

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. M. Koray GÜMÜŞTAŞ

**CUPRİZON ile İNDÜKLENMİŞ
DENEYSEL MULTİPL SKLEROZ MODELİNE
ELLAGİK ASİT (*Punica granatum*) ve LİKOPENİN (*Lycopersicon esculentum*)
İNTRAGASTRİK UYGULAMASININ OKSİDATİF VE NİTROZATİF STRES
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**BİYOKİMYA
UZMANLIK TEZİ**

Dr. Berna YAVUZ

İSTANBUL-2010

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimim süresince eğitimime olan katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülden Burçak' a,

Tezimin gerçekleştirilmesi sırasında her konuda bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, eğitimim sırasında desteğini esirgemeyen, tüm problemleri hoşgörüsü ve sabrı sayesinde özgürce tartışabildiğim tez danışmanım Prof. Dr. M. Koray Gümüştas' a ,

Bilime, hayata ve insana bakış açısıyla kendime örnek aldığım, önceki danışman hocam olduğu andan itibaren her konuda maddi ve manevi desteğiyle hep yanımda olan Prof.Dr.Ahmet Belce'ye,

Uzmanlık eğitimim süresince özellikle laboratuvar bilgisini ve tecrübesini aktaran, manevi desteği ile de hep yanımda olan Prof. Dr. Ezel Uslu'ya, ve eğitimimde emeği olan tüm anabilim dalı hocalarıma,

Deney hayvanlarının temininde ve hayvan laboratuvarı çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Tuncay Altuğ ve Tıbbi. Bio. Çetin Karaca'ya,

Yoğun çalışmaları arasında bana vakit ayıran, hep güler yüzü sıcak ilgisiyle karşılaştığım, bilimsel bakış açısıyla örnek olan İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Büge Öz'e ve patoloji laboratuvarındaki desteği için Bülent Tata' ya,

Tezimin istatistik çalışmalarında destek olan Yrd. Doç. Dr. Penbe Çağatay'a,

Tanıdığım ilk günden beri gerek bilimsel yönüyle gerek hayat deneyimi ile maddi ve manevi desteğini hep gördüğüm, hayatıma güzel renkler katan sevgili arkadaşım Dr.Pınar Atukeren(PhD)'e,

Pek çok dersi, semineri ve güzel anıları paylaştığım çalışma arkadaşlarıma,

Uzun eğitim hayatım boyunca, her koşulda maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili anne, baba ve ağabeyime

Sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Berna YAVUZ

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir. Proje no: 2126

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
KISALTMALAR	vii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. MULTİPL SKLEROZ.....	3
2. 1. 1. Epidemiyoloji	3
2. 1. 2. Etiyoloji ve patogenezi	4
2. 1. 3. Histopatoloji	7
2. 1. 4. Klinik bulgular ve tanı.....	8
2.2. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER	10
2.2.1. Serbest radikaller	10
2.2.2. Reaktif oksijen türleri	10
2.2.3. Nitrik Oksit	15
2.2.4. Antioksidan savunma sistemleri.....	18
2.2.5. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri	20
2.3. BEYİN ve OKSİDATİF STRES	22
2.4. MULTİPL SKLEROZ VE OKSİDATİF STRES	24
2.5. LİKOPEN	26
2.6. ELLAGİK ASİT	27
2.7. CUPRİZON	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
3.1.KULLANILAN ALETLER VE KİMYASAL MADDELER.....	31
3.1.1. Aletler ve cam malzemeler	31
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	31
3.2. DENEY HAYVANLARINA UYGULANAN İŞLEMLER	33
3.2.1. Deney hayvanlarının genel özellikleri	33
3.2.2. Deney hayvanlarından çalışılacak örneklerin alınması	33
3.2.3. Beyin Dokusundan Histopatoloji Preparatlarının Hazırlanması	34
3.2.4. Doku homojenizasyonu	34
3.3. YÖNTEMLER	35

3.3.1. iNOS enzim aktivitesi tayini	35
3.3.2. Nitrotirozin miktar tayini.....	37
3.3.3. Miyeloperoksidaz miktar tayini.....	39
3.3.4. Total nitrit + nitrat miktar tayini.....	41
3.3.5. Tiyobarbitürik asitle reaksiyonlaşan maddelerin tayini.....	44
3.3.6. Süperoksid dismutaz aktivitesi tayini	45
3.3.7. Hemoglobin tayini	47
3.3.8. Protein tayini	47
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	49
4.BULGULAR	50
5.TARTIŞMA.....	63
6. ÖZET	66
7. SUMMARY	67
8. KAYNAKLAR	68
9. ÖZGEÇMİŞ	77

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 2.1: Reaktif oksijen türleri	12
Tablo 4.1: Deney gruplarının beyin dokusu TBARS düzeyleri	51
Tablo 4.2: Deney gruplarının plazma TBARS düzeyleri	52
Tablo 4.3: Deney gruplarının beyin dokusu SOD aktiviteleri.....	53
Tablo 4.4: Deney gruplarına ait eritrosit SOD aktivitesi.....	54
Tablo 4.5: Deney gruplarının beyin dokusu iNOS aktivitesi	55
Tablo 4.6: Deney gruplarının plazma iNOS aktivitesi	56
Tablo 4.7: Deney gruplarının beyin dokusu total nitrit+nitrat düzeyleri	57
Tablo 4.8: Deney gruplarının plazma total nitrit+nitrat düzeyleri	58
Tablo 4.9: Deney gruplarının beyin dokusu nitrotirozin düzeyleri	59
Tablo 4.10: Deney gruplarının plazma nitrotirozin düzeyleri	60
Tablo 4.11: Deney gruplarının beyin dokusu miyeloperoksidaz miktarları	61
Tablo 4.12: Deney gruplarının plazma miyeloperoksidaz miktarları	62

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1:Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen arjinin amino asidinden nitrik oksit sentezi	16
Şekil 2.2: Oksijen ve azot serbest radikalleri ve etkileşimleri	18
Şekil 2.3: Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu	21
Şekil 2.4: Likopenin yapısı	26
Şekil 2.5: Ellagik asitin yapısı.	28
Şekil 2.6: Cuprizonun kimyasal yapısı	29
Şekil 3.1. iNOS standart eğrisi	36
Şekil 3.2. Nitrotirozin standart eğrisi	39
Şekil 3.3. MPO standart eğrisi.....	41
Şekil 3.4. Nitrat standart eğrisi	43
Şekil 4.1: Gruplara ait beyin dokusu TBARS düzeylerinin karşılaştırılması.	51
Şekil 4.2: Gruplara ait plazma TBARS düzeylerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.3: Gruplara ait beyin dokusu SOD aktivitelerinin karşılaştırılması	53
Şekil 4.4: Gruplara ait eritrosit SOD aktivitelerinin karşılaştırılması.	54
Şekil 4.5: Gruplara ait beyin dokusu iNOS aktivitelerinin karşılaştırılması	55
Şekil 4.6. Gruplara ait plazma iNOS aktivitelerinin karşılaştırılması.	56
Şekil 4.7: Gruplara ait beyin dokusu total nitrit+nitrat düzeylerinin karşılaştırılması. 57	
Şekil 4.8: Gruplara ait plazma total nitrit+nitrat düzeylerinin karşılaştırılması.....	58
Şekil 4.9: Gruplara ait beyin dokusu nitrotirozin düzeylerinin karşılaştırılması.	59
Şekil 4.10: Gruplara ait plazma nitrotirozin düzeylerinin karşılaştırılması.....	60
Şekil 4.11: Gruplara ait beyin dokusu miyeloperoksidaz miktarlarının karşılaştırılması	60
Şekil 4.12: Gruplara ait plazma miyeloperoksidaz miktarlarının karşılaştırılması ...	62

KISALTMALAR

8-OHdG	: 8-hidroksi 2-deoksiguanozin
ASH	: Antijen sunucu hücre
BH₄	: Tetrahidrobiopterin
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Ca²⁺	: Kalsiyum
CPZ	: Cuprizon
DAE	: Deneysel allerjik ensefalomyelit
EA	: Ellagik asit
EBV	: Epstein Barr Virüs
ELISA	: Enzim bağlı immunosorbent testi
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
HLA	: Histo-kompatibilite lokus antijen
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HO₂·	: Hidroperoksil radikali
HOCl	: Hipokloröz asit
KBB	: Kan beyin bariyeri
MAG	: Myelin ilişkili glikoprotein
MBP	: Myelin temel (basic) protein
MHC	: Majör Histokompatibilite kompleksi
MPO	: Miyeloperoksidaz
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MS	: Multipl Skleroz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NO·	: Nitrik oksit radikali
NO⁻	: Nitroksil anyonu
NO⁺	: Nitrozonyum katyonu
N₂O	: Nitröz oksit
N₂O₃	: Azot trioksit
NO₂⁻	: Nitrit
NO₃⁻	: Nitrat
NO₂·	: Azot dioksit radikali

NOS	: Nitrik oksit sentaz
NT	: Nitrotirozin
OG	: Oligodendrosit
O₂NOO⁻	: Peroksinitrat
ONOO⁻	: Peroksinitrit (oksoperoksinitrit [-1])
O₂[•]	: Süperoksit radikali
OH[•]	: Hidroksil radikali
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
RO[•]	: Alkoksil radikali
ROO[•]	: Peroksil radikali
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RS	: Tiyil
RSO₂	: Sülfonil
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBARS	: Tiyobarbiturik asitle reaksiyonlaşan maddeler

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl skleroz (MS) genellikle genç erişkinde başlayan kronik bir hastalıktır. Patolojik olarak; merkezi sinir sisteminin (MSS) birden çok yerinde beyaz madde enflamasyonu, demiyelinizasyonu ve glial hasarı ile karakteristiktir. Oligodendrositler (OG); miyelin şekillenmesinden sorumlu hücreler, MS patogenezindeki hedef hücrelerdir .

MS' in MSS' nin birçok alanını etkilemesi sonucu klinikte de hastalarda birden çok belirtiyeye sebep olmaktadır. Ataklarda en sık görülen belirtiler; bir tarafta veya birden çok ekstremitede kuvvetsizlik, uyuşukluk, duyu bozukluğu, gözde ağrılı görme kaybı, çift görme gibi bulgular olabilir. MS klinik olarak tekrarlayan düzelen (relapsing-remitting) form en sık görülen klasik form olmak üzere, ikincil ilerleyici (sekonder progressif) form, birincil ilerleyici (primer progresif) form, ilerleyen tekrarlayan (progresif relapsing) form olarak sınıflandırılmıştır.

MS'in başlangıcındaki neden tam olarak açıklanamamakla birlikte MS plaklarının oluşumunda otoimmünite, genetik yatkınlık, infeksiyon gibi faktörlerin etkili olabileceği öngörülmüştür (1,2).

İmmün aracılı enflamasyon ve enflamatuvar şartlarda makrofaj ve mikroglialar tarafından reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmış üretimi hastalığın patogenezinde önemli mekanizmalar olarak gösterilmiştir. Bu mekanizmalar doğal olarak ROS aracılı hasara yatkın olan MSS'de, hastalığın ilerlemesine neden olan oligodendrosit ve nöron hasarına hatta hücre ölümüne katkıda bulunur (2,3).

Nitrik oksit (NO) enflamatuvar MS lezyonlarında normalden yüksek konsantrasyonlarda bulunmuş serbest radikaldir. Bu yüksek konsantrasyonun nedeni astrosit ve makrofajlardaki indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) varlığıdır. NO üretiminin belirleyicileri (ör: nitrit,nitrat) de MS hastalarının kan, idrar ve beyin omurilik sıvılarında artmış olarak bulunmuştur. Eldeki kanıtlar NO' un MS' in özellikleri olan kan beyin bariyerindeki bozulmada, OG hasarında, aksonal dejenerasyonda rolü olduğunu göstermektedir (4).

Likopen (*Lycopersion esculentum*); domateste doğal olarak bulunan bir karotenoiddir. Son çalışmalar likopenden zengin diyetin kanser ve kalp hastalıkları gibi pek çok kronik hastalık riskinin azaltılmasıyla ilişkisi olduğunu göstermiştir. Antioksidan özelliği ile oldukça dikkati çekmektedir (5,6).

Nar (*Punica granatum*); polifenolik, flavonoid antioksidanlar (antosiyantinler) açısından zengin potansiyel bir kaynaktır (7). **Ellagik asit (EA)** narda doğal olarak bulunan fenolik bir bileşiktir. Bütün fitokimyasallar arasında, antioksidan, antikanserojen, antimutagen özellikleri nedeniyle dikkati çekmektedir (8).

Bu tez çalışmasında amacımız bu bulgular ışığında, cuprizon verilerek deneysel MS modeli oluşturulan sıçanlarda (9); beyin dokusunda oksidatif ve nitrozatif hasarı enflamasyon bulgularını da değerlendirerek incelemek ve güncel antioksidanlar olarak domateste bulunan likopen ve narda bulunan ellagik asit uygulamasının hasara karşı koruyucu etkileri olup olmadığını ve oluşan hasarı ne ölçüde azalttığını biyokimyasal açıdan değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. MULTİPL SKLEROZ

MS, MSS'nin demiyelinizasyonla seyreden kronik enflamatuvar bir hastalıdır. Multifaktoriyel bir hastalık olarak tanımlanır ve hastalar duyuşal değişiklik, görme problemleri, kas zayıflığı ve koordinasyon bozukluğu, konuşma bozuklukları gibi çok çeşitli klinik semptomu sahiptir.

MSS' de akut fokal enflamatuvar demiyelinizasyon ve sınırlı remiyelinizasyonlu aksonal kayıp; kronik multifokal sklerotik plaklarla sonuçlanır ve MS' e ismini veren de bu plaklardır. Bu plakların patolojik özellikleri; kan-beyin bariyeri geçirgenliğinde artma, miyelin kılıf harabiyeti, OG hasarı ve hücre ölümü, aksonal hasar ve aksonal kayıp, glial skar oluşumu ve çoğunlukla lenfosit ve makrofaj içeren enflamatuvar infiltratların varlığı ile karakterizedir. Monosit türevi makrofajlar miyelin fagositozu yapar. Bu da miyelin kılıf, OG ve aksonların yıkımı ve hasarına neden olur. Ayrıca enflamasyon sırasında makrofajlardan sitokinler, kemokinler, NO, reaktif oksijen türleri gibi çeşitli enflamatuvar mediatörler salınır ki bunlar hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde rol oynarlar (10).

2. 1. 1. Epidemiyoloji

MS nadir bir hastalık değildir. Nörotravmanın ardından genç erişkinlerde en sık görülen nörolojik bozukluktur. Sadece ABD'de yaklaşık 350.000-400.000 doktorlarca tanı konmuş kişi vardır (11).

MS insidansı 20-30 yaşlar arasında pik yapar. İlk semptomların 10 yaşından önce ve 60 yaşından sonra görülmesi nadirdir. MS' in kadınlarda görülme olasılığı erkeklerden daha yüksek olup; kadınlar erkeklerden 1,4 ile 3,1 kat daha sık etkilenir (1). MS beyaz ırkta ve Avrupa kökenlilerde daha sık görülür (12).

Coğrafi özelliklere bakıldığında, dağılım düzensizdir. Çok sayıda epidemiyolojik çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi ile belirlenen yüksek, orta ve düşük prevalanslı coğrafi bölgeler tarif edilmiştir.

MS prevelans oranı $>30/100000$ olan coğrafi bölgeler yüksek, $5-29/100000$ arasında olan bölgeler orta ve $<5/100000$ olan bölgeler ise düşük prevelans alanları olarak sınıflandırılmıştır.

Kuzey Avrupa' nın çoğunluğu, ABD' nin kuzeyi, Kanada, güney Avustralya ve Yeni Zellanda yüksek prevelans bölgeleri; Ukrayna, Sibiryaya, ABD' nin güneyi, kuzey Avustralya, güney Akdeniz ülkeleri, güney afrika, Güney amerikanın orta bölümü, orta prevelans bölgeleri, Afrika' nın geri kalan bölümleri, Asya, Karaibler, Meksika, Güney Amerika' nın kuzeyi, Venezuelle ve Kolombiya düşük prevelans bölgeleri olarak katogeryze edilmiştir (13).

Genel bir kural olarak prevelans oranları enlem derecesi ile paralel artış göstermektedir. Kuzey yarım kürede güneyden kuzeye, güney yarım kürede ise kuzeyden güneye doğru prevelans artmaktadır (14).

Ülkemizde MS prevelansı ve insidansı tam olarak bilinmemekle birlikte, Kıbrıs Türk kesiminde yapılan bir epidemiyolojik çalışma sıklığın $24/100000$ olduğunu ortaya koymuştur. Türkiye hastalığın sık görüldüğü Kuzey Avrupa ile nispeten seyrek görüldüğü Asya arasında seyrek bir bölgede yer almaktadır, ülkemizde sıklığın 2500 kişide 1 olduğu tahmin edilmektedir (12).

2. 1. 2. Etiyoloji ve patogenezi

MS' in etiyojisi bilinmemektedir. MS' in; genetik olarak yatkın bireylerde; çevresel faktörler, viral ya da bakteriyel ajanlar, enflamatuvar ve otoimmün cevap sırasında salgılanan sitokinler ve henüz tanımlanamayan bazı etiyojistik ajanların kombinasyonu sonucu gelişen bir hastalık olduğu düşünülmektedir (1,3).

MS' de ailesel olgular, epidemiyolojik veriler, genetik analiz multijenik kalıtımsal bir yatkınlığı destekler. MS' li bireylerin birinci, ikinci ve üçüncü derece akrabalarının genel nüfusa göre daha fazla MS geliştirme riski taşıdığı gösterilmiştir. MS' li olgular arasında en az %15-20' sinin etkilenmiş bir akrabası bulunurken, birinci derece akrabalarda risk %3-5 arasındadır. Monozigot ikizlerde eş hastalanma oranı %25, dizigotlarda ise %2,4' tir; yani aynı yumurta ikizlerinin ikiz eşinde çift yumurta ikizlerine göre multipl skleroz geliştirmeye daha yatkın olduğu gösterilmiştir (1,12). Evlat edinilmiş çocuklarla ilgili çalışmalardan elde edilen

sonuçlar göstermiştir ki, evlat edinilmiş bireylerin erken çocukluk döneminden başlayarak; MS' li bireylerle büyümesine karşın genel nüfusa göre daha fazla MS geliştirmemiştir. Bu MS' in ortak aile çevresinde yetişmekten çok genetik materyalin paylaşımı ile ilgili olduğunu düşündürür (15).

MS'de genetik yatkınlığı destekleyen bir diğer kanıt da belli histo-kompatibilite lokus antijenlerinin (HLA) MS'lilerde kontrol gruba göre daha sık görülmesidir. En önemli ilişki 6. kromozomun kısa kolundaki DR lokusundadır (14). MS, farklı popülasyonlarda farklı HLA antijenleriyle ilişki göstermektedir. Türkiye'de çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir; yapılan çalışmalarda DR2-DR4 ve DQ2- DR14 ilişkileri saptanmıştır (16).

MS'in başlamasında ve ilerlemesinde enfeksiyonların da rolü olduğu dşnlmektedir. MS' e neden olduğu düşünülen olası patojenler kızamık virüsü, Klamidya Pnömoni, Human Herpes virüs 6 ve Epstein Barr virüstür (EBV)(14,15). Heterofil EBV antikoru pozitif olan Danimarkalılar da MS için artmış risk olduğu gösterilmiştir (15).

MS klinik görünüm ve patolojik özellikler bakımından heterojen bir hastalıktır. Oligodendrositler; MSS'nin miyelin sentezinden sorumlu hücreler, MS patogenezinde hedef hücrelerdir. MS' in başlangıcındaki neden halen bilinmemekle birlikte son çalışmalar, mikroglial aktivasyonun oligodendrosit apoptozunda birincil neden olduğunu ileri sürmektedir. Ardından, T hücreleri ve makrofajlar aktive olur ve lezyon bölgesine göç ederler (2).

MS ile ilgili patolojik mekanizmalar arasında immün aracılı enflamasyon ve oksidatif stress yer alır (2,4).

MS' te en fazla kabul gören patogenetik teori genetik olarak yatkın bireylerin çocukluk çağından itibaren infektif bir ajan, g veya aşılama gibi çevresel bir etmenle karşılaşması sonucu başta miyelin proteinleri olmak üzere tüm MSS elemanlarına karşı gelişen otoimmün olayların ortaya çıkmasıdır. MS hastalarının serum ve BOS örneklerinde miyelin temel proteine (MBP) karşı otoantikor gözlenmesi bu görüşü desteklemektedir. MBP' ye, diğer proteolipitlere reaktif T lenfositlerin ve otoantikorların hastalığın aktivitesiyle arttığı gözlenmiştir. RT Jonson çok farklı virüslerin (kızamık-kızamıkçık-varisella) T lenfositlerin MBP' ye karşı sensitizasyonuna neden olduğunu bulmuştur. Ayrıca viral enfeksiyonlar ve MSS' deki otoimmün reaksiyonların MSS' de otoantijenlerin anormal ekspresyonu ile

ilişklendirilebileceğini ileri sürmüştür. Bu da T lenfositlerin hem myelin kılıfta hem de virüste benzer bir yapıyı tanıdığı anlamına gelmektedir (14).

MS, esas olarak T lenfosit aracılı enflamatuvar bir hastalıktır. İmmün olaylar self yada nonself antijen tanınması ve T lenfosit aktivasyonu ile başlar. Bu aktivasyondan sorumlu olan mekanizmalar; moleküler benzerlik, sitokinler ve süper antijenlerdir (14). Ardından aktif T hücreleri kan beyin bariyerini (KBB) geçip MSS' ye girer. Aktive olmuş immün hücrelerin taşıdıkları selektin ile KBB' deki ligandlar ile etkileşerek hücrelerin endotel üzerinde yuvarlanır, integrin adezyon molekülleri ile bağlanıp tutunurlar. Aktive immün sistem hücreleri, endotel hücreleri veya hasarlı doku tarafından salgılanan kemokinler integrin aktivasyonunu arttırarak, daha güçlü bir tutunmaya katkıda bulunurlar. İmmün sistem hücrelerince "matriks metalloproteinazlar" gibi enzimlerin salınımı da bazal membranın yapısını bozarak, dokuya infiltrasyonu kolaylaştırır. Bu mekanizmalar MS' te KBB nin geçirgenliğini arttırıp aktive hücrelerin infiltrasyonunu kolaylaştırır.

İnflamasyondaki bundan sonraki adım, MSS' de T hücrelerinin reaktivasyonudur. Otoreaktif T hücreleri MSS' de antijen sunucu hücrenin (ASH'nin) MHC Sınıf-II molekülünde yerleşmiş olan otoantijenlerini tanır ve reaktive olurlar. Tüm olayların başında immün tetiklenmeyi MSS' ne giren otoreaktif T hücreleri başlatırken zamanla diğer enflamatuvar hücreler ve aktif glia hücreleri de rol alır. Tetiklenme esnasında lenfotoksin, IFN- γ , TNF- α ya büyük rol düşmektedir. Özetle, fizyolojik dönüşüm esnasında komşu OG ve miyelin kılıftan salınan yeterli miktarda miyelin bulunduğu zaman otoreaktif T hücreleri lokal olarak bulunan ASH'lerce reaktive olabilirler. Reaktive olan T hücrelerden salınan proenflamatuvar sitokinlerle diğer lokal hücreler, MHC Sınıf-II ve kostimülatör molekülleri üretebilecek bir farklılaşmaya girerler ve hiyerarşik bir düzenle MSS de ASH fonksiyon gösterimi tetiklenmiş olur. Miyelin kılıfına ait hasarın antikor, makrofaj, mikroglia, TNF- α , sitotoksik T hücre aracılı ve direkt OG zedelenmesi sonucu oluştuğu bilinir.

Miyelin yüzeyine bağlanan antikorlar komplemanı aktive eder, makrofaj ve mikrogliaları ortama çekerler. Makrofajlar fiziksel olarak miyelini harap eder ve ürettikleri reaktif O₂ radikalleri, TNF- α gibi enflamatuvar medyatörler ve komplemanı uyararak demiyelinizasyona neden olurlar. İnflamatuvar sitokinlerle üretimi tetiklenen NO de bu patogeneizde rol alır.

Makrofaj, mikroglia aracılı demiyelinizasyon ise miyelin spesifik antikor ve T hücreleri yokluğunda bile olur. Makrofajlar ürettikleri proteolitik enzimler, sitokinler, kemokinler, aktif O₂ molekülleri, serbest radikaller, çok sayıda sitotoksik, proenflamatuvar maddelerle ve kompleman komponentlerini de uyararak demiyelinizasyon patogenezinde rol alırlar. Ayrıca aktive makrofajlar KBB' yi bozarak ve ürettikleri sitokinler ile enflamatuvar hücreleri artırarak enflamasyon aracılı demiyelinizasyonun daha da ağırlaşmasını sağlarlar. Makrofajlar, MS lezyon oluşumunun başlangıç fazında lokal oluşan ROS, KBB hasarını indükleyebilir ve lökosit migrasyonunu artırır.

İnflamatuvar demiyelinizasyonla birlikte MSS mikroçevresindeki değişiklikler, immün moleküller ve enflamatuvar araçlar akson zedelenmesine, akson zedelenmesi ise klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olur (17-19).

2. 1. 3. Histopatoloji

MS' de lezyonların histopatolojisi; fokal enflamasyon, demiyelinizasyon, oligodendrosit kaybı, remiyelinizasyon ve reaktif astrogliazdır. Aksonlar görece korunmuş ve sinir hücre gövdesi sağlamdır.

Skleroz ve enflamatuvar aktivite temel alınarak MS plakları kronik plak, kronik aktif plak, akut plak, gölge(shadow) plak olarak dört grupta incelenir (20).

Aktif demiyelinizan MS lezyonlarının patolojik olarak incelenmesi, demiyelinizasyon gelişiminde farklı mekanizmaların varlığını ortaya koymuştur. Lezyonların büyük kısmında T lenfosit ve makrofajlardan oluşan enflamatuvar reaksiyon saptanmasına rağmen, oldukça farklı miyelin paternleri gözlenmiştir. Bu bulgulara göre MS' de dört farklı patern tanımlanmıştır (21).

Buna göre;

Patern I: Makrofajla ilişkili demiyelinizasyon,

Patern II: Makrofajla ilişkili demiyelinizasyon ve aktif miyelin yıkım alanlarında gözlenen immünoglobulin ve kompleman birikimi,

Patern III: Makrofajla ilişkili demiyelinizasyon, miyelin ilişkili glikoprotein (MAG) kaybı ve oligodendrosit apoptozu,

Patern IV: Makrofajla ilişkili demiyelinizasyon ve beraberinde peri-plak ak maddede oligodendrosit dejenerasyonu ile karakterizedir.

2. 1. 4. Klinik bulgular ve tanı

Hastalığın iki karakteristik özelliği vardır; ataklar ve düzelmelerle seyretmesi, MSS'de birden fazla lezyona ait klinik belirti ve bulguların ortaya çıkmasıdır. Semptom ve bulgular çeşitlidir ve spinal kordtan serebral kortekse kadar nöroaksisin herhangi bir bölümünün hasarı sonucu gelişen tüm semptomları içerdiği görülür (1).

-Duyusal belirtiler: Multipl skleroz hastalığında en sık karşılaşılan ilk belirti duyuşal belirtilerdir. Duyu kaybı, paresteziler, dizesteziler ve hiperesteziler sıktır.

-Motor belirti ve bulgular: Paraparezi, kuadriparezi, hemiparezi,, bir ekstremitede zaaf sık karşılaşılan motor belirti ve bulgulardandır. Piramidal yol işlev bozukluğuna sık rastlanır; spastisite ve refleks artışına neden olur.

-Görme ile ilgili belirtiler: Hastaların %17' sinde optik nöropati MS' in başlangıç belirtisidir; ve % 50' den fazla hasta yaşam sırasında bir optik nöropati atağı geçirebilir. En sık karşılaşılan belirti bir gözde birkaç gün içerisinde gelişen görme azalmasıdır.

-Serebellar bulgular: Serebellar yollar sık etkilenir. Belirtiler dismetri, disdiadokinezi, aksiyon tremoru, kompleks motor hareketlerin bozulması ve denge kaybıdır.

-Duygulanım bozuklukları: Duygulanım bozuklukları MS'de normal popülasyondan daha sık görülür. Anksiyete ve depresyonu içerir.

-Otonomik bulgular: Hastalarda büyük oranda mesane, barsak fonksiyonlarının etkilendiği bildirilmektedir. Mesane fonksiyon bozukluğu sık idrara gitme, yetiştirememe ile kendini gösterir. Genellikle kalıcıdır. Barsak fonksiyon bozukluğu ise sıklıkla kabızlık olarak karşımıza çıkar. Hastaların 2/3'ünde cinsel işlev bozukluğu tariflenmektedir. Cinsel işlev

bozukluğu erkeklerde ereksiyon sağlamada ve sŸrdŸrmede gŸçlŸk, kadınlarda vajinal his azalması Ÿeklinde ortaya çıkar.

Bu bulgular dıŐında hastalığın seyrinde yorgunluk, epileptik nŸbetler, hemiataksi, Lhermitte bulgusu, trigeminal nevralsi, tonik spazmlar ve hemifasial spazm gibi belirtiler gŸrŸlebilir.

Hastalığın klinik gidiŐinde temel olarak 4 değişik form belirlenmiştir: (1,11)

1. Relapsing-remitting (RR); tekrarlayan dŸzelen,
2. Progresif relapsing (PR); ilerleyen tekrarlayan,
3. Primer Progresif (PP); birincil ilerleyen,
4. Sekonder Progresif (SP) ; ikincil ilerleyen.

MS tanısı diğer tŸm nedenler dıŐlandıđında, klinik veriler eŐliđinde , zaman ve mekan içerisinde dađılmıŐ ak madde lezyonlarının gŸrŸlmesine dayanır. MRG, uyarılmıŐ potansiyeller ve beyin omurilik sıvısı (BOS) incelenmesi klinik tanısı kesin olmayan olgularda tanıyı desteklemeye yardımcı olabilir (11).

2.2. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER

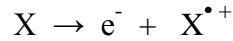
Oksidatif stres, oksidan (ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS)) ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin, oksidan maddelerin lehine kayması olarak tanımlanmaktadır (22).

2.2.1. Serbest radikaller

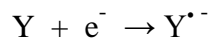
Serbest radikaller; dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler (23). Eşleşmemiş elektronları nedeniyle son derece reaktif bir yapıya sahip olabilen serbest radikaller, diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerek elektron kaybetmelerine neden olurlar (3).

Serbest radikaller başlıca üç yolla oluşur (24):

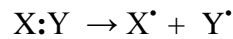
-Radikal özelliği olmayan bir atom veya molekülün, bir elektron kaybetmesi ile



-Radikal özelliği olmayan bir atom veya molekül yapısına tek bir elektron transferi ile



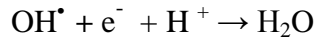
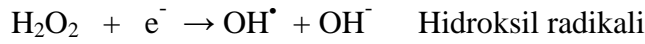
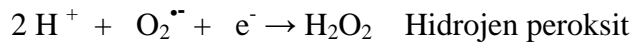
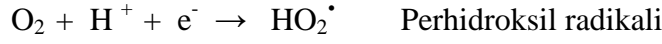
-Kovalent bağın kırılması sonucunda, bağ yapısındaki eşlenmiş elektronlardan her birinin molekülün her bir parçasında kalması ile (homolitik fisyon).



2.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Aerobik organizmalar yaşamları için gerekli enerjiyi sağlamak amacıyla karbon ve hidrojenden zengin molekülleri okside etmek için oksijene mutlak gereksinim duyar.

Hücre kendisi için enerji sağlarken oksijen hücrede bir dizi reaksiyon ile indirgenerek suya dönüşür. Fakat bu süreçte oksijenin % 2-3 kadarı suya dönüşmeyip oksijen kaynaklı radikaller oluşur. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit oluşur. Üçüncü elektronun eklenmesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali, dördüncü elektron eklenmesi ile su oluşur (25).



İnsan vücudunda serbest radikallerin fizyolojik koşullarda oluşturulduğu birçok mekanizma ve metabolik yol vardır. Bu endojen kaynaklar;

- Mitokondriyal elektron transport zinciri,
- Mikrozomal elektron transport zinciri,
- Karışık fonksiyonlu oksidazlar (ksantin oksidaz gibi),
- Solunum patlaması,
- Prostaglandin sentezi,
- Otoksidasyon olarak sayılabilir.

İnsan vücudunda maruz kalınan anormal koşullara bağlı olarak da serbest radikaller üretilebilir. Bu ekzojen kaynaklar;

- Diyet faktörleri,
- Çevresel faktörler,
- İlaçlar olarak sayılabilir (26).

Oksijenli ortamda, çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oluşan ROS; hücrel protein, karbonhidrat, nükleotid ve lipidler ile reaksiyona girerek yapı ve fonksiyonlarında modifikasyona neden olur. Oluşan zarar verici biyokimyasal reaksiyonlar kanser, ateroskleroz, enflamasyon, nörodejenerasyon gibi bir çok kronik hastalığın, hatta yaşlanmanın patogenezine katkıda bulunan önemli faktörlerdir (27).

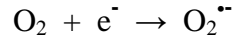
ROS' lar tablo 2.1.de gösterilmiştir (24).

Tablo 2.1: Reaktif oksijen türleri

Radikaller	Non-Radikaller
Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH^{\bullet})	Hipokloroz asit ($HOCl$)
Alkoksil radikali (RO^{\bullet})	Ozon (O_3)
Peroksil radikali (ROO^{\bullet})	Singlet oksijen ($O_2^{\downarrow \uparrow}$)
Perhidroksil radikali (HO_2^{\bullet})	

Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur.



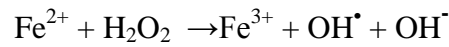
Süperoksit radikalının aerobik canlı organizmalarda en önemli kaynağı mitokondriyal elektron transport sistemidir. O_2 varlığında ksantin oksidaz' ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH' nin NADPH oksidaz ile oksidasyonu da oluşabilir. Süperoksit radikali hidrojen peroksit oluşumu için de öncü molekül olarak görev alır (24, 25, 27).

Hidroksil radikali (OH[•])

Bilinen en reaktif oksijen radikali hidroksil radikalidir. Hidroksil radikali (OH[•]), canlılarda çeşitli mekanizmalarla oluşabilir (24):

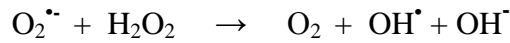
- **Fenton** reaksiyonu ile,

Hidrojen peroksit, Fe²⁺ ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek hidroksil radikalini oluşturur.

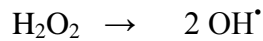


- **Haber – Weiss** reaksiyonu ile,

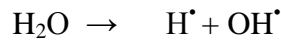
Hidrojen peroksit, süperoksit radikali ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Bu reaksiyon bakır ve demir iyonları tarafından katalizlenir.



- Hidrojen peroksitlerin oksijen bağlarının ultraviyole etkisiyle homolitik yarılmaları sonucu hidroksil radikali oluşabilir.



- Hidroksil radikalleri ayrıca suyun yüksek enerjili iyonizasyonu (iyonizan radyasyon) sonucu da oluşabilmektedir.



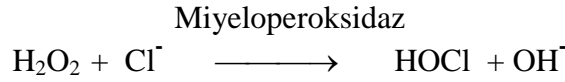
Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit (H₂O₂) yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden radikal değildir.

Hidrojen peroksit; oksijenin, enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesiyle ya da süperoksit radikallerinin, enzimatik veya non-enzimatik dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Biyolojik önemi hidroksil radikali için kaynak oluşturmaktadır. Fe^{2+} ile hidrojen peroksit reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur (Fenton reaksiyonu) (24, 25, 28).

Hipokloroz asit (HOCl)

Hipokloroz asit de (HOCl) radikal olmayan ROS'lar arasında yer alır. Aktive olmuş nötrofillerde miyeloperoksidaz enzimi tarafından üretilir. Miyeloperoksidaz hem içeren , sitoplazmik bir enzimdir. Hidrojen peroksit ve klor iyonlarından hipokloroz asit oluşumunu katalizler.



Fagositozla bakterilerin öldürülmesinde önem taşır. Ancak yüksek reaktivitesi ve direk veya klorin salınımıyla biyomoleküllere zarar verebilmesi açısından dikkat çekmektedir (24, 25).

Singlet Oksijen ($O_2^{\downarrow\uparrow}$)

Singlet oksijen eşlenmemiş elektronu olmaması nedeniyle bir radikal değildir. Bununla birlikte çok reaktif olması nedeniyle serbest radikal sayılmaktadır. Singlet oksijen oluşumu fotokimyasal reaksiyonlarda oldukça önemlidir (25).

Singlet oksijen süperoksit radikalinden ve hidroksil radikalinden üretilebilir. Delta ve sigma olarak iki tipi mevcuttur. Delta tipi termodinamik olarak daha stabil olduğundan daha yaygındır. Sigma tipi ise hızla delta tipine dönme eğilimindedir. Singlet oksijen membran lipidlerini de içeren birçok molekülü oksitleyebilir (23).

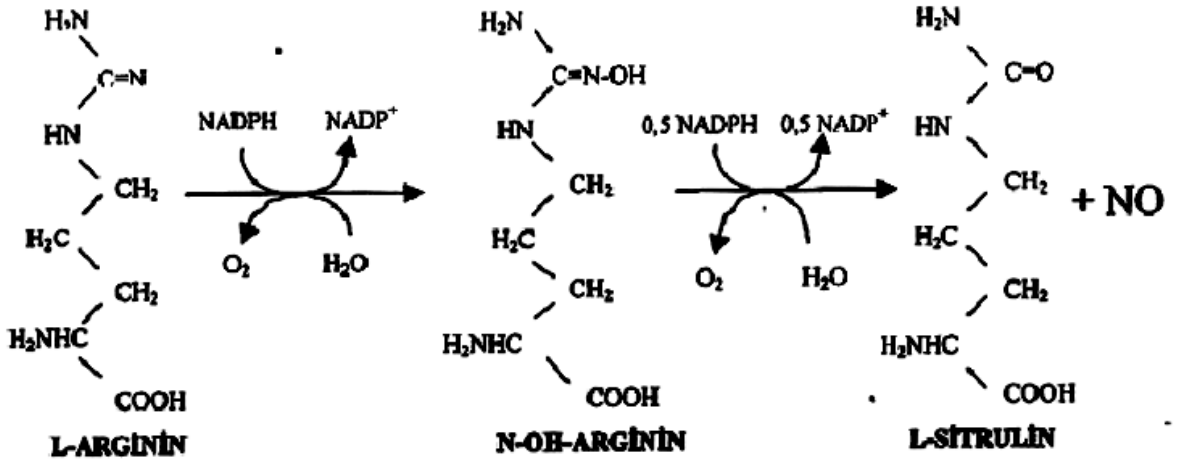
2.2.3 Nitrik Oksit (NO)

NO; nitrojen monoksit olarak da adlandırılan renksiz bir gazdır. Suda ve daha kolay bir şekilde organik çözücülerde çözünebildiğinden hücre zarlarından kolaylıkla geçebilmektedir (24).

NO' un sinir sistemi ve vasküler sistemde önemli bir çok fizyolojik rolü vardır. Sinir sisteminde nörotransmisyon ve nöromodülasyonda; vasküler sistemde kan basıncının kontrolünde, trombosit agregasyonunu ve adezyonunu önlemede rol almaktadır. İmmün sistem hücrelerinde spesifik olmayan savunma mekanizmalarına ve makrofaj aracılı hücre ölümüne katılır (24). NO antitümör, sitotoksik ve antimikrobiyal etkilerini yüksek konsantrasyonda gösterir. Düşük konsantrasyonlarda guanilat siklazı sitimüle eder ki; bu mekanizma ile kan akımındaki ve kan basıncındaki etkiden, nöronal sinyal iletiminden ve nöroendokrin aktiviteden sorumludur. NO sepsis, artrit, vaskülit, bazı otoimmün hadiseler astım, esansiyel hipertansiyon gibi bazı patolojik mekanizmalara da katılır (23).

NO, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektronu bulunması nedeniyle radikal özelliği taşır (24). Nitrik oksit radikalinde (NO[•]) paylaşılmamış elektron nitrojen atomu üzerinde yerleşik değil; nitrojen ve oksijen atomları üzerinde delokalize bir halde bulunur. NO radikalinin bu özelliği kendi reaktivitesini baskılar, stabilitesini artırır ve biyolojik koşullarda sentezlendiği yerden daha uzak mesafeye difüzyonunu sağlar. Oksi radikallerde paylaşılmamış elektron tek atom üzerinde lokalize olduğundan, bu radikaller son derece reaktif, kısa ömürlü ve kısıtlı difüzyona sahiptirler (29). NO' nun eşlenmemiş elektronu bir elektron oksidasyonu aracılığı ile kalkarsa nitrosonyum katyonu (NO⁺) oluşur. NO bir elektron ile indirgenirse nitroksil anyonu (NO⁻) oluşur (29). Nitrik oksit radikali diğer ROS gibi unstabil bir moleküldür ve hemoglobin, miyogloblin, oksijen veya süperoksitle çabukça reaksiyona girer (23).

NO, nitrik oksit sentaz enzim ailesi tarafından (NOS) bir aminoasit olan L- arginin' in L- sitrülün'e dönüşümü sırasında meydana gelir. NO'nun arjininden sentezi iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında arjinini guanido nitrojeni (N⁰) hidrksillenerek oldukça stabil N⁰-Hidroksi arjinin oluşur. Enzime sıkı bağlı ara ürün ikinci aşamada sitrulin ve nitrik okside çevrilir (29). Sentez için oksijen gerekir ve flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), tetrahydrobiopiterin (BH₄) ve hem kofaktör olarak tepkimeye katılır (24).



Şekil 2.1: Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen arjinin amino asidinden nitrik oksit sentezi (29).

NOS' un indüklenebilir form, endotelial form ve nöronal form olmak üzere üç izoenzimi vardır. İsimlendirmeler NOS' un ilk tanımlandığı hücreye göre yapılmıştır.

Basitçe iki temel gruba ayrılır:

1. Konstittif NOS (cNOS)
 - a. Nöronal NOS (nNOS; tip I)
 - b. Endotelial NOS (eNOS; tip III)
2. İndüklenebilir NOS (iNOS; tip II)

Her izoform ayrı bir genin ürünüdür; insan eNOS geni 7. kromozoma, nNOS geni 12. kromozoma, iNOS geni 17. kromozoma lokalizedir. NOS formları geniş bir dağılım gösterir ve ekspresyonu lokal faktörlere göre up veya down regule edilir.

cNOS formları kalsiyum ve kalmoduline mutlak bağımlıdır. Hücre içinde artan Ca²⁺; kalmoduline bir kompleks oluşturarak eNOS'ı aktive eder. Endotel hücresi tarafından sentezlenen NO, guanilat siklezı aktive ederek düz kaslarda gevşemeye neden olur. nNOS ise beyin ve periferik nöronlarda salınan izoenzimdir. Nörotransmitter veya nöromodülatör olarak etki eder. cNOS enzimi düşük miktarlarda (pikomol düzeyinde) ve kısa süreli NO sentezine yol açar (29, 30).

iNOS; ilk olarak murin makrofajlarında tespit edilmiştir. Enzim indüksiyonu çeşitli bakteriyel ürünlere ve proenflamatuvar sitokinlere bağımlıdır. Enzim aktivitesi transkripsiyonel olarak regüle edilir. iNOS alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyarken, aktivitesi için hücre içi kalsiyum derişimini arttırması gerekli değildir (29).

iNOS' un, çeşitli uyarılara cevap olarak MSS' nin astrosit ve mikroglialarını da içeren değişik hücrelerden salındığı gösterilmiştir. Astroglialar ve mikroglialar sağlıklı beyinde iNOS eksprese etmezler. Fakat iskemik, travmatik, nörotoksik veya enflamatuvar hasardan sonra iNOS ekspresyonu görülür (31).

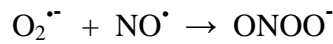
NO' un parçalanma ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrattır (NO_3^-). Nitrit kanda oksihemoglobin tarafından hızlıca plazmada baskın bulunan form olan nitrata okside edilir. *in vitro*; NO' un kararlı metabolitleri olan nitrit ve nitrat NO varlığını indirekt olarak göstermede kullanılır (29).

Nitrik oksit ve nitrozatif stres

Reaktif nitrojen türlerinin fazla üretilmesi nitrozatif stres olarak adlandırılır.

Nitrozatif stres nitrozilasyon reaksiyonlarına neden olur ve proteinlerle etkileşerek yapı ve fonksiyon bozukluğuna neden olabilir (32).

İmmun sistem hücreleri, enflamatuvar süreçlerde süperoksit anyonu ve nitrik oksidi solunum patlaması sırasında birlikte üretir. Bu şartlar altında NO ve süperoksit anyonu birbirini etkileyerek daha aktif peroksinitrit anyonunun anlamlı miktarda üretimine neden olabilir (32).



Biyolojik koşullarda üretilen süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz enzimi tarafından hidrojen perokside çevrilir. Fakat yukarıdaki tepkimenin hızı, SOD enziminin katalizlediği dismutasyon tepkimesinden daha hızlıdır. Bu nedenle ortamdaki peroksinitrit miktarı biyolojik sonuçlara neden olabilecek miktardadır. Oldukça toksik peroksinitrit lipidleri, proteinleri, DNA ve karbonhidratları oksitleyebilir ve nitratlayabilir (29).

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak başlıca iki gruba ayrılırlar. Bu antioksidanlardan enzimler, düşük moleküler ağırlıklı moleküller ve enzim kofaktörlerini içeren kısmı endojen olarak üretilir. Non enzimatik antioksidanlar ise çoğunlukla diyet kaynaklıdır. Antioksidan enzimler oksidatif stresin neden olduğu şiddetli akut hasara karşı koymada daha kuvvetli ajanlardır (35).

Antioksidanlar:

1. Enzimatik antioksidanlar;

Temel enzimler; SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz

Yardımcı enzimler; glutatyon reduktaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz

2. Enzimatik olmayan antioksidanlar;

Mineraller; çinko, selenyum

Vitaminler; vitamin A, vitamin C, vitamin E, vitamin K

Karotenoidler; β -karoten, likopen, lutein

Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar; glutatyon, ürik asit

Antioksidan kofaktörler; koenzim Q

Polifenoller

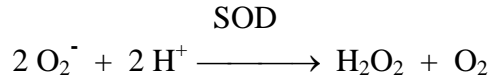
Flavonoidler; kuarsetin, kateşin

Fenolik asitler; gallik asit, ellagik asit olarak sınıflandırılabilir (35).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Serbest radikallere karşı ilk savunma süperoksit dismutaz enzimleri ile gerçekleşir. Doğada bulunan en kuvvetli antioksidandır (35).

SOD süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizleyen metalloenzimler ailesindedir (10).



SOD' un sitozolik CuZn-SOD, mitokondrial Mn-SOD ve ekstrasellüler SOD olmak üzere üç izoenzimi vardır.

Serbest radikallerin ana kaynağı ve ana hedefi olan mitokondride Mn-SOD enzim ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir (35).

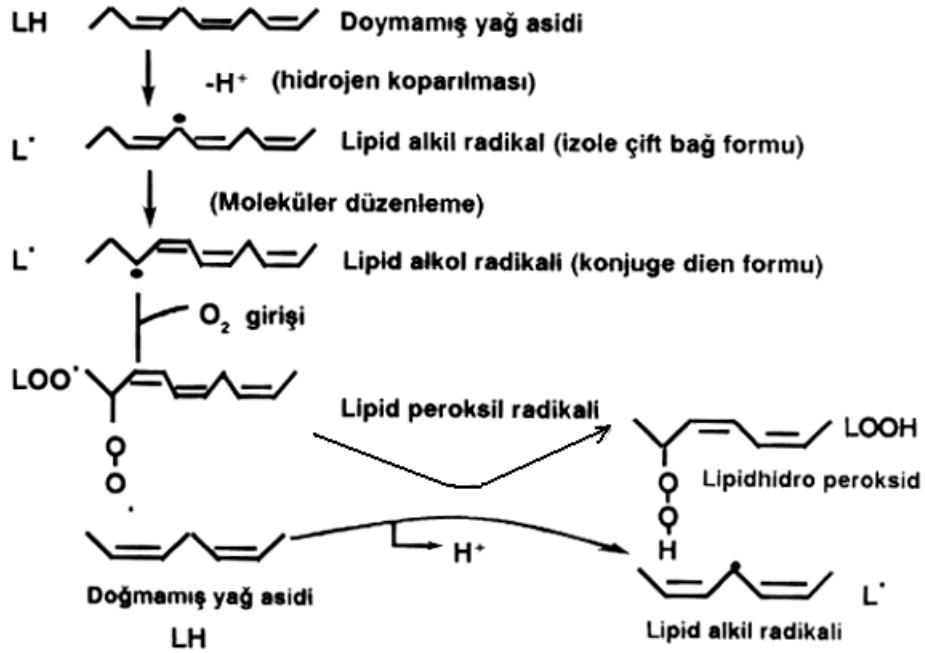
2.2.5. Serbest radikallerin lipitlere etkileri

Lipid peroksidlerinin oluşum kaskadındaki ilk zincir reaktif serbest radikalın, membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki metilen (-CH₂-) grubundan hidrojen atomunu koparması ile başlar. Tek elektron içeren hidrojen atomunun koparılmasıyla, çiftleşmemiş elektron içeren karbon merkezli lipid radikali (L[•]) geride kalır. Yağ asidinde çift bağ varlığı, C-H bağı zayıflatarak H⁺ atomunun kopartılmasını kolaylaştırır.

İlk hidrojen atomunu kopartacak reaktivitedeki radikaller, hidroksil (OH[•]), alkoksil (RO[•]), peroksil (ROO[•]) ve hidroperoksil (HO₂[•]) dir. Süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit bu reaksiyonu başlatamaz. İlk hidrojen atomunun koparıldığı basamak başlangıç basamağı olarak adlandırılır.

Karbon merkezli lipid radikali moleküler yeniden düzenleme ile konjuge dien formuna dönüşür. Konjuge dien moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini (LOO[•]) oluşturur. Lipid peroksil radikalinin kendisi bir başka yağ asidinden hidrojen atomunu kopararak lipid hidroperoksidi ve yeni bir lipid alkil radikalini oluşturarak yeni bir zincir reaksiyonu başlatabilmektedir. Lipid peroksidleri, fizyolojik koşullarda nispeten kararlı moleküllerdir fakat geçiş metalleri veya metal komplekslerinin katalizörlüğünde parçalanabilirler. İndirgenmiş metal iyonları (Fe²⁺ ve Cu⁺), lipid hidroperoksidi ile reaksiyona girerek alkoksil radikalini, okside metal iyonları ise (Fe³⁺ ve Cu²⁺) daha yavaş bir reaksiyonla

alkoksil ve peroksil radikallerini oluşturmaktadır. Her iki radikal de, başka yağ asitlerinden hidrojen atomu kopartarak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu sürdürebilir (23,25,32) .



Şekil 2.3: Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu (25).

Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu, iki lipid peroksit radikalinin etkileşmesi sonucu siklik peroksidi (LOOL) ve aldehit ürünleri oluşturması ile son bulur (23,25).

Biyolojik membranlardaki lipit peroksidasyonu; membran akıcılığında azalmaya, membran potansiyelinde azalmaya, H⁺ ve diğer iyonlara geçirgenlikte artışa ve sonuç olarak hücre ve organel yapısında bozulmaya yol açar.

Lipid peroksidasyon varlığının belirlenmesi ve ölçümü, hastalıkların serbest radikaller ile olan ilişkisini desteklemek için en sık başvurulan kanıttır. Lipid peroksitlerini, konjuge dienleri, aldehitleri tayin eden birçok metod ile lipid peroksidasyon düzeyi ölçülebilir (25).

2.3. BEYİN VE OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres ve antioksidan sistem hemen hemen vücutta her hastalığın patofizyolojisinde çalışıldığı gibi sinir sistemi hastalıklarında da klinik ve deneysel çalışmalarla incelenmiştir. Beyin ve sinir dokusu oksidatif stres aracılı hasara doğal yatkınlık göstermektedir. Bu yatkınlığın başlıca nedenleri şunlardır:

- Beyinin yüksek miktarda oksijen tüketmesi. Beyin, vücut ağırlığının yalnızca % 2 si olmasına rağmen, solunan toplam oksijenin %20' sini tüketir ve yüksek hızda fazla miktarda ATP üretir. Hücreler tarafından tüketilen oksijenin yaklaşık % 5' inin ROS'a indirgendiği düşünülürse; daha az oksijen kullanan diğer dokularla karşılaştırıldığında, beyinde göreceli olarak yüksek miktarlarda ROS üretildiği tahmin edilebilir (36).

- Nöronal membranlar arasında Ca^{2+} trafiğinin hızlı olması. Normalde hücre içinde serbest Ca^{2+} seviyesi çok azdır, Ca^{2+} mitokondri içinde, endoplazmik retikulumda veya kalmoduline bağlı olarak bulunmaktadır. Organizmada ROS oranı artarsa mitokondri hasar görebilir ve kalsiyum açığa çıkarak serbest hale geçer. Serbest kalsiyum oranının artması hücrede iki yönde etki yapar. Birincisi; membran yapısını bozulabilir, ikincisi; kendisine bağımlı enzimler olan NOSs ve fosfolipaz A_2 enzimlerinin aktiviteleri artar. Sonuç olarak NO radikali oluşumu artar ve hücre hasar görür (24).

- Uyarıcı nörotransmitterlerin bulunması: Bu postsinaptik membranda ROS oluşumuyla sonuçlanan bir dizi reaksiyonu kaskadını başlatır (37). Oksidan stres nöronlardan uyarıcı aminoasitlerin salınmasını arttırarak bir kısır döngüye yol açabilir. Diğer bir olasılık da ROS'ların glial hücreler aracılığı ile glutamat geri alınımını azaltması ve glutamin sentaz enzimini inaktive etmesi olabilir (24).

Bazı nörotransmitterler (Dopamn, L-DOPA, noradrenalin) O_2 ile reaksiyona girerek $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve reaktif kinonlar/semikinonlar oluşturabilir. Bunlar antioksidan enzimlerden GSH'ı azaltır ve proteinlerin -SH gruplarına bağlanabilir (24).

- Beyin metabolizmasının H_2O_2 oluşturmaları: Örneğin, dopaminin monoaminoksidaz (MAO) ile oksidasyonu sırasında H_2O_2 oluşur (24).

- Mikrogliaların varlığı: Mikroglialar sinir sisteminin makrofajlarıdır ve diğer makrofajlar gibi aktive olduklarında $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 oluşturabilir, sitokinleri (IL1, IL6, TNF α) salgılayabilirler. TNF α aktivasyonu ile ROS oluşumu artabilir ve hücre hasarıyla sonuçlanabilir (24).
- Nöron zarlarında bulunan lipitlerin, yüksek oranda kolayca okside olabilen çoklu doymamış yağ asidi içermesi (24).
- BOS' un yüksek derecede reaktif OH^{\bullet} formasyonunu katalizleyen düşük moleküler ağırlıklı demir ve bakır komplekslerini içermesi (37).
- Antioksidan enzimlerin düşük seviyede olması: Özellikle katalaz ve glutatyon peroksidaz diğer dokularla karşılaştırıldığında beyinde daha az seviyede bulunur (38).
- Pineal bezde üretilen, iyi bir radikal temizleyici, endojen bir antioksidan olan melatonin konsantrasyonu yaşla birlikte azalması (37).
- Nöronların yenilenemeyen hücreler olup, ROS türleri tarafından beyin dokusuna olan herhangi bir hasarın kümülatif olma eğiliminde olması (37).
- Diğer bir sebepte MSS fizyolojisinde önemli rol oynayan, önemli bir mesajcı RNS olan nitrik oksittir. NO, O_2 ile hızlıca reaksiyona girerek peroksit radikalini oluşturur (39).

MSS' nin Alzheimer, Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarında oksidatif stresin arttığı çalışmalarla gösterilmiştir. Parkinson hastalarının caudatum ve substantia nigra da 8-hidroksideoksiguanosinde (8-OHdG) belirgin bir artışla DNA' ya artmış oksidatif stresle ilişkili olduğu bulunmuştur parkinsonlu beyinde artmış lipit peroksidasyonuna ilişkin kanıtlar da mevcuttur Parkinsonlu substantia nigra da diğer parkinsonlu beyin bölgelerine ve kontrol dokuya kıyasla MDA düzeyleri artmıştır Alzheimer hastalarında üç kortikal alan ve serebellumdan izole edilen nükleer DNA ve mitokondriyal DNA'da kontrollere kıyasla özellikle de parietal kortekste 8-OHdG'ne ait anlamlı bir artış bulunmuştur. Ayrıca Alzheimer donörlerinden elde edilen lenfosit DNA'sında artmış 8-OHdG düzeyleri tespit edilmiştir (38).

2.4. MULTİPL SKLEROZ VE OKSİDATİF STRES

Makrofajlar tarafından üretilen oksijen ve nitrojen serbest radikallerinin MS ve deneysel allerjik ensefalomyelitte (DAE) demiyelinizasyon ve aksonal hasara mediatör olarak karıştığı kabul edilmiştir (3).

MS lezyonlarında oksidatif hasarın birçok belirteci bulunur ve ek olarak antioksidanların azalmış konsantrasyonları MS hastalarının serumlarında ve MS plaklarında ölçülmüştür (2,3).

Yapılan çalışmalarda MS hastalarının BOS ve plazmalarında oksidan hasarın göstergesi olan lipid peroksidasyonuna dair kanıtlar bulunmuştur (40). Yine MS hastalarında yapılan birçok çalışmada kontrol grubuna göre artmış serbest radikal aktivitesi ve veya önemli antioksidan enzimlerde eksiklik gösterilmiştir (41). Karg ve ark. MS in aktif fazında (42) lipid peroksidasyonunda % 38 artış, okside glutatyon seviyelerinde anlamlı artış ve plazma vitamin E: lipid oranında azalma tespit etmişlerdir. BOS'nın analizinde araşidonik asit gibi poliansatüre yağ asitlerinin nonenzimatik peroksidasyonu ile oluşan ürünler olan isoprostanların konsantrasyonunda artış (43), MDA seviyelerinde ve glutatyon reduktaz aktivitesinde artış ve glutatyon peroksidaz aktivitesinde azalma (44) gösterilmiştir. Bununla birlikte MS plaklarında yapılan direk ölçümlerde artmış serbest radikal aktivitesi, bunun yanında glutatyon, alfa tokoferol, ürik asit gibi önemli antioksidanlarda azalma ortaya çıkarılmıştır (45).

Hidroksil radikalini güçlü bir şekilde azaltarak serbest radikal temizleyici özellik gösteren edaravonun etkisi DAE de çalışılmış, histolojik analizlerde MSS' ne enflamatuvar hücre infiltrasyonunda azalmaya neden olduğu, makrofaj mikroglia aktivasyonunu azalttığı ve tedavinin DAE'nin klinik ciddiyetini belirgin iyileştirdiği tespit edilmiştir (46).

NO üretiminin MS lezyonlarında arttığını gösteren çok miktarda kanıt vardır, sadece lezyonlarda değil hastaların BOS, kan ve idrar örneklerindeki çalışmalarda da artış gösterilmiştir.

NO önemli bir biyolojik habercidir ve nörofizyolojide önemli rol alır. Nitrik oksidin aşırı üretimi peroksinitrit formasyonu için itici bir güçtür. MS lezyonlarında peroksinitrit varlığı gösterilmiştir (47). Oldukça toksik peroksinitrit lipid, protein, DNA ve

karbonhidratları oksitleyebilir ve nitratlayabilir. Özellikle, peroksinitrit tirozin kalıntılarını nitratlar ve nitrotirozin (NT) oluşumuna neden olur. NT peroksinitrit toksisitesinin belirteci olarak ölçülebilir. Perivasküler ve parankimal infiltrasyonun şiddetli olduğu akut lezyonlarda NT pozitif hücreler mononükleer enflamatuvar hücrelerdir. Perivasküler infiltrasyonları olan ve demiyelinizasyona giden kronik aktif lezyonlarda NT pozitifliği olan hücreler baskın olarak lipid dolu makrofajlardır. Baskın miktarlar yüksek enflamasyonun olduğu plaklarda görülmektedir. Ters olarak enflamatuvar bileşeni olmayan kronik sessiz plaklarda NT pozitif hücreler görülmemektedir (48). Deneysel MS modeli olan DAE' de peroksinitrit formasyonu erken dönemde hastalık aktivitesiyle uyumlu olarak tespit edilmiş, remisyonunda ve kronik sessiz dönemde tespit edilememiştir (49). Bu bilgiler ışığında MS ve DAE de ışığında enflamatuvar süreç ile peroksinitrit oluşumu arasında belirgin bir uyum vardır.

Peroksinitrit ile indüklenen myelin ve akson hasarı ratlarda gösterilmiştir. Peroksinitritin spontan donörü corpus callosuma enjekte edildiğinde MS lezyonlarına benzer vakuolizasyon ve myelin hasarı gösterilmiştir (50).

DAE' de mitokondriyal proteinlerin peroksinitrit tarafından nitrolanması erken hadisedir; bunu solunum zincirinde baskılanma, ATP sentezinde azalma, kalsiyum hemoastazında bozulma, ROS' da artma, geçirgen porlarda açılma ve DNA' da tek bağ kırıkları gibi birçok mitokondriyal disfonksiyon takip eder. Bu peroksinitrit aracılı mitokondriyal bozukluklar hem nöronların oligodendrositlerin apoptozunda hem akson dejenerasyonunda asıldır. Tirozinin peroksinitrit tarafından nitrasyonu özellikle motor nöronlarda eksprese edilen ve sağkalım için gerekli olan nörofilament-L gibi proteinlerin fonksiyonlarındaki inaktivasyon ile ilişkilidir (33).

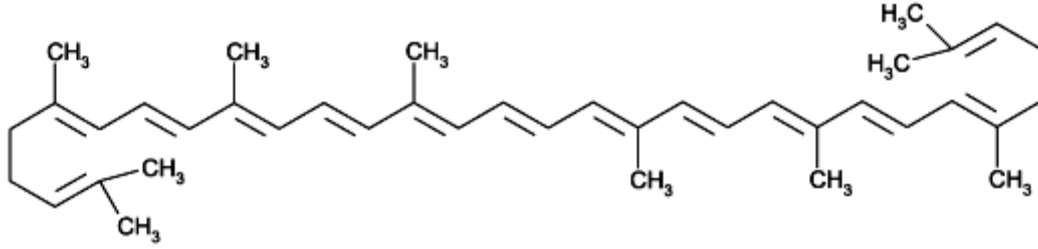
Peroksinitrit fizyolojik konsantrasyonlarda sinir büyüme faktörünü motor nöronlar için apoptotik faktöre dönüştürebilir (51).

MS hastalarının aktif demiyelinize lezyonlarında enzimatik antioksidanlardan sitozolik Zn–Cu bağlı SOD' un gen ekspresyonunda belirgin artış (52) gösterilmiştir. H₂O₂ temizleyicisi olan katalaz enzimi uygulanan DAE' de hastalık belirgin derecede baskılanmıştır (53). İnsandaki doğal bir antioksidan olan ürik asidin MS te rol oynadığı düşünülmektedir. MS hastalarının serumlarında ürik asit seviyeleri düşük bulunmuştur (54). İmmunmodulator glatiramer asetat ile tedavi edilen MS hastalarında ise ürik asit seviyelerinde artış gözlenmiştir (55).

2.5. LİKOPEN (*Lycopersicon esculentum*)

Likopen sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan ve bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen ama hayvanlar tarafından sentezlenemeyen karoten familyasına ait bir pigmenttir (56). Kırmızı meyve sebzeler; domates, karpuz, pembe greyfurt, kayısı en yaygın likopen kaynaklarıdır. Diyet içerisindeki likopenin başlıca kaynakları domates ve bu sebzeden elde edilen ketçap, sos ve domates suyu gibi ürünler olup diyetel likopenin %85' ini içerirler(5).

Likopen; β -karotenin akrilik izomeri olup, β -karotenden farklı olarak provitamin A aktivitesi göstermez . İnsan plazmasında en yüksek düzeylerde bulunan karotenoidlerden olan likopenin yarı ömrü 2–3 gündür (5,57).



Şekil 2.5: Likopenin yapısı

Likopen moleküler formülü ($C_{40}H_{56}$) olan , yüksek derecede doymamış, 40 karbon atomlu, 11 konjuge ve 2 konjuge olmayan, çift bağlı, açık zincirli bir hidrokarbondur. Doğal bitki kaynaklarında likopen ağırlıklı olarak all-trans konfigürasyonunda bulunurken insan plazmasında %50 oranında cis-isomeriyle karışım halinde bulunur. All-trans konfigürasyonu termodinamik olarak en stabil formdur (5, 56, 57).

Karotenden zengin besinlerin tüketilmesi çok kez birtakım sağlık faydalarıyla ilişkilendirilmiştir. Önemli sağlık faydalarının çoğunun oksidatif hasara karşı koruma becerileri üzerinden oluştuğu varsayılmıştır (5). Kanserden korumanın yanı sıra , karotenoidlerin potansiyel antioksidan özellikleri serbest radikaller tarafından başlatıldığına inanılan ateroskleroz, katarakt, yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve multipl sklerozu gibi hastalıkların başlangıcını engellemeye yardımcı olabilir (58).

Birçok çalışma göstermiştir ki, likopen efektif bir antioksidandır ve serbest radikal temizleyicidir. Hayvan ve insanlarda karotenler özellikle β -karoten ve likopen, fotooksidatif süreçlere karşı korumada singlet oksijeni etkisiz kılan güçlü bileşiklerdir. Peroksil radikal temizleyicisi olarak rol oynarlar ve diğer antioksidanlarla sinerjistik olarak etkileşebilirler (57,58). Likopen, yüksek sayıda konjuge çift bağından dolayı, β -karoten ve α -tokoferol ile karşılaştırıldığında daha yüksek singlet oksijen yakalama özelliği gösterir (5,56).

in vitro sistemlerde, likopenin hidrojen peroksit ve nitrojen dioksidi inaktive ettiği bulunmuştur. Serbest nitrojen dioksidi (NO_2), tiyil (RS) ve sülfonil (RSO_2) radikallerini temizleyebildiği de çalışmalarda gösterilmiştir. Son çalışmalarda, likopenin lenfositleri NO radikali ile indüklenen membran hasarına ve hücre ölümüne karşı β -karotenden en az iki kat daha fazla koruduğu gösterilmiştir. Likopen son derece lipofilik olduğundan en yaygın hücre membranlarında ve diğer lipoprotein bileşiklerinde yer alır. Bu nedenle likopenin lipofilik çevrede maksimum ROS temizleyici etki göstereceği tahmin edilmektedir (5).

Karotenoidlerin oksidatif olmayan mekanizmalarla hücreler arası gap bağlantılı iletişimi indükleyebildiği, böylece kanser gelişimini önlemekteki potansiyel temeli oluşturduğu önerilmiştir. Likopenin ayrıca orta derecede hipokolesterolemik ajan olarak hareket ettiği ve bu etkisi kolesterol sentezindeki hız kısıtlayıcı enzim olan HMG-CoA redüktazı inhibe etmesiyle ilişkilendirilmiştir (5).

Likopenin yüksek kan değerleri; azalmış prostat kanseri, sindirim kanalı kanseri, pankreas kanseri, servikal intraepitelial neoplazi, ve miyokart infarktüsü riski ile korelasyon göstermektedir (57).

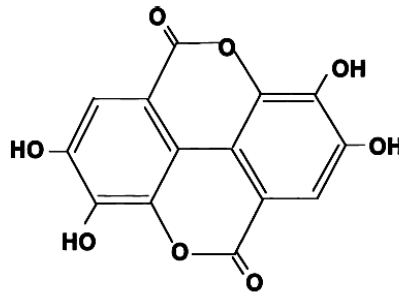
2.6. ELLAGİK ASİT (EA)

Nar (*Punica granatum L.*) biyolojik aktiviteleri nedeniyle son zamanlarda oldukça popüler olan ve özellikle meyve suyu şeklinde bolca tüketilmeye başlanan bir bitkidir. Nar, Lythraceae familyasından içinde küçük çekirdekler ve meyve gövdesini oluşturan yüzlerce tanecikten oluşmuş, hafif ekşi-tatlı tadı olan, ılıman iklimlerde yetişen bir bitkidir (59).

Nar bileşenlerinin antioksidan, antikanserojenik, antienflamatuvar özelliklerinden yola çıkarak kalp-damar hastalıklarını, diabeti, diş hastalıklarını, erektil disfonksiyonu, ultraviyole

radyasyona karşı korumayı içeren güçlü tedavi edici özellikleri üzerine odaklanan bir çok çalışma yapılmıştır. Diğer potansiyel uygulamalar infant beyin iskemisi, Alzheimer hastalığı, artrit ve obesiteyi içerir (59).

EA, narın güçlü antioksidan, antikanserojenik, antiinflamatuvar etkilerinden sorumlu bileşenlerinden biridir. EA, polifenolik yapıda bir bileşendir. EA, ahudutu, böğürtlen, çilek, kıvılcık, nar gibi kırmızı meyvelerin çoğunda ve cevizde bulunur. En yüksek seviyede ahudutunda bulunur. EA bitkilerde şekere bağlanmış olarak ellagitanin formunda bulunur. EA bitkiye karakteristik buruk tadını verir (60,61).



Şekil 2.5: EA' nın yapısı

EA' in antioksidan özelliği birçok çalışmada gösterilmiştir. EA; anti-mutagen, anti-kanser, anti-enflamatuvar, anti-hepatotoksik, anti-bakteriyel ve HIV replikasyonunu önleyici özellikler gösterir (60,61,62).

Antioksidan özelliğinden dolayı Japonya'da gıdalara ilave edilebilmektedir (63).

Antioksidan etkilerini hidroksil radikali, peroksil radikali, nitrit radikali, peroksinitrit radikali gibi ROS ve RNS' yi temizleme özelliği ile gösterdiği düşünülmektedir. Aktivitesi için yapısındaki fenolik hidroksil gruplarının ve lakton grubunun gerekli olduğu düşünülmektedir. (60,64)

EA' nın, sıçan karaciğerinde hidroksil radikali aracılı lipit peroksidasyonunu doz ve konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Peroksinitrit radikalinde iyi bir temizleyicisi olduğu bulunmuştur (60). *In vitro*' da EA' nın peroksinitritin indüklediği diklordihidroflorosein oksidasyonunu, yine peroksinitritin indüklediği DNA kırıklarını, proteinlerin tirozin nitrasyonunu önlediği gösterilmiştir (65). Yine sıçanlarda yapılan bir çalışmada alkol aracılı karaciğer hasar modelinde EA' nın karaciğer enzimlerini azalttığı,

antioksidan statüyü arttırdığı, Zn ve Cu düzeylerini düzenlediği, dolaşımdaki lipid seviyelerini düzenlediği gösterilmiştir (64).

EA içeren Pomagranate ekstraktının serbest radikalleri temizlediği, makrofaj oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu azalttığı hayvanlarda (66), total plazma antioksidan kapasitesini arttırdığı, plazma protein karbonil düzeyini azalttığı insanlarda gösterilmiştir (67).

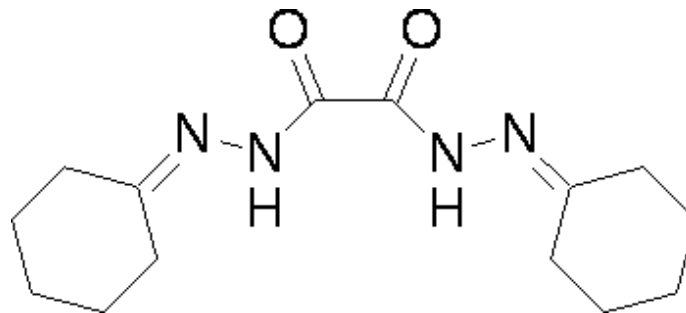
21.6 mg EA içeren, nar ekstratı kapsülü verilen bireylerde plazma antioksidan kapasitesinin ekstrakt eklenmesinin 30 dakika ardından anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (67).

EA' nın *in vitro* insan oral, prostat ve kolon tümör hücre serilerinde antiproliferatif, antiapoptotik ve antioksidan etkileri değerlendirilmiş ve yaşayan hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir (61). Ayrıca prostat kanser hücrelerinin büyümesini, hücre siklusunu durdurarak ve apoptozu stümle ederek inhibe eder. Prostat kanserinde anjiogenezi inhibe ettiği de *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (68).

2.7. CUPRİZON (CPZ)

MS sadece insanları etkileyen bir hastalık olmasına rağmen; hastalık için bir çok hayvan modeli kabul edilmiştir. CPZ modeli toksik demiyelinizasyon modelidir. Diğer uygulanan modeller DAE, Theiler virüsü ile indüklenmiş ensefalomyelitir (69).

CPZ, bakır kelatörüdür, 1950 lerde Nilsson tarafından keşfedilip tanımlanmıştır (70).



Şekil 2.6: Cuprizonun kimyasal yapısı

CPZ ile beslenme bakır eksikliğine ve MSS demiyelinizasyonuna neden olur. Bu demiyelinizasyon erken göze çarpan bir hadisedir, oligodendrositlerden başka MSS' nin diğer

hücre tiplerine hasar vermeksizin meydana gelir. Neden oligodendrositlerin bakır eksikliğine tercihen duyarlı olduğu bilinmemektedir (71) .

CPZ uygulaması beyinde bakır bağımlı mitokondriyal enzimler olan hem sitokrom oksidazın hem de monoamin oksidazın aktivitesinde azalmaya neden olur (71,72). CPZ ile indüklenmiş bakır eksikliğinin beyin mitokondri fonksiyonuna zarar veriyor olabileceği ve bunun oligodendrositlerde enerji metabolizmasında ve hücre fonksiyonunda bozukluğa yol açarak demiyelinizasyona neden olduğu varsayılmaktadır. Yüksek doz cuprizona maruz kalan farelerin karaciğerinde megamitokondri görülmesi bu hipotezi desteklemektedir (69). Pasquini ve ark. CPZ ile muamele edilen OG hücre kültürlerinde CPZ nin mitokondriye hasar verdiğini belirten solunum zincirinin kompleks 1,2, ve 3 bileşenlerinin aktivitesinde belirgin bir azalma göstermişlerdir. Mitokondri disfonksiyonu artmış miktarda oksidan türlerinin üretimi ile sonuçlanır. Yine aynı çalışmada CPZ uygulanan oligodendrosit hücre kültüründe oksidan ürünlerin artmış olduğu bulunmuştur (73).

Önceleri CPZ' nin oluşturduğu demiyelinizasyonun corpus callosum ve superior cerebellar pedunkülü baskın olarak etiklediğine inanılmasına rağmen, yeni çalışmalarda kortikal demiyelinizasyon yaptığı da gösterilmiştir. Ek olarak akson kaybı MS ve cuprizon modelinin her ikisinde de gösterilmiştir. Toksik demiyelinizasyonun modeli olarak CPZ, biricil olarak oligodendrosit kaybına yol açar, patolojik patern Lucchinetti ve arkadaşlarının tarif ettiği tip3 veya tip4 MS lezyonlarına benzeyebilir (21).

CPZ uygulaması ayrıca mikrogliya ve makrofajların cuprizonun ana hedeflerinden biri olan corpus callosumda hızlı proliferasyonuna ve birikmesine neden olur (74). Bu hücreler MSS demiyelinizan hastalıklarının patogenezi ile ilişkilendirilmiş tumor nekroz faktör (TNF) ailesinden sitokinleri salgılar (73). Bununla birlikte CPZ modeli kan beyin bariyerinin değişmeden kalmasıyla MS ve DAE den farklılık gösterir. MS ve DAE kompleks immunolojik süreçleri ve T hücre aktivasyonunu içerirken CPZ ile indüklenmiş demiyelinizasyonda T hücreleri hemen hemen tamamen yoktur. Kan beyin bariyerinin bozulmaması bu durumu açıklayabilir (74).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.KULLANILAN ALETLER VE KİMYASAL MADDELER

3.1.1. Aletler ve cam malzemeler

- Spektrofotometre (Hitachi U-1900)
- ELISA okuyucu (Bio-tek 800)
- Otomatik yıkayıcı (Bio-tek ELX 50)
- Derin dondurucu (-80 °C) (Rua Instruments)
- Elektronik tartı (Shimadzu Libror)
- El homojenizatörü (Braun Melsulgen AG 5449)
- Sonikasyon cihazı (MSE)
- Düşük devirli santrifüj (Hetitch, soğutmalı)
- Yüksek devirli santrifüj (Heraeus Biofuge Stratus)
- Vorteks (Elektromag)
- pH metre (Shott CG 840)
- Mikrotom bıçağı (Sakura, Accu Cut SRM)

Otomatik pipetler ve pipet uçları, pastör pipetler, santrifüj tüpleri, deney tüpleri,kapaklı tüpler, balon joje, cam kapsül, ependorf, vb. malzemeler.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Likopen (Mikro –Gen)
- *Punica Granatum* ekstraktı (%40 ellagik asit) (GNC)
- Cuprizon (Sigma)
- iNOS ELISA kiti(R&D Systems, Quantikine®)
- MPO ELISA kiti (Hycult Hbt biotechnology)
- Nitrotirozin ELISA kiti (Hycult Hbt biotechnology)
- Nitrit-Nitrat kolorimetrik metot kiti (Roche)
- Trikloroasetikasit (Merck)
- Tiyobarbitürik asit (Sigma)
- Hidroklorik asit (Carlo-Erba)
- Ksantin oksidaz (Sigma)

- Ksantin (Sigma)
- Bakır klorür (Sigma)
- Kloroform (Merck)
- Etanol (Merck)
- Disodyum EDTA (Carlo-Erba)
- Nitroblue tetrazolium (Sigma)
- Sodyum karbonat (Merck)
- Albumin (Sigma)
- Potasyum ferrosiyaniür (Carlo Erba)
- Potasyum siyaniür (Merck)
- Bakır sülfat (Merck)
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Luksol fast blue- cresyl fast violet boya çözeltisi;
 - Luksol fast blue (Sigma)
 - % 95 alkol
 - % 10 asetik asit (Sigma)
 - % 0,05 lityum karbonat (Merck)
 - % 0,01 cresyl fast violet (Sigma)

3.2. DENEY HAYVANLARINA UYGULANAN İŞLEMLER

3.2.1. Deney hayvanlarının genel özellikleri

Çalışmamızda İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilen Wistar Albino soyu 33 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Bu çalışmaya ait etik kurul raporu İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden alınmıştır. Sıçanlar 150 ± 50 g ağırlığa ulaşıncaya kadar, standart pellet sıçan yemiyle beslenen hayvanlara musluk suyu verildi. Sıçanlar istenilen ağırlığa ulaştıktan sonra deneysel işlemlere başlanmıştır.

Sıçanlar rastgele olarak 4 gruba ayrıldı:

- I. Grup, kontrol grubu (Kontrol, n=9)
- II. Grup, MS modeli oluşturulan grup (MS, n=8)
- III. grup MS modeli oluşturulan ve ellagik asit (*Punica granatum* ekstraktı) uygulanan grup (MS + EA, n=8)
- IV. grup; MS modeli oluşturulan ve likopen (*Lycopersicon esculentum*) uygulanan grup (MS + L, n=8) olarak belirlenmiştir.

Sıçanlarda MS modeli oluşturmak amacıyla; 15 gün süre ile toz haline getirilen yemlerine % 0,6 (w/w) oranında cuprizon ilave edilmiştir (9).

Çalışmada kullandığımız maddelerden likopenin uygulama dozu 4/mg/kg/gün (6), ellagik asitin 10 mg/kg/gün (8) olarak belirlenmiştir. Likopen ve ellagik asit distile suda süspanse edilerek intragastrik gavaj yoluyla verilmiştir. MS modeli oluşturulması sırasında ve model oluşturulduktan bir hafta sonrasına kadar maddelerin uygulanması sürdürülmüştür. Maddeler sıçanlara daima taze hazırlanarak günlük verilmiştir.

3.2.2. Deney hayvanlarından çalışılacak örneklerin alınması

Deneyin sonlanacağı 21. günde, eter anestezisi altında tüm sıçanların kalplerinden alınan kanlar EDTA'lı tüplere aktarıldı. Beyin dokusu çıkarıldı. Histo-patolojik değerlendirme için tüm sıçanların sol beyin hemisferleri nötral tamponlu formalinde, sağ beyin hemisferleri homojenat örneklerinin hazırlanması için -80 °C saklandı.

3.2.3. Beyin Dokusundan Histopatoloji Preparatlarının Hazırlanması

Çıkartılan beyin doku örnekleri oda sıcaklığında formalin çözeltisi içinde tespit edildikten sonra artan oranda (%60, %70, %80, %90, %99.9) alkol serilerinden geçirildi. Dokular şeffaflaştırma amacıyla iki kere ksilene maruz tutulduktan sonra sıvı parafin içinde infiltrasyon işlemi yapıldı. Ardından dokular parafin içine gömüldü. Bloklardan mikrotom bıçağı ile 9 mikronluk koronal kesitler alınarak miyelin durumunu incelemek için deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra Luksol Fast Blue (LFB) boyası ile boyandı. %80 ve %95 lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dk ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

3.2.4. Doku homojenizasyonu

Kontrol ve deney gruplarına ait beyin doku örnekleri yaş olarak tartıldıktan sonra, fosfat tamponlu serum fizyolojik içerisinde (pH 7.4) homojenize edilip, %20' lik (w/v) homojenatlar hazırlandı. Elde edilen doku homojenatları 30 saniye süreyle, orta şiddette iki kez sonike edildi. Homojenizasyon ve sonikasyon işlemleri yaklaşık olarak 4 °C de soğuk ortamda yapıldı. Sonikasyon işleminden sonra lipid peroksidasyonu tayini için hazırlanmış homojenatlar 2000 rpm'de 5 dakika, diğer tayinler için ise soğutmalı eppendorf santrifüjü ile 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Çalışmalar süpernatantlardan alınan örneklerle yapıldı.

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. iNOS enzim aktivitesi tayini

Plazma ve homojenat iNOS enzim aktivitesinin belirlenmesinde iNOS ELISA test kiti (R&D Systems, Quantikine®) kullanıldı. Kullanılan ELISA testi sandviç prensibine dayalı solid faz enzim bağı immunosorbent ölçüm yöntemidir.

Prensip

Kuyucuklar iNOS için spesifik monoklonal antikorlar ile kaplı haldedir. Örnek ve standartlar bu kuyucuklara pipetlenir ve örneklerdeki iNOS'lar hareketsiz antikorlara bağlanır. Yıkama yapılarak bağı olmayan materyal uzaklaştırılır. Ardından iNOS için spesifik enzim bağı monoklonal antikor (iNOS konjugatı) kuyucuklara eklenir. Yıkama yapılarak bağı olmayan enzim-antikor belirteci uzaklaştırılır. Kuyucuklara substrat çözeltisi eklenir; ilk adımda bağlanan iNOS enzim aktivitesi ile orantılı olarak renk gelişir. Renk oluşumu stabilize edilir ve yoğunluğu ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler

- * iNOS konjugatı
- * Seyreltici RD1-34
- * Kalibratör seyreltici RD5-10
- * Liyofilize iNOS standartı; 2 ml kalibratör seyreltici RD5-10 eklenerek sulandırıldı.
- * Hücre eritici tampon
- * Yıkama tamponu 25 kat seyreltildi.
- * Renk belirteci A; hidrojen peroksit içermektedir.
- * Renk belirteci B; kromojen tetrametilbenzidin içermektedir.

Renk belirteci A ve B eşit hacimlerde birbirine karıştırılarak substrat çözeltisi elde edildi.

- * Durdurma çözeltisi; 2 N sülfürik asit içermektedir.

iNOS Standartlarının Hazırlanması

Stok çözeltisi konsantrasyonu 80 U/ml idi.

- I. Tüp 1 de 80 U/ml standart yüksek standart olarak görev aldı.
- II. 2. tüpten 8. tüp dahil 300 µl kalibratör seyreltici konuldu,

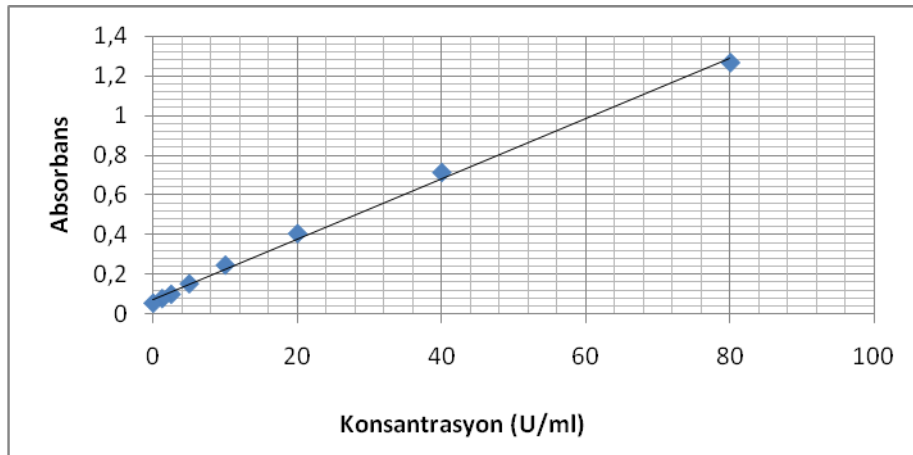
- III. 300 µl 1. tüpten alınıp 2. tüpe kondu ve karıştırıldı,
IV. 300µl 2. tüpten alınıp 3. tüpe kondu ve karıştırıldı,
V. 3. tüpten 7. tüpe kadar aynı transfer işlemi tekrarlandı.
VI. 8. tüpe 300 µl kalibratör seyreltici konuldu. Bu tüp 0 U/ml lik standarttır.

Tüp no	1	2	3	4	5	6	7	8
Konsantrasyon U/ml iNOS	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0

Uygulama

Örnekler ve kitler kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Doku homojenatları hücre eritici tampon ile ön işleme tabi tutuldu. 1:2 oranında kalibratör seyreltici RD5-10 ile seyreltildi.

Her bir kuyucuğa seyreltici RD1-34' ten 100 µl eklendi. Her bir standarttan ve numuneden kuyucuklara 100'er µl kondu. Mikroplate çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her kuyucuk 400 µl seyreltik yıkama tamponu ile dört kez yıkandı ve en son kalan yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 200 µl iNOS konjugatı konuldu ve tekrar mikroplate çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi daha önceki gibi tekrarlandı. Her kuyucuğa 200 µl substrat çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 50'şer µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve yarım saat içinde 450 nm de absorbans ölçüldü. Sonuçlar standart eğri grafiğine göre değerlendirildi.



Şekil 3.1: iNOS standart eğrisi

3.3.2. Nitrotirozin (NT) miktar tayini

Plazma ve homojenat nitrotirozin düzeylerinin belirlenmesinde Nitrotirozin ELISA test kiti (Hycult Hbt) kullanıldı. Kullanılan ELISA testi sandviç prensibine dayalı solid faz enzim bağı immunosorbent bir ölçümdür.

Prensip

Örnek ve standartlar nitrotirozini tanıyan antikor kaplı kuyucuklarda inkübe edilir. Bu inkübasyon sırasında nitrotirozin solid faza bağı antikorlar tarafından yakalanır. Örnekteki bağı olmayan materyal yıkama ile uzaklaştırılır. Biotinlenmiş ikinci antikor (tracer) kuyucuklara eklenir. İşaretli antikorlar yakalanmış nitrotirozine bağılanır. İşaretin fazlası yıkama ile uzaklaştırılır. Streptavidin-peroksidaz konjugatı kuyucuklara uygulanır. Bu konjugat, spesifik olarak yakalanmış nitrotirozin üzerine bağı biotinle işaretli antikor ile reaksiyona girer. Fazla streptavidin-peroksidaz konjugatı yıkama ile uzaklaştırılır ve substrat, tetrametil benzidin (TMB), kuyucuklara eklenir. Örnekteki mevcut nitrotirozin miktarı ile orantılı olarak renk oluşur. Reaksiyon sitrik asit ile durdurulur ve 450 nm de absorbans ölçülür. Standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri belirlenerek standart eğrisi çizilir. Nitrotirozin konsantrasyonu bilinmeyen örnekler, standart gibi çalışılır ve sonuçlar standart eğrisinden hesaplanır.

Kullanılan Çözeltiler

- * Yıkama tamponu; Tween 20 içermektedir. 40 kat seyreltildi.
- * Konsantre seyreltme tamponu; fosfat tamponu içermektedir. 10 kat seyreltildi.
- * Liyofilize nitrotirozin (7.8 µM) standardı
- * Liyofilize tracer
- * Liyofilize streptavidin peroksidaz konjugatı

Standart, tracer ve streptavidin peroksidaz konjugatı 1 ml distile su ile sulandırıldı. Daha sonra tracer'a 11 ml seyreltme tamponu, streptavidin peroksidaz konjugata da 23 ml seyreltme tamponu eklenerek hazırlandı.

- * TMB substratı
- * Durdurma çözeltisi; 2 M sitrik asit içermektedir.

Nitrotirozin Standartlarının Hazırlanması

Stok çözeltisi konsantrasyonu 7.8 μM ' dı.

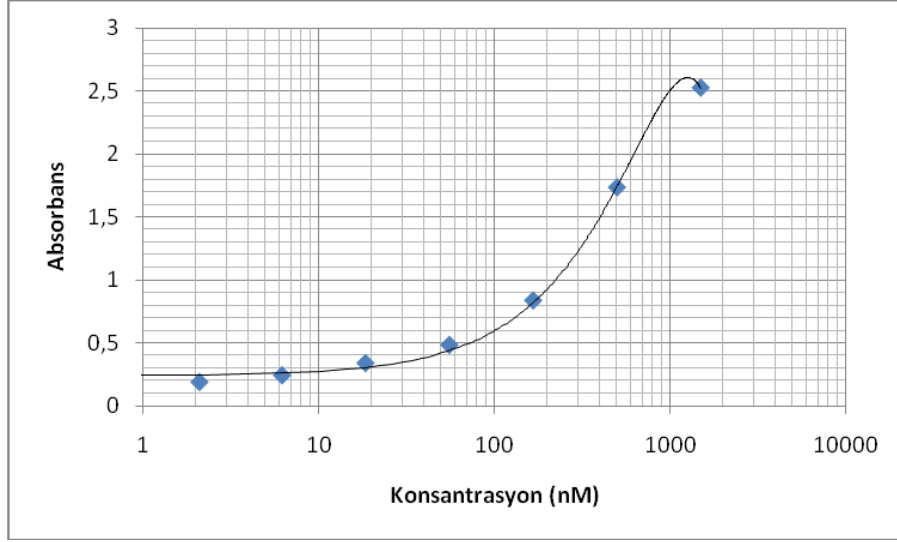
- I. Tüp 1'e 525 μl seyreltme tamponu kondu,
- II. 2. tüpten itibaren 7. tüp dahil 250 μl seyreltme tamponu konuldu,
- III. Tüp 1'e 125 μl hazırlanan stok standarttan ilave edildi,
- IV. 125 μl 1. tüpten alınıp 2. tüpe kondu ve karıştırıldı,
- V. 2. tüpten 7. tüpe kadar aynı transfer işlemi tekrarlandı.
- VI. 8. tüpe 500 μl seyreltme tamponu ilave edildi. Bu tüp 0 nM' lık standarttır.

Tüp no	1	2	3	4	5	6	7	8
Konsantrasyon nM NT	1500	500	167.7	55.6	18.5	6.2	2.1	0

Uygulama

Örnekler ve kitler kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Plazma örnekleri 10 kat, homojenatlar 20 kat seyreltme tamponu ile seyreltildi.

Önceden belirlenmiş kuyucuklara her bir standarttan ve numuneden 100'er μl kondu. Mikroplate yapışkan bir tabaka kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her kuyucuk 200 μl seyreltik yıkama tamponu ile dört kez yıkandı ve en son kalan yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 μl seyreltik tracer konuldu ve tekrar oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi daha önceki gibi tekrarlandı. Her kuyucuğa 100 μl seyreltik streptavidin-peroksidaz konjugatı eklendi ve tekrar oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi daha önceki gibi tekrarlandı. TMB substrat çözeltisinden her kuyucuğa 100 μl kondu ve oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 100'er μl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm de absorbans ölçüldü. Sonuçlar standart eğri grafiğine göre değerlendirildi.



Şekil 3.2: Nitrotirozin standart eğrisi

3.3.3. Miyeloperoksidaz (MPO) miktar tayini

Plazma ve homojenat miyeloperoksidaz düzeylerinin belirlenmesinde Miyeloperoksidaz ELISA test kiti (Hycult Hbt) kullanıldı. Kullanılan ELISA testi sandviç prensibine dayalı solid faz enzim bağlı immunosorbent bir ölçümdür.

Prensip

Örnek ve standartlar miyeloperoksidazı tanıyan antikor kaplı kuyucuklarda inkübe edilir. Bu inkübasyon sırasında miyeloperoksidaz solid faza bağlı antikorlar tarafından yakalanır. Örnekteki bağlı olmayan materyal yıkama ile uzaklaştırılır. Biotinlenmiş ikinci antikor (tracer) kuyucuklara eklenir. İşaretli antikorlar yakalanmış miyeloperoksidaza bağlanır. İşaretin fazlası yıkama ile uzaklaştırılır. Streptavidin-peroksidaz konjugatı kuyucuklara uygulanır. Bu konjugat, spesifik olarak yakalanmış miyeloperoksidaz üzerine bağlı biotinle işaretli antikor ile reaksiyona girer. Fazla streptavidin-peroksidaz konjugatı yıkama ile uzaklaştırılır ve substrat, tetrametil benzidin (TMB), kuyucuklara eklenir. Örnekteki mevcut miyeloperoksidaz miktarı ile orantılı olarak renk oluşur. Reaksiyon sitrik asit (durdurma çözeltisi) ile durdurulur ve 450 nm de absorbans ölçülür. Standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri belirlenerek standart eğrisi çizilir. Miyeloperoksidaz konsantrasyonu bilinmeyen örnekler, standart gibi çalışılır ve sonuçlar standart eğrisinden hesaplanır.

Kullanılan Çözeltiler

* Yıkama tamponu; tween 20 içeren tris tamponlu serum fizyolojik içermektedir. 20 kat seyreltilmiştir.

* Seyreltme tamponu A; tween 20 içeren asetat tamponu içermektedir. 5 kat seyreltilmiştir.

* Seyreltme tamponu B; serum fizyolojik içermektedir. 5 kat seyreltilmiştir.

Seyreltme tamponu A ve B 1:1 oranında karıştırılarak seyreltme tamponu elde edildi.

* Liyofilize miyeloperoksidaz (1.8 µg/ml) standardı

* Liyofilize tracer

* Liyofilize streptavidin peroksidaz konjugatı

Standart 0,5 ml, tracer ve streptavidin peroksidaz konjugatı 1 ml distile su ile seyreltilmiştir. Daha sonra tracer'a 11 ml seyreltme tamponu, streptavidin peroksidaz konjugata da 23 ml seyreltme tamponu eklenerek hazırlandı.

* TMB substratı

Durdurma çözeltisi 2 M sitrik asit içermektedir.

Miyeloperoksidaz Standart Serilerinin Hazırlanması

Stok çözeltisinin konsantrasyonu 1.8 µg/ml idi.

I. Tüp 1'e 930 µl seyreltme tamponu kondu,

II. 2. tüpten 7. tüp dahil 225µl seyreltme tamponu konuldu,

III. Tüp 1'e 150 µl hazırlanan stok standarttan ilave edildi,

IV. 150µl 1. tüpten alınıp 2. tüpe kondu ve karıştırıldı,

V. 150 µl 2. tüpten alınıp 7. tüpe kadar aynı transfer işlemi tekrarlandı.

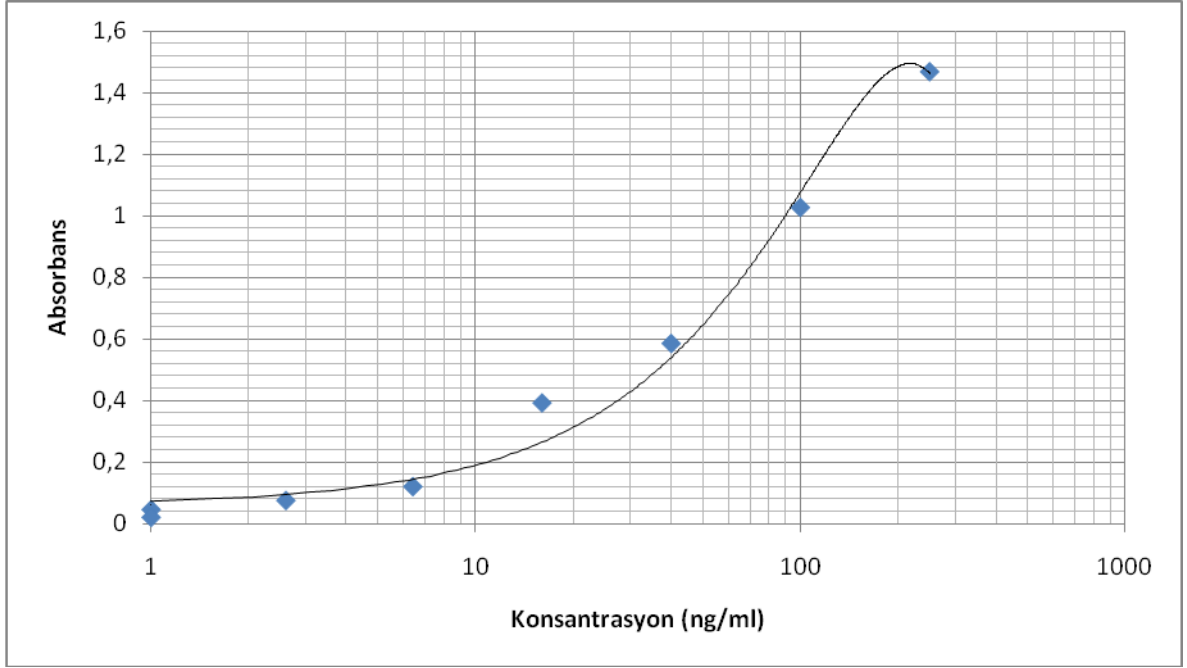
VI. 8. tüpe 500 µl seyreltme tamponu ilave edildi. Bu tüp 0 µM lık standarttır.

Tüp no	1	2	3	4	5	6	7	8
Konsantrasyon ng/ml MPO	250	100	40	16	6,4	2,6	1,0	0

Uygulama

Örnekler ve kitler kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Plazma örnekleri 4 kat, homojenatlar 8 kat seyreltme ile seyreltilmiştir.

Önceden belirlenmiş kuyucuklara her bir standarttan ve numuneden 100'er µl kondu. ELISA tablası yapışkan bir tabakayla kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her kuyucuk 200 µl seyreltik yıkama tamponu ile dört kere yıkandı. Her kuyucuğa 100 µl seyreltik tracer konuldu ve tekrar oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi daha önceki tekrarlandı. Her kuyucuğa 100 µl seyreltik streptavidin-peroksidaz bileşiği eklendi ve tekrar oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi daha önceki gibi tekrarlandı. Konjugat ile inkübasyon periyodu bitmeden hemen önce hazırlanan TMB substrat çözeltisinden her kuyucuğa 100 µl kondu ve oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 100'er µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm de absorbans ölçüldü. Sonuçlar standart eğri grafiğine göre değerlendirildi.



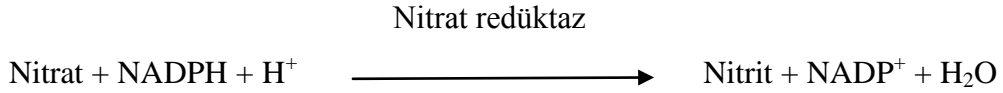
Şekil 3.3: MPO standart eğrisi

3.3.4. Total nitrit + nitrat tayini

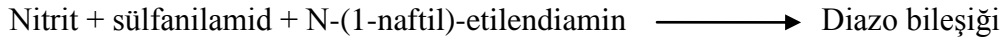
Plazma ve homojenat total nitrit-nitrat düzeylerinin ölçülmesinde Griess reaksiyon prensibine dayalı 'Roche Nitrit +Nitrat , kolorimetrik metod' kiti kullanıldı (75).

Prensip

NO kısa yarı ömrü ve kararsız yapısından dolayı biyolojik sistemlerde oksijenle reaksiyona girerek hızlıca nitrit (NO_2^-) ve nitrate (NO_3^-) okside olur. Bu nedenle NO düzeyleri, kararlı son ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeylerinin ölçümü ile dolaylı olarak yapılır. Nitrat, nitrat redüktaz isimli enzim tarafından indirgenmiş nikotin amid dinükleotid (NADPH) varlığında nitrite indirgenir.



Oluşan nitrit, sülfanilamid ve N-(1-naftil)-etilen-diamin dihidroklorür ile reaksiyona girerek kırmızı mor renkli diazo bileşiğini oluşturur.



Diazo bileşiğinin 540 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek, toplam nitrit ve nitrat ölçülmüş olur.

Kullanılan Çözeltiler

Reaksiyon karışımı I: Bir NADPH tableti 3 ml fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı.

Reaksiyon karışımı II: 4U liofilize nitrat redüktaz enzimi 0.7 ml distile su ile çözülerek hazırlandı.

Renk reaktifi I: Sülfanilamid.

Renk reaktifi II: N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorür

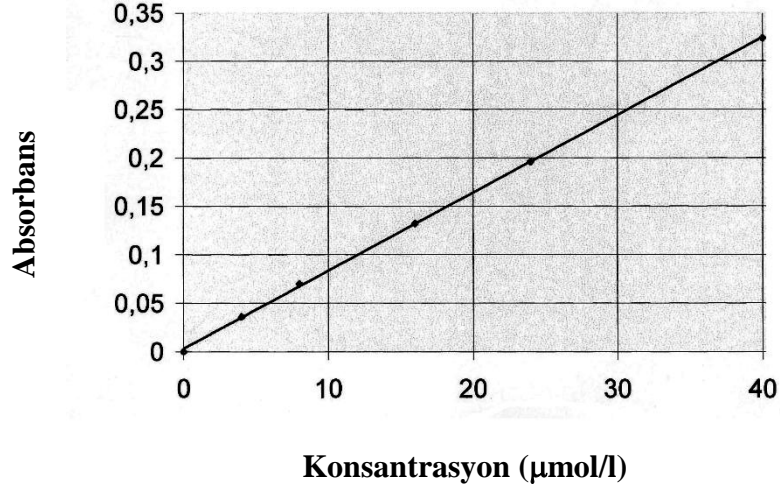
Nitrat standardı: 100 $\mu\text{mol/l}$ nitrat içeren stok standardından 4, 8, 16, 24, 40 $\mu\text{mol/l}$ konsantrasyonlarında nitrat standart çözeltileri hazırlandı.

Uygulama

	Kör	Örnek
Örnek	-	500
Fosfat tamponu (µl)	500	-
Reaksiyon karışımı I (µl)	250	250
Reaksiyon karışımı II (µl)	20	20
Karıştırılıp 15-25 °C’de 30 dakika inkübe edildi, A ₁ absorbansı okundu.		
Renk reaktifi I	250	250
Renk reaktifi II	250	250
Karıştırılıp 15-25 °C’de ve karanlıkta 10-15 dakika inkübe edildi, A ₂ absorbansı okundu.		

Hesaplama: $\Delta A_{\text{Nitrit+Nitrat}} = (A_2 - A_1)_{\text{Nitrit+Nitrat}} - (A_2 - A_1)_{\text{Kör Nitrit+ Nitrat}}$

Hesaplamalar standart eğri kullanılarak absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar bulunarak yapıldı.



Şekil 3.4: Nitrat standart eğrisi

3.3.5. Tiyoarbitürük asitle reaksiyonlaşan maddeler (TBARS)' in tayini

Prensip

Tiyoarbitürük asitle reaksiyonlaşan maddelerin bir molekülü ile iki molekül tiyoarbitürük asidin kondansasyonu sonucunda oluşan renkli kompleksin 535 nm dalga boyundaki absorpsiyonunun spektrofotometrik olarak tayin edilmesi esasına dayanır (Buege yöntemi) (76). TBARS düzeyleri doku ve plazma örneklerinde tayin edildi.

Kullanılan Çözeltiler

- % 30 triklorasetik asit (TCA)
- % 0.375 tiyoarbitürük asit (TBA)
- 0.5 N Hidroklorik asit (HCl)

Uygulama

	Kör	Örnek Plazma	Örnek homojenat
Örnek (ml)	-	0.250	0.200
%30 TCA (ml)	1	1	1
% 0.375 TBA (ml)	1.5	1.5	1.5
0.5 N HCL (ml)	0.200	0.200	0,200

Örneklerin pipetlenmesi işleminden sonra kapakları kapatılan tüpler 15 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Daha sonra soğutulan tüpler 5 dakika 4000 g'de santrifüj edilip, süpernatantın absorpsiyonu 535 nm'de köre karşı okundu.

Hesaplama

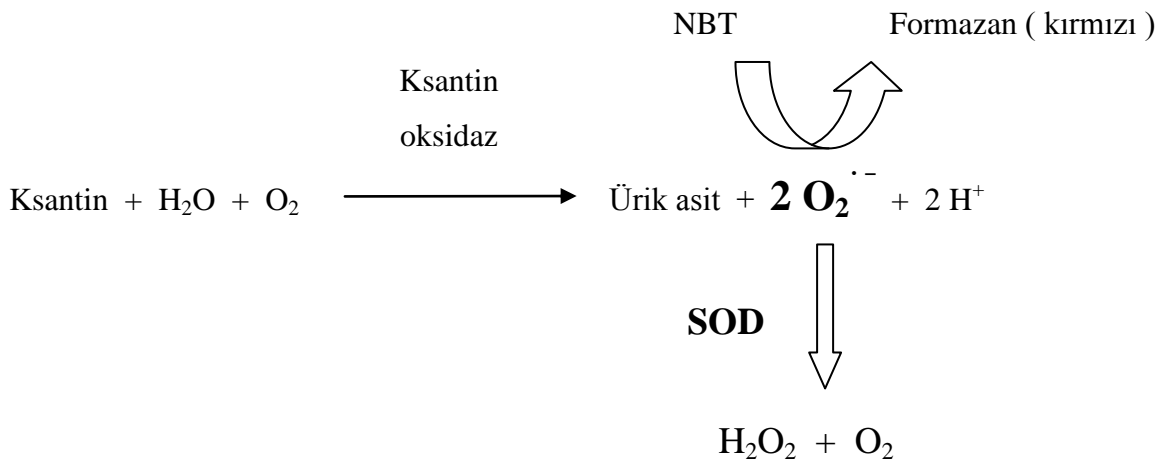
TBARS için molar ekstinksiyon katsayısı; $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesap yapıldı.

$$\text{TBARS (nmol/ml)} = \frac{\text{Toplam Hacim} \cdot \text{Aörnek} \cdot 10^6}{\text{Örnek Hacmi} \cdot 1,56 \cdot 10^5}$$

3.3.6. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini

Prensip

Doku ve eritrosit SOD aktivitesi Sun'ın modifiye yöntemine dayanarak ölçüldü (77). Yöntemin esası ksantin / ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan süperoksit anyonlarının nitroblue tetrazoliumu indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonuna dayanır. 1 Ünite SOD aktivitesi nitroblue tetrazoliumun (NBT) indirgenmesini %50 inhibe eden protein konsantrasyonu olarak ifade edilir. SOD aktivitesi doku ve eritrosit örneklerinde tayin edildi.



Kullanılan Çözeltiler

- * Ksantin oksidaz çözeltisi (0.2 U/ml)
- * Bakır klorür (8 mM)
- * Kloroform/etanol (3:5, v/v)
- * Ksantin çözeltisi (0.3 mM)
- * Na₂EDTA çözeltisi (0.6 mM)
- * Nitroblue tetrazolium çözeltisi (150 µM)
- * Sodyum karbonat çözeltisi (0.6 mM)
- * Albumin çözeltisi (% 100 mg)

Reaksiyon karışımı

40 ml ksantin çözeltisi, 20 ml Na₂EDTA çzeltisi , 20 ml nitroblue tetrazolium çözeltisi, 12 ml sodyum karbonat çözeltisi , 6 ml albumin çözeltisi karıştırılarak çözeltinin pH'sı 10.2'ye ayarlanır.

Uygulama

Eritrositler için ön işlem:

Yıkanmış eritrosit 50 µl

Soğuk distile su 450µl

Kloroform-etanol 400 µl

Vortekslenir, 15.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilir, üst faz analiz için kullanılır.

	Kör	Örnek
Reaksiyon karışımı (ml)	2.850	2.850
Distile su (ml)	0.05	-
Örnek (ml)	-	0.05
Ksantin oksidaz (ml)	0.05	0.05
Karıştırılıp 25 °C'de 20 dk inkübe edilir.		
Bakır klorür	0.05	0.05

Kör ve örnekler tüplerinde oluşan formazanın optik dansitesi 560 nm dalga boyunda ölçüldü.

Hesaplama

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kör}}} \times 100$$

Bu reaksiyon karışımında %50 inhibisyon = 1 Ü enzim aktivitesine karşılık gelir.

3.3.10. Hemoglobin tayini

Prensip

Hemoglobin potasyum ferrisiyanür ile methemoglobine dönüşür. Methemoglobin potasyum siyanür ile siyanmethemoglobine dönüşür. Oluşan renkli bileşiğin absorbansı 546 nm de spektrofotometrik olarak ölçülür (78).

Kullanılan çözelti

Drabkin ayıracı; $K_3[Fe(CN)_6]$ 0.2 g, KCN 0.5 g Na_2CO_3 1 g tartılır ve distile suyla 1 litreye tamamlanır.

Uygulama

5 ml Drabkin çözeltisi üzerine 20 µl kan örneği eklenip iyice karıştırıldı. 5 dakika sonra absorbanlar 546 nm de Drabkin ayıracına karşı okundu.

Hesaplama

$$\text{Hemoglobin konsantrasyonu (g/dl)} = \text{Absorbans} \times 36.77$$

3.3.8. Protein tayini

Prensip

Beyin dokusu protein düzeylerinin belirlenmesinde Folin Lowry yöntemi kullanıldı(79).

Bu yöntemin prensibi; alkali koşullarda bakır (II) iyonlarının proteinlerin peptid bağlarıyla kompleks oluşturup (Biüret reaksiyonu). daha sonra ortama eklenen Folin-Ciocalteau ayıracının bakır peptid bağı, proteinlerde bulunan tirozin ve triptofan ile indirgenerek şiddetli mavi-yeşil renk vermesi esasına dayanır. Reaksiyon sonucu oluşan mavi renkli ürünün absorbansı 750 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler

- Bakır sülfat (% 0,1)
- Alkali tartarat stok çözeltisi (1 litre 0.1 N NaOH içinde 20,1 g sodyum karbonat, 0.5 g sodyum tartarat)
- Alkali tartarat çalışma çözeltisi (9 birim alkali tartarat stok çözeltisi, 1 birim bakır sülfat çözeltisiyle seyreltilerek oluşturulur.)
- Folin-Ciocalteau reaktifi (1:1 distile su ile seyreltilerek oluşturulur.)

Uygulama

	Örnek (ml)	Standart(ml)	Kör (ml)
Doku	0.01	-	
Standart	-	0.05	
Distile su	-	-	0.01
Alkali tartarat çalışma çözeltisi	2.5	2.5	2.5
Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilir.			
Folin ayırıcı	0.25	0.25	0.25

İyice karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir. 750 nm dalga boyunda köre karşı standart ve örnek tüplerinin absorbanları okunur.

Hesaplama

$$\% \text{ mg protein} = \frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{standart}}} \times 100 \times \text{dilüsyon faktörü}$$

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizlerde Unistad 5.1 programı kullanıldı. Tanımlayıcı değerler ort±SD olarak verildi. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi ve Kruskal Wallis testi kullanıldı. Kruskal Wallis testi; nk denek içeren k adet grubun karşılaştırılmasında kullanılır. Her gruptaki denek sayıları 5 veya fazla ise k-1 serbestlik derecesine uygun bir x² dağılım söz konusudur. Test ölçütü;

$$H = \left[\left(\frac{12}{(N+1)N} \sum \frac{TG^2}{nG} \right) - 3(N+1) \right]$$

N: Çalışma toplam denek sayısını

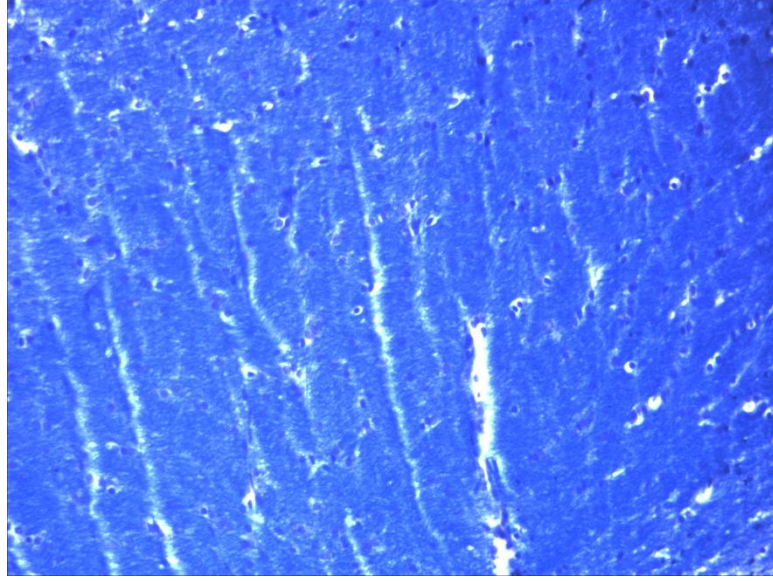
nG: Bir gruptaki denek sayısını

TG: Bir gruptaki sıra sayıları toplamını belirtir.

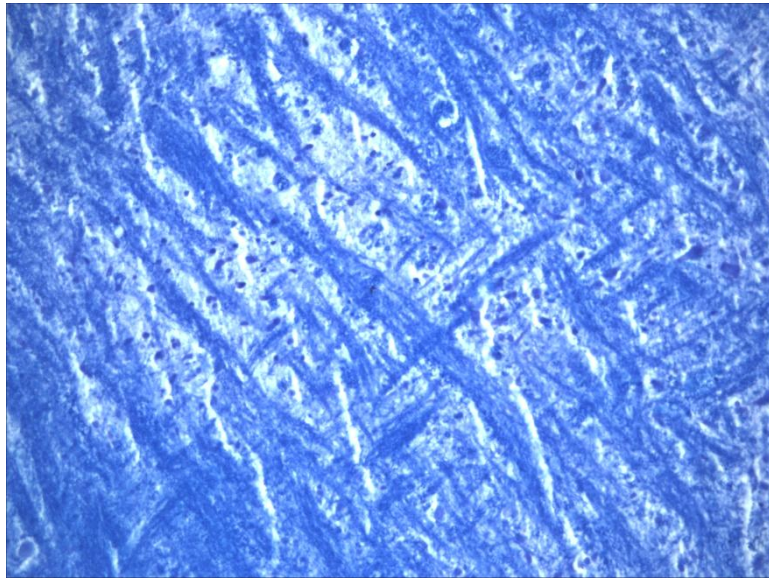
Grupların ikili karşılaştırmalarında Bonferroni, Tamhane ve Dunn testi kullanıldı. p<0.05 anlamlı, p<0.01 ileri derecede anlamlı, p<0.001 çok ileri derecede anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Cuprizon uygulaması ile deneysel MS modelinin oluşup oluşmadığını anlamak için alınan beyin dokusu koronal kesitleri LFB ile boyanmıştır. Kontrol grubunda miyelinizasyon tam olarak gözlenirken, cuprizon uygulanan MS grubunda beyaz cevherde LFB ile erken miyelin kaybını destekler boyanma elde edilmiştir. Miyelin kaybını gösteren LFB alanlarında histiyosit infiltrasyonu gözlenmiştir. MS+L ve MS+EA gruplarında ise kontrol grubuna benzer boyanma görülmüştür.



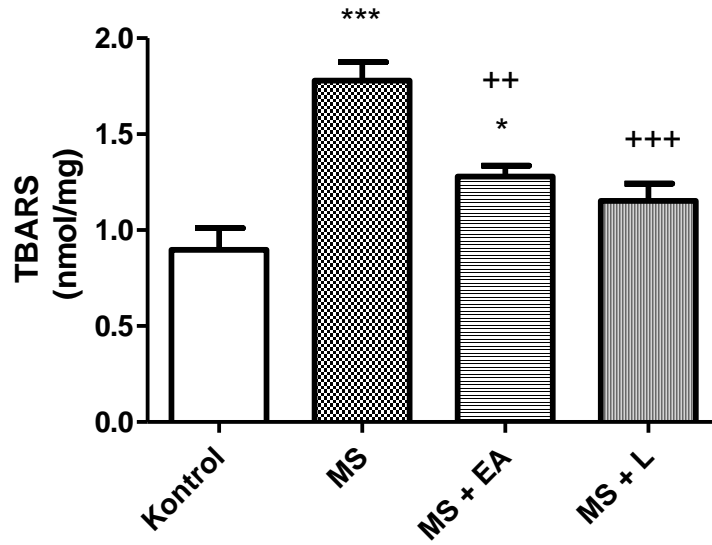
Kontrol grubuna ait beyaz cevherde düzenli yapı. X200. LFB



Deneysel MS beyaz cevherde fokal demiyelinizasyon, bu alanda makrofaj infiltrasyonu. X200. LFB

Tablo 4.1: Deney gruplarının **beyin dokusu TBARS** düzeyleri (nmol/mg protein)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=8	MS + L n=6
	1.32	1.85	1.07	1.08
	0.63	1.74	1.06	0.83
	0.92	2.15	1.32	1.22
	0.45	1.37	1.30	1.39
	0.38	2.07	1.47	0.99
	0.92	1.75	1.39	1.37
	1.14	1.41	1.14	
	1.17	1.84	1.43	
	1.12			
Ort±sd	0.89±0.33	1.77±0.27	1.27±0.16	1.15±0.22

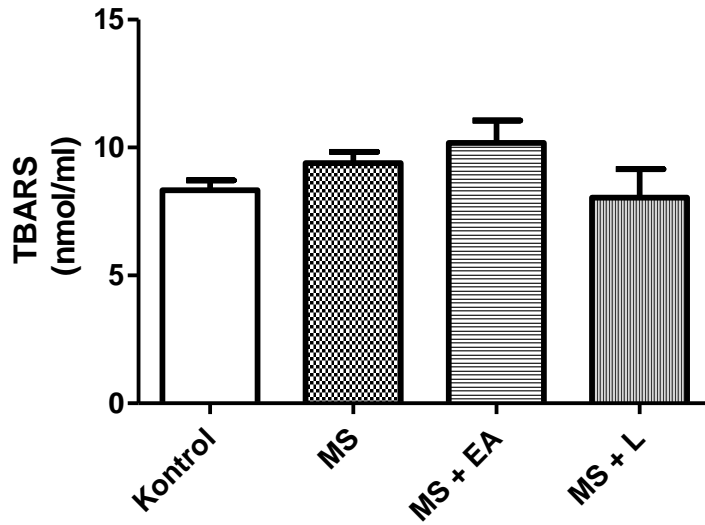


Şekil 4.1: Gruplara ait beyin dokusu TBARS düzeylerinin karşılaştırılması. * p<0.05, ***p<0.001; Kontrol grubu, ++p<0.01, +++p<0.001; MS grubuna göre anlamlılık değeri.

Grupların ikili karşılaştırılmasında;
Kontrol ve MS grupları arasında (p<0.001)
Kontrol ve MS+EA grupları arasında (p<0.05)
MS ve MS+L grupları arasında (p<0.001)
MS ve MS+EA grupları arasında (p<0.01) istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulundu.
Grupların diğer ikili karşılaştırılmalarında anlamlı derecede fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 4.1, Şekil 4.1.).

Tablo 4.2: Deney gruplarının plazma TBARS düzeyleri (nmol/ml)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=7	MS + L n=6
	6.91	9.74	14.27	5.27
	8.94	10.03	10.41	6.24
	9.44	10.48	7.95	5.57
	7.88	9.22	8.70	10.44
	9.29	7.80	12.34	11.71
	6.09	7.51	9.14	9.00
	9.14	11.07	8.40	
	8.55	9.29		
	8.70			
ort±sd	8.33±1.15	9.39±1.23	10.17±2.34	8.04±2.72

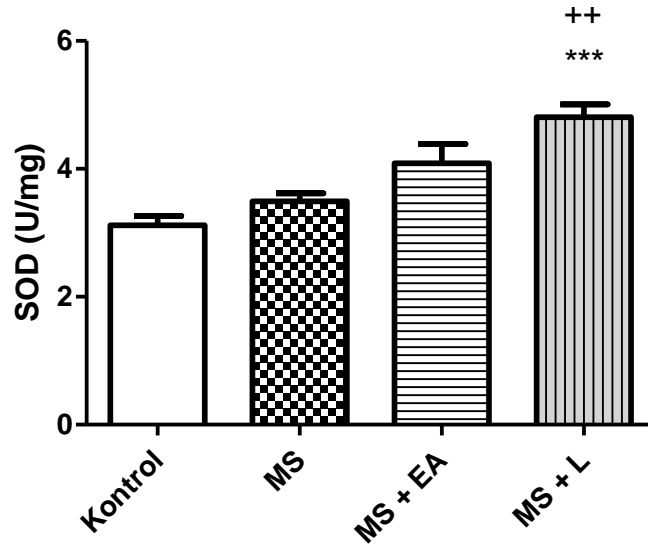


Şekil 4.2: Gruplara ait plazma TBARS düzeylerinin karşılaştırılması.

Plazma TBARS düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.2, Şekil 4.2.).

Tablo 4.3: Deney gruplarının **beyin dokusu SOD** aktiviteleri (U/mg protein)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=8	MS + L n=6
	3.18	3.68	4.68	4.98
	2.47	3.43	4.68	4.18
	2.83	3.65	3.94	5.12
	2.72	4.01	5.61	4.64
	3.25	3.05	3.26	4.37
	2.87	3.83	3.13	5.51
	3.72	3.09	3.88	
	3.73	3.14	3.49	
	3.28			
ort±sd	3.11±0.43	3.49±0.36	4.08±0.84	4.80±0.49



Şekil 4.3: Gruplara ait beyin dokusu SOD aktivitelerinin karşılaştırılması. ***p<0.001; Kontrol grubu, ++p<0.01; MS grubuna göre anlamlılık değeri.

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

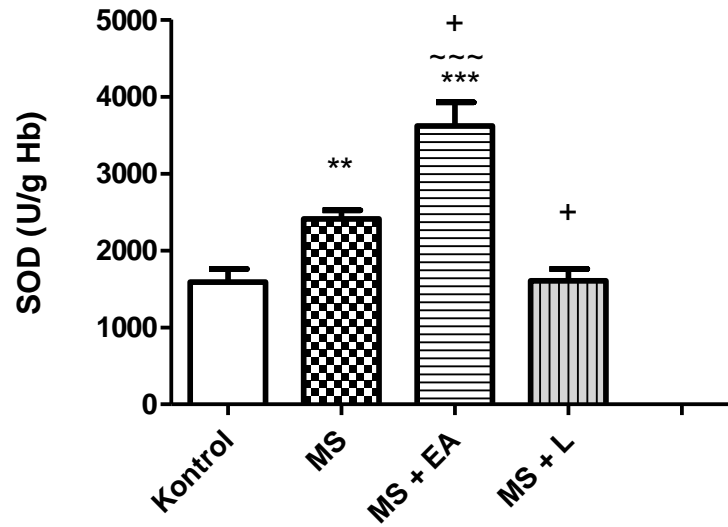
Kontrol ve MS+L grupları arasında (p<0.001)

MS ve MS+L grupları arasında (p<0.01) istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulundu.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 4.3, Şekil 4.3.).

Tablo 4.4: Grupların eritrosit SOD aktiviteleri (U/g Hb)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=8	MS + L n=6
	2207	2031	3178	1701
	1005	2539	3564	1974
	1139	2430	2706	1163
	1142	2496	2745	1908
	1385	3005	5103	1112
	1458	1948	4708	1770
	1431	2456	3706	
	2294	2358	3248	
	2233			
ort±sd	1588±514	2408±325	3620±872	1605±375

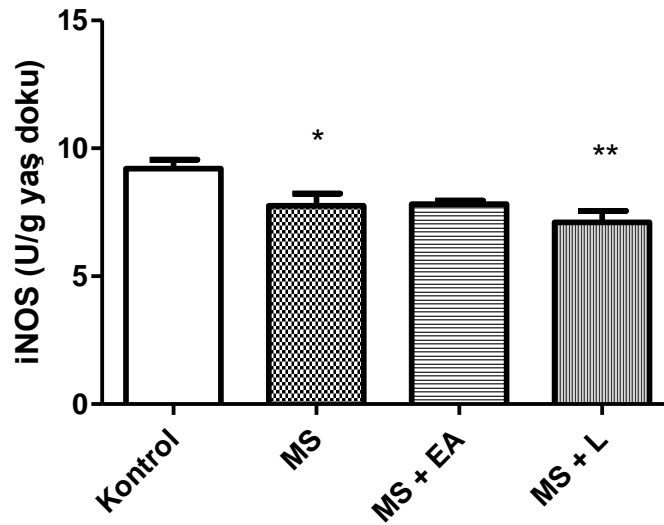


Şekil 4.4: Gruplara ait eritrosit SOD aktivitelerinin karşılaştırılması. ** p<0.01, *** p<0.001; Kontrol grubu, + p<0.05; MS grubuna göre, ~~~ p<0.001 MS+L grubuna göre anlamlılık değeri.

Grupların ikili karşılaştırılmasında;
Kontrol ve MS grupları arasında (p<0.01),
Kontrol ve MS+EA grupları arasında (p<0.001),
MS+EA ve MS+L grupları arasında (p<0.001),
MS ve MS+EA grupları arasında (p<0.05),
MS ve MS+L grupları arasında (p<0.05) istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulundu.
Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 4.4, Şekil 4.4.).

Tablo 4.5: Deney gruplarının **beyin dokusu iNOS** aktivitesi (U/g yaş doku)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=8	MS + L n=6
	9.93	9.82	7.46	7.46
	8.88	7.82	7.82	6.75
	10.66	7.82	7.82	5.33
	8.88	5.86	7.46	8.17
	8.88	6.04	7.46	8.17
	7.46	7.82	8.17	6.75
	8.17	9.02	7.82	
	10.66	7.82	8.53	
	9.24			
ort±sd	9.20±1.07	7.75±1.33	7.82±0.38	7.11±1.07



Şekil 4.5: Gruplara ait beyin dokusu iNOS aktivitelerinin karşılaştırılması *p<0.05, **p<0.01; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

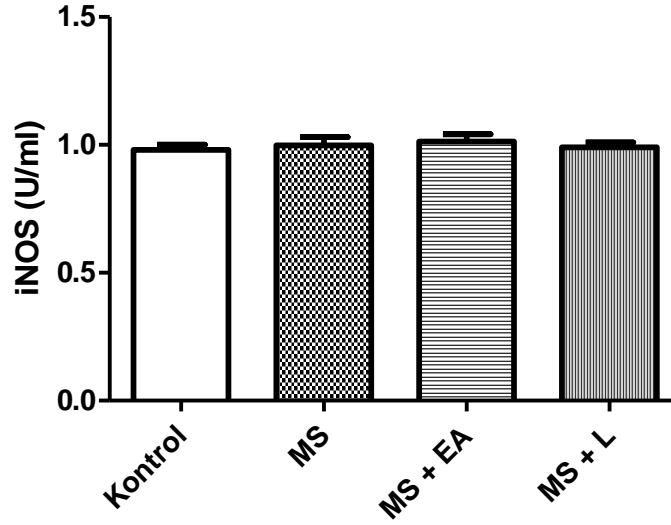
Kontrol ve MS grupları arasında (p<0.05)

Kontrol ve MS+L grupları arasında (p<0.01) istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulundu.

Grupların diğer ikili karşılaştırılmalarında anlamlı derecede fark bulunmadı (p>0.05). (Tablo 4.5, Şekil 4.5.).

Tablo 4.6: Deney gruplarının plazma iNOS aktiviteleri (U/ml)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=7	MS + L n=6
	0.89	0.94	0.96	1.03
	0.92	1.21	1.08	0.94
	0.96	0.92	0.92	0.96
	0.92	0.98	1.00	1.01
	0.98	0.94	0.98	0.94
	1.03	0.96	0.98	1.03
	0.96	1.00	1.14	
	1.08	1.00		
	1.03			
ort±sd	0.98±0.06	0.99±0.09	1.01±0.07	0.99±0.04

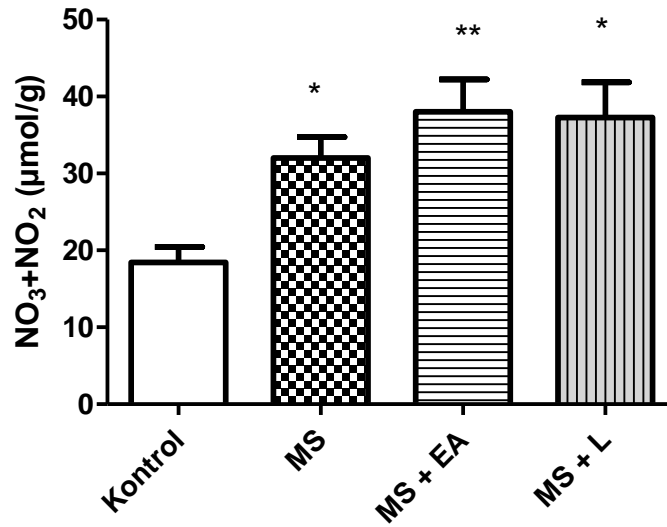


Şekil 4.6. Gruplara ait plazma iNOS aktivitelerinin karşılaştırılması.

Plazma iNOS düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.6, Şekil 4.6.).

Tablo 4.7: Deney gruplarının beyin dokusu total nitrit+nitrat düzeyleri ($\mu\text{mol/g}$ protein)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=8	MS + L n=6
	16.48	25.33	52.52	39.31
	15.63	45.55	26.83	16.19
	19.44	29.62	27.14	34.89
	18.11	29.96	51.98	44.70
	20.00	25.64	27.91	41.67
	29.53	29.19	26.77	46.95
	24.59	42.54	45.86	
	11.02	28.25	45.17	
	11.23			
ort\pmsd	18.45 \pm 5.94	32.01 \pm 7.66	38.02 \pm 11.89	37.29 \pm 11.15

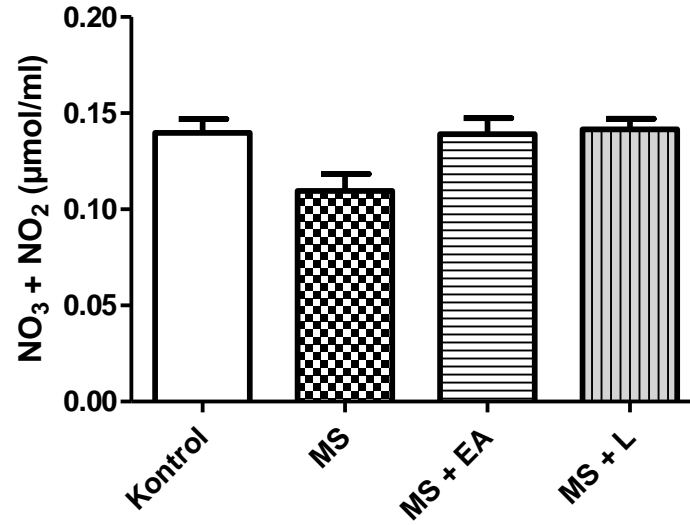


Şekil 4.7: Gruplara ait beyin dokusu total nitrit+nitrat düzeylerinin karşılaştırılması. * $p<0.05$, ** $p<0.01$; Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

Grupların ikili karşılaştırılmasında;
Kontrol ve MS grupları arasında ($p<0.05$),
Kontrol ve MS+EA grupları arasında ($p<0.01$),
Kontrol ve MS+L grupları arasında ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulundu. Grupların diğer ikili karşılaştırılmalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmadı (Tablo 4.7, Şekil 4.7.).

Tablo 4.8: Deney gruplarının plazma total nitrit+nitrat düzeyleri ($\mu\text{mol/ml}$)

	Kontrol n=9	MS n=5	MS + EA n=7	MS + L n=6
	0.16	0.11	0.15	0.12
	0.12	0.09	0.11	0.16
	0.13	0.09	0.17	0.13
	0.11	0.13	0.12	0.12
	0.12	0.09	0.13	0.14
	0.12		0.14	0.15
	0.17		0.11	
	0.12			
	0.15			
ort±sd	0.13±0.02	0.10±0.01	0.13±0.00	0.14±0.01

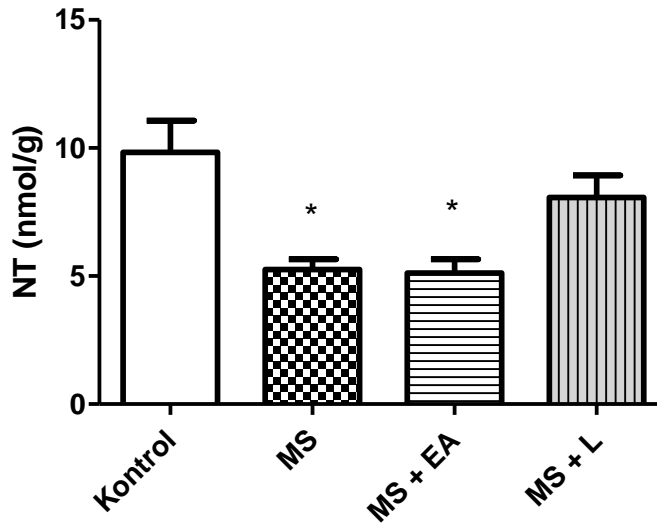


Şekil 4.8: Gruplara ait plazma total nitrit+nitrat düzeylerinin karşılaştırılması

Plazma total (nitrit+nitrat) düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.8, Şekil 4.8.)

Tablo 4.9: Deney gruplarının beyin dokusu nitrotirozin düzeyleri (nmol/g protein)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=8	MS + L n=6
	11.37	6.21	6.43	6.21
	13.311	5.12	4.93	6.58
	11.363	7.41	4.36	10.24
	6.73	4.348	8.20	6.62
	6.377	3.99	3.34	7.57
	6.54	4.78	4.08	11.18
	14.09	5.60	5.04	
	4.68	4.55	4.55	
	13.97			
ort±sd	9.82±3.72	5.25±1.12	5.12±1.53	8.07±2.11



Şekil 4.9: Gruplara ait beyin dokusu NT düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0.05$; Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

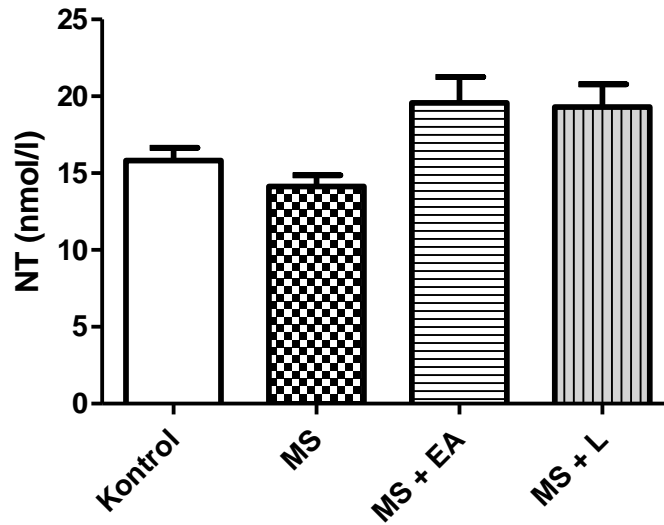
Kontrol ve MS grupları arasında ($p < 0.05$)

Kontrol ve MS+EA grupları arasında ($p < 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu bulundu.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.9, Şekil 4.9.).

Tablo 4.10: Deney gruplarının **plazma nitrotirozin** düzeyleri (nmol/l)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=7	MS + L n=6
	18	15	24	20
	14	13	22	14
	16	19	26	25
	13	13	16	18
	18	14	14	20
	12	13	17	19
	15	13	18	
	18	13		
	19			
ort±sd	15.82±2.47	14.12±2.1	19.57±4.46	19.3±3.61

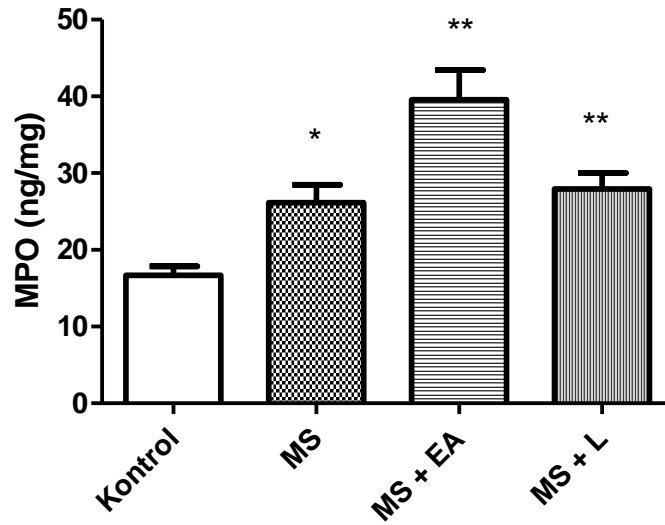


Şekil 4.10: Gruplara ait plazma NT düzeylerinin karşılaştırılması

Plazma NT düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı derecede fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.10, Şekil 4.10.).

Tablo 4.11: Deney gruplarının **beyin dokusu MPO** miktarı (ng/mg protein)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=8	MS + L n=6
	15.87	38.98	51.51	30.99
	14.37	17.65	24.49	18.96
	12.05	23.42	42.40	25.29
	14.20	28.57	39.94	29.81
	16.40	26.94	29.70	30.23
	15.13	19.13	28.38	32.44
	22.62	28.62	53.09	
	17.57	25.77	46.93	
	21.88			
ort±sd	16.68±3.51	26.14±6.61	39.56±10.94	27.95±5.01



Şekil 4.11: Gruplara ait beyin dokusu MPO miktarlarının karşılaştırılması. * $p<0.05$,

** $p<0.01$; Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve MS grupları arasında ($p<0.05$),

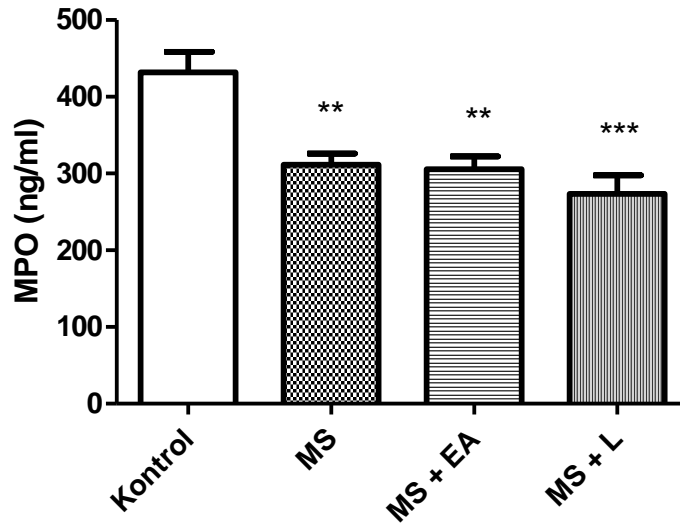
Kontrol ve MS+EA grupları arasında ($p<0.01$)

Kontrol ve MS+L grupları arasında ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.11, Şekil 4.11.).

Tablo 4.12: Deney gruplarının plazma MPO miktarları (ng/ml)

	Kontrol n=9	MS n=8	MS + EA n=7	MS + L n=6
	560	292	270	264
	400	294	256	228
	356	300	252	220
	368	284	324	380
	336	254	336	300
	532	370	340	250
	490	366	360	
	444	332		
	400			
ort±sd	431.77±79.86	311.50±40.87	305.42±44.73	273.66±59.36



Şekil 4.12: Gruplara ait plazma MPO düzeylerinin karşılaştırılması. ** p<0.01, *** p<0.001; Kontrol grubu grubuna göre anlamlılık değeri.

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve MS grupları arasında (p<0.01)

Kontrol ve MS+EA grupları arasında (p<0.01)

Kontrol ve MS+L grupları arasında (p<0.001),
istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulundu.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 4.12, Şekil 4.12.).

5.TARTIŞMA

MS, MSS' nin beyin parankimine lenfosit ve makrofaj infiltrasyonunun olduğu, demiyelinizasyonla karakterize kronik enflamatuvar hastalığıdır (3). Özellikle genç bireylerde başlayarak en verimli oldukları dönemde görülmesi, önemli özürllüklere ve iş gücü kaybına neden olması, yaşam kalitesini etkilemesi bu hastalığı inceleme yönündeki ilgiyi arttırmaktadır. Hastalığın radikal metabolizması ile ilişkisi yoğun çalışılmakta olup,ROS hücrede birçok düzenleyici süreçte etkilidir. Serbest radikal üretimi antioksidan kapasiteyi aştığında, oksidatif stres söz konusudur ve lipit, protein ve nükleik asit gibi makromoleküllerin hasarına neden olur (10). Son yıllarda ROS, oksidatif ve nitrozatif stresin MS lezyonlarının oluşumuna ve sürmesine katkısı olduğu anlaşılmıştır (80). MS lezyonlarında oksidatif hasarın birçok belirteci gösterilmiş, ek olarak MS hastalarının serumlarında ve MS plaklarında antioksidan düzeyleri azalmış olarak ölçülmüştür (2,3). ROS temizleyicileri, MS lezyon oluşumunun çeşitli düzeylerini etkileyebileceğinden dolayı, antioksidan uygulamasının MS tedavisi için faydalı olması beklenmektedir (10).

Buradan yola çıkarak MS modelinde güncel antioksidanlar olan likopen ve EA' nın oksidatif ve nitrozatif stres üzerine olan etkilerini inceledik.

Çalışmamızda cuprizon ile MS modeli oluşturulan sıçanların beyin dokularında histokimyasal olarak erken demiyelinizasyonun gözlenmesi modelin başarıyla oluşturulduğunu göstermiştir. Aynı dokuların TBARS değerlerinin anlamlı yüksek bulunması MS modeli ile beyin dokusunda lipooksidatif hasarın arttığı anlamlı şekilde aşıkardır. Bu modele antioksidan uygulaması ile lipooksidatif hasarın azalması her iki antioksidan için anlamlı bulunmuştur. Antioksidanların etkinliği kendi aralarında kıyaslandığında fark gözlenmese de kontrol ile kıyaslandığında likopenin daha etkin bir antioksidan olduğu gözlenmiştir. Plazmada tayin edilen TBARS değerleri tüm gruplar kıyaslandığında anlamlı sonuçların bulunamaması cuprizonun daha çok beyin dokusuna etkinliğinin bir göstergesi olarak düşünülebilir. Oksidatif stresle ilişkili olarak doku SOD aktiviteleri değerlendirildiğinde MS modeli oluşumu ile beyin dokusu SOD aktivitesi anlamlı bir değişim göstermese de MS modeli varlığında likopen uygulaması doku SOD aktivitesini anlamlı arttırmıştır. Bu artış EA için anlamlı bulunamamıştır. Buna göre MS modelinde likopen uygulaması doku TBARS azalması yanında doku SOD aktivitesinin etkinliğini arttırmada

yararlı gözükmemektedir. Buna karşılık eritrosit SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında MS modeli oluşumu ile eritrosit SOD aktivitesi anlamlı indüklenirken , yalnız antioksidan olarak EA uygulamasında SOD aktivite artışı ileri derecede anlamlı ve etkili bulunmuş olması ilginçtir. Zira likopen uygulaması ile beyin dokusunda olduğu gibi eritrositlerde SOD aktivite artışının anlamlı bulunmamış olması SOD etkinliğini arttırmada likopen EA gibi etkili gözükmemektedir.

Nitrozatif stres açısından deney sonuçları değerlendirildiğinde doku düzeyinde total nitrit-nitratın artışı istatistiksel olarak tüm deney gruplarında anlamlı bulunmuştur. Fakat doku iNOS enzim aktivitesinin artmış bulunmaması NO oluşumu artışının doku demyelinizasyonundan da büyük oranda sorumlu olan deneysel olarak tayin edemediğimiz nNOS'tan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Benzer literatür çalışmaları bu durumu desteklemektedir (81). Buna karşılık makrofajlarda önemli reaksiyondan sorumlu MPO miktarının deney gruplarında anlamlı artmış bulunması kimyasal bir ajanla reaksiyonun doku makrofajlarını uyurabileceğini göstermiştir. Plazmada ise cuprizonun muhtemel bir birikiminin olmadığı düşünüldüğünde böyle bir etkisi gözlenmemiştir.

Doku hasarına neden olabilecek doku nitrotirozin düzeylerinin deney gruplarında artmış TBARS ve NO ürünlerine rağmen anlamlı düşük bulunması ilginçtir. Nitrotirozin düzeyindeki değişikliklerin peroksinitrit miktarıyla korelasyon gösterdiği bilinmektedir (33). Uyumsuz bir bulgu gibi gözükse de bu durum mevcut literatür bilgileri ile değerlendirildiğinde peroksinitrit dekompozisyonunu destekleyen bilgiler ışığında bu azalmayı açıklamak mümkündür. Her üç deney grubunda da cuprizon uygulamasının nitrotirozin dekompozisyonunu hızlandırdığı düşünülmektedir (82). Ayrıca EA' nın peroksinitritin indüklediği oksidatif ve nitrozatif hasara karşı koruyucu rolü olduğu bilinmektedir (65). Plazma nitrotirozin düzeyleri irdelendiğinde kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir.

Sonuç olarak; nörotoksik bir madde olan cuprizon ile demyelinizasyon başarıyla oluşturulmuş, deneysel MS modeli gerçekleştirilmiştir. Bulgularımız cuprizon ile oluşturulan deneysel MS modelinde TBARS' nin arttığı yönündedir. Çalışmamızda deney gruplarında doku düzeyinde NO'nun arttığı, yıkım ürünleri olan nitrit-nitrat aracılığıyla gösterilmiştir. NO artışından nNOS' un sorumlu olduğunu düşünmekteyiz (81). Nitrotirozinin düşük bulunmasında ki neden bakır kelatörü olan cuprizon aracılı peroksinitrit dekompozisyonu

olabilir. Deney gruplarında doku düzeyinde MPO'unun artmış olması enflamatuvar cevabın indüklendiği savını desteklemektedir.

Serbest radikal aracılı hasarın olduğu deneysel MS modelimizde her iki antioksidan oksidatif hasarı azaltmış gözükmemektedir Likopen hem oksidatif hasarı azaltması, hem de antioksidan SOD enzimi arttırması açısından doku düzeyinde EA' ya göre daha etkilidir

Bu bilgiler doğrultusunda deneysel MS modelinde antioksidan olarak likopen ve EA uygulamasının oksidatif azaltarak hastalığın önlenmesinde veya ilerlemesini yavaşlatmada etkili olacağını düşünmekteyiz.

6. ÖZET

MS çoğunlukla genç erişkinleri etkileyerek, genç yaşta özür lülü ğe neden olan MSS'nin kronik enflamatuvar bir hastalıktır. Oksidatif ve nitrozatif stresin MS patogenizinde rol aldığı düşünölmektedir. Son yıllardaki çalışmalar da antioksidan maddelerin MS hastalı ğındaki etkileri üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmamızda amacımız deneysel MS modeli oluşturulan sıçanlarda, oksidatif hasarı ve NO metabolizmasını , güncel antioksidanlar olan likopen ve EA'nın etkilerini incelemektir. Deneysel MS modeli oluşturmak amacıyla; Wistar Albino sıçanların toz haline getirilen yemlerine % 0,6 (w/w) oranında cuprizon 15 gün süre ile ilave edildi. Deneysel MS gruplarının oksidan strese ne kadar maruz kaldıklarını görmek amacıyla beyin dokusu ve plazma TBARS düzeyleri, oksijen radikal detoksifikasyonu etkinliğini göstermek amacıyla beyin dokusu ve eritrosit SOD aktiviteleri incelendi. Nitrozatif stres açısından incelemek amacıyla beyin dokusu ve plazmada NO metabolitleri, nitrotirozin düzeyleri ve iNOS aktivitesi tayin edildi. MPO miktarıda da ölçölerek enflamatuvar cevap değeriendirildi.

Cuprizon vererek deneysel MS modeli oluşturduğumuz deney gruplarında beyin dokusu TBARS düzeyleri kontrol grubuna göre artmış bulunurken, likopen ve EA uygulamasıyla oksidatif stresin azalması her iki antioksidan için anlamlı bulundu. Kontrol ile kıyaslandığında likopenin oksidatif hasarı önlemede daha etkili olduğu göröldü. Doku SOD aktiviteleri deneysel MS modeli oluşumu ile anlamlı bir değışim göstermezken, eritrosit SOD aktivitesi anlamlı indüklenmiş olarak bulundu. Doku düzeyinde likopenin, eritrosit düzeyinde EA'nın SOD etkinliğini arttırmada daha etkili olduğu göröldü. Nitrozatif stres açısından bakıldığında tüm deney gruplarında doku düzeyinde total nitrit + nitrat düzeyleri anlamlı artmış olarak bulundu. Ancak iNOS enzim aktivitesi paralel bir artış görölmedi. Artmış TBARS ve NO ürünlerine rağmen doku nitrotirozin düzeyleri anlamlı düşük bulunmuştur.. Doku düzeyinde enflamasyonun belirteci miyeloperoksidaz aktivitesi artmış olarak bulundu.

7. SUMMARY

MS is a chronic inflammatory disease of the central nervous system which causes disability at early ages by mainly effecting young adults. It is suggested that oxidative and nitrosative stresses play roles in pathogenesis of MS. Recent studies focused on the effects of antioxidants on MS disease.

In this study our aim was to investigate the oxidative damage and NO metabolism, effects of lycopene and ellagic acid (EA) which are among the popular antioxidants for rats in experimental MS model. For generating an experimental MS model; %0,6 (w/w) cuprizone was added to dustified food of Wistar Albino rats for 15 days. Brain tissue and plasma TBARS levels were measured in order to determine the amount of oxidative stress which the experimental MS groups were exposed to and brain tissue and also erythrocyte SOD activities were examined to show the effectiveness of detoxification of oxygen radials. NO metabolites, nitrotyrosine levels and iNOS activity were analysed in brain tissue and plasma in order to examine nitrozative stress. Inflammatory response was evaluated by measurement of myeloperoxidase activity.

While brain tissue TBARS levels in experimental MS groups generated by giving cupizone were found higher than control groups, the decrease of oxidative stress by lycopene and EA treatment were found significant for both antioxidants. Lycopene was found to be more effective in preventing oxidative stress compaired to the control. Although tissue SOD activity was not correlated with MS model severity, the erythrocyte SOD activity was significantly induced by this experimental model. Lycopene in tissues and EA in erythrocyte to improve the SOD activity was seen as more effective. Total nitrite + nitrate levels in tissues were found to be significantly increased in all experimental groups when evaluated for nitrozative stress. But there was no parallel increase in iNOS enzyme activity. Despite of increased TBARS and NO products, tissue nitrotyrosine levels were found significantly low. . In brain tissue as an inflamatory marker myelopeoxidase amount was found elevated.

8. KAYNAKLAR

1. Rowland PL. Meritt's neurology, 11th edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2005; Section XIX: 941-962.
2. Meeteren ME, Teunissen CE, Dijkstra CD, van Tol EA. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59(12): 1347-61.
3. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol* 2004; 251(3): 261-8.
4. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2002; 1: 232-241.
5. Rao AV, Agarwal S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutr. Res* 1999; 9: 305-323.
6. Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, Ozer S. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol* 2006; 218(2-3): 164-71.
7. Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, de Nigris F, Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric Oxide* 2006; 15(2): 93-102.
8. Atessahin A, Ceribasi AO, Yuce A, Bulmus O, Cikim G. Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100(2): 121-6.

9. Adamo AM, Paez PM, Escobar Cabrera OE, Wolfson M, Franco PG, Pasquini JM, Soto EF. Remyelination after cuprizone-induced demyelination in the rat is stimulated by apotransferrin. *Exp Neurol* 2006; 198(2): 519-29.
10. Schreibelt G, van Horssen J, van Rossum S, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res Rev* 2007; 56(2): 322-30.
11. Drew PD, Xu J, Racke MK. PPAR-gamma: Therapeutic potential for multiple sclerosis. *PPAR Res* 2008; 2008: 627463.
12. Eraksoy M, Demir GA. Nöroloji. 1.baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2004: 508-522
13. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol Scand* 1975; 51(2): 110-36.
14. Ropper AH, Samuels MA. Adams and Victor's principles of neurology. 9th Edition , USA, The McGraw-Hill. Comp. 2009; 874-896.
15. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7(3): 268-77.
16. Mirza M. Multipl sklerozun etyolojisi ve epidemiyolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi* . 2002; 24 46 (1) 40-47.
17. Kurne A, Karabudak R, Aydın ÖF. Multipl skleroz patogenezinde basamaklar-1: Nöroinflamasyondan Nörodejenerasyona. *Turk Norol Derg* 2006; 12(1): 5-12.
18. Akpınar Z, Akça AH. Multipl sklerozun immunopatolojisi. *Selçuk Tıp Derg* 2007; 24; 99-107.
19. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006; 52(1): 61-76.

20. Tunalı G. Türkiye Klinikleri nöroloji dergisi multipl skleroz özel sayısı. 2004; 2(3): 277-181.
21. Lucchinetti CF, Bruck W, Parisi J et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707-17.
22. Sies H. Oxidative Stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; (91):31-38.
23. Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry. Physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65(18-19): 1865-74.
24. Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3th edition, New York, Oxford Univ Press, 1999.
25. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
26. Akyol Ö. Şizofrenide oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Derg* .2004; Ek Sayı 15.
27. Castro L, Freeman BA. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* 2000; 17(2): 161-165.
28. Schöneich C. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach, *Experimental Gerontology* 1999; 34(1): 19–34
29. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara Palme Yayıncılık 2003.
30. Vallance P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundam Clin Pharmacol*, 2003; 17: 1–10.
31. Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 2006 ; 8(5-6): 929–947.

32. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39 : 44–84.
33. Gonsette RE. Oxidative stress and excitotoxicity: a therapeutic issue in multiple sclerosis? *Mult Scler* 2007; 14(1): 22–34.
34. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18(10): 872-9.
35. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006; 113(3): 189-207.
36. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB Journal* 1995; 9: 526-533.
37. Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 771– 799.
38. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 827(1): 65-75.
39. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2004; 58: 39–46.
40. Naidoo R, Knapp ML. Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. *Clin Chem* 1992; 38: 2449–2454
41. LeVine SM. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 1992; 39: 271–274.

42. Karg E, Klivenyi P, Nemeth RE et al. Nonenzymatic antioxidants of blood in multiple sclerosis. *J Neurol* 1992; 246: 533–539.
43. Greco A, Minghetti L, Sette G et al. Cerebrospinal fluid isoprostane shows oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1999; 53: 1876–1879.
44. Calabrese V, Raggaele R, Cosentino E et al. Changes in cerebrospinal fluid levels of malondialdehyde and glutathione reductase activity in multiple sclerosis. *Int J Clin Pharmacol Res.*1994; 14: 119–123.
45. Langemann H, Kabiersch A, Newcombe J. Measurement of lowmolecular-weight antioxidants, uricacid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 1992; 32: 248–252.
46. Moriya M, Nakatsuji Y, Miyamoto K, Okuno T, Kinoshita M, Kumanogoh A, Kusunoki S, Sakoda S. Edaravone, a free radical scavenger, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett.*2008; 440(3): 323-6.
47. Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 2001; 158: 2057–66.
48. Hill KE, Zollinger LV, Watt HE, Carlson NG, Rose JW. Inducible nitric oxide synthase in chronic active multiplesclerosis plaques: distribution, cellular expression and association with myelin damage. *J Neuroimmunol* 2004; 151: 171–79.
49. van der Veen RC, Hinton DR, Incardonna F, Hofman FM. Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation. *J Neuroimmunol* 1997; 77: 1–7.
50. Touil T, Deloire-Grassin MS, Vital C, Petry KG, Brochet B. In vivo damage of CNS myelin and axons induced by peroxynitrite. *Neuroreport* 2001; 12: 3637–44.

51. Pehar M, Vargas MR, Robinson KM, Cassina P, England P, Beckman JS et al. Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motoneurons. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 1632–44.
52. Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenberg AE, Nagra RM, Tourtellotte WW, Griffiths LR. Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 119(2): 170-83.
53. Ruuls SR, Bauer J, Sontrop K, Huitinga I, 't Hart BA, Dijkstra CD. Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 1995; 56(2): 207-17.
54. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, et al. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 675–80.
55. Constantinescu CS, Freitag P, Kappos L. Increase in serum levels of uric acid, an endogenous antioxidant, under treatment with glatiramer acetate for multiple sclerosis. *Mult Scler* 2000; 6: 378–81.
56. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 2000; 163(6): 739-44.
57. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother*. 2004; 58(2): 100-10.
58. R. Edge, D. J. McGarvey and T. G. Truscott. The carotenoids as anti-oxidants — a review. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1997; 41(3): 189-200.
59. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Altern Med Rev* 2008; 13(2): 128-44.

60. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem* 2002; 50(7): 2200-6.
61. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* 2005; 16(6): 360-7.
62. Bakkalbaşı E, Menteş O, Artik N. Food ellagitannins-occurrence, effects of processing and storage. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; 49(3): 283-98.
63. Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Yasuhide T. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatogr A* 2000; 896: 87-93.
64. Devipriya N, Sudheer AR, Menon VP. Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21: 621-630.
65. Ippoushi K, Takeuchi A, Azuma K. Prevention of peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions by ellagic acid. *Food Chem* 2009; 112(1): 185-188.
66. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Pomegranate by product administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 1928-1935.
67. Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 8956-8961.
68. Heber D. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Letters* 2008; 269: 262-268.

69. Torkildsen Ø, Brunborg LA, Myhr K-M, Bø L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand* 2008; 117 (188): 72–76.
70. Messori L, Casini A, Gabbiani C, Sorace L, Muniz-Miranda M, Zatta P. Unravelling the chemical nature of copper cuprizone. *Dalton Trans* 2007; 21: 2112-4.
71. Glenn K, Matsushima, Pierre Morell. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathology* 2001; 11: 107-116.
72. Venturini G. Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo. *J Neurochem* 1973; 21: 1147-1151.
73. Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone Uña AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF. The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res* 2007; 32(2): 279-92
74. Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP, Suzuki K, Matsushima GK. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 1998; 92(1-2): 38-49.
75. Arneht W, Herold B, Nitrit/nitrat- bestimmung in wurstwaren nach enzymatischer reduction. *Fleischwirtschaft* 1998; 68: 761-764.
76. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 12: 302-10.
77. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3): 497-500.
78. Fairbanks F, Klee OO. Biochemical aspects of hematology. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia, Saunders Company 1994; 2020-2021.

79. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-275.
80. Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: The role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol.* 1999; 9: 69-92.
81. Liñares D, Taconis M, Maña P, Correcha M, Fordham S, Staykova M, Willenborg DO. Neuronal nitric oxide synthase plays a key role in CNS demyelination. *J Neurosci* 2006; 26(49): 12672-81.
82. Pfeiffer S, Gorren AC, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. *J Biol Chem* 1997; 272(6): 3465-70.

9. ÖZGEÇMİŞ

20.06.1980 yılında VAN, Erciş'te doğdum. İlköğrenimimi Havsa Sokollu İlkokulu'nda, ortaöğrenimimi Havsa Ortaokulu'nda tamamladım. 1998 yılında Edirne Lisesi'nden, 2004 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 25 Ekim 2005 tarihinden itibaren İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık öğrencisi olarak görev yapmaktayım.