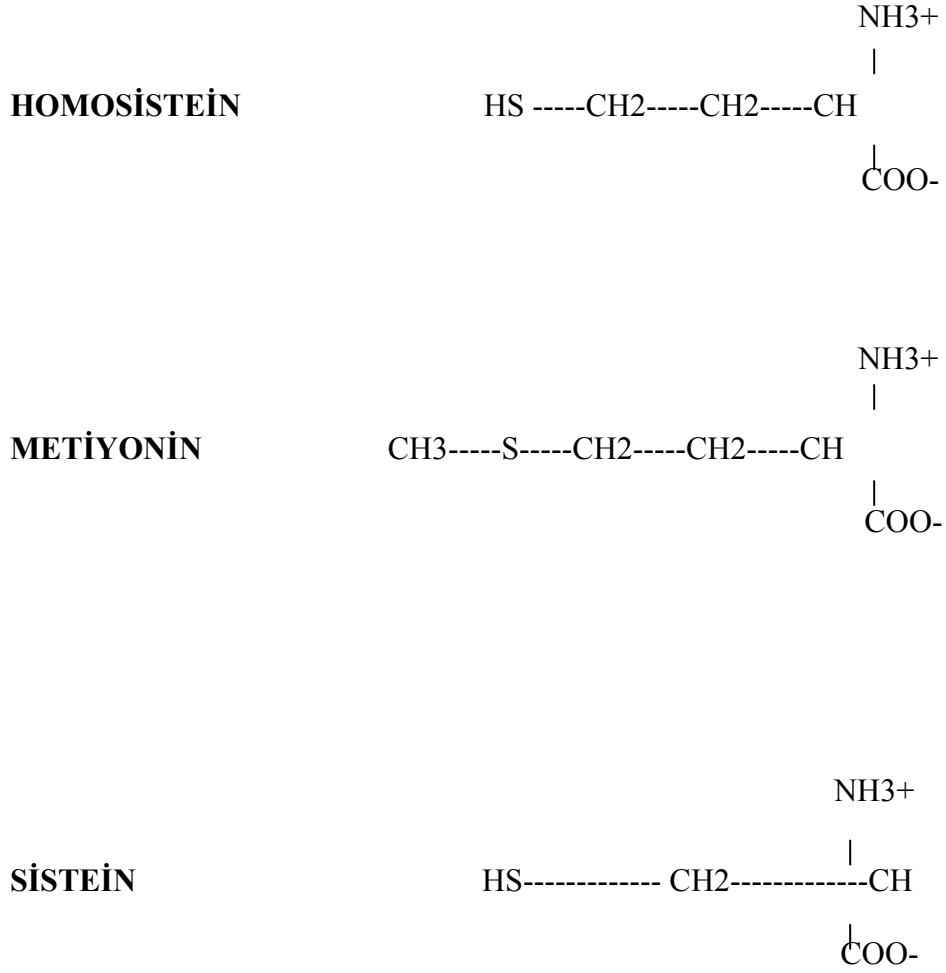
Homosistein 5-metil tetrahidrofolat varlığında B12'ye bağımlı metiyonin sentaz (MS) tarafından metiyonine remetile olur. Daha sonra 5,10 metilen tetrahidrofolat (CH<sub>2</sub> THF) metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ile 5-metil tetrahidrofolata indirgenir. Karaciğer ve böbrekte homosistein remelitasyonu betain-homosistein metil transferaz (BHMT) aracılığıyla gerçekleşir (52,103).

### **3.2.2. Transsülfürasyon**

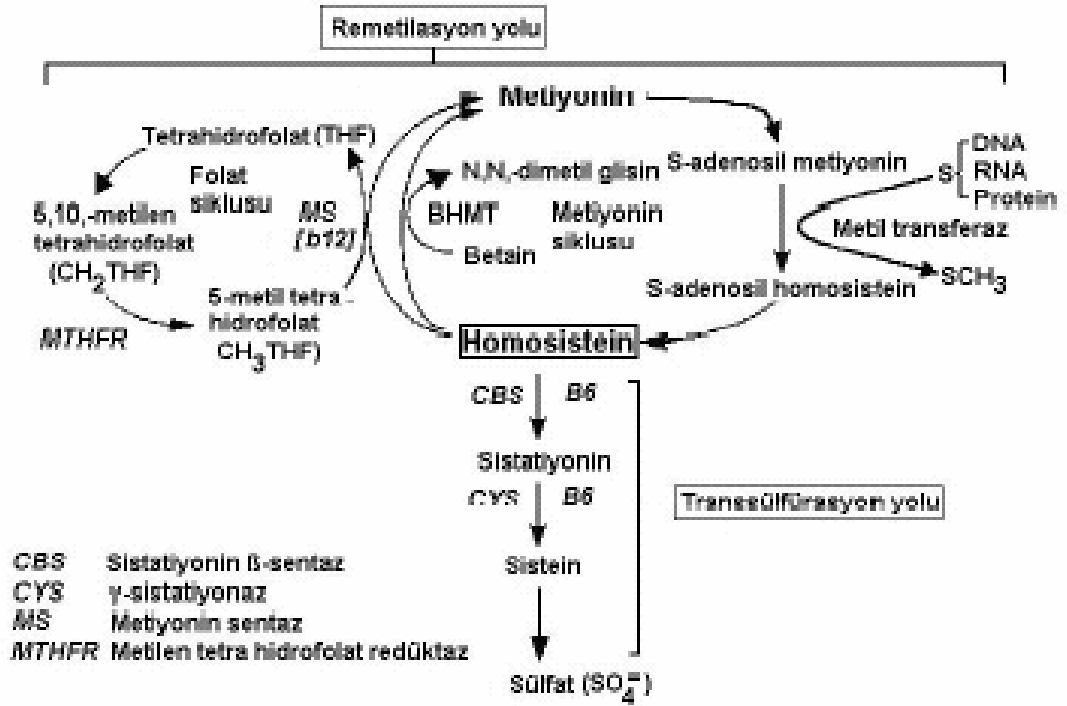
Bu yol özellikle ortamda fazla miktarda metiyonin varsa kullanılmaktadır. Sistatyonin oluşumu ise geriye dönüşümlü değildir. Böylelikle homosistein tekrar metiyonin öncülü olarak kullanılmamaktadır. Homosistein, serin aminoasidi ile sistatyonin beta sentaz enzimi ile birleşerek sistatyonu oluşturmaktadır. Bu enzim kofaktör olarak B6 vitamin aktif form olan pridoksal 5 fosfatı kullanılmaktadır. Sistation, gama sistatyonaz enzimi tarafından sisteine ve alfa ketobütirata metabolze olur. Alfa ketabütirat kofaktör olarak pridoksal fosfatı kullanır.



Daha sonra oluşan sistein glutatyonun yapısına girer veya sülfata dönüşüp ve glikoaminoglikonların yapısına katılır. Diğer yandan homosistein ile birleşerek sistein-homosistein disülfid bileşiklerini de oluşturabilirler (141).



**Şekil 3.1. Metiyonin metabolizmasınınin kükürtlü aminoasitleri (29)**



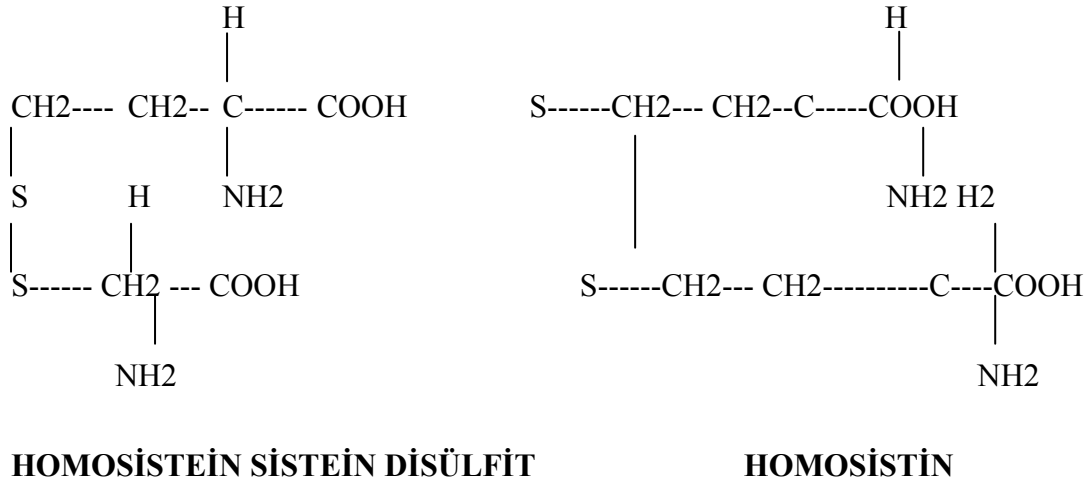
Şekil 3.2 Total plazma homosistein komponentleri (46,77)

<b>İndirgenmiş (redükte)</b>		
Homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-SH} \end{array}$	%1
<b>Yükseltgenmiş (Oksidize)</b>		
Homosistin	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\   \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	%5-10
Mikst disülfidler:		
Proteine bağlı homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\   \\ \text{Protein} \\   \\ \text{-S} \end{array}$	%80-90
Sistinli homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\   \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{-S} \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	%5-10

Tablo 3.1. Total plazma homosistein yüzdeleri (46,77).

Homosistein-sistein karışımı olan disülfid formu; ilk kez 1978 yılında Wicken (147). tarafından açlıkta erkeklerin plazmasında asit ile deprotenize edilerek saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda erkeklerde, kadınlara oranla homosistein düzeyinin yüksekliği ve bu formun varlığına ait bulgular kanıtlanmıştır (16,140).

Proteine bağlı homosistein formu ilk kez Kang ve arkadaşları tarafından saptanmıştır (64). Bu form yaklaşık olarak total homosisteinin % 70'ini oluşturmaktadır. Daha sonra yapılan çeşitli araştırmalarda bağlı homosisteinin hangi proteine bağlandığı araştırılmış ve büyük çoğunlukla albumine bağlandığı belirlenmiştir. Taze hazırlanmış plazmanın asit ile deproteinizasyonu sonucu presipite olan kısmı proteine bağlı olan homosisteini yansıtmakta, çözünür olan kısmı ise serbest homosisteini oluşturmaktadır. Solubl kısmı homosistein-sistein disülfid, homosistin ve homosistein içermektedir. Proteine bağlı olan kısmı ile solubl kısmın birleşimi total homosisteini oluşturmaktadır.



**Şekil 3.3.** Homosistein formları (29).

### **3.2.3. Regülasyonu**

Arametabolitlerin miktarı, diyet içeriği gibi birçok faktör homosistein metabolizmasının düzenlenmesinde etkilidir. Örneğin; remetilasyon ve transsülfürasyon yollarla homosistein değişimi SAH (S-Adenozilhomosistein) ve SAM (S-Adenosilmetiyonin) gibi etkili metabolitler tarafından düzenlendiği görülür. Metiyonince zengin bir öğünün tüketimini takiben hepatic SAM düzeyi artar bu sistatyonin-B-sentaz aktivasyonu ile SAM fonksiyonunu artırır ve metilentetrahidroflavon redüktaz inhibe olur. Bu münasebetle homosistein remetilasyonu sınırlanır (61,80).

Homosistein ayrıca katabolik transsülfürasyon yoluna da girer. Bu yolda da ilk enzim B6'ya bağımlı sistatyonin  $\beta$ -Sentaz (CBS) dir. Sistatyonin B6'ya bağımlı sistatyonaz aracılığıyla sisteine dönüşür, oluşan sistein daha sonra inorganik sülfata dönüşerek idrarla atılır (52,103).

### **3.3. Plazma homosisteini**

Dokularda homosistein metabolizması plazma homosistein konsantrasyonunu etkiler. Dokular homosisteinin uzaklaştırılması ve plazma homosisteinin dokular tarafından alınması arasındaki denge ile sağlanır. Her iki kademede veya birindeki bozukluk homosisteinin plazma konsantrasyonunun değişmesine yol açar. Plazma homosisteini üzerine etkili olan faktörler geniş bir şekilde sınıflandırılabilir. Farmakolojik, beslenme, hormonal dengesizlik, yaşam şekli ve genetik faktörlerdir (80,86).

### **3.4. Homosistein düzeyleri ve ölçümü**

Homosistein düzeyleri genel olarak total plazma homosisteini ya da total serum homosisteini olarak ölçülmektedir. Bu ölçüm serbest ve proteine bağlı olan kısmı içermektedir.

İnsanlarda normal total plazma homosistein düzeyi 5-15  $\mu\text{mol/L}$  arasındadır (49). Bazı araştırmacılar, 12-15  $\mu\text{mol/L}$  olan düzeyleri “sınırdá” olarak kabul etmektedirler. Ancak homosisteinin normal düzeylerini belirlerken bazı parametrelerin göz önüne alınması gerekmektedir. Yapılan bir araştırmada plazma homosistein düzeylerinin yaşlanma ve cinsiyet (erkeklerde) ve postmenopozal kadınlarda artış gösterdiği saptanmıştır (62).

Tokluk homosistein düzeyleri çok değişken sonuçlar verebildiği için homosistein düzeyleri 5-15  $\mu\text{mol/L}$  olduğunda normal 16-30  $\mu\text{mol/L}$  olduğunda hafif, 31-100  $\mu\text{mol/L}$  düzeyinde orta, >100  $\mu\text{mol/L}$  düzeyinde hiperhomosisteinemi olarak tanımlanır (65). Normal homosistein düzeyine sahip kişilerde homosistein artışında şüphede edildiğinde oral metiyonin yükleme testi yapılabilir. Bu test oral metiyonin verilmesini müteakiben hücre içi homosistein üretimi ve kullanımı arasındaki dengenin araştırılması amacıyla yapılır. Metiyonin yükleme testi yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra 6. ve 8. saatlerde plazma homosistein ölçümü yapılmaktadır. Kullanılan oran 100 mg/kg olup oral olarak verilmektedir. Metiyonin yüklemesinden sonra ölçülen oran, açlık düzeyine göre 2 standart deviasyon’dan daha fazla ise hiperhomosisteinemiden bahsedilir (16). Bu durum homosistein metabolizmasındaki muhtemel bir defekti göstermektedir. Hiperhomosisteinemi kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız risk faktörüdür. Hoogveen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada homosistein düzeyinde her 5  $\mu\text{mol/L}$ ’lik artış ile kardiyovasküler hastalık riskini normal bireylerde 1,38 kat, glukoz intoleransı olanlarda 1,55 kat ve diyabetik olgularda 2,33 kat artırdığını ortaya koymuşlardır (56).

Homosistein ölçümü çeşitli yöntemlerle yapılmaktadır. Bunlardan bazıları, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (145), aminoasit kromatografisi (141), ELİSA ve radyoenzimatrik ölçümdür (102).

### 3.5.Hiperhomosisteinemi ve nedenleri

Plazma homosistein düzeylerinin 15 µmol/L üzerinde olması hiperhomosisteinemi olarak kabul edilmektedir (49). Homosistein düzeyleri hafif 15 mmol/L 'nin üzerindeki değerler hiperhomosisteinemi olarak tanımlanmakta ve kardiyovasküler hastalık oluşumunu hızlandırmaktadır (49).

Sağlıklı insanlarda normal homosistein oranı çeşitli çalışmalarda açlıkta 5-15 mmol/L arasında bildirilmiştir. Bu oran, genetik ve sonradan kazanılan olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir.

Plazma homosistein düzeyleri hem genetik olarak hem de bedensel olarak düzenlenmektedir. Hiperhomosisteineminin oluşumunda yer alan besinsel nedenler arasında homosisteinin metabolize olmasında kofaktör olarak görev yapan folik asit, vitamin B6 ve vitamin B12'nin kısmi ya da tam eksikliği sayılabilmektedir. Birçok araştırmacı hiperhomosisteinemi sınıflandırmışlar ve sınıflandırmada çeşitli faktörleri göz önüne almışlardır. Bunlardan biri de Fallest-stradol ve arkadaşlarının yaptığı sınıflandırmadır (36).

Metilen tetra hidrofolat rediktaz (MTHFR)'in mutasyonu gibi genetik faktörler , aktivite azalması ve özellikle düşük folatlı diyet sonunda açlık hiperhomosisteinemisine neden olur (18,43). MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, enzimde inaktivasyona neden olarak, kardiyovasküler ve serbrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (31,130).

Bu sınıflandırmada hiperhomosisteinemi sınıflandırılırken, edinsel, genetik, kronik hastalıklar ve ilaç kullanımına bağlı nedenler ana başlıklar olarak kullanılmıştır. Bu sınıflanmaya ek olarak hiperhomosisteineminin nedenleri arasında fizyolojik nedenler de ilave edilmiştir. Ayrıca akut lenfoblastik lösemi, hipogonadizm, kronik atrofik gastrit,

malabsorbsiyon sendromları, gastrointestinal sistem cerrahileri, periyodik gebelikler ile ilaçlardan; niosin, siklosporin ve steroidler de hiperhomosisteinemiye neden olan faktörler arasında yer almaktadır (47).

### **3.5.1. Edinsel nedenler**

Vitamin eksiklikleri , pek çok çalışmada serum homosistein düzeyleriyle folik asit, vitamin B6 ve vitamin B12 düzeyleri arasında ters ilişki gösterilmiştir (51,89). Hiperhomosisteinemi etiyolojisinde en sık görülen etkidir. Hiperhomosisteinemi tanısı alanında ilk uygulanan tedavi yönteminde vitamin takviye edilmektedir (58).

#### **3.5.1.1. Folik asit eksikliği ve metabolizması**

Günlük ihtiyaç 50µg'dır. Toplam vücuttaki 5mg kadardır. Folik asidin günlük alımı günlük ihtiyacın onda birine düşerse dört ay içerisinde megaloblastik anemi gerçekleşmektedir. Folik asit gereksinimi hemolitik anemilerde, alkolizmde, büyüme çağında, gebelikte ve laktasyonda artmaktadır (39). 0.2-15 mg/d arasındaki folik asit dozlarının toksisiteye yol açmadan plazma homosistein düzeylerinin düşmesini sağladığı gösterilmiştir (118). Amerikan Kalp Akademisi yüksek homosistein düzeylerinin düşürülmesinde uygun diyetin düzenlemesinin yanı sıra 0.4 mg folik asit 2 mg Vitamin B6 ve 6 mikrogram B12 tedavisi önermektedir (115).

Süt, süt ürünleri ve kırmızı et metiyonin aminoasidinin esas kaynağıdır. Yeterli folat, B6 ve B12 vitaminlerinin varlığında metiyonin homosisteine ve en sonunda zararsız sistatyonin aminoasidine dönüşür. Eğer bu dönüşüm yetersiz olursa homosistein seviyeleri yükselir ve vasküler endotele direkt toksik etki yapar (68,71). Ayrıca B6, B12 vitaminlerinin mental durum ve sinirsistemi üzerinde olumlu etkileri vardır (71).

Folik asit; homosistein metabolizmasında çok önemli bir yere sahiptir. Homosistein metiyonine dönüşümünde Vitamin B12 ile birlikte remetilasyon basamağında görev almaktadır. Eksikliğinde ise plazma homosistein düzeylerinin yükselmesi neticesinde periferik vasküler bozukluklar ve son yıllarda önemle üzerinde durulan doğumsal nörolojik rahatsızlıklar meydana gelmektedir.

Morrison ve arkadaşları (90) yaptıkları çalışmada 5056 kişiye 15 yıl süreyle takip uygulamışlar ve folat eksikliği olanlarda koroner arter hastalığının normal kişilere oranla 1.69 kat daha yüksek bulmuşlardır.

Rimm ve arkadaşları (117) yaptıkları çalışmada kadınlarda KKH risk faktörlerini kontrol altına alarak 14 yıl takip etmişler ve yeterli miktarlarda folik asit ve B6 vitamini kullananlarda KKH ve buna bağlı olarak miyokard infarktüsü gelişiminde bu vitaminleri almayanlara oranla azalma tespit etmişlerdir. Hiperhomosisteineminin tedavisinde folik asitle desteklenmiş besinlerle beslenmenin tavsiye edilmesi gerektiği günümüzde klinik deneyler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Günlük diyete 0.5 mg folik asit eklenerek homosistein seviyeleri %25 azaltılabilmektedir (5,76). Folik asit birçok besinde özellikle de ıspanak, marul, pırasa gibi yeşil yapraklı sebzelerde, meyvelerde ise en fazla limon, muz ve kavunda bulunmaktadır (59). Metilokobalaminler; insan plazmasının en çok bulunan formudur. Erişkinlerde günlük gereksinim miktarı 5 mg dır. B12 vitamini özellikle homosisteinin metiyonine dönüşümündeki remetilasyon basamağında etkilidir. Metiltetra hidrofolat, homosistein metil transferaz enzimi ve B12 vitamini etkisi ile homosisteini metilleyerek metiyonine dönüşmektedir. Diğer görevli olduğu basamak ise Propiyonatın metabolizması sonucu oluşan metil malonil CoA'nın Süksinil CoA'ya dönüşümüdür (74). Plasebo kontrollü bir çalışmada folik asit ve vitamin B12 içeren kombinasyon tedavisiyle hafif ve orta hiperhomosisteinematik hastalarda homosistein düzeylerinde belirgin düşme saptanmıştır (139). On iki klinik çalışmanın meta analizinde 0.9-



5.7 mg/gün folik asit verilmesinin homosistein düzeylerini %25 düşürdüğü, bu tedaviye 0.02-1 mg/gün vitamin B12 eklenmesinin ilave olarak %7 düşmeye neden olduğu gösterilmiştir (75).

### 3.5.2. Genetik nedenler

Genç hastalarda orta homosisteinemi ile birlikte serbrovasküler hastalık gözlenmesinin genetik olma olasılığı fazlayken, yaşlı hastalarda homosistein genellikle edinseldir (41). Homosisteinüriye en sık sebep olan genetik durum, yüksek hiperhomosisteinemi seviyeleri ve prematüre kardiyovasküler hastalıklara karakterize sistationin B sentez (CBS) eksikliğidir. Artmış homosisteinin diğer genetik sebepleri; metionin sentataz ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) yokluğu ve bozukluğudur (135). Homosisteinüri, doğumsal, metabolik bozukluk olup toplumda görülme sıklığı 1/200.000'dir, ancak İrlanda ve İsveç gibi bazı ülkelerde daha sık oranda rastlanmaktadır (19,20). Sistationin B-Sentaz ve metilentetrahidrofolat eksikliği vardır. Homozigot ve heterozigot formları tanımlanmış olup en yaygın ve en ağır görülen formu homozigot olan formudur.

Homosistinüride enzim aktivitesi %0-2 arasındadır. Bu enzim geni 21. kromozomda bulunmaktadır. Çok farklı mutasyonları olup plazma homosistein düzeyleri, mutasyonların farklılığına göre değişim göstermektedir. Genel klinik bulgular arasında mental gerilik, prematüre vasküler hastalık, ektopia lentis, iskelet deformitleri ve trombo embolizm sayılmaktadır (16,74).

Yapılan bir çalışmada konjenital kalp defektli çocukları olan annelerde plazma homosistein düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiş bu defektlere hiperhomosisteinemisinin neden olabileceği düşünülmüştür (67).

### 3.5.3. Kronik hastalıklar

Homosisteinin atılımı böbreklerden olmaktadır bu nedenle böbrekleri etkileyen hastalıklar homosistein düzeylerini yükseltmektedir. Özellikle akut ve kronik böbrek yetmezliklerinde plazma homosistein düzeyleri oldukça yükselmektedir (27,57). Çeşitli malign hastalıklarda (lösemi, lenfoma, over, meme, pankreas kanserleri) hücrelerin yeterince olgunlaşmadan kana salınımları, homosistein metabolizmasında görev alan enzimlerin yeterince gelişmemesi, ayrıca transforme hücrelerin endojen homosisteini metabolize edememelerinden dolayı homosistein düzeyleri yükselmektedir (105). Yüksek homosistein seviyelerine sebep olan diğer klinik durumlar; meme ve over ca. ve psöriazis'dir. Hipotroidi ve birçok farmakolojik ajanda yükselmiş homosistein konsantrasyonundan sorumlu olabilir. Genetik bozukluklara bağlı olarak görülen eksiklikler genel popülasyonda veya vasküler hastalıklı kişilerde görülen yüksek seviyelerin muhtemelen sadece bir kısmının sebebi olarak düşünülmektedir. Homosisteinuriye en sık sebep olan genetik durum, yüksek homosistein seviyeleri ve prematüre kardiyovasküler hastalıklarla karakterize sistatyonin B sentaz eksikliğidir. Artmış homosisteinin diğer genetik sebepleri; metionin sentetaz ve metilentetrahidrofolat redüktazın yokluğu ve bozukluğudur (19). Yüksek homosistein seviyesi ilerlemiş yaş, hipotroidi, nikotonik asit, teofilin ve L-dopa gibi ilaçların kullanımı sırasında görülebilir (149). Psöriozisli vakalarda plazma homosistein düzeyleri artmakta olup nefropati, retinopati ve koroner kalp hastalığı olan komplikasyonlu diyabetik hastalarda düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada (92) diyabetik hastalarda plazma homosistein düzeyleri ile glomeruler filtrasyon hızı ters orantılı, serum kreatin düzeyleri ve sigara içimi ile ise doğru orantılı olarak arttığı bulunmuştur.

Hipotroidli hastalarda da plazma homosistein düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda hipotroidik kişilerde glomerul filtrasyon hızının düşüklüğü ve buna bağlı

olarak homosistein yeterince atılmadığı ayrıca homosisteinin metabolize olmasını sağlayan MTHFR enziminin gereksinim duyduğu kofaktör flavinadenindinükleotid (FAD) bileşiğinin yapısal bozukluğu hiperhomosisteineminin nedeni olarak gösterilmektedir (89).

#### **3.5.4. Fizyolojik nedenler**

Genç hastalarda orta homosisteinemi ile birlikte sebrovasküler hastalık gözlenmesinin genetik olma olasılığı fazlayken, yaşlı hastalarda homosisteinemi genellikle edinseldir (54). Artmış plazma homosistein düzeylerinin özellikle yüksek serum kolesterol düzeyleri, yüksek kan basıncı ve sigara içmek gibi diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığında ateroskleroz için bağımsız risk faktörü olduğu bildirilmektedir (96).

Yaşlılarda yükselmiş homosistein seviyesi ile kardiyovasküler olaylarda ki artış arasında korelasyon vardır (104). Erkeklerde kadınlara oranla homosistein düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (78). Bu fark özellikle menapozdan önce daha anlamlı iken menapoz ve sonrasında arasındaki fark kapanmaktadır. Postmenopozal dönemdeki kadınlarda homosistein ile östradiol düzeyleri arasında ters orantılı bir ilişki mevcuttur. Bu kadınlara uygulanan hormon replasman tedavisi ile homosistein düzeyleri azalmaktadır (97).

#### **3.5.5. Hiperhomosisteinemide İlaçların etkisi**

İlaçlar hiperhomosisteinemi gelişiminde oldukça önemli bir role sahiptir. Genel anesteziye kullanılan nitroz oksit çok kuvvetli metiyonin sentez inhibitörüdür (35). Antiepileptik ilaçlardan karbomazepin, valproik asit, fenotionin ve metotreksat gibi ilaçlar vitaminlerin emilimini engelliyerek folat metabolizmasını bozmakta ve plazma homosistein düzeylerini yükseltmektedir (143). Kolesterol düşürücü ilaçlardan bazıları olan kolestipal ve niosin de homosistein metabolizmasını etkilemektedir (45). Atrovastatin ve fibrat türü kolesterol düşürücü ilaç kullananlarda plazma homosistein düzeylerinin yükseldiği tesbit

edilmiştir (42,47). Astım tedavisinde bronkodilatör olarak kullanılan teofilin, pridoksal, fostat sentezini antagonize ederek hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır.

### **3.6.Hiperhomosisteinemi ve mekanizması**

İlk kez 33 yıl önce Mc Cully, plazma homosistein düzeyleri ile arterosklerotik vasküler hastalık arasındaki ilişkiye dikkat çekerek hiperhomosisteineminin arterosklerotik hastalıklarla sonuçlandığını bildirmiştir (84). Şiddetli hiperhomosisteinemili hastalarda miyokard infarktüsü, inme ve pulmoner embolizm gibi vasküler patolojiler sonucu yüksek sıklıkla erken ölümler saptanmıştır (91). Artmış kan homosistein düzeylerinin homosistinürik çocuklarda arterial ve venöz tromboembolizm riskini arttırdığı ifade edilmektedir (91,104). Homosisteinemili hastalarda ki beyin infraktlarında büyük intrakranial damarlarda ateromatöz oklüzyon gözlenmektedir (91). Bu damarlarda tipik aterosklerotik değişiklikleri, fibröz plaklar, medial fibröz ve internal elastik laminada kesintiler gözlenmiştir (84).

Homosistenüri nedenli ölümlerde yapılan incelemelerde arteriyel ve venöz tıkaçlar, odakal venöz patolojiler, koroner, serebral ve karotid arterlerde arterosklerotik değişiklikler saptanmıştır. Daha sonra araştırmacılar bu değişikliklerin sadece homosisteinüride olduğu gibi genetik nedenli hastalıklarda değil, hiperhomosisteinemisi olan diğer hastalıklarda da meydana geldiğini gözlemişlerdir (79). Hiperhomosisteinemi patogenezine yönelik bir çok çalışma yapılmış ve bu araştırmalar sonucunda genelde homosisteinemie bağlı olarak aterojenik olaylar iki alanda toplanmıştır. Bunlar damar endotelindeki fonksiyonel anomaliler ve endotel hasarı ile başlayıp bunu takip eden trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu ve trombüs formasyonu sonucu endotel üzerine daha toksik etki göstermiştir (19). Bu etkisini, homosisteinin taşıdığı sülfür gruplarının otooksidasyona uğraması, hidrojen peroksiti katalize etmesi ve endotelde fonksiyonel bozulmaya neden olması ile gösterdiği belirlenmiştir (128).

Homosistein düzeylerinin artmasının bir sonucu da endotelde bulunan ve lipid peroksidasyonunu engelleyen glutatyon peroksidaz aktivitesinin baskılanmasıdır (144).

Araştırmacılar yaptıkları bir çalışmada homosisteinin timidin alımında ve siklik-mRNA düzeylerinde artışa yol açtığı, bunun sonucunda damar düz kas hücrelerinde poliferasyona neden olduğu ve sonuç olarak endotel hasarı yaptığını saptamıştır (137). Ayrıca homosistein düzeylerinin artması, tromboksan B<sub>2</sub> sentezini ve tromboksan A<sub>2</sub> aktivitesini arttırmakta buda damarların endotel yapısını bozmakta spazm ve iskemi oluşturmaktadır (33). Endotelial hücre yüzeyine süperoksit dismutazın (SOD) bağlanması ile ilgili yapılan bir çalışmada homosistein SOD'un etkinliğini azalttığı görülmüştür. Hiperhomosisteinemide endotelial heparan sulfat proteoglikanı inhibe ederek SOD'un arterial hücre yüzeyine bağlanmasını engeller. SOD'un ekspresyonunu azaltır. Homosistein endotel hücrelerinin özellikle süperoksit radikali olmak üzere serbest radikallere karşı savunma yeteneğini azaltır (151). Süperoksit dismutaz antioksidan enzimlerin uyarıcısıdır (13). Homosisteinin vasküler endoteli koruyucu özelliği olan nitrik oksit salınımı azalttığı, salınan nitrik oksitle homosisteinin birleşerek S-nitro-homosisteine dönüştüğünü ve bu bileşiğin antitrombosit ve endotele toksik etki gösterdiği saptanmıştır (128).

Homosisteinin kardiyovasküler hastalıktaki etkisi tartışmalı olduğu için homosisteinin vasküler hastalıklara neden olduğuna dair fazla veriye ve etki mekanizmasının açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Kozal bir faktör olarak homosisteinin etkisini açıklayan bir mekanizma gösterilmelidir. İleri sürülen mekanizmalarda, homosisteinin endotelial disfonksiyona, düz kas poliferasyonuna, ekstrasellüler matriks poliferasyonuna, lipid oksidasyonuna, sitotoksititeye veya koagülasyon ve trombositlere etkisi sonucu vasküler hasara neden olabileceği ileri sürülmüştür.

Homosistein ayrıca LDL kolesterolün oksidasyonuna neden olarak LDL'nin plazmadan temizlemesini sağlayan reseptörlere bağlanmasını engellemekte, okside LDL'nin serum düzeyini arttırmakta ve endotelde köpük hücrelerine dönüşümlerini sağlayarak ateroskleroza zemin hazırlamaktadır. Homosisteinin yukarıda bildirilen tüm etkileri sonucunda damar endoteli hasara uğramakta, yapısı bozulmakta, trombolik eğilim artmakta ve lipitler okside olmaktadır. Bu mekanizmalar sonucunda plazma kolayca koagüle olmakta, bu da kronik kalp hastalığı başta olmak üzere periferik arter hastalıklarına neden olmaktadır. Stampfer ve arkadaşları (55,128).

### **3.7. Hiperhomosisteineminin tedavisi**

Hiperhomosisteineminin tedavisinde folik asitle desteklenmiş besinlerle beslenmenin tavsiye edilmesi gerektiği günümüzde klinik deneyler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Günlük diyetle 0.5mg folik asit eklenerek total homosistein seviyesi %25 azaltılabilmektedir (5,76). Folik asit desteği normal kişilerde ve vasküler hastalıklı kişilerde homosistein seviyelerini düşürür (55). Folik asit tek başına veya vitamin B<sub>6</sub> ile birlikte kullanılabilir. Kronik böbrek yetmezliği olmayan yaşlı kişilere günde 1 mg folik asit, 1.1 mg vitamin B<sub>12</sub> ve 5 mg vitamin B<sub>6</sub> kombinasyonlarının intramusküler enjeksiyonu ile yüksek total homosistein seviyeleri normale indirilebilmektedir (94). Hiperhomosisteinemi tedavisinde ilk basamak, homosistenin temel kaynağı olan methionin kısıtlanmasıdır. Methioninin temel kaynağı ise hayvansal besinler özellikle kırmızı ettir. Bu nedenle homosistein düzeylerini düşürmede kişisel beslenmenin düzenlenmesi büyük önem taşımaktadır (30).

Son yıllarda tedavi yaklaşımı, kombine olarak vitamin verilmesi yönündedir. Günlük olarak 400 mg folat, 5 mEq demir, 122 µg vitamin B<sub>12</sub>, 10-40 mg B<sub>6</sub> vitamini içeren multivitamin kompleksi ve ek olarak 800 µg folat verilmektedir. Tedaviye 8-10 hafta devam edilerek homosisteinin düzeyleri önemli ölçüde düşürülmektedir (25).

### 3.10. Melatonin sentezi ve salgılanması

Melatonin pineal bezde bir amino asit olan triptofan'dan sentelenir. Melatoninin etkilerini vücutta başlıca beyin olmak üzere çoğunlukla periferik dokularda bulunan özel resptörler aracılığıyla gösterir. Melatonin hücreleri, dokuları ve organları serbest radikal oluşturan ajan ve olaylar sonucu gelişen oksidatif zedelenmeye karşı koruduğu gösterilmiştir (22,111). Melatonin çok güçlü bir antioksidandır. Özellikle en zararlı serbest radikal olan “hidroksil radikali” ile reaksiyona girerek onu indolil katyonuna dönüştürmek suretiyle ortadan kaldırır (98).

İlk kez 1958 yılında Lerner ve arkadaşları (73) Pineal bezden salgılanan ve kurbağalardaki melanofer hücrelerini etkilediği için ‘melatonin’ adı verilen bir hormonun varlığını ileri sürmüşlerdir. Melatonin temel fizyolojik fonksiyonları; uyku davranış ve sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesi ile immün sistem ile ilişkili etkileridir (7,138). Nörotropik bir özelliğe sahip olduğu ve bu nedenle de bellek fonksiyonu ile de ilişkili olduğu iddia edilmektedir (8). Melatonin pineal bezde salgılanan bir nörohormondur. Sekresyonu gece en yüksek olmak üzere ritmik bir özellik gösterir (13).

Vücutta endojen melatoninin çoğunluğu pineal bezde sentezlenmektedir. Son yıllarda diffüz nöroendokrin sisteme ait endokrin hücrelerde de az miktarda da melatonin sentezlendiği bildirilmiştir. Aynı şekilde hemotopoiyetik sisteme ait kemik iliği hücrelerinin de önemli bir melatonin sentez yeri olduğu gösterilmiştir (72). Melatonin sentezinde pineal bez ve retinada bulunan iki enzim rol oynamaktadır. NAT (N-asetil transferaz) enzimi ile hidroksi indol-0-metil transferaz (HIOMT) enzimi. Bu enzimlerin salınımı gündüz ışıktaki azalmasına karşın gece karanlıkta 100 kata ulaşan bir artma göstermektedir (76,153,154). Gündüz pineal bez ve presinaptik terminallerde serotonin miktarı maksimum düzeyde olup sürekli bir şekilde depolanmaktadır (108). Gece ise suprakortizmatik nükleustan gelen uyarı sonucu postsinoptik

aralıkta norepinefrin salınımı maksimum düzeyde olmaktadır. Norepinefrin'in %85'i postsinoptik pinealosit membranında bulunan beta adrenerjik reseptörlerine ve geri kalan %15'i ise alfa adrenerjik reseptörlerine bağlanmaktadır (96,83) norepinefrinin hücre membranına bağlanması neticesi adenilat siklaz enzimi aktive olmakta ve oluşan cAMP ile melatonin sentezinde rol oynayan NAT enzimi aktifleşmektedir (153). Bu da melatonin sentezinde önemli ölçüde bir artışa neden olur. Eğer hem alfa hem beta adrenerjik membran reseptörleri stimule olur ise cAMP miktarı ve melatonin sentezinde artış olmaktadır (129,132).

Pinealositlerde üretilen melatonin çok hızlı bir şekilde bu hücrelerin komşuluğunda yer alan kapilerlere bırakılmak suretiyle sistemik kan dolaşımına karışmaktadır (140). Lipofilik özelliği nedeniyle vücuttaki tüm doku ve sıvılara kolayca dağılmaktadır. Pineal kan-beyin bariyeri olmadığı için salgılanan melatonin direkt olarak sistemik kan dolaşımı ve serebrosipinal sıvı içine karışmaktadır (116,152).

Melatonin sentezinin son basamağı N-asetilserotonin metilazlardır ve bu mekanizma homosistein-methionin gibi sülfür içeren aminosaitlerin metabolizması sırasında oluşan metil verici S-adenosil metiyoninin gerektirir. Homosisteininde methionine remetilasyonu için folat gerekmektedir. Methionin sekresyonunun folat yetersizliğinden etkilendiği ileri sürülmüştür (6).

### **3.8.1. Melatoninin etkileri**

Melatonin glutatyon peroksidaz , glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimleri stimule ettiği nitrik oksit sentataz gibi oksidatif enzimlerin sentezinde ise inhibitör etki yaptığı belirlenmiştir (106,109). Melatoninin antioksidan özelliğini hücrenin enerji merkezi olan mitokondirilerin üzerinde de göstermektedir. Melatonin hücrenin mitokondirisine nüfuz edip mitokondirilerde oksidasyon zehirlenmesinden koruyabilmektedir.



Melatonin OH ile reaksiyona girerek toksik etkisi çok düşük olan indolil radikaline dönüşür. Melatonin ile diğer indollerin antioksidan özellikleri karşılaştırıldığında melatoninin bu moleküllerin antioksidan özelliklerinden belirgin olarak yüksek olduğu görülmüştür. Melatonin mannitol ve glutatyon gibi diğer OH radikali temizleyicileri ile karşılaştırıldığında antioksidan etkisi glutatyondan beş kat, mannitolden onbeş kat daha güçlü olduğu belirtilmiştir (106,109).

Safrol adı verilen maddenin karaciğer üzerindeki etkisinin melatonin verilerek önlenmesi mümkün olmuştur (134). Geceleyin uygulanan safrolün toksik etkisinin gündüz verilen safrole göre daha az olduğu saptanmıştır (107). Pinealektomi uygulanmış ratlarda ise melatonin düşmesi ve gündüz-gece salınım ritminin bozulması nedeniyle safrolün neden olduğu hasarda artış gözlenmiştir (134). Melatonin sekresyonu gece en yüksek olmak üzere salgılanan bir nörohormondur ve salgılanması ritmik bir özellik gösterir. Serbest radikallerin fazla oluşumu lipid, protein ve nükleik asitlerin yapılarını bozarak bazı makromoleküllerin vucüt için zararlı olmasına yol açarak bir çok hastalığın oluşmasına temel oluşturur (13).

Melatonin güçlü bir antioksidandır (12,13). Melatonin glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon redüktaz (GSSG-Rd), süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimlerin uyarıcısıdır (13). Ayrıca hidroksil radikali (OH), simpelt oksijen, peroksitnitrit anyonu (ONOO-) ve peroksil radikali gibi (LOO-) oksijen ve nitrojen kökenli reaktifleri inhibe edici özelliği vardır (99,133).

### **3.9. S100 Proteini**

S100 proteini intrasellüler bir glikoproteindir. Asidik bir protein olup kalsiyum bağlar. 10-20 kDa ağırlığındadır. Homodimer veya heterodimerler oluşturur. Birkaç yıl öncesine kadar üç farklı S100 proteininin yapısı bilinirken (Calbindin Dgk, S100A<sub>6</sub>, S100B) bugün birçok formları gösterilmiştir (87).

S100 protein ailesi, kalsiyum bağlayan proteinlerin en geniş alt grubu olup 20'ye yakın değişik tipleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında en son bulunanlar; S100A14 ve S100Z'dir. S100 proteini pleotropik kalsiyum bağımlı hücrel olaylarda rol oynar. Bazı S100 proteinlerinin fizyolojik olarak kalsiyumdan daha çok çinkoya affiniteleri vardır. Örneğin; S100A2 ve S100A3'ün kalsiyuma çok düşük affiniteleri varken çinkoya yüksek affiniteleri vardır (87).

Tipik bir S100 geni üç exon'dan meydana gelir. S100 proteini genel olarak sinyal transdüksiyonu, hücre farklılaşması, hücre motilite regülasyonu ve transkripsiyonu gibi birçok hücre aktivitesinde rol oynar. Hücredeki bu olaylar S100 proteininin kalsiyum bağımlı bir yolla hedef proteinlerinin aktivitesini modüle ettikleri düşünülmektedir (124).

S100B ve S100A12'nin son zamanlarda tespit edilen bir yüzey reseptörü olan RAGE (receptor for advanced glycation) reseptörlerine bağlanarak sinyal mekanizmalarını başlattığı düşünülmektedir (124).

S100 proteininin romatoid artrit, akut inflamatuvar lezyonlar, kardiyomyopati, Alzheimer hastalığı ve kanser gibi ciddi hastalıklarla yakın ilişkili olduğu tespit edilmiştir. S100 proteininin bu hastalıkların klinik yaklaşımında ve yaşam süresini tahminde bir marker olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (124). Tablo 2.9'da S100 proteinlerinin hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir.

Protein	İlgili Hastalık
S100B	Alzheimer hastalığı, Down sendromu
S100A1	Kardiomyopati
S100A2	Kanser, tümör supresyonu
S100A4	Kanser, metastaz
S100A6	Kanser, amyotrofik lateral skleroz
S100A8/9	İnflamasyon, yara iyileşmesi
S100A11	Kanser, oküler hastalıklar
S100A12	İnflamasyon
S100P	Kanser

**Tablo 3.2. S100 proteinlerinin hastalıklarla ilişkisi (124).**

### **3.9.1. S100B**

S100B; astrosit, oligodendrosit ve schwan hücrelerinde sentezlenir. Total beyin proteinlerinin %0.2'sini oluşturur. S100B; beyin hasarında BOS ve daha sonra kana rahatlıkla geçmektedir. S100B seviyesinin BOS ve plazmada ölçümü serebral iskemisi olan hastaların tayini için iyi bir göstergedir. Bununla birlikte plazmadaki değerleri özellikle malign melanom ve kardiyak cerrahiye maruz kalan pediatrik hastaların takibinde önemli bir markerdir (124).

### **3.10.Nöron Spesifik Enolaz**

Nöron spesifik enolaz (NSE), glikolik yolun enzimi olan enolazın bir izoenzimidir. Enolaz, 2-fosfoglisaratın fosfoenolpirüvata dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. İlk kez 1965'de Moore ve Mc Gregor tarafından beyin dokusu protein haritaları üzerinde çalışırken

14-3-2 proteini olarak adlandırılmıştır. Daha sonra nörona lokalizasyonu nedeniyle nöron spesifik protein adı verilmiştir (87).

Merkezi sinir sistemindeki enolaz formunun en asidik olanı NSE'dir. Bunun dışında orta (hibrid) ve düşük asiditeli formları da vardır. Genel olarak enolazın alfa, beta ve gama alt ünitelerinin ikili kombinasyonları izoenzimleri oluşturur. Bu izoenzimlerden NSE gama-gama enolazdan oluşmaktadır. Nöronlarda ve nöroendokrin hücrelerde bulunmaktadır. Alfa-beta ve beta-beta enolaz yalnızca kas dokusunda bulunur. Santral sinir sisteminde bulunan izoenzimlerin özellikleri Tablo 3.3.'de gösterilmiştir (85-119).

**Tablo 3.3. Santral Sinir Sisteminde Bulunan İzoenzimlerin Özellikleri (85,119).**

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

NNE: Non nöronal enolaz

NSE: Nöron spesifik enolaz

NSE enzim kinetiği açısından diğer enolazlardan belirgin olarak farklı değildir. Bununla birlikte NSE ve diğer enolazlar arasında belirgin yapısal ve immünolojik farklılık bulunmaktadır. Bu durum NSE'nin fonksiyonel özelliklerinin de farklılık göstereceğini belirlemektedir (85-119).

NSE'in en yüksek düzeyleri beyinde bulunur. Periferik sinir sistemi ve çeşitli nöroendokrin bezlerde de orta düzeylerde görülür. En düşük düzeyleri ise serum ve beyin omurilik sıvısında (BOS) tespit edilir. Karaciğer ve kas gibi dokularda eser oranlarda bulunmaktadır. Bununla birlikte pineal bez, adrenal bez, hipofiz, tiroid ve pankreas'ta, APUD (amin precursor uptake and decarboxylation) hücreleri, trombosit ve eritrositlerde de NSE bulunmaktadır. Tablo 3.9'da NSE ile NNE'in fonksiyonel özelliklerinin karşılaştırılması yapılmıştır (85-119).

NSE'in beyin total çözünebilir proteininin %0.4-2.2 kadarını oluşturduğu gösterilmiştir (85). NSE beyinde sadece nöronlarda sitoplazmada bulunan ancak nükleusta bulunmayan bir proteindir. Sitoplazma içinde poliribozomların, mikrotübüllerin, mitokondrilerin dış membranlarının ve granüllü endoplazmik retikulumun çevresinde immunpresipitatu gösterilmiştir (120,146).

Amyotrofik lateral sklerozda serum ve beyin omurilik sıvısında NSE düzeyleri artmaktadır. Kafa travması, serebral infarkt gelişimi sırasında, periferik sinir sistemini ilgilendiren hücre hasarlarında, bakteriyel menenjit ve ensefalit durumlarında NSE düzeyleri artmıştır (23-44). Perinatal asfiksili yenidoğanlarda BOS'taki NSE artışı ve bu artışın hasarın derecesiyle orantılı olduğu gösterilmiştir (32,101).

**Tablo.3.4. NSE ve NNE'in Fonksiyonel Özelliklerinin Karşılaştırılması (85).**

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

$K_m$ : Michaelis sabitesi

Mg: Magnezyum

Yapılan rat çalışmalarında, nöronal gelişim sırasında NSE'in nöronların fonksiyonel olgunlaşmasının başlamasıyla ortaya çıktığı görülmüştür. Tablo 3.10'da NSE ve NNE'nin beyin dokusundaki dağılımı gösterilmiştir (85).

**Tablo 3.5. NSE ve NNE'nin beyin dokusundaki dağılımı (85).**

	NNE	NSE
<b>1) Glial hücreler</b>		
- Astrositler	+	-
- Oligodendrositler	+	-
- Radyal glial hücreler	++	-
- Ependimal hücreler	+	-
- Tanositler	+	-
<b>2) Nöronlar</b>		
<b>Serebellum</b>		
- Satellit sepet hücreleri	+	++
- Purkinje hücreleri	-	+++
- Golgi tip 2 hücreleri	-	++++
- Granüllü hücreler	-	++
- Derin serebellar nöronlar	-	++++
<b>Hipokampus</b>		
- Piramidal olmayan nöronlar	-	++++
- CA3 piramidal nöronlar	-	+++
- Dentat granüllü hücreler	-	++
- CA1 ve 2 nöronlar	+	+
<b>Korteks</b>		
- Piramidal olmayan nöronlar	-	++++
- Yüzeysel piramidal hücreler	+	++
- Derin piramidal hücreler	-	+++
<b>Talamus</b>		
- Retiküler nöronlar	-	++++

Çeşitli nöroendokrin kanserler ve APUD'omalardaki değişmiş nöroendokrin hücrelerin NSE'den çok zengin olması bu hastalıklarda diagnostik ve prognostik indeks olarak kullanım alanı sağlamıştır. Küçük hücreli akciğer kanseri olan hastalarda serum NSE düzeylerinin yükseldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (105,107).

NSE santral sinir sistemi hücrelerinde, eriyebilen proteinlerde ortalama %1.5 kadar yüksek oranlarda bulunduğundan, iskemik ve nekrotik hasarlarda en önce ve hasarla orantılı olarak salınan bir enzimdir (100).

### **3.11.Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)**

Astroditler beyinde n6ronların yaşamlarını s6rd6rmesinde 6nemli bir rol oynarlar ve n6ronların fizyolojik olarak fonksiyon g6rmeleri i7in gerekli olan iyonik 7evrenin d6zenlenmesini sağlarlar. Glial h6creler merkezi sinir sistemine karşı olan tahripleri takiben başlangı7taki h6crenel cevapları oluştururlar. Reaktif gliosis fiziksel ve kimyasal tahriplerden kaynaklanan n6ronal bozukluğa karşı astrositlerin bir reaksiyonudur. Bu olay astrositler i7in spesifik belirleyici olan GFAP 'nin aşırı bir ekspresyonuyla karakterize edilir. GFAP bir intrasell6ler intermediate filamenttir. GFAP'nin stabil astrosidik s6re7lerde esas olduğu ve hatta n6ronal hasarlarda merkezi sinir sisteminin morfojenezi i7in kritik bir materyal olduğu bilinmektedir.N6ronal hasara cevap olarak astrositler GFAP yapımını hızlandırırklar (9,10). Baydaş ve arkadaşları yaptıkları araştırmada streptozotocinin ile oluşturulan diabatte beyinde GFAP, S100B, NSE ve LPO sviyelerinin belirgin şekilde y6keldiğini , alfa lipoik asit uygulamasıyla beyinlerdeki glial ve noronal markırların azaldığını ve LPO seviyesinin artışının 6nlendiğini g6stermişlerdir (11).



## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Deneysel uygulamalar

Çalışmada F.Ü Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden sağlanan, 200-220 ‘g’ ağırlığında 45 adet Wistar cinsi sıçan kullanıldı. Hayvanlar 3 ayrı gruba ayrıldı. 1.Grup n=15 kontrol, bu grup oda sıcaklığı ( $21 \pm ^\circ\text{C}$ ) sağlanan ortamda, her gün temizlenen pleksiglas kafeslerde, beşerli gruplar halinde tutuldu ve çeşme suyu ve özel rat yemiyle beslendi, 2.Grup n=15 Homosistein grubu, bu gruba her gün karanlık periyoda geçmeden 40mg/kg dozunda homosistein intraperitoneal olarak altı (6) hafta ile süre günlük hazırlanarak enjekte edildi. Hayvanlar çeşme suyu ve özel rat yemiyle beslendi, 3. Grup n=15 Melatonin+Homosistein grubu bu gruba her gün 40mg/kg dozunda homosistein ve 10mg/kg dozunda Melatonin intraperitoneal olarak aynı süreyle günlük taze hazırlanarak uygulandı. Melatonin (% 0.1 alkol içeren serum fizyolojikte hazırlandı) karanlık periyoda geçmeden hemen önce enjekte edildi. Ratlar deneyin sonunda dekapite edildi. Beyin alındı ve hipokampus ve korteks kısımları ayrılarak  $-70 ^\circ\text{C}$ ’de ölçümler yapılincaya kadar saklandı.

Doku örnekleri 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM NaCl, 0.2 mM fenilmetilsülfonil florid, 5 mM EDTA, 2mM  $\beta$ -merkaptöetanol kullanılarak cam bir homojenizatörle soğuk ortamda homojenize edildi. Proteaz inhibitörü (soybean; Sigma Chemical Co., Deisenhofen, Almahya) ve %1’lik Triton X-100 içeren homojenatlar  $4 ^\circ\text{C}$ ’de 60 dakika süreyle  $30.000 \times g$  ‘de santrifüj edildi. Süpernatant ve pelet kısımlar ayrıldı ve çalışılincaya kadar  $-70 ^\circ\text{C}$ ’de saklandı. Doku proteinleri Sodium Dodecyl Sulfate Poli Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ile ayrıştırıldı (55). Ayrıştırılan proteinler nitroselüloz membran kağıda (Schleich ve Schuell inc. ABD) transfer edildi. Non-spesifik olan bağlanmalar %1 bovine serum albuminle inkübasyon yoluyla bloklandı. Primer antikör (rabbit anti-rat NSE, S100B ve GFAP antikoru) %0.05 Tween-20 içeren tamponda seyreltildi. Blotlar diaminobenzidin ve

goat anti-rabbit immunoglobulin peroksidaz konjugatı kullanılarak görünür hale getirildi. Elde edilen NSE, S100B ve GFAP protein bantlarının yoğunlukları LabWorks 4.0 (Ultra-violet Products Ltd. Cambridy, CD41TGUK) software programı kullanılarak hesaplandı.

Doku lipid peroksidasyon (LPO) [malondialdehit (MDA)+4-hidroksialkenal (4-HDA)] seviyeleri LPO-586 kiti kullanılarak ölçüldü (Oxis, Inc. Portland, OR). Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri Elisa metoduyla IMUBIND (Biochemicals, NORVEÇ) marka ticari kit kullanılarak tespit edildi.

#### **4.2. Doku ve Plazmada Lipid Peroksidasyon Tayini**

Plazma ve dokuda Lipid peroksidasyon tayini (Malondialdehit) Placer ve arkadaşlarının tanımladığı yöntemle göre spektrofotometrik olarak belirlendi (156).

Prensip : Ph'nin 3.4 olduğu aerobik bir ortamda TBA ile plazmanın 100 °C'de inkubasyonu, lipid peroksidasyon sekonder bir ürünü olan Malondialdehiti (MDA) oluşturmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturur. Pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyon saptanır. Belirlenen absorban değeri MDA standart eğrisinden yada yina standart eğrisinden hesaplanan 0,00092 rakamına bölünerek plazma MDA değeri nmol/ml olarak hesaplandı.

Standart eğri çizimi için 1,1,3,3 Tetraethoxypropane'den 10µ/10 ml absolut etanolde çözdürülerek. +4 °C 'de koyu bir şişede saklanarak bu stok solüsyondan farklı konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlanarak standart eğri çizildi.

#### **4.3.Doku ve Plazma Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Tayini**

Plazma ve dokuda GSH-Px aktivitesi düzeyini Lawrence ve arkadaşlarının belirttiği şekilde belirlendi (157).

Prensip: Plazma ve dokulardaki GSH-Px, GSH Cumenehidropetoksit (CHPO<sub>4</sub>) ile oksidasyona uğratılır. Renk ajanı olarak 5,5- ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit] (DTBN) solusyonu ile karıştırılması sonucu hem kör ve hemde örneklerde meydana gelen sarı renk kompleksinin spektrofotometrede 412 nm'de ile okunması sonucu belirlenir.

#### **4.4. Plazma Homosistein Düzeyinin Tayini**

Plazma homosistein düzeyleri ELİSA (Enzyme linked-immunosorbent assay) yöntemiyle ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi L-homsistein, enzimatik olarak S-adenozil-L-homosisteine dönüşümü sonucu oluşan anti-SAH antikorlarının ölçümüne dayanmaktadır. Ölçümler ELX 800 (USA) cihazında yapılmış olup sonuçlar µmol/L olarak verilmiştir. Çalışmada Axis (biochemicals ASA, Normay) marka kitleri kullanılmıştır.

#### **4.5. ELİSA (Enzyme Linked-Immunsorbent Assay)**

Bu yöntem antijen antikör ilişkisini, antikörle bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanmaktadır. ELISA yöntemiyle hem küçük hem de büyük moleküller kolaylıkla ölçülebilmektedir. Diğer yöntemlere oranla daha ucuzdur. ELİSA yöntemi üç kısma ayrılmaktadır. Bu metodlar ; daha çok immünoglobülinlerin ölçümünde kullanılan indirekt metod, küçük moleküllerin ölçümünde kullanılan sandviç metodu ve yarışmalı metoddur.

#### **4.6.Western Blot**

Bu yöntemde, doku örnekleri 10 Mm Tris (pH 7.4), 0.1 mM NaCl, 0.2 Mm fenilmetilsülfonil florid, 5 Mm EDTA, 2mM β-merkaptotanol kullanılarak cam bir homojenizatörle soğuk ortamda homojenize edilir. Proteaz inhibitörü (soybean; Sigma Chemical Co., Deisenhofen, Germany) ve %1'lik Triton X-100 içeren homojenatlar 4 °C'de 60 dakika süreyle 30.000 xg devirde santrifüj edilir. Süpernatant ve pelet kısımları ayrıldı ve

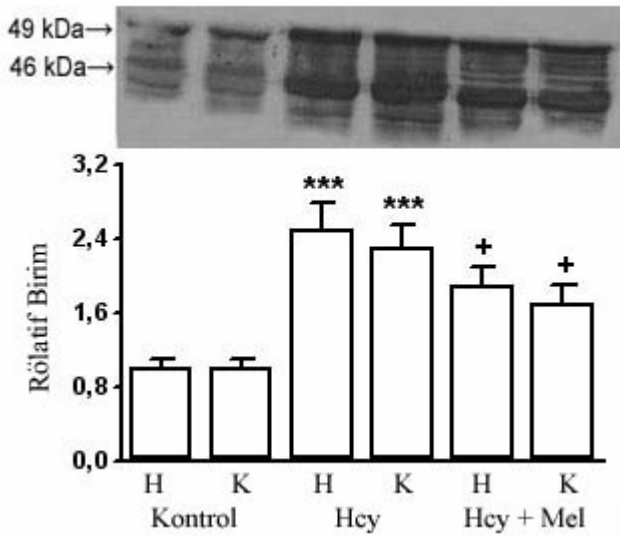
çalışıncaya kadar -70 °C'de saklanır. Doku proteinleri Dodecyl Sulfate Poli Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ile ayrıştırılır. Ayrıştırılan proteinler nitroselüloz membran kağıda (Schleich ve Schuell inc. USA) transfer edilir. Non-sprstik olan bağlanmalar %1 bovine serum albuminle inkübasyon yoluyla bloklanır. Primer antikör (rabbit anti-rat NSE, S100B ve GFAP antikoru) %0.05 Tween-20 içere tampona seyreltilir. Blotlar diaminobenzidin ve goat anti-rabbit immunoglobulin peroksidaz kanjugatı kullanılarak görünür hale getirilir. Elde edilen NSE, S100B ve GFAP protein bantlarının yoğunlukları LabWorks 4.0 ( Ultra- violet Products Ltd. Cambridy, CD41TGUK) software programı kullanılarak hesaplanır (9,10).

#### **4.7. İstatistik**

Değerler ortalama  $\pm$  SD olarak gösterildi. Post-Hoc hesaplaması için Bonferroni'nin t-istatistik analizi kullanıldı.  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

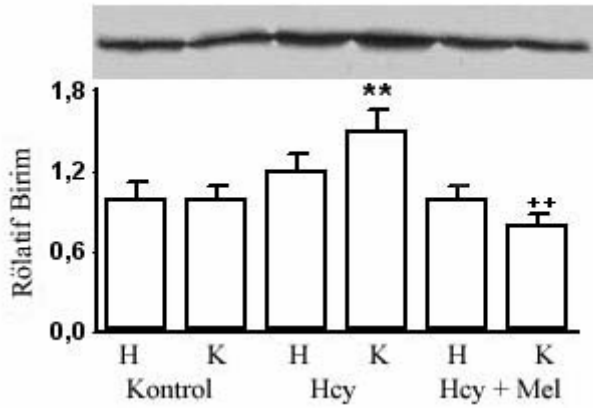
## 5. BULGULAR

Western blot analizlerinde homosistein uygulanmış rat beyinlerindeki hipokampus ve korteks bölgelerinde GFAP içeriğinde önemli bir yükselme gözlenmiştir ( $P<0.001$ ) (şekil5.1). Total GFAP içeriğindeki yükselme hipokampusta kortekse göre daha büyüktür ( $P<0.05$ ) (şekil 5.1). Normal 49 kDa'luk GFAP'ye ek olarak düşük molekül ağırlıklı (46 kDa) GFAP bandları homosistein uygulanmış ratlarda kontrol grubuna göre daha yüksektir ( $P<0.001$ ). GFAP'nin 46 kDa'luk formu hipokampusta kortekse göre daha yüksektir (şekil 5.1). 45 günlük melatonin uygulamasıyla GFAP içeriği hipokampus ve kortekste homosistein grubuna göre önemli ölçüde düşmüştür ( $P<0.05$ ) (şekil 5.1).



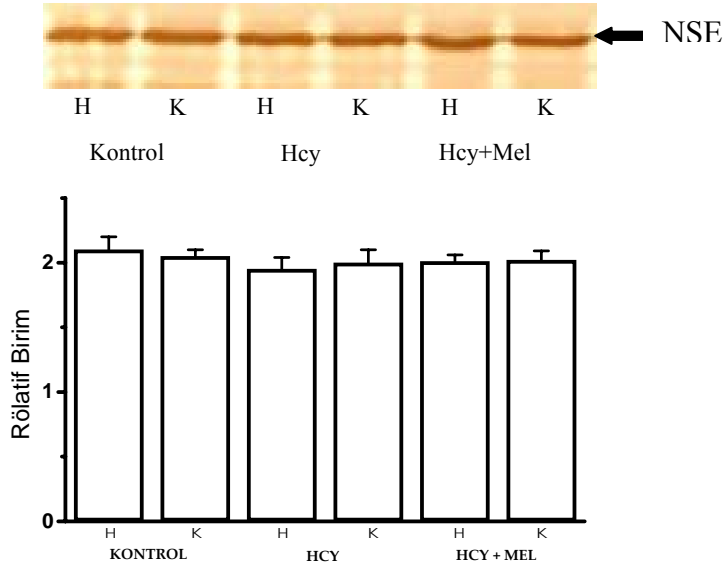
**Şekil 5. 1:** Kontrol, Homosistein (Hcy) ve Homosistein +Melatonin (Hcy+Mel) gruplarındaki rat beyinlerinin hipokampus (H) ve frontal kortekslerindeki (K) GFAP düzeyleri.

Homosistein uygulanmış ratların beyinlerinin hipokampus ve korteks bölgelerinde S100B protein içeriğinde bir yükselme görülmektedir (şekil 5.2). S100B içeriğindeki yükselme kortekste hipokampusa göre daha büyüktür ( $P<0.01$ ) (şekil 5.2). 45 günlük melatonin uygulanmasıyla S100B içeriği hipokampus ve kortekste homosistein grubuna göre oldukça önemli ölçüde düşmüştür ( $P<0.001$ ). Özellikle kortekste melatoninin bu etkisi daha net bir biçimde gözlenmektedir (şekil 5.2).



**Şekil 5.2:** Kontrol, Homosistein (Hcy) ve Homosistein+Melatonin (Hcy+Mel) gruplarındaki rat beyinlerinin hipokampus (H) ve frontal korteks (K) bölgelerindeki S100B düzeyleri.

Kontrol, homosistein ve homosistein+melatonin gruplarındaki rat beyinlerinin hipokampus ve korteks bölgelerinde NSE içeriğinde önemli bir değişiklik görülmemektedir ( $P>0.05$ ) (şekil 5.3).



**Şekil. 5.3.** Kontrol, Homosistein (Hcy) ve Homosistein+Melatonin (Hcy+Mel) gruplarındaki rat beyinlerinin hipokampus (H) ve frontal korteks (K) bölgelerindeki NSE düzeyleri.

Homosistein uygulanmış ratların beyinlerinin hipokampus bölgesinde LPO düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde yükseldi. ( $P < 0.01$ ) (tablo 5.1) Homosistein grubuna melatonin uygulanmasıyla homosistein grubuna göre LPO düzeylerinde bir azalma görüldü ( $P < 0.05$ ) (tablo 5.1). Homosistein verilen ratların beyinlerinin frontal korteksinde LPO düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde yükseldi ( $P < 0.01$ ) (tablo 5.1). Homosistein grubuna melatonin uygulanmasıyla homosistein grubuna göre LPO düzeylerinde bir azalma görüldü ( $P < 0.05$ ).

Homosistein verilen ratların beyinlerinin hipokampus bölgesindeki GSH-Px aktivitesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldı ( $P < 0.01$ ) (tablo 5.1). Homosistein verilen sıçanlarda melatonin uygulanmasıyla GSH-Px aktivitesi önemli ölçüde artış saptandı ( $P < 0.01$ ) (tablo 5.1). Homosistein verilen hayvanların frontal korteksindeki GSH-Px düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azalma göstermektedir ( $P < 0.05$ ) (tablo 5.1).

Homosistein grubuna melatonin verilmesiyle homosistein grubuna göre GSH-Px düzeylerinde önemli bir artış olduğu gözlemlendi ( $P<0.01$ ). Melatonin enjeksiyonunun GSH-Px düzeyini kontrol grubuna göre de artırdığı görülmektedir (tablo 5.1).

Deney süresinde günlük olarak enjekte edilen homosisteinin serum homosistein miktarını önemli oranda artırdığı gözlemlendi ( $p< 0.001$ ; tablo 5.1). Homosistein ile beraber melatonin verilen deneklerde ise sadece homosistein verilen gruba göre homosistein değerleri daha az artış gösterdi. Böylece melatonin homosistein miktarının ayrı artışını engellediği saptandı.

	Kontrol	Homosistein	homosistein+melatonin
<b>Hippokampus</b>			
LPO (nmol/mg Protein)	4.10±0.5	5.30±0.7	4.50±0.6 <sup>+</sup>
GSH-Px (unit/g protein)	31±4	20±3	32±4 <sup>++</sup>
<b>Frontal Korteks</b>			
LPO (nmol/mg protein)	4.30±0.5	5.20±0.7	4.45±0.4 <sup>+</sup>
GSH-Px (unit/g protein)	28±3	22±4	30±3 <sup>++</sup>
<b>Serum homosistein (µmol/L)</b>	7.8±0.9	19±2.0	14±3.0 <sup>+</sup>

**Tablo 5.1. Tüm grupların hipokampus ve kortekslerinde LPO miktarı GSH-Px aktivitesi ve serum homosistein düzeyleri.**



## 6. TARTIŞMA

Astrofitler merkezi sinir sisteminde meydana gelen tahribe karşı en erken hücrenel cevapları oluştururlar. Bu cevap GFAP'nin aşırı ekspresyonuyla karakterize edilir (9). Bu çalışmamızda rat beyninin hipokampus ve korteks bölgesinde homosistein uygulanmasıyla GFAP ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (10). Bu çalışmada homosistein uygulamasının özellikle hipokampusta GFAP içeriğini yükselttiği gösterilmiştir. Melatoninin değişik nörotoksik ajanların azalmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (10). Çalışmamda homosistein grubuna melatonin uygulanmasıyla GFAP içeriğindeki yükselmenin azaldığı gösterilmiştir. Serbest radikaller reaktif glioziste bir rol oynadığı için melatoninin serbest radikalleri inhibe ederek reaktif gliozisi engellemektedir (9,10). Astrofitlerin diğeri bir markırı olan S100B intrasellüler bir glikoproteindir. Asidik bir protein olup  $Ca^{++}$  bağlar. Nöronal sitoplazmada serbest  $Ca^{++}$  düzeylerini artırır. S100B başlıca astrofitlerde bulunur. Nöron büyümesini uyarır ve nöronal yaşamı olumlu yönde etkiler (9,10). Çalışmamda rat beyninin hipokampus ve korteks bölgesinde homosistein uygulanmasıyla S100B ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamda homosistein grubuna melatonin uygulanmasıyla S100B içeriğindeki yükselmenin azaldığı gösterilmiştir.

Yapılan rat çalışmaları, nöronal gelişim sırasında NSE'nin nöronların fonksiyonel olgunlaşmasının başlamasıyla ortaya çıktığı görülmüştür. Astrofitlerin oksidatif strese karşı olan duyarlılıkları, nöronları hasara karşı daha da duyarlı hale getirmektedir (85). Çalışmamızda tüm gruplardaki rat beyinlerinin hipokampus ve korteks bölgelerinde NSE içeriğinde önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Serbest oksijen radikallerinin aşırı artmasının ve antioksidanların azalmasının birçok komplikasyonlara sebep olduğu bildirilmiştir. Merkezi sinir sisteminde savunma sistemini

oluşturan antioksidanların özellikle glial hücrelerde yoğunlaştığı ileri sürülmüştür (9,10). Bu çalışmamızda homosistein uygulamasıyla artan serbest oksijen radikallerinin özellikle glial hücrelerde hiperaktiviteye sebep olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlarla melatonin hem nöronlar üzerinde direkt koruyucu hem de kötü gelişen metabolik ve kimyasal olaylarda glial hücre üzerinde koruyucu etki gösterdiği açıktır. O halde melatoninin etkisi iki yönlüdür. Birincisi LPO düzeyini düşürerek membranı koruduğu, ikincisi intrasellüler antioksidan olan GSH ve GSH metabolizmasını sağlayan enzimleri (GSH-Px) ve bu enzimlerin aktivitelerini artırdığıdır. Sonuç olarak artan glial markırların (GFAP, S100B) artan LPO miktarları ile orantılı olduğu, glial reaktivitenin homosistein uygulanmasıyla meydana gelen oksidatif stresle ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamda Kontrol, homosistein ve homosistein+melatonin gruplarının serumları incelendiğinde serum homosistein düzeylerinde homosistein uygulanmış gruplarda kontrol grubuna göre oldukça önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Homosistein grubuna melatonin uygulanmasıyla serum homosistein düzeylerinde homosistein grubuna göre azalma gözlenmiştir. Bu bulgular melatoninin homosistein üzerinden plazma homosistein konsantrasyonunu azaltıcı etkisinin olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak homosisteinin lipid peroksidasyon ürünlerini artırdığı, plazma ve dokulardaki antioksidan enzim düzeylerini ise azaltıcı yönde bir etki gösterdiği, melatoninin ise LPO ürünleri üzerinde indirgeyici bir etki gösterdiği ve antioksidan enzim aktivitesini arttırdığı söylenebilir

## 7. KAYNAKLAR

1. Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, et al. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res*, 1994; 16: 100.
2. Ak H, Dingiloglu T, Habif N, Kultursay S, Baymdir O, Onat T. (1994). Plasma Lipid Peroxidation, Vit. E, Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Alterations in Coronary Atherosclerosis. *Tr J MedSci*. 26: 11-15.
3. Akkus I (1995). Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, 2. Baski, Mimoza Yayinlan, Konya.
4. Altunbas Y, Guven M, Ince E, Acbay O, Caner M, Kanigur G, Hatemi H. (1996). The in Vitro Effects of Captopril on the Levels of Lipid Peroxidation and Glutathione of Erythrocytes in Type II Diabetics. *Tr J Med Sci*. 26: 139-142.
5. Andreotti F, Burzotta F, Manzoli A, Robinson K. Homocysteine and risk of cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2000;9;13-21.
6. Arendt J, Deacon S, English J, Hampton S, Morgan L. (1995). Melatonin and Adjustment to Phase Shift. *J Sleep Res*. 4: 74-79.
7. Arendt J, Skene DJ, Middleton B, et al. Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work and blindness. *J Biol Rhythms*, 1997; 12: 604.
8. Argyriou A, Prast H, Philippu A. Melatonin facilitates short-term memory. *Eur J Pharmacol*, 1998;349:159.
9. 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 Feb 21;462(1-3):67-71.
10. Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F, Canatan H. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett*. 2003 Feb 3;137(3):169-74.

11. Baydaş G, dande E, Kilboz M Neuroprotection by alfa-lipoik acid in streptozotcin-induced diabetes. *Biochemistry (Mosc)*.2004 sep; 69(9):1001-5.
12. Baydaş G, Ercel E, Canatan H, Donder E, Akyol A. (2001). Effect of melatonin on oxidative status of brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell Biochem Fuct*. 19: 37-41.
13. Baydaş G. Gursu M F, Yilmaz S, Canpolat S, Yasar A, Cikim G, Canatan H. (2002). Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neuroscience Letters*. 323: 195-198.
14. Behrentein TT. (1972). Effect of Selenium and Vitamin E on Antibody Formation in Rabbits. *Zdra Wookhr Bolorus*. 18: 34-36.
15. Behrman RE , Kliegman RM, Janson HB, Nelson textbook of pediatrics. 16thed. Pldelphia: W.B. Saunders Co, 2000, pp 351.
16. Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, Selhup J. (1999). Nonfasting Plasma Total Homocysteine Levels and All-cause and Cardiovascular Disease Mortality in Elderly Framingham Men and Women. *Arch Intern Med*. 159(10): 1077-1080.
17. Boushey CJ, Bersford SAA, Omenn GS, Mcculsky AG. (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 274:1049-1057.
18. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L- Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not fo vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998;98:252()-6.
19. Brattstrom L, Israelson B, Tengbora L. (1959). Homocysteine, factor VII, and antithrombin III insubjects with difference gene damase for cystathionine (3 synthase. *J. Inherit Metab. Dis*. 12:475-482.

20. Brattstrom L, Israelsson B, Lingarde F, Hultberg B. (1988). Higher total Plasma Homocysteine in vitamin B12 Deficiency than Heterozgosity for Homocystinuria Due Cystathionine p-Synthase Deficiency. *Metabolism*. 37: 175-178.
21. Brattstrom L, Israelsson B, Lingarde F, Hultberg B. (1988). Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than heterozgosity for homocystinuria due cystathionine b-synthase deficiency. *Metabolism*. 37: 175-178.
22. Brezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336:186-196.
23. Büyükpamukçu M, Akyüz C, Sevinir B, Hazar V. Çocukluk çağı kanserlerinde biyolojik belirleyiciler. *Pediatri: Yeni bilgiler, yeni görüşler*. Ankara 1995; 749-763.
24. Cardinali DP, Glombek DA, Rosenstein RE, et al. Melatonin site and mechanisms of action: single or multiple. *J Pineal Res*, 1997; 23: 3
25. Challem J, Doldy V. (1997). Homocysteine the secret killer. Keats Publishing, inc. New Canaan, USA,
26. Challem J, Doldy V. (1997). Homocysteine the Secret Killer. Keats Publishing, Inc New Canaan, USA.
27. Chauveau P, Chadeaux B, Coude M, Aupetit J. (1993). Hyperhomocysteinemia a Risk Factor for Atherosclerosis in Chronic Uremic Patients. *Arch Intern Med*. 41:72-77.
28. Cooper AJL. (1983). Biochemistry of sulfur-containing Amino Acids. *Ann Rev Biochem*. 52: 187-222.
29. Cunningham RT, Morrow JI, Johnston CF, Buchanan KD. Serum neuron specific enolase concentrations in patients with neurological disorders. *Clin Chim Acta* 1994; 230: 117-124.
30. Dalery K, Luisier S, Selhup J, Latour Y. (1995). Homocysteine and Coronary Artery Disease in French Canadian Subject: Relation with Vitamins B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, Pyridoxal Phosphate, and Folate. *Am J Cardiol*. 75: 1107-1111
31. Daly SF, Molloy AM, Mills JL, et al. The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue *Brit J Obstet Gynaec*, 1999;106:1214-1218.

32. DeGiorgio CM, Correale JD , Gott PS, Ginsburg DL, Bracht KA, Smith T, et al. Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology* 1995; 45: 1134-1137.
33. Di Minno G, Davi G, Margaglione M. (1993). Abnormally High Thromboxane Biosynthesis in Homozygous Homocystinuria. *J Clin Invest.* 92: 1400-1406.
34. Eikelboom JW, Lonn E, Genest j, Jr., et oL Homocysr(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131;363-75.
35. Ermens AAM, Refsum H, Ruprecht J. (1991). Monitoring Cobalamin Inactivation During Nitrous Oxide Anaesthesia by Determination of Homocysteine and Folate in Plasma and Urine. *Clin Pharmacol Ther.* 49: 385-393.
36. Fallest-Strobl PC, Koch DD, Stein JH, Mcbride PE. (1997). Homocysteine: a New Risk Factor for Atherosclerosis. *Am Fam Physician.* 56: 1607-1610.
37. Fawcett DW, Jenesh RP. Pineal gland. In: Bloom M, Fawcett DW, Eds. *Concise Histology.* New York, Chapman & Hall International Thomson Publishing; 1977; 164
38. Finkelstein JD . Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990 ,1:228-237.
39. Finkelstein JD. (1990). Methionine Metabolism in Mammals. *J Nutr Biochem.* 1: 228-237.
40. Frankel P, Madsen P. (1998). *Homocysteine Through the Methylation Process.* The Research Coroner, Publications. Thousand Oaks, USA.
41. Freeman BA, Crapo ID. (1982). Biology of Disease-Free Radicals and Tissue Injury. *Lab Invest.* 47: 412.
42. Frick MH, Elo O, Haapa K. (1987). Helsinki Heart Study: Primary- prevention Trial with Gemfibrozil in Midle Aged Men with Dyslipidemia: Safety of Treatment, Changes in Risk Factors and Incidence of Coronary Heart Disease. *N Eng J Med.* 317: 1237- 1245.
43. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in merhylenctetrahydrofolafe reductasc- *Nat Genet* 1995;10:111-3;

44. Garcia-Alix A, Cabanas F, Pellicer A, Hernanz A, Stiris TA, Quero J. Neuron specific enolase and myelin basic protein: relationship of cerebrospinal fluid to the neurologic condition of asphyxiated full-term infants. *Pediatrics* 1994; 93(2): 234-240.
45. Garg R, Malinow M, Pettinger M, Upson B. (1999). Niacin Treatment Increases Plasma Homocysteine Levels. *Am Heart J.* 138: 1082- 1087.
46. Genest JJR, Malinow MR. (1992). Homocysteine and Coronary Artery Disease. *Curr Opin Lipidol.* 3: 295-299.
47. Giral P, Bruckert E, Nelly J, Chapman M, Foglietti M, Turpin G. (2001). Homocysteine and Lipid Lowering Agents. A Comparison Between Atorvastatin and Fenofibrate in Patients with Mixed Hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 154: 421-427.
48. Gruba S, Fink L, Fanceso V. (1996). Hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Path.* 106:709-722.
49. Gruba S, Fink L, Fanceso V. Hyperhomocysteinemia. *Am. J. Clin. Path.* 1996; 106:709-722
50. Halliwell B. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am J Med.* 91(3). 14-21.
51. Halsted CH. (1980). Folate Deficiency in Alcoholism. *Am J Clin Nutr.* 33: 2736.
52. Hankey GJ, Eikelbom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354:407-13
53. Heinzmann WC, Fritz G, Schafer WB. S100 proteins: Structure, Functions and Pathology. *Frontiers in Bioscience Zürich* 2002; 7: 1356-1368.
54. Henry J Barnett, J.P. Mohr, Bennett M. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management.* Churchill Livingstone. 3 ed. p.142-143, 1998.
55. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: Meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 1998; 316:894-8.

56. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jakobs C, Bouter LM, Heine RJ, Stehouwer CD. Does metformin increase the serum total homocysteine level in non-insulin-dependent diabetes mellitus? *J Intern Med* 1997;242:389-394.
57. Hulstberg A, Anderson A, Sterner G. (1993). Plasma Homocysteine and Renal Failure. *Clin Nephrol.* 40: 230-235. *J Biomed Sci* 2000; 7:444-458.
58. Jacques P, Bostom A, Williams R. (1996). Relations between Folate Status a Common Mutation in MTHFR and Plasma Homocysteine Concentrations. *Circulation.* 93: 7-12.
59. Jacobsen DW. (1996). Determinants of Hyperhomocysteinemia: a matter of nature and nurture. *Am J Clin Nutr.* 64: 641-642.
60. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998;44:1833-43.
61. James DH, Rene LJ, Lori MS, Margaret EB, John TB. (1999). Regulation of Homocysteine Metabolism. *Advan Enzyme Regul.* 39: 69-91.
62. Jousilahti P, Tuomilehto J, Vartiainen E, Pekkanen J, Puska P. (1996). Body Weight, Cardiovascular Risk Faktors, and Coronary Mortality. 15-year Follow-up of Middle-aged Men and Women in Eastern Finland. *Circulation.* 93: 1372-1379.
63. Kalyaranaman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamrju S. Doxorubicin-induced apoptosis; implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem* 2002; 234/235:119-124.
64. Kang S, Wong PWK, Curley K. (1982). The Effect of d-penicillamine on Protein-bound Homocysteine in Homocystinurics. *Pediatr Res.* 16: 370-372.
65. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. (1992). Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Occlusive Vascular Disease. *Ann Rev Nutr.* 12: 279-298.
66. Kang SS, Wong PWK. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism,* 36: 458- 462, 1987.
67. Kapusta L, Haagmans M, Steegers E, Cuypers M. (1999). Congenital Heart Defects and Maternal Derangement of Homocysteine Metabolism. *J Pediatr.* 135: 773-774.



68. Kass-Annese B. Alternative therepierfor menapose. Clin Obstet Gynecol 2000;43:162-83.
69. Kato K, Suzuki F, Semba R. Determination of brain enolase isoenzymes with an enzyme immunoassay at the level of single neurons. J. Neurochem 1981; 37: 998-1002.
70. Klein DC. The mammalian melatonin rhyth-generating system. In: Weterberg L, Ed. Light and Biological Rhythms in Man, Neuroscience, Oxford, Pergamon Press; 1993; 55,
71. Krismann GJ, Krsshmann JD. Nutrients. Nutrtrion Almanac. Mc Graw-Hill yayınevi, 4. baskı Newyork 1996;27-143.
72. Lee P, Shiu SY, Chow PH. Regional and diurnal studies of melatonin and melatonin binding sites in the duct gastrointestinal tract. Biol Signals, 1995; 4: 212.
73. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, et al. Isolation of melathoinin, pineal factor that lightens melanocytes. J. Am. Chem. Soc. 1958;80:2587
74. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. (1994). Prevalace of Cobalamin Deficiency in the Framingham Elderly Population. Am J Clin Nutr. 60: 2-11.
75. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine Lowering Trialists Collaboration. BMJ, 316: 894-898, 1998.
76. Lowering blood homocysteine with folk acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine Lowering Trialists<sup>1</sup> Collaboration. BMJ 1998 ;316:894-8.
77. Lunec, J., Blake, D. (1990). Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes, P. 189- 212, Ed. R.D. Cojhen, Balliere Tindall, London.
78. Lussier S, Cacan S, Xhignesse M. (1996). Plasma Total Homocysteine in Healthy Subjects: Sex Spesific Relation with Biological Traits. Am J Clin Nutr. 64: 587-593.
79. Malinow M, Nieto F, Szklo M. (1993). Carotid Artery Intimae Medial Wall Thickening and Plasma Homocysteine in Asymptomatic Adults. Circulation. 87: 1107-1113.

80. Malinow MR. (1994). Homocysteine and Arterial Occlusive Disease (Frontiers in Medicine). *J Intern Med.* 236: 603-617.
81. Marangos PJ, Parma AM, Goodwin FK. Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase. *J Neurochem* 1978; 31: 727-732.
82. Marangos PJ, Schmechel DE. Neuron specific enolase, a clinically useful for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci* 1987; 10: 269-295.
83. Marangos PJ, Zis AP, Clark R, Goodwin FK. Neuronal non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res* 1978; 150: 117-133.
84. McCully KS. (1969). Vascular Pathology of Homocysteinemia. *Am J Pathol.* 56: 111-128.
85. Mineer SE, Evroski J, Cole D. (1997). Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism. *An Update Clin Bioch.* 30 (3):189-201
86. Miner SES, Evrovski J, Cole DEC. (1997). Clinical Chemistry and Molecular Biology of Homocysteine Metabolism: An Update. *Clin Biochem.* 30: 189-201.
87. Moore BW, McGregor D. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem.* 1965; 240: 1647-1653.
88. Morita Y, Absence of electrical activity of the pigeon's pineal organ in response to light. *Experientia,* 1966; 22: 402.
89. Morris M, Bostom G, Jacques P, Selhub J, Rosenberg I. (2001). Hyperhomocysteinemia and Hypercholesterolemia Associated with Hypothyroidism in the Thirt US National Healthy and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis.* 155: 195-200.
90. Morrison HI, Schaubel D, Desmeules M, Wigle DT. (1996). Serum Folate and Risk of Fetal Coronary Heart Disease. *JAMA.* 275: 1893-1896.
91. Mudd SH, Levy HL Disorders in . transsulfuration. In Scriver C. Beaudet AL: *The Metabolic and Molecular Basis of Metabolic Disease.* P. 1279-1327, 1995.

92. Nabila A, Olusegun AM, Aboyomi A. (2000). Homocysteine and Endogenous Markers of Renal Function in Type 2 Diabetic Patients without Coronary Heart Disease. *Diabetes Res Clin Pract.* 50: 177-185.
93. Nara T, Nozaki H, Nakae Y, Arai T, Ohashi T. Neuron-specific enolase in comatose children. *Am J Dis Child* 1988; 142(2): 173-174.
94. Naurath HJ, Joosten E, Riezler R, et al : Effects of vitamin B12 folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet* 1995; 346:85-9.
95. Nygard O, Vollset SE, Refsum H. (1995). Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. *JAMA.*224:1526-33
96. Nygard O, Vollset SE. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*, 274: 1526-1533, 1995.
97. ObekA. (1990). ig Hastahklan. Gunes Kitapevi. Bursa.
98. Ozguner F,Kerman M, Delibaş N, Gultekin F.The relationship of age related decrease in melatonin with oxidative damage and mental status. *Biomed Resn*2000; 11(1): 61-5.
99. Pieri c, Marra M, Gaspar R, Damjanovich S.(1997). Melatonin protects LDL from pxidation but does not prevent the apolipoprotein derivazation. *Biochem Biophys Res Commun.* 22: 203-209.
100. Pieri C, Marra M, Marcheselli F, et al. Melatonin: peroxy radical scavenger more effective- than vitamin E. *Life Sci*, 1994; 55: PL271.
101. Rabinowicz AL, Correale JD, Couldwell WT, DeGiorgio CM. CSF neuron specific enolase after methohexital activation during electrocorticography. *Neurology* 1994; 44: 1167-1169.
102. Refsum H, Helland S, Ueland PM. (1985). Radioenzymic Determination of Homocysteine n Plasma and Urine. *Clin Chem.* 31: 624-628.
103. Refsum H, Ueland P, Nygard O, Vollset SE. (1998). Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 49: 31-62.

104. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
105. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. (1991). Plasma Homocysteine in Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia. Changes During a Chemotherapeutic Regimen Including Methotrexate. *Cancer Res.* 51: 828-835.
106. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress; a review
107. Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, et al. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci*, 1994; 719
108. Reiter RJ, Trakulrunsi WK, Trakulrunsi C, et al. Pineal melatonin production: endocrine and age effects Melatonin Rhythm System, *Int. Symp.*, Bethesda, Md., 1981, pp. 143-154
109. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanism. *Horm Metab Res* 1997;29:363-372.
110. Reiter RJ. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol*, 1996; 134:412.
111. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals; a brief review. *Braz J Med Biol Res* 1993;26 1141-1155.
112. Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991;79:153-158.
113. Reiter RJ. The pineal gland and melatonin relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol*, 1995; 30: 199.
114. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction mammals. *Endocr Rev* 1980; 1:109-131.
115. Rene Malinow, Andrew G. Homocysteine, Diet, and Cardiovascular Disease, *Circulation*, 99:178-182, 1999.

116. Reppert SM, Perlow MJ, Tamarkin L, et al. A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinology*, 1979; 104:295.
117. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannuci E. (1996). Dietary Folate Vitamin B<sub>6</sub> and Vitamin B12 Intake and Risk of CHD among a Long Population of Men. *Circulation*. 93: 625.
118. Rimm EB, Willentt WC, Hu FB. (1998). Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA*.279:359-364
119. Schmechel DE, Brightman MW Barker JL. Localization of neuron specific enolase in mouse spinal cord neurons grown in tissue culture. *Brain Res* 1980; 181: 391-400.
120. Smechel DE, Brightman MW, Marangos PJ. Neuron switch from non-neuronal enolase (NNE) to neuronal enolase (NSE) during development. *Brain Res* 1980; 190: 195-214.
121. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, et al. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993,270:2693-8.
122. Selhub J, Jacques PF. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in a elderly population. *JAMA*, 270:2693-2698,1993.
123. Sirotkin AV, Schaeffer HJ, Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *J Endocrinol*, 1997; 154: 1.
124. Siu AW, Reiter RJ, To CH. The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J Pineal Res*, 1998; 24: 239.
125. Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH. (1993). Elevation of Serum Cystathionine Levels in Patients with Cobalamin and Folate Deficiency. *Blood*. 81: 3403-3413.
126. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. (1987). Quantitation of Homocysteine, Total Cysteine and Methionine in Normal Serum and Urine Using Capillary Gas Chromatography-mass Spectrometry. *Anal Biochem*. 162: 185-196.

127. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. (1987). Quantitation of homocysteine, totalcysteine and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 162:185-196
128. Stampfer MJ, Osborn JA, Jaraki M. (1993). Adverse Vascular Effects of Homocysteine are Modulated by Endothelium-derived Relaxing Factor and Related Oxides of Nitrogen. *J Clin Invest.* 91: 308-318.
129. Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA. Adrenergic signals direct rhythmic expression of the transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, 1993; 365: 314
130. Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, et al .Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr*, 2000;130:2238-2242.
131. Still RA, McDowell IF. *ACP Broadsheet No 152: March 1998. Clinical implications of plasma homocysteine measurement in cardiovascular disease. J.Clin Pathol* 1998;51:183-8.
132. Sugden D. Adrenergic mechanisms regulating pineal melatonin synthesis. *Advances in Pineal Res*, 1991; 5: 33.
133. Tan DX , Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ . (1993). Melatonin: A potent Endogenous Hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.* 1:57-60.
134. Tan DX, Reiter RJ, Chen LD, et al Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole in vivo *Carcinogenesis*, 1994;15:215
135. Todesco L. Angst C, Litynski P, et al; MTHFR polymorphism, plasma homocysteine and age. *Eur J Clin Invest* 1999; 29(12):1003-9
136. Trapp BD, Marangos PJ, Webster H. Immunohistochemical localization and developmental profile of neuron specific enolase (NSE) and nonneuronal enolase (NNE) in aggregating cell cultures of fetal rat brain. *Brain Res* 1981; 220:121-130.

137. Tsai JC, Peralla MA, Yarkizumi M. (1994). Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci. USA.*91: 6369-6373.
138. Turgut M, Ozkaya B. Pineal bölge tümörleri ve cerrahi yaklaşım şekilleri. *Arsiv*, 2000; 10: 100.
139. Ubbink JB, Becker PJ. Results of B- vitamin supplementation study used in a prediction model to define a reference range for plasma homocysteine. *Clin Chem*, 41: 1033-37, 1995.
140. Ubbink JB, Vermaak WJH, Von-der A, Becker PJ. (1993). Vitamin B<sub>12</sub>, Vitamin B<sub>6</sub> and Folate Nutritional Status in Men with Hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr.* 57: 47-53.
141. Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. (1992). Plasma homocysteine and cardiovascular disease. New York, Marcel Dekker. 183-236.
142. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH (1993): Total homocysteine in plasma or serum methods and clinical applications. *Clin Chem* 39 :1764-1779.
143. Ueland PM, Refsum H. (1989). Plasma Homocysteine a Risk Factor for Vascular Disease: Plasma Levels in Health, Disease, and Drug Therapy. *J Lab Clin Med.* 114: 473-501.
144. Upchurch GR, Welch GN, Freedman JE. (1995). Homocysteine Attenuates Endothelial Glutathione Peroxidase and Thereby Patients Peroxide Mediated Injury. *Circulation.* 92:1-28.
145. Vester B, Rasmussen K. (1991). High Performance Liquid Chromatography Method for Rapid and Accurate Determination of Homocysteine in Plasma and Serum. *Eur J Clin Chem Biochem.* 29: 549-554..
146. Vinore SA, Herman MM, Rubinstein LJ, Marangos PJ. Electron microscopic localization of neuron specific enolase in rat and mouse brain. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 1295-1302.
147. Wicken DEL, Dudman NPB. (1992). Homocystinuria and Atherosclerosis (Review). *Monogr Hum Genet.* 14: 311-324.
148. Wirz Justice A, Graw P, Krauchi K, et al. "Natural" light treatment of seasonal affective disorder. *J Affect Disord*, 1996; 37: 109.

149. Wouters MG, Moorrees MT, Van der Mooren MJ. (1995). Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest.* 25: 801- 805.
150. Wouters MG, Moorrees MT, Van der Mooren MJ. Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest.* 1995; 25:801-5
151. Yamamoto M, Hara h, Aadachi T. (2000). Effects of homocystene on the binding pf sxtacellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Let.*486: 159-162
152. Young SN, Gauthier S, Kiely ME, et al. Effect of oral melatonin administration on melatonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, indoleacetic acid, and cyclic nucleotides in human cerebrospinal fluid. *Neuroendocrinology*, 1984; 39: 87.
153. Yu L, Schaad NC, Klin DC. Calcium potentiates cyclic AMP stimulation of pineal arylalkylamine N-acetyl transferase, *J Neurochem*, 1993; 60: 1436.
154. Yuwiler A. Sympathetic innervation of the pineal gland: effect of thyroxine and cortisol. *Melatonin Rhythm System. Int. Symp.*, Bethesda, Md., 1981, pp. 42-61 (Basel, Karger; 1982).
155. Zeltzer PM, Marangos PJ, Sather H, Evans A, Siegel S, Wong KY, et al. Prognostic importance of serum neuron specific enolase in local and widespread neuroblastoma. *Adv Neuroblast Res* 1985; 175: 319-329.
156. Placer AZ, Linda LC, Johnson B (1996). Estamination of Product of Lipid Peroxidation (Malondialdehit) in Biochemical Systems. *Anal Biochem* 16:359-364.
157. Lawrence RA, Burk RF. (1976). Glutathione Peroxidase Activity in Selenium- deficient Rat Liver. *Bioch Bioph Res Commun.* 71:4,952-958.



## 8. ÖZ GEÇMİŞ

10.09.1962 yılında Bingöl'de doğdum. İlk , orta ve lise eğitimimi aynı şehirde tamamladım.1982 Yılında F.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 1986 yılında Biyolog olarak mezun oldum. 1987 yılında Gaziantep İli Devlet hastanesinde Biyolog olarak göreve başladım.1990 yılında Bingöl' e tayin oldum.Halen Bingöl Devlet Hastanesi Kan Bankası Sevisinde sorumlu olarak çalışmaktayım.2001 yılı bahar döneminde, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım.Evli ve üç çocuk babasıyım.