

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

**BEYİNDE, SÜLFİTİN APOPTOZİSE ETKİSİ VE
ELEKTROFİZYOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

Ceren KENCEBAY

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2010

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

BEYİNDE, SÜLFİTİN APOPTOZİSE ETKİSİ VE ELEKTROFİZYOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

Ceren KENCEBAY

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Narin DERİN**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2009.02.0122.001)

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir.”

Antalya, 2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma jürimiz tarafından Biyofizik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 12.07.2010

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Narin DERİN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Piraye YARGIOğLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Aysel AçAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr Murat CANPOLAT
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr Semir ÖZDEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Onay:

Bu tez, Enstitü Yönetimi Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu' nun/...../..... tarih,/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

İnsanlar bazı aminoasitlerin metabolizmasıyla oluşan endojen sülfite, gıda, ilaç tüketimi ve kirli havanın solunmasıyla eksojen sülfite maruz kalırlar. Alınan sülfid miktarının fazla olması veya vücutta okside edilememesi sonucunda oluşan sülfid radikallerinin biyomoleküllere olumsuz etkisinin olduğu bilinen bir gerçektir. Bu nedenle, çalışmamızda sülfidin apoptozise olan etkisi ve bu etkinin elektrofizyolojik parametrelerle ilişkisi incelenmiştir.

Çalışmamızda 40 adet wistar sıçan dört gruba ayrılmıştır: Kontrol grubu (K), sülfid ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) verilen grup(S), fosfolipaz A₂ inhibitörü (Quinacrine) verilen grup (Q) Quinacrine-Sülfid verilen grup (QS). 100 mg/kg/gün sülfid gavajla, 10 mg/kg/gün Quinacrine intraperitoneal enjeksiyonla otuz beş günlük deney süresi boyunca verilmiştir. Deney süresinin bitiminde sıçanların somatosensoryel uyarılma potansiyelleri (SEPs) kaydedilmiş, biyokimyasal analizler için beyin dokuları çıkartılmış, kanları alınmıştır.

Sülfite maruz kalmanın bir göstergesi olarak kabul edilen plazma-S-sülfonat düzeylerinin S ve QS gruplarında arttığı saptanmıştır.

Çalışmamızda lipid peroksidasyonu değerlendirmek için, tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) oluşumuna bakılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, diğer grupların TBARS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Diğer yandan, S grubu ile karşılaştırıldığında QS grubunda TBARS değerlerinin azaldığı fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Kontrol ve deney gruplarının beyin dokularında gerçekleştirilen Western Blot ve dansitometrik analizlerin de, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında S, Q ve QS gruplarının sPLA₂ miktarında anlamlı bir artışın olduğu bulunmuştur. S grubu ile karşılaştırıldığında, QS grubunda quinacrine tedavisinin sPLA₂ miktarındaki artış üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Kontrolle karşılaştırıldığında Q grubunda SEP latenslerinin değişmediği, S grubunda ise tüm dalga formlarında istatistiksel olarak anlamlı uzama olduğu, QS grubunda ise P1 ve N1 bileşenlerinin latenslerinin uzadığı gözlenmiştir. S grubu latenslerine göre QS grubunun SEP latenslerinin N1, P2, N2 bileşenlerinin kısaldığı, Q grubu ile karşılaştırıldığında QS grubu P1 ve N1 bileşenlerinin latenslerinin istatistiksel olarak uzadığı gözlenmiştir.

Kaspaz-3 enziminin düzeyi K grubuyla karşılaştırıldığında S grubunda artmış, Q ve QS gruplarında ise değişmemiştir. Apoptozise girmiş hücreleri belirleyebilmek için yapılan Tunel analizi verilerimiz kaspaz 3 bulgularımızla uyumludur. Sülfid gruplarında somatosensoryel alanda Tunel pozitif hücreler saptanırken K, Q ve QS gruplarına ait somatosensoryel alandan Tunel pozitif hücrelere rastlanmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, günlük normal diyetle alınan sülfid dozunun lipid peroksidasyonu arttırdığı, SEP latenslerini uzattığı ve apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir. Sülfidin bu etkisinde sPLA₂ enziminin etkili olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Sülfid, Somatosensoryel uyarılma potansiyelleri (SEP), Lipid peroksidasyonu, Sektretuar fosfolipaz A2 (sPLA₂)

ABSTRACT

Humans are exposed to both endogenous and exogenous sulfites through separate sources. Whereas endogenous sulfites are formed through metabolism of some aminoacids, exogenous sulfites can stem from drugs, food consumption and inhalation of air pollution. It is a known fact that sulfite radicals, which are produced due to high amounts of sulfite injection or reduced oxidation capacity of the body, have negative effects on biomolecules. Therefore, in our study we investigated the effect of SO_3^{2-} on the apoptosis and the relationship of this effect with electrophysiological parameters.

In the present study, 40 wistar rats were divided randomly into four groups; control group (C), sulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) administered group (S), PLA_2 inhibitor (Quinacrine) administered group (Q) and Quinacrine+Sulfite administered (QS) group. Sulfite and Quinacrine were administered at the doses of 100 mg/kg/day via gavage and 10 mg/kg/day intraperitoneal injection respectively for thirty five-days. At the end of the period, somatosensory evoked potentials (SEPs) were recorded, blood samples and brain tissues were collected for biochemical analysis.

The plasma-S-sulfonate levels, as an indicator of exposure to sulfur dioxide, were increased in the S and the QS groups. In our study, the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were used to determine the lipid peroxidation. A statistically significant increase in TBARS values was observed in other experimental groups compared with the control group. On the other hand, TBARS values were decreased in the S group compared with the QS group, but this decline was not significant.

In the western blot and densitometric analysis of brain tissues, a significant increase in the level of s PLA_2 of S, Q and QS groups was detected compared with the C group. Quinacrine treatment had no significant effect on the increased s PLA_2 level of the sulfite administered group. Somatosensory evoked potential latencies did not change in the Q group compared with the C group, whereas a statistically significant prolongation of all wave forms was observed in the S group and the latencies of P1 and N1 components prolonged in the QS group. It was observed that N1, P2, N2 components of SEP latencies were shortened in the QS group compared with the latencies of S group, those of P1 and N1 components were statistically longer in the QS group than in the Q group.

The level of caspase-3 enzyme was increased in the S group, however no change was observed in groups Q and QS compared with the C group. The data obtained from the tunnel analysis to determine the cells underwent apoptosis were consistent with our caspase-3 findings. While tunel positive cells were detected in the somatosensory area of the sulfite groups, they were not detected in the somatosensory area of C, Q and QS groups.

As a result of our study, it is determined that the daily normal dietary intake of sulfide increased lipid peroxidation, induced apoptosis and prolonged SEP latencies. It is thought that s PLA_2 enzyme could play a role in the detrimental effect of sulfite.

Key words: sulfite, somatosensory evoked potentials (SEP), lipid peroxidation, secretory phospholipase A2 (s PLA_2)

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerekleşmesinde yol gösteren ve araştırmanın her aşamasında destek olan hocam Doç. Dr. Narin DERİN' e, özverili çalışmalarından dolayı Prof. Dr. Piraye YARGIOĞLU'na, bana her aşamada yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Dicle KİPMEN KORGUN, Dr. Gamze TANRIÖVER, Araş. Gör. Nihal ÖZTÜRK ve Araş. Gör. Özlem KÖSE' ye, teknik olanakları ile bu çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına teőkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------------|
| SAYFA | |
| ÖZET | IV |
| ABSTRACT | V |
| TEŞEKKÜR | VI |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ | VII |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | IX |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | XI |
| TABLolar DİZİNİ | XII |
| GİRİŞ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Somatosensoriyel korteks ve somatosensoriyel uyarılma Potansiyelleri | 4 |
| 2.1.1. Somatosensoriyel korteks | 4 |
| 2.1.2. Somatosensoriyel Uyarılma Potansiyeller | 6 |
| 2.2. Oksidatif Stres | 8 |
| 2.2.1. Serbest Radikal Kavramı | 8 |
| 2.2.2. Serbest Radikal Oluşumu | 8 |
| 2.2.3. Oksijen ve Oksijen Radikalleri | 9 |
| 2.2.3.1. Moleküler Oksijenin Özellikleri | 9 |
| 2.2.3.2. Serbest Oksijen Radikalleri | 9 |
| 2.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri | 11 |
| 2.2.4.1. Serbest radikallerin lipidlerle reaksiyonu | 12 |
| 2.2.4.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri | 12 |
| 2.2.4.3. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri | 13 |
| 2.2.4.4. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri | 13 |
| 2.2.5. Antioksidan savunma sistemi | 13 |
| 2.3. Sülfid | 14 |
| 2.3.1. Endojen Sülfid Oluşumu | 14 |
| 2.3.2. Eksojen Sülfid Alımı | 14 |
| 2.3.3. Sülfidin Metabolizması | 16 |
| 2.3.4. Sülfid Radikallerinin Oluşumu | 17 |
| 2.3.5. Sülfid Toksisitesi | 20 |
| 2.4. Apoptozis | 21 |
| 2.4.1. Apoptozis Morfolojisi | 21 |
| 2.4.2. Apoptozis ve Nekrozis Farkı | 22 |

| | | |
|------------------------------|---|-----------|
| 2.4.3. | Apoptozis yolağı | 24 |
| 2.4.4. | Apoptozis de görev alan aracılarda | 27 |
| 2.4.5. | Apoptozis ve oksidatif stres | 28 |
| 2.5. | Fosfolipaz A ₂ | 29 |
| 2.5.1. | Beyin dokusunda PLA ₂ eşitliliği | 29 |
| 2.5.1.1. | Sekretuar fosfolipaz A ₂ (sPLA ₂) | 30 |
| 2.5.1.2. | Sitozolik fosfolipaz A ₂ (cPLA ₂) | 31 |
| 2.5.1.3. | Plazmalojen-selektif PLA ₂ (Pls-EtnPLA ₂) | 33 |
| 2.5.1.4. | Ca ⁺² -bağımsız fosfolipaz A ₂ (iPLA ₂) | 34 |
| GEREÇLER VE YÖNTEMLER | | 35 |
| 3.1. | Gruplandırma | 35 |
| 3.2. | Deney Protokolü | 35 |
| 3.3. | Somatosensoryel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi | 35 |
| 3.4. | Biyokimyasal Yöntemler | 36 |
| 3.4.1. | Plazma-S-Sülfonat Tayini | 36 |
| 3.4.2. | Doku Tiyobarbitürik Asit Reaktif rnlerinin (TBARS) lmleri | 37 |
| 3.4.3. | sPLA ₂ düzeyinin tayini | 37 |
| 3.4.4. | Protein Tayini | 38 |
| 3.5. | Histolojik parametreler | 39 |
| 3.5.1. | Doku Takibi | 39 |
| 3.5.2. | Kaspaz 3 İmmünofloresan Boyama Yöntemi | 39 |
| 3.5.3. | TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labelling) Metodu | 39 |
| 3.6. | Sonuçların Değerlendirilmesi | 40 |
| BULGULAR | | 41 |
| 4.1. | Genel Görünüm | 41 |
| 4.2. | Plazma-S-Sülfonat Aktivite Sonuçları | 41 |
| 4.3. | SEP Sonuçları | 41 |
| 4.4. | Doku Tiobarbitürik Asit Reaktif rnleri (TBARS) Sonuçları | 44 |
| 4.5. | sPLA ₂ Miktarı Sonuçları | 44 |
| 4.6. | Kaspaz 3 İmmunohistokimyasal Analizi Sonuçları | 45 |
| 4.7. | TUNEL Analizi Sonuçları | 47 |
| TARTIŞMA | | 49 |
| SONUÇLAR | | 53 |
| KAYNAKLAR | | 54 |
| ZGEMIŐ | | 64 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---|---|
| SO₂ | : Sülfür dioksit |
| SO₄⁻² | : İnorganik sülfat |
| SO₃⁻ | : Sülfür trioksit anyon radikali |
| SO₄⁻ | : Sülfat anyon radikali |
| VEP | : Görsel uyarılma potansiyelleri |
| SEP | : Somatosensoriyal uyarılma potansiyelleri |
| Na₂S₂O₅ | : Sodyum metabisülfid |
| 4-HNE | : 4-hidroksi-2-nonenal |
| TBARS | : Tiobarbitürik asit reaktif ürünleri |
| SO₃⁻² | : Sülfid |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| TNF-α | : Tümör nekroze edici faktör |
| sit-c | : Sitokrom c |
| APAF-1 | : Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 |
| MAPK | : Mitojen aktive edici protein kinaz |
| SAPK/JNK | : Activation of the stress-activated protein kinase |
| PLA₂ | : Fosfolipaz A2 |
| AA | : Araşidonik asit |
| ROS | : Reaktif oksijen türleri |
| PAF | : Aktive edici faktör |
| sPLA₂ | : Sekretuar PLA ₂ |
| cPLA₂ | : Sitozolik PLA ₂ |
| PlsEtn-PLA₂ | : Plazmalojen-selektif PLA ₂ |
| iPLA₂ | : Kalsiyum-bağımsız PLA ₂ |
| Ca²⁺ | : Kalsiyum |
| TUNEL | : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labelling |
| S-I | : Primer somatosensoriyel korteks |
| S-II | : Sekonder somatosensoriyel korteks |
| OH• | : Hidroksil radikali |
| O₂ | : Moleküler oksijen |
| Fe⁺³ | : Ferrik demir |
| Cu⁺² | : Bakır |
| Mn⁺² | : Mangan |
| Mo⁺⁵ | : Molibden |
| O₂⁻ | : Süperoksit anyonu |
| H₂O₂ | : Hidrojen peroksit |
| Fe⁺² | : Ferröz demir |
| LOO• | : Peroksil radikali |
| LOOH | : Lipid hidroperoksitler |
| MDA | : Malondialdehit |
| TBA | : Tiyobarbitürik asit |

| | |
|---|---|
| SOD | : Süperoksit dismutaz |
| Cu/ZnSOD | : Bakır/Çinko süperoksit dismutaz |
| MnSOD | : Mangan süperoksit dismutaz |
| FeSOD | : Demir süperoksit dismutaz |
| CAT | : Katalaz |
| GSH-Px | : Glutatyon peroksidaz |
| Se | : Selenyum |
| GSSG-R | : Glutatyon redüktaz |
| GSSG | : Okside glutatyon |
| NADPH | : Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidad |
| GSH | : İndirgenmiş glutatyon |
| GST | : Glutatyon-S-transferaz |
| GSH | : Glutatyon |
| H₂SO₃ | : Sülfüröz asit |
| HSO₃⁻ | : Bisülfid iyonu |
| FDA | : Food and Drug Administration |
| SOX | : Sülfid oksidad |
| ⁻O₃SOO[•] | : Peroksimonosülfat anyon radikali |
| ONOO⁻ | : Peroksinitrit |
| GS[•] | : Glutathionyl radikali |
| GSOO[•] | : Glutatyon tiylperoksil radikali |
| GSSG^{•-} | : Glutatyon disülfid anyon radikali |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| ER | : Endoplazmik retikulum |
| TNFR-1 | : Tümör nekrozis faktör reseptörü-1 |
| FADD | : Fas associated death domain |
| TRADD | : TNFR1 associated death domain |
| DISC | : Death inducing signaling complex |
| Smac/DIABLO | : Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI |
| CAD | : Caspase- Activated DNase |
| AIF | : Apoptozisi indükleyen faktör |
| ICAD | : Inhibitor of Caspase-Activated DNase |
| MMP | : Mitokondrial membran permeabilizasyonu |
| PS | : Fosfotidilserin |
| IL-1β | : İnterlökin-1 β |
| Ag⁺ | : Gümüş |
| Hg⁺² | : Civa |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil | | Sayfa |
|-------|--|-------|
| 2.1. | Somatosensoriyel korteks | 5 |
| 2.2. | SEP'lerin yolları | 7 |
| 2.3. | Serbest oksijen radikallerinin oluşumu | 10 |
| 2.4. | Antioksidan savunma sistemi öğeleri | 13 |
| 2.5. | Vücutta endojen sülfid oluşumu | 15 |
| 2.6. | Sülfid oksidazın sülfidi sülfata oksitlemesi | 16 |
| 2.7. | Glutasyonun S-sülfosisteine dönüşümü | 17 |
| 2.8. | Glutasyonun zincir reaksiyonları GSNO: S-nitrosoglutasyon, GSSG: glutasyon disülfid, GSOOH: glutasyon sülfenil Hidroperoksit | 20 |
| 2.9. | Apoptozisin hücrel morfolojisi | 22 |
| 2.10. | Apoptotik ve nekrotik hücrelerin immünohistokimyasal Görüntüleri | 24 |
| 2.11. | Apoptozis yolları | 26 |
| 2.12. | Fosfolipaz A2 mekanizması | 30 |
| 2.13. | Fosfolipaz A2 yolağı | 32 |
| 2.14. | Hücre içi Fosfolipaz A2 yolağı | 33 |
| 4.1. | Plazma-S-Sülfonat Düzeyleri | 41 |
| 4.2. | Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen SEP'ler ve bileşenleri | 42 |
| 4.3. | Beyinde sPLA ₂ Western Blot analizi | 44 |
| 4.4. | Beyinde sPLA ₂ Western Blot dansitometrik analizleri | 45 |
| 4.5. | Kontrol ve sülfid grubuna ait somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde kaspaz-3 immünreaktivitesi | 46 |
| 4.6. | Quinacrine ve Quinacrine-Sülfid grubuna ait somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde kaspaz-3 immünreaktivitesi | 47 |
| 4.7. | Kontrol grubu somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde TUNEL immünreaktivitesi | 48 |
| 4.8. | Sülfid grubu somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde TUNEL immünreaktivitesi | 48 |
| 4.9. | Quinacrine grubu somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde TUNEL İmmünreaktivitesi | 48 |
| 4.10. | Quinacrine-Sülfid grubu somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde TUNEL immünreaktivitesi | 48 |

TABLULAR DİZİNİ

| Tablo | | Sayfa |
|--------------|--|--------------|
| 2.1. | Apoptozis ve nekrozis farkı | 23 |
| 4.1. | Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen SEP latensleri | 43 |
| 4.2. | Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen SEP genlikleri | 43 |
| 4.3. | Kontrol ve deney grubu hayvanlarının beyin TBARS değerleri | 44 |

GİRİŞ

İnsanlar ekzojen ve endojen olarak sülfite maruz kalırlar. Sülfite, metionin ve sistein gibi sülfür içeren aminoasitlerin metabolizması sırasında endojen olarak üretilir (1). Yiyecekler, içecekler, ilaçlar ve hava sülfitin ekzojen kaynaklarıdır. Sülfite gıda ve içeceklerin depolanması, dağıtımı ve hazırlanması sürecinde oksidatif renk değişimini önlemek, fermentasyona neden olan mikroorganizmaları selektif olarak inhibe etmek amacıyla yaygın olarak kullanılır (2). Ayrıca sülfite birçok ilaçta stabilizatör olarak bulunur (3). Sülfite çözeltilerde sülfite iyonu, bisülfite iyonu ve sülfüröz asit formunda bulunur. Ancak, pH'nın düşürülmesi ve sıcaklığın yükseltilmesi ile sülfür dioksit (SO₂) ve sülfüröz asite dönüşür. Mide ve ağız gibi asidik ortamlarda sülfüröz aside göre daha fazla SO₂ ortaya çıkar. Oluşan SO₂ gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilerek sistemik dolaşıma geçer ve dokulara dağılır (4). Ekzojen olarak alınan veya endojen olarak üretilen sülfite, mitokondriyal bir enzim olan sülfite oksidaz tarafından oksidasyona uğrar ve zararsız bir bileşik olan inorganik sülfata (SO₄²⁻) dönüştürülür (5). Dokularda sülfite oksidaz aktivitesi farklılık gösterir, örneğin karaciğer, böbrek ve kalp yüksek sülfite oksidaz aktivitesine sahipken, beyin, dalak ve testis düşük aktiviteye sahiptir (6, 7). Sülfite oksidaz enziminin yetersizliğinde veya çok fazla sülfite maruz kalındığında, sülfite oksidasyonu non-enzimatik serbest radikal mekanizmaları ile gerçekleşir (8). Sülfite peroksidazlar (horse radish peroksidaz ve prostaglandin H sentaz) tarafından katalizlenen oksidasyonu sonucunda sülfür trioksit anyon radikali (SO₃⁻), bunu takip eden zincir reaksiyonlarında peroksimonosülfat anyon radikali (O₃SOO^{*}) ve sülfat anyon (SO₄⁻) radikalleri ortaya çıkar (9). Ayrıca, sülfite peroksinitrit ile birçok reaksiyonu sonucunda da sülfür merkezli serbest radikaller meydana gelir (10). İn vitro çalışmalarda, sülfite radikallerinin DNA gibi önemli biyolojik moleküllerle reaksiyona girebildiği gösterilmiştir (11).

Kemirgenlerde sülfite maruz kalmanın santral sinir sisteminde bir takım etkilere yol açtığı ve bu hayvanlarda solunumla veya sindirim yoluyla alınan sülfite görsel uyarılma potansiyelleri (VEP) ve somatosensoryel uyarılma potansiyelleri (SEP) latenslerini uzattığı birçok çalışmada gösterilmiştir (12, 13, 14).

Somatosensoryel uyarılma potansiyelleri, duyu liflerinin uyarılmasıyla periferik sistemden başlayıp somatosensoryel kortekse kadar devam eden yollarda meydana gelen elektriksel değişikliklerdir (15). Bu yollardaki afferent yolun fonksiyonunu değerlendirmek için SEP kayıtları yaygın olarak kullanılmaktadır ve serebral disfonksiyon, periferik nöropati gibi nörolojik hastalıkların tanısında, nörotoksik ajanların neden olduğu komplikasyonların takibinde önemlidir (16, 17). Nitekim yapılan literatür araştırmasında diyabet hastalarında SEP latenslerinin uzadığı gösterilmiştir (13). Diğer yandan multipl sklerozis hastalığında SEP kayıtlarının tanıyı kolaylaştırdığı bilinmektedir (16).

Daha önce inhalasyonla maruz kalınan SO₂'nin SEP üzerine etkisi incelenmiş ancak oral yolla alınan sodyum metabisülfite (Na₂S₂O₅)'nin SEP üzerine etkisi değerlendirilmemiş olup, çalışmamızda bu konu aydınlatılmaya çalışılacaktır.

Son çalışmamızda, değişik dozlarda (10, 100, 260 mg/kg/gün) Na₂S₂O₅ uyguladığımızda sıçanlardan kaydedilen VEP latenslerinin değiştiği, beyin ve retina dokularındaki 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) ve tiobarbitirik asit reaktif ürünleri (TBARS) düzeylerinin doz bağımlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmaların ışığı altında Na₂S₂O₅'e maruz kalınan dozun önemi ortaya çıkmaktadır. Til ve arkadaşlarının (18) kullandıkları ve herhangi bir zararlı etki bulamadıkları % 0.25 Na₂S₂O₅ içeren yemin tüketilmesi, yaklaşık olarak günde 72 mg/kg SO₂ alımına karşılık gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, bu sonuçları da göz önünde bulundurarak sülfite alımı ile ilgili yaptığı çalışmada, 100 katlık bir güvenlik faktörünü de ekleyerek 0.7 mg SO₂/kg alımının zararlı bir etkisinin olmayacağını, fakat bu düzeyin üzerine çıkılmasının toksik olarak kabul edildiğini açıklamıştır (19). Bu rakamlar dikkate alındığında, besin katkı maddesi olarak sülfite (SO₃⁻²) güvenli olarak kabul edilen maddeler arasında yer almaktadır. Ancak pek çok besinin değişik düzeylerde SO₃⁻² içerdiği düşünülecek olursa, beslenme alışkanlığına göre, örneğin sosis, sucuk, kurutulmuş meyve, bira ve şarap gibi gıdaları tüketenlerde günlük kabul edilebilir (0.7 mg SO₂/kg) alımın kolaylıkla aşılabileceği görülmektedir (20, 21). Nitekim, günlük SO₃⁻² tüketiminin hesap edildiği az sayıdaki çalışmada bu sınırın hayli üstüne çıkıldığı görülmüştür. Bu çalışmalarda bir restoran öğününün dahi 200 mg SO₃⁻² içerebildiği ve bir tahminle Amerikan popülasyonunun % 99'unun yiyecek ve içeceklerle günlük ortalama 163 mg SO₃⁻² tükettiği bildirilmiştir (20, 21). Sülfite içeren yiyecekler, içecekler ve ilaçlar ile birlikte hava kirliliği de düşünüldüğünde, SO₃⁻²'e maruz kalmanın 163 mg/gün düzeyinin de üzerine çıkması mümkündür.

İnsanların maruz kaldığı SO₃⁻² dozu düşünüldüğünde ve daha önce yaptığımız çalışmaların ışığı altında serbest radikal artışı bilinmekte ve sonuç olarak beyin dokusunda apoptozisin artabileceği fikri akla gelmektedir. Apoptozis programlanmış hücre ölümünün bir formudur. Apoptoziste hücre membranında değişiklikler, nükleer fragmentasyon, kromatin birikimi ve kromozomal DNA fragmentasyonu gibi değişiklikler meydana gelmektedir (22). Virüsler, açlık benzeri stres durumları, iyonize radyasyon veya toksik kimyasal ajanlar apoptozise neden olabilir. Apoptotik süreçte iki ana yolak bulunmaktadır. İntrinsek yolakta, mitokondriyal sitokrom c salınımı meydana gelirken, ekstrinsek yolak membran reseptörlerine tümör nekroze edici faktör (TNF- α) ve Fas ligandının bağlanması ile meydana gelir. Salınan sitokrom c (sit-c) apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF-1) ve prokaspaz-9 ile kompleks oluşturur, bu olay kaspaz-9'u aktive eder. Her iki yolakta da kaspaz-3 aktivasyonunda birleşir. Kaspaz-3'ün aktivasyonu nükleer yıkım ve hücre morfolojik değişimler ile sonuçlanır (23).

Apoptozis sürecinde serbest radikallerin yanı sıra, lipid peroksidasyonun son ve stabil ürünü 4-HNE'nin etkili olduğu farklı laboratuvarlarda ve farklı hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (24, 25). Bu çalışmalarda, 4-HNE'nin apoptozis yolağında bulunan mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ailesinin bir üyesi olan SAPK/JNK'yı aktive ettiği ve sonuç olarak kaspaz-3 aktivasyonuna yol açtığı ortaya konulmuştur (24, 25). Biz daha önceki

çalışmamızda (196), 100mg/kg dozda Na₂S₂O₅ ile beslenen sıçanlarda 4-HNE'nin arttığını tespit etmiştik. Bu artış ve apoptozis arasındaki ilişki dikkate alındığında, Na₂S₂O₅ ile beslenen sıçanlarda apoptozisin indüklenebileceği düşünülmektedir.

Apoptotik yolda PLA₂ enziminin önemi bilinmekte olup, SO₃⁻² in apoptotik yoldaki olası etkilerinde PLA₂ enziminin etkin olabileceği fikri akla gelmektedir. Çünkü PLA₂ enziminin aktive ettiği araşidonik asit (AA) yolağında 4-HNE yanı sıra superoksit anyonu (O₂⁻), hidroksil radikalleri (OH•), alkoksil radikalleri, peroksil radikalleri ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi olmakta ve bu radikallerin tümünün hücreyi apoptozise götürebileceği bilinmektedir (26, 27). Fosfolipaz A₂ enzimi, membran fosfolipidlerinin sn-2 pozisyonundaki açil ester bağına spesifik olarak bölerek, araşidonik asit, eikosanoidler, lizofosfatidilkolin, platelet aktive edici faktör (PAF) gibi çeşitli lipid mediatörlerin sentezinde kritik rol oynamaktadır (28). Normal beyin fonksiyonları için PLA₂ aktivitesinin sıkı regülasyonu, dolayısıyla PAF, araşidonik asit ve lizofosfolipidlerin bazal düzeylerinin korunması gerekmektedir. Son yapılan çalışmalarda PLA₂'nin yalnız inflamatuvar yanıtlarda değil, oksidatif stresle ilgili multipl skleroz, Parkinson ve Alzheimer gibi nörolojik hastalıklarda da önemli rol oynadığı gösterilmiştir (29, 30, 31). PLA₂ enzimleri yapıları, enzimatik özellikleri, subsellüler lokalizasyonları ve hücre fonksiyonlarına göre gruplara ayrılmıştır (26, 30, 31, 32). Bu gruplar sekretuar PLA₂ (sPLA₂), sitozolik PLA₂ (cPLA₂), plazmalojen-selektif PLA₂ (PlsEtn-PLA₂) ve kalsiyum-bağımsız PLA₂ (iPLA₂)'dir. sPLA₂ hücre içinde sentezlenir, hücre dışına sekrete edilir ve etkisini gösterir. sPLA₂'nin nöronlarda N tipi, iskelet kasında M tipi olmak üzere iki tip hücre yüzey reseptörü tanımlanmıştır (33). Beyinde sPLA₂'nin enzimatik aktivitesi için Ca²⁺'nin milimolar konsantrasyonları gereklidir. Bu enzim memeli beyninin bütün bölgelerinde mevcuttur. sPLA₂'nin yüksek aktivitesi medulla oblongata, pons, hipokampus ve serebral kortekste, orta derecede aktivitesi hipotalamus ve talamusta, düşük aktivitesi serebellum ve bulbus olfactoryusta bulunmaktadır (34). Yagami ve arkadaşları (35), orta serebral arter oklüzyonu oluşturulan sıçanlarda yaptıkları çalışmada, sPLA₂'nin progressif hücre büzüşmesi, sitozolik organellerin kaybı, kromatin birikimi ve DNA fragmentasyonuna neden olduğunu, bütün bunların sonucunda hücre ölümüne yol açtığını göstermişlerdir.

Bu bilgilerden yola çıkarak, deneysel protokolümüzde 100 mg/kg dozunda Na₂S₂O₅'e maruz kalan sıçanların beyin dokularında oluşan moleküler oksidasyon, elektrofizyolojik ve biyokimyasal yöntemler ile değerlendirilmiştir. Sülfite maruz kalmanın bir göstergesi olarak kabul edilen plazma S-sülfonat düzeyi ve SO₂'ye maruz kalma sonucunda oluşan lipid peroksidasyon düzeyi ölçülerek, SO₃⁻² ile elektrofizyolojik değişiklikler arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır. Aynı zamanda verilen Na₂S₂O₅'in oluşturduğu apoptozisin SEP'e olan etkisi ve eğer etkisi varsa PLA₂ yolağının bu etkideki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda, SO₃⁻² in apoptozise etkisini araştırmak amacıyla Kaspaz-3 enzim düzeyine immünofloresan boyama yöntemi ile, DNA fragmentasyona ise TUNEL metoduyla bakılmış ve etkisi değerlendirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Somatosensoriyel Korteks Ve Somatosensoriyel Uyarılma Potansiyelleri

2.1.1. Somatosensoriyel korteks

Duyusal bilgiler, spinal korda periferik sinirlerin afferent lifleri ile taşınırlar. Bu afferent lifler arka kök ganglionlarında bulunan primer duyuşal nöronların periferik uzantılarıdır. Duyusal nöronların santral uzantıları ise spinal korda arka köklerden girer ve duyuşal bilgiyi ikincil duyuşal merkezlere taşırlar (37). Somatik duyuşal sinyaller spinal kordda 2 ana yolak ile taşınır:

a) Arka Kordon-Medial Lemniskus yolağı:

Dokunma ve derin duyuşmaları (proprioepsiyon) taşıyan sistemdir. Bu yolak, arka kök ganglionlarının santral uzantılarından (primer afferent lifler) ve kısmen de arka boynuz III. ve IV. laminalarındaki nöronların aksonlarından oluşmaktadır. Bu aksonlar kaudal medullaya kadar sinaps yapmadan devam eder. Üst spinal düzeylerden itibaren 2 ayrı fasikül şeklinde yükselir. Medialden laterale doğru sakral, lomber ve aşağı torasik segmentlerden gelen lifler fasikülüs grasilis, yukarı torasik ve servikal segmentlerden gelen lifler ise fasikülüs kuneatus içinde yol alırlar. Bu fasiküller kaudal medulla düzeyinde sırasıyla nukleus grasilis ve nukleus kuneatus adı verilen arka kordon nukleuslarında bulunan ikincil duyuşal nöronlarla sinaps yaparlar. Bu nöronların aksonları ise medulla düzeyinde çaprazlaşarak medial lemniskusu oluştururlar. Medial lemniskus, beyin sapından ilerleyerek koku duyuşu hariç, tüm sistemlerden gelen afferent impulsları amaca yönelik olarak filtre eden talamusta sonlanır. (38). Gelen duyuşal yollar lateral talamustaki spesifik ara nöronlardan geçerek ventral posterior nukleus aracılığıyla serebral kortekse iletilir. Gövde ve ekstremitelerden gelen bilgiler talamusun ventral posterolateral nukleusunda, yüz bölgesinden gelen bilgiler ise ventral posteromedial nukleusunda sinaps yaparlar. Ventral posterior nukleus grubundaki üçüncül duyuşal nöronların aksonları ise internal kapsülün arka bacağından geçerek primer somatosensoriyel kortekse ulaşır (38). Bu yolak şekil 2.2.'de gösterilmektedir.

b) Anterolateral yolak:

Somatik duyuşmaların iletiminden sorumlu ikinci ana duyuşal sistemdir. Ağrı, ısı ve basit dokunma duyuşmalarının merkezlere taşınmasında işlev görmektedir. Bu sistem 3 ayrı yoldan oluşmaktadır: spinotalamik, spinoretiküler ve spinomezensefalik traktüsler.

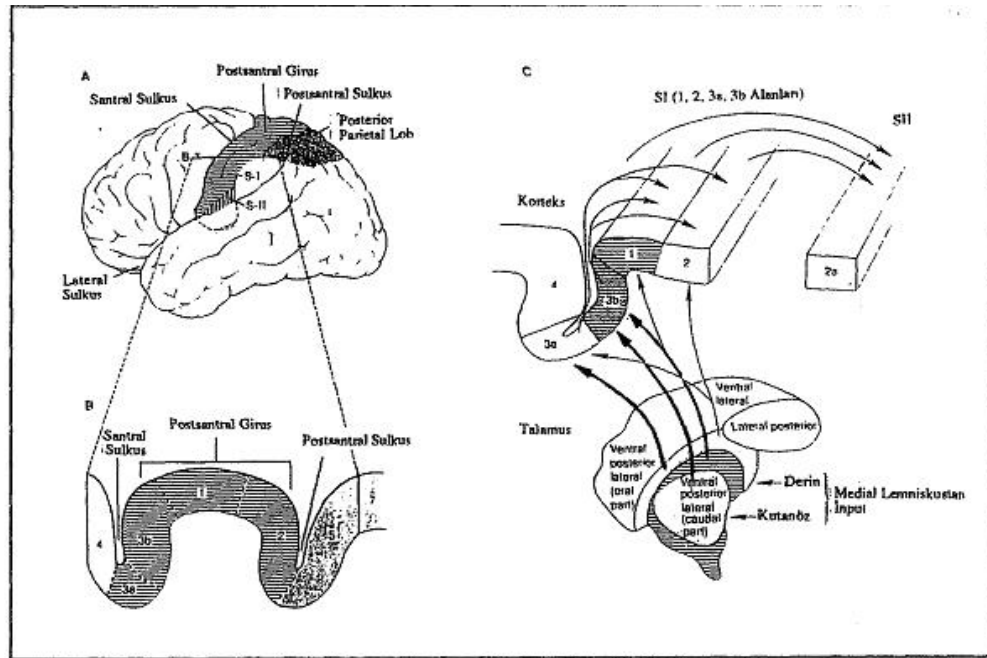
Bu sistemin arka kordon-medial lemniskus yolağından farklılıkları vardır (38).

1) Bu sisteme ait primer afferent lifler ilk sinapslarını medulla spinalisin arka boynuzu düzeyinde yaparlar. Dolayısıyla spinal arka boynuzda bulunan ikincil duyuşal nöronların aksonlarından oluşmaktadır.

2) Anterolateral yolak spinal kordda segmental düzeyde çaprazlaşır. Bu nedenle arka kordon sisteminin aksine spinal kordda kontrolateralde yükselir.

3) Anterolateral yolaktaki lifler talamusun yanısıra beyinsapı, hipotalamus gibi bölgelerde de sonlanırlar. Dolayısıyla daha yaygın bir dağılım gösterirler (37, 38). Anterolateral yolağın lifleri talamusta da ventral posterolateral nukleus, intralaminar ve posterior nukleuslar olmak üzere 3 bölgede sonlanır. Ventral posterolateral nukleustan çıkan lifler sadece somatik duyuşal korteks alanlarına, posterior nukleuslardan çıkan lifler ise somatosensöriyel korteks alanları dışında kalan parietal bölgelere ulaşırlar; oysa intralaminar nukleuslar daha yaygın olarak korteks ve bazal ganglionlarla bağlantı gösterirler (37, 38).

Duyum ve algılamanın gerçekleşebilmesi için impulsların serebral korteks düzeyine iletilmesi zorunludur. Duyum ile ilgili en önemli kortikal bölge primer somatosensöriyel korteks (S-I) olarak isimlendirilmektedir. Bu bölge postsantral girus ve santral sulkusun derinliklerinde lokalizedir. Bu korteks bölümü her biri somatik duyuşla ilgili farklı roller üstlenmiş 4 fonksiyonel alandan oluşmaktadır. Bu alanlar Brodmann'ın, 1, 2, 3a ve 3b olarak belirlediği korteks bölümlerinden oluşmaktadır (36). (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. Somatosensöriyel korteks

Sekonder somatosensöriyel korteks (S-II) ise lateral sulkusun (Sylvian sulkus) üst duvarında insulaya bitişik yerleşimlidir. Bu korteks alanına duyuşal bilgiler esas olarak primer somatosensöriyel korteksten gelmektedir. Primer ve sekonder somatosensöriyel korteksler dışındaki posterior parietal lob alanlarına da bir kısım duyuşal bilgilerin ulaştığı bilinmektedir (37).

Somatosensöriyel korteks 2 majör nöron grubundan oluşmaktadır:

1) Piramidal hücreler, korteksin çıkış (output) nöronları olup, lokalizasyonlarına ve çıkış bölgelerine göre birçok alt grupta incelenirler. Korteksin 2. ve 3. tabakalarındaki piramidal hücreler değişik kortikal alanlara

ulaşırlar. Oysa 5. ve 6. tabakalardaki piramidal nöronlar diğer subkortikal alanlara ve geriye talamusa bağlanırlar.

2) Nonpiramidal hücre grubu ise, değişik tiplerde nöronlardan oluşurlar ve çoğunluğu yaygın dallanmalar gösterirler. Bu hücrelerin de çoğu piramidal hücreler gibi asıl girişlerini (input) talamik afferentlerden alırlar (36).

Somatosensoriyel korteks alanlarında fonksiyonel olarak somatotopik bir yerleşim gözlenir. Dolayısıyla vücudun farklı bölgelerine ait kısımlardan gelen bilgiler, somatosensoriyel korteksde farklı bölgelere ulaşır.

Primer somatosensoriyel korteks, tüm duyuşal modalitelerin işlemlenmesinde önemli rol oynar. Talamusun ventral posterior nükleer kompleksinin lateral ve medial kısımlarındaki nöronlar primer somatosensoriyel korteksin değişik bölümlerine bağlanırlar. Bu aksonlar kortekste piramidal hücrelerde sonlanırlar ve onları kuvvetle eksite ederler. Aynı zamanda nonpiramidal internöronlarla da sinaps yaptıkları bilinmektedir. Primer somatosensoriyel korteks içinde 1, 2, 3a ve 3b alanları arasında ve bu alanlarla posterior parietal korteks arasında bağlantılar bulunur. Bu bağlantılar S-I ve S-II arasında ve bu iki korteks alanı ile motor korteks arasındaki karşılıklı bağlantılardır. Aynı zamanda her 2 hemisferin simetrik duyuşal alanları arasında korpus kallozum aracılığıyla kurulan bağlantılar da mevcuttur (36.)

Primer somatosensoriyel korteks 4 majör subkortikal bölgeyle ilişkilidir. Bunlar bazal ganglionlar ve talamus (ventral posterior nükleer kompleksi), arka kordon nukleusları ve spinal kord arka boynuzudur (38).

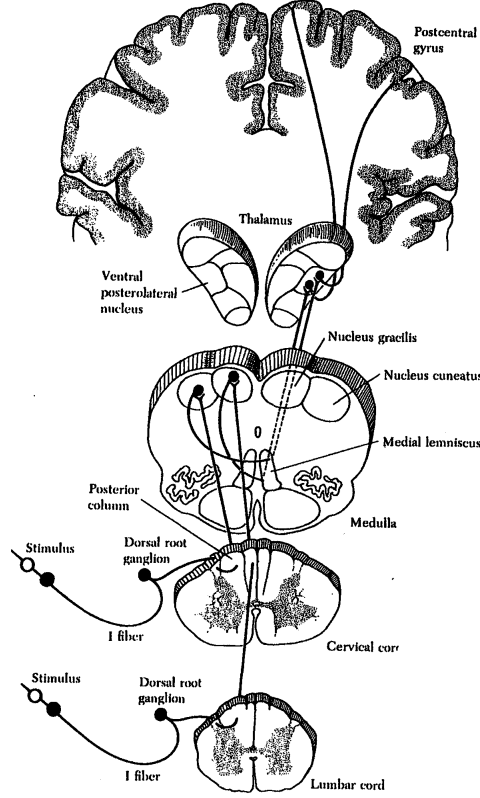
Talamik duyuşal afferentlerin çoğu 3a ve 3b alanlarında sonlanırlar. Bu alanlardaki hücreler daha sonra Brodmann'ın 1 ve 2. alanlarına ulaşırlar (Şekil 2.1.). Talamik nöronların aynı zamanda 1 ve 2. alanlar ile sekonder somatosensoriyel korteksle de doğrudan bağlantıları bulunur. Ayrıca S-I' in 4 alanının her birinden de S-II' ye projeksiyon bulunmaktadır. Bununla beraber talamik nöronlar, posterior parietal korteks, motor korteks ve S-I ile de bağlantılıdır. Primer somatosensoriyel korteksin 1, 2, 3a ve 3b alanlarında ve S-II' de ayrı ayrı vücut yüzeyinin representasyonu saptanmıştır (39). Somatosensoriyel korteksin fonksiyonel yapılanmasındaki önemli bir özellik ise bu korteksin 4 alanına da (3a, 3b, 1 ve 2) tüm vücut yüzeyinden projeksiyonların gelmesidir. Fakat Merzenich ve arkadaşları (40) çalışmalarında her bir alanda bir modalitenin baskın olduğunu göstermiştir. Bunlardan 3a alanında kas içciklerinden, 3b alanında tüm kutanöz reseptörlerden, 2 nolu alanda derin basınç reseptörlerinden, 1 nolu alanda ise hızla adapte olan kutanöz reseptörlerden gelen bilgilerin baskın olduğu saptanmıştır. Kısacası 3b ve 1 nolu alanlara primer olarak taktıl inputlar, 3a alanına primer olarak grup 1 kas (gerilim) afferentleri, 2 nolu alana ise primer olarak eklem reseptörlerinden informasyonlar ulaşmakta ve işlenmektedir (40).

2.1.2. Somatosensoriyel Uyarılma Potansiyelleri

Somatosensoriyel uyarılma potansiyeller periferik ya da kranial sinirlerin elektriksel, fizyolojik (dokunma, eklem hareketleri, vibrasyon, kas kasılması gibi) ya da mekanik yöntemlerle uyarımının duyuşal sistemde periferik sinirden

başlayıp somatosensoryel kortekse kadarki yollar ve merkezler boyunca oluşturduğu elektriksel değişikliklerin tümüdür (41).

Uyarılan bir sinirde oluşan duyu potansiyellerinin serebral kortekse ulaşabilmeleri için periferik sinirleri, medulla spinalisi, beyin sapını ve talamokortikal lifleri geçmeleri gerekmektedir. SEP'ler büyük oranda santral sinir sisteminde dorsal kolon, medial lemniskal sistem ile periferik sinirlerde geniş çaplı IA duyu lifleri ile oluşturulurlar (42). (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. SEP'lerin yolları.

SEP'leri bugünkü anlamda ilk olarak 1947 yılında Dawson adlı bir bilim adamı incelemiştir (43). İlk klinik uygulamalar Cunningham ve arkadaşlarına aittir (44).

Uyaran kol, bacak, yüz veya vücudun diğer bir alanındaki motor veya duyu sinirlere ardışık elektrik uyarısı olarak verilir ve uyarı verilen bölgede hafif hareket etmesine neden olan uyarın şiddeti yeterli kabul edilir. Uyarılan sinirin vücuttaki gidiş yolu üzerinden ve uyarının sonlandığı beyin bölgesine uyan kafatası derisinden belli yanıtlar kaydedilir. Tekrarlanan uyarılarla elde edilen yanıtların ortalaması alınır. Çeşitli işaretlemeler yapılarak yanıtların zamana göre dağılımı, genlikleri ve şekilleri kontrol edilir. Uyarılan sinir yolu üzerinde herhangi bir sorun varsa beklenen yanıt gecikebilir, genliği düşebilir, şekli bozulabilir ve hatta tamamen kaybolabilir (45).

Somatosensoryel uyarılma potansiyeller yaş, boy, vücut ve ekstremitte sıcaklığı gibi fizyolojik faktörlerden olumsuz etkilenirler. Aynı zamanda

yaşlanma ile birlikte de latens uzamaları gözlenebilir (46). SEP'lerin mutlak latenslerini belirleyen en önemli faktörlerden biri olan duyuşal sinyalin katettiği yol denediğin boyu ile doğru orantılıdır (46).

Somatosensoryel uyarılma potansiyellerin kaydı alındıktan sonra, önce kortikal ve subkortikal bileşenlerin tepe latensleri ölçülür. Latens, uyarım sinyali ile birlikte ortaya çıkan bileşenlerin negatif ya da pozitif tepe noktalarına kadar ölçülen zaman birimidir ve ms olarak ifade edilir. Bu değer mutlak anlamda latensi verir. Ancak mutlak latensler ekstremite ve tüm boy uzunluğuna göre bireyler arası değişkenlik gösterir. Bu nedenle mutlak latenslerin yerine “santral iletim zamanı” dediğimiz değerler ölçülür. Böylesine ölçüm yaklaşıımı ile bir yandan bireyler arası boy farklarının yarattığı latens değişkenliği azaltılmış olur, bir yandan da periferik sinir sistemindeki özellikler ve patolojiler kısmen devre dışı bırakılmış olur. Somatosensoryel uyarılma potansiyellerinin incelemesinde bir anomaliyi en belirgin gösteren bulgu, potansiyellerin kaybolması veya latenslerinin uzamasıdır. Genliklerin yanında potansiyellerin morfolojik özellikleri de değerlendirilir. Ancak genlik değerlendirmesi genellikle güç olur. Çünkü aynı bireyde bile değişik zamanlarda çok değişik genlik değerleri elde edilebilir (47). Somatosensoryel uyarılma potansiyelleri etkileyen önemli etkenlerden bir diğeride oksidatif stresdir (16,17).

2.2. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırma hızında azalma bu dengenin bozulmasına neden olur ve bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stres, doku hasarı gibi patolojik durumların gelişmesine neden olur (48).

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki ROS, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), peroksil radikali (ROO^{\cdot}) ve radikal olmayan H_2O_2 gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenleridir (49, 50).

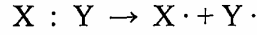
2.2.1. Serbest Radikal Kavramı

Kararlı moleküllerin çoğunun dış yörüngelerinde birbirlerine zıt yönde hareket eden elektron çiftleri bulunmaktadır. En dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan atom veya moleküllere serbest radikal, oksidan moleküller veya ROS denmektedir (51). Bu eşleşmemiş elektronlar atom ya da molekülü reaktif hale getirirler. Serbest radikal reaksiyonları nötrofil, makrofaj gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin savunma mekanizması için gerekli olup hücrede devamlı üretilseler de, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (52). Serbest radikaller normal hücresel bileşenleri bağlayarak, membran lipidlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girer, proteinleri denatüre eder ve nükleik asitlere saldırırlar (53).

2.2.2. Serbest Radikal Oluşumu

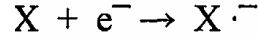
Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur.

1. Kovalent bağı bir molekülün, kovalent bağının yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklığın etkisiyle homolitik ayrılması sonucu eşlenmiş elektronların her birinin ayrı atomlar üzerinde kalması ile.



2. Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybetmesi sonucunda dış orbitalinde eşlenmemiş elektron bulunması ile.

3. Radikal özelliği taşımayan moleküle bir elektron eklenmesiyle dış orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunması sonucu.



Bir radikal, radikal olmayan bir moleküle reaksiyona girerse, başka bir serbest radikal oluşur. Bu özellik serbest radikallerin zincirleme reaksiyonlara girebilmelerine olanak sağlar (54).

Biyolojik sistemlerde önemli serbest radikallerin çoğu oksijene dayanır. Bunlardan $O_2^{\cdot-}$ hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir (55).

2.2.3. Oksijen ve Oksijen Radikalleri

2.2.3.1. Moleküler oksijenin özellikleri

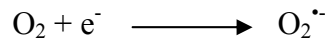
Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen “biradikal” olarak değerlendirilir. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Bunun dışında demir (Fe^{+3}), bakır (Cu^{+2}), mangan (Mn^{+2}) ve molibdenyum (Mo^{+5}) gibi geçiş metalleri de eşleşmemiş elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (56).

2.2.3.2. Serbest Oksijen Radikalleri

Reaktif oksijen türleri, normal oksijen metabolizması sırasında oluşur ve yarılanma ömürleri birkaç milisaniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişir. Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler (57).

Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$):

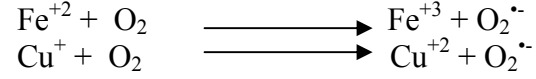
Oksijen molekülü, orbitalinde eşleşmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır (51). Bütün aerobik hücrelerde meydana gelen $O_2^{\cdot-}$ hücre hasarlarında tek başına fazla etkili değildir (58).



Süperoksit anyonu, başka moleküllerle kolayca elektron alışverişine girebilmesine rağmen hücre membranından kolay geçemediği için hücreye doğrudan zarar

veremez (59). Bu radikalın asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (60).

İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit meydana getirebilir.



Geçiş metallerinin oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü reaksiyonlardır.

Süperoksit anyonu bir proton (H^+) alarak HO_2^{\cdot} 'yi oluşturur. Oldukça reaktif olan bu radikal hücre zarlarında lipid peroksidasyonu başlatabilir ve zarla ilişkili antioksidanları oksitleyebilir.



Şekil 2.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu

Hidrojen peroksit (H_2O_2):

Hidrojen peroksit; moleküler oksijenin diğer moleküllerden iki elektron alması ve iki proton (H^+) ile birleşmesiyle veya süperoksit anyonunun diğer moleküllerden bir elektron alması ve iki proton (H^+) ile birleşmesiyle meydana gelir (56).



Hidrojen peroksit (H_2O_2) hücre membranından kolayca geçebilir ve uzun ömürlü bir oksidan olduğundan difüze olarak komşu olmayan dokularda da hasara neden olabilir (61).

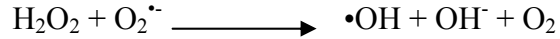
Hidrojen peroksitin üretimi $O_2^{\bullet-}$ 'in dismutasyonu ile olmaktadır. Bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) katalizörlüğünde, $O_2^{\bullet-}$ molekülünün protonlanması sonucu hidrojen peroksit ve moleküler oksijenin meydana gelmesiyle oluşur (62).



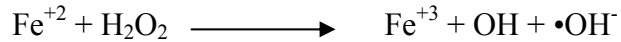
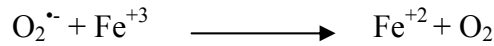
Hidrojen peroksitin eşleşmemiş elektronu yoktur. Fakat geçiş metal iyonlarının varlığında reaktif bir serbest oksijen radikali olan OH^{\bullet} 'nin oluşturabilir (60).

Hidroksil radikali ($\bullet OH$):

Hidroksil radikali, ilk olarak 1934 yılında Haber ve Weiss adlı araştırmacıların gösterdikleri, kendi adları ile anılan reaksiyon ile ortaya konmuştur. Biyolojik sistemlerde rastlanan en etkili oksijen radikalidir ve makromoleküller ile kolaylıkla reaksiyona girer (63). Yarılanma ömrü çok kısa ($37^{\circ}C$ 'de 10^{-9} sn) olduğundan in vivo üretilen OH^{\bullet} , oluşum yerinde ya da yakınında reaksiyona girerek daha düşük reaktiviteli başka bir radikal üretir (63). Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilmektedir ve H_2O_2 'in, $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girmesiyle OH^{\bullet} oluşur. Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır fakat geçiş metallerinin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur.



Süperoksit radikali biyolojik sistemlerde bulunan ferrik (Fe^{+3}) demiri, ferröz (Fe^{+2}) demire indirger. Bu sırada H_2O_2 , hidroksil radikaline dönüşür. Bu reaksiyona Fenton reaksiyonu adı verilir. (64).



2.2.4. Serbest radikallerin etkileri:

1956'da Denham Harman, oksijen radikallerinin in vivo enzimatik reaksiyonların ürünü olabileceği hipotezini ortaya atmış ve serbest radikallerin büyük çaplı hücre hasar, mutagenез, kanser ve biyolojik yaşlanmanın dejeneratif süreçlerinden sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür (65).

Serbest radikaller, yaşlanma ve çeşitli patolojik durumlarda arttığında ve bu artış antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aştığında hücre makromoleküllerden lipidler başta olmak üzere DNA, protein ve karbonhidratlar ile reaksiyona girerler. Sonuçta hücrenin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü bozulur ve geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hasarlar meydana gelir (67). Kontrolsüz ROS artışının etkileri sonucu hücre apoptoz ya da nekroz ile ölüme gider (68).

2.2.4.1. Serbest radikallerin lipidlerle reaksiyonu:

Organizmadaki biyomoleküllerin hepsi serbest radikallerden etkilenirler fakat en fazla lipidler etkilenir. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturmaktadır. Genel olarak serbest radikal kaynaklı zincir reaksiyonları olarak bilinen lipid peroksidasyonda, serbest radikaller doymamış yağ asitlerini (Poly unsaturated fatty acid=PUFA) okside eder ve zarın lipid yapısını değiştirirler (69). Böylece hücrenin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar (70).

Lipid peroksidasyon tepkimeleri serbest radikallerin PUFA zincirinin α -metilen gruplarından bir hidrojen uzaklaştırması ile başlamaktadır. Uzaklaşan hidrojen atomu sebebiyle karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir adet elektron kalır. Bu oluşan kararsız lipid radikali kararlı hale geçebilmek için oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikaline (LOO•) dönüşür (71). Peroksil radikali, membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını koparıp peroksidatif zincir reaksiyonunu başlatır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra geri dönüşümsüz devam eder (77). Peroksil radikali, membran yapısında bulunan diğer doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksite (LOOH) dönüşmüş olur. Lipid hidroperoksitler de yıkılarak LO•, LOO• gibi radikaller, hidrokarbonlar, alkoller ve eterin yanında malondialdehit (MDA) ve 4-HNE gibi sitotoksik moleküllerin oluşmasına neden olurlar (73). Bunlar peroksidasyonun ikincil ürünleridir. 4-hidroksinonenal, proteinlere konjuge olmak için sistein, lizin ve histidin rezidüleriyle etkileşir ve aminoasit modifikasyonlarına sebep olur. Malondialdehit ise, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olmakta, membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Dolayısıyla MDA hücre ve dokulardaki oksidatif hasarın bir göstergesidir. MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucunda TBARS meydana gelmektedir. Bu nedenle TBARS ölçümü PUFA'nın peroksidasyonunun tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (73). Lipid peroksidasyonu membran akışkanlığını azaltır, membranların biyofiziksel özelliklerini olumsuz etkiler (74, 75). Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan hasar nedeni ile homeostazis bozularak, iyonlara özellikle Ca^{+2} 'a olan geçirgenlik artarken Ca^{+2} pompasının aktivitesi bozulur (76).

2.2.4.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikallerin etkilerine karşı PUFA'ya göre daha az duyarlıdır ve serbest radikal hasarına karşı duyarlılıkları aminoasit bileşimlerine bağlıdır (56). Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenerek birçok kovalent değişikliğe uğrar ve serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olurlar (77). Başlayan bu reaksiyon zincirleri lipidlerdeki kadar hızlı ilerleyememesine rağmen başlangıç reaksiyonunu daha da güçlendiren (H_2O_2 gibi) yan ürünleri de üretebilirler (75). Bu şekilde oluşan aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerde fragmentasyon, agregasyon ve proteolitik yıkıma duyarlılık gibi fiziksel değişikliklere neden olmaktadır (78).

Proteinlerin oksidasyonu sonucu membran enzimlerinin aktivitesinde azalma ve Ca^{+2} inflaksında artış gözlenmektedir. Hücre içi serbest Ca^{+2} artışına bağlı olarak zararlı etkilere sahip pek çok enzimin aktivitesi artmakta, bu da hücre hasarına yol açmaktadır (79).

2.2.4.3. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

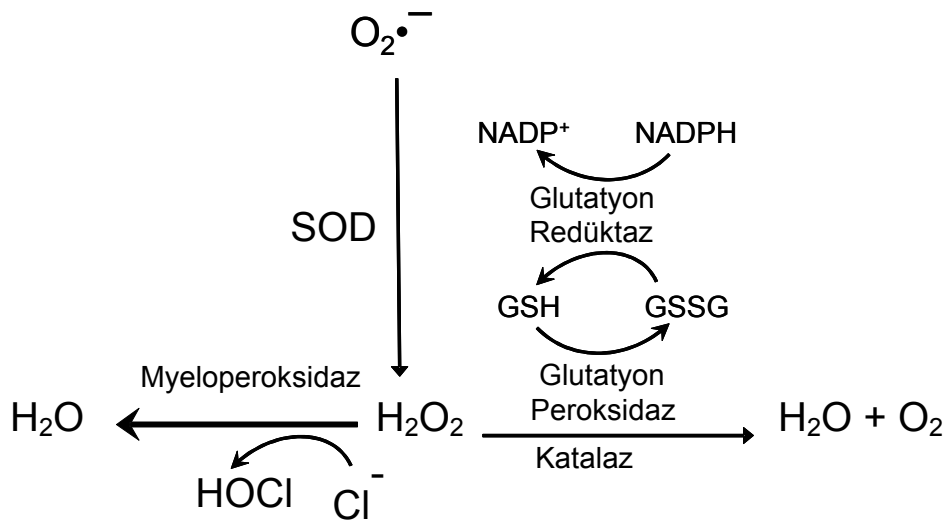
Serbest radikaller, karbonhidratlarla da reaksiyona girebilirler. Yapılan çalışmalarda, α -hidroksialdehid yapıya sahip karbonhidratların, metal iyonlarının varlığında fizyolojik PH ve ısıda hızlı bir şekilde otooksidasyona uğradıkları ve bunun sonucunda dikarbonil bileşikleri ve H_2O_2 oluşturdukları belirtilmiştir (60). Oluşan bu moleküllerin, protein ve nükleik asitler gibi diğer makromoleküllerle çapraz bağlar oluşturup, yapılarını bozduğu bilinmektedir (61).

2.2.4.4. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

Serbest oksijen radikalleri, bazıları parçalayarak, tek zincir kırıkları oluşturarak ve proteinlere çapraz bağlanarak DNA'da delesyonlara ve mutasyonlara neden olurlar. Bu durum hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (80).

2.2.5. Antioksidan Savunma Sistemi

Sağlıklı bireylerde normal metabolizma sonucunda oluşan ROS zararlı etkilerinin dışında, organizmanın yabancı maddeler ve infeksiyon ajanlarına karşı savunmasında yararlı etkilere sahiptir. Fakat bu etkilerin bir dengede tutulması gerekir (81). Bu dengenin bozulması ve ROS' ların artması halinde hem hücre içinde hem de hücre dışında oluşan radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemi öğelerinin ortaklaşa çalışmaları sonucu ortadan kaldırılır (82). Bu savunma sistemini süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GSSG-R), mitokondriyal sitokrom oksidaz enzimleri ve C, A, E vitaminleri gibi antioksidan bileşikler oluşturur (81).

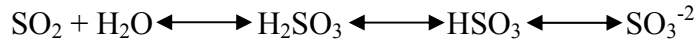


Şekil 2.4. Antioksidan savunma sistemi öğeleri

2.3. Sülfıt

İnsanların SO_3^{-2} ye maruz kalmaları, endojen ve eksojen olmak üzere iki şekilde olur. Sülfıt vücutta endojen olarak üretildiği gibi, eksojen olarak dışarıdan da alınabilir. Gerek endojen olarak üretilen, gerekse eksojen yolla alınan SO_2 vücutta SO_3^{-2} 'ye dönüşmektedir.

Sülfür dioksit ve onun çeşitli iyonlarla yaptığı tuzları, suda eriyebilir bileşikler olup sıvı ortamlarda hızlı bir şekilde aşağıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi sülfüroz asit (H_2SO_3) oluştururlar. Sülfüroz asit özellikle yüksek pH ve 37 °C'de kolayca bisülfıt (HSO_3^-) iyonuna dönüşür. HSO_3^- ise daha yüksek pH'larda SO_3^{-2} iyonuna dönüşmektedir. Fizyolojik pH'larda HSO_3^- ve SO_3^{-2} iyonlarının birbirlerine kolayca dönüşebildikleri gösterilmiş, bu yüzden SO_3^{-2} her iki iyon için de ortak isim olarak kullanılmıştır.



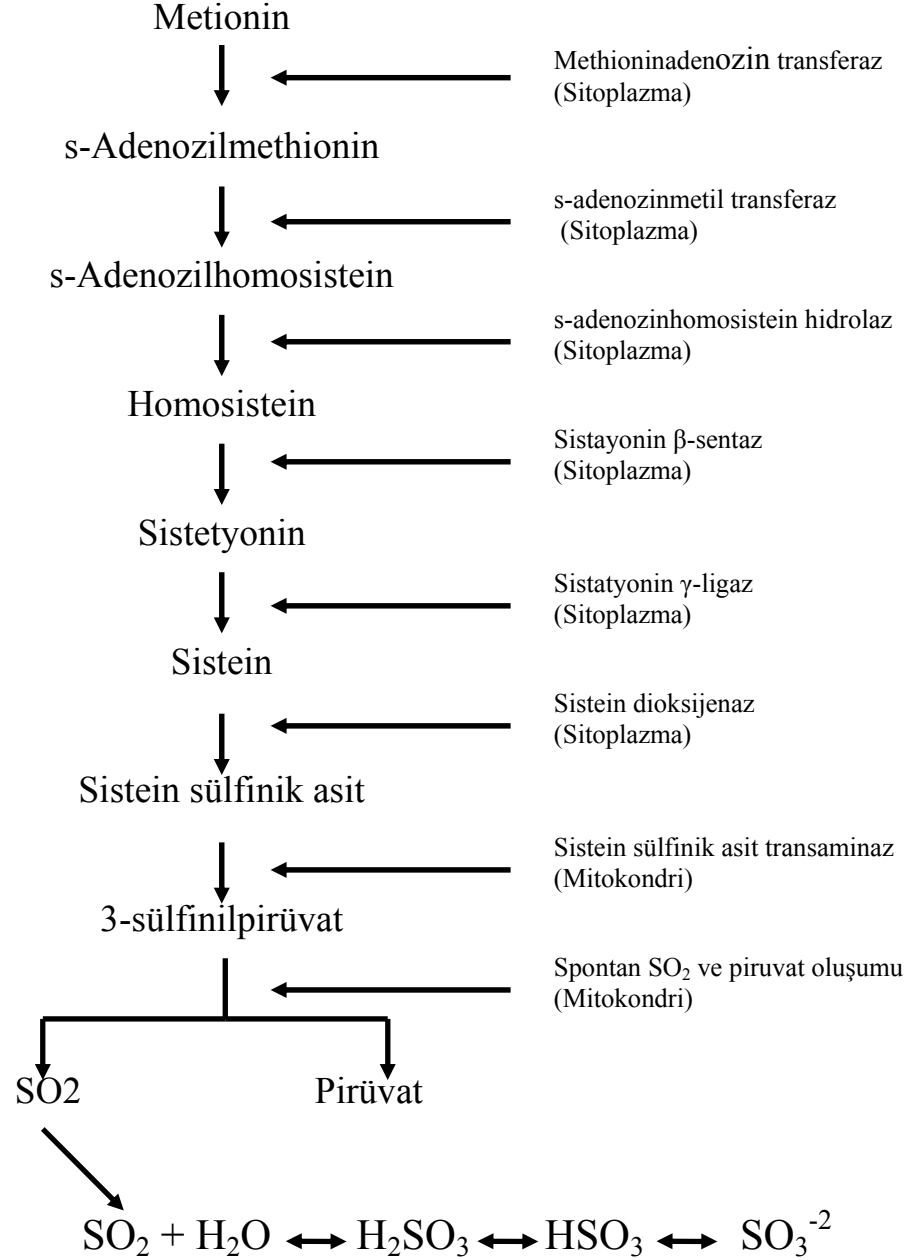
2.3.1. Endojen sülfıt oluşumu:

Vücutta sülfür içeren aminoasitlerin ve diğer sülfür içeren bileşiklerin normal katabolizması sonucu SO_3^{-2} oluşumu gerçekleşir (8). Sülfıtın üretiminde en önemli yolak; sistein ve metionin aminoasitlerinin katabolizmasıdır (8). Metionin sitoplazmik bir enzim olan metionin adenzin transferaz ile s-adenozin methionine dönüştürülür. Oluşan methionin s-adenozinmetil transferaz enzimi ile s-adenozin homosisteine döner. Daha sonra bu bileşikten s-adenozin homosistein hidrolaz ile homosistein meydana gelir. Bunu takiben homosistein sistionin β sentaz ile sistatyonine ve o da sistatyonin gama ligaz ile sisteine dönüşür. Sisteinden sistein dioksijenaz enziminin etkisiyle sistein sülfınik asit oluşur. Sistein sülfınik asit aspartat transporter aracılığıyla sitoplazmadan mitokondriye taşınır ve mekanizmanın bundan sonraki basamakları mitokondride gerçekleşir. Sistein sülfınik asit, sistein sülfınik asit transaminaz enzimi yardımıyla 2-ketoglutarat veya oksaloasetat ile transaminasyona uğrayarak 3-sülfınil piruvat oluşturur. 3-sülfınil piruvat daha sonra spontan desülfınasyona uğrar ve sonuçta SO_2 ve piruvat oluşur. Oluşan SO_2 hidrasyona ve proton ayrılmasına uğrayarak SO_3^{-2} 'yi meydana getirir. Vücutta üretilen SO_3^{-2} 'nin büyük bir kısmı bu yolla üretilir (8).

2.3.2. Eksojen sülfıt alımı:

Yiyecek ve içeceklerde sülfıt kullanımı:

Yiyecek ve içeceklerin üretimi sırasında, tatlarında ya da kokularında istenmeyen değişikliklerin önlenmesi ve dayanıklılıklarının artması amacı ile SO_3^{-2} kullanılmaktadır (83). Bira, şarap, konserve, dondurulmuş gıdalar gibi birçok işlenmiş yiyecek ve içekte kullanılan SO_3^{-2} restoran yemeklerine de eklenmektedir. Öyle ki restoran yemeklerinin hazırlanmasında yüksek miktarda SO_3^{-2} kullanılması, SO_3^{-2} 'nin yan etkilerinin görülmesinde restoran yemeklerinin büyük etkisi olduğunu gösterir. Bu nedenle FDA (Food and Drug Administration) tarafından, restoran yiyeceklerinde kullanılan SO_3^{-2} bileşiklerinin miktarının 15 mg/gün'ü geçmemesi bildirilmiş, ayrıca sülfıtın ette kullanımı yasaklanmış, şarapta 350 ppm ve karideste 100 ppm olarak kullanımı sınırlandırılmıştır (8).



Şekil 2.5. Vücutta endojen sülfirik oluşumu

İlaçlarda sülfirik kullanımı:

İlaç endüstrisinde, ilaçların etkilerinin azalmasına neden olan oksidasyonu önlemek ve ilaçlara suda eriyebilirlik kazandırmak amacıyla SO₃⁻² kullanılmaktadır (84).

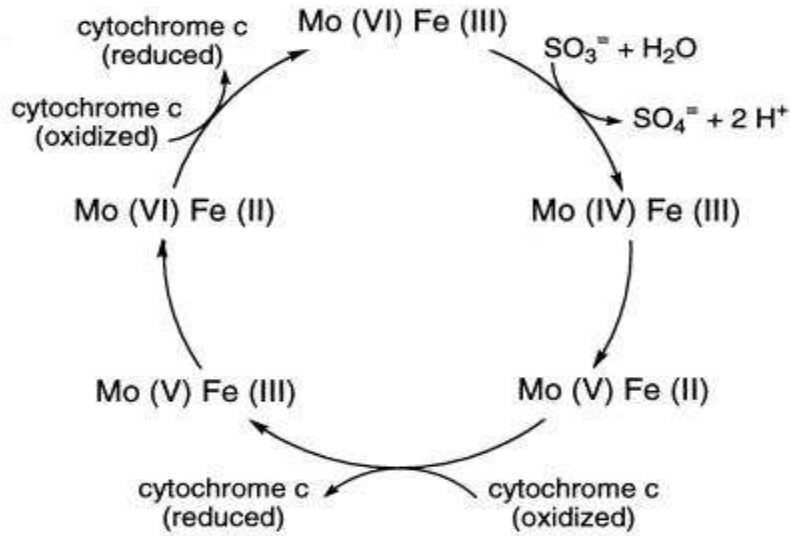
SO₂ inhalasyonu:

Kirli havadan SO₃⁻² alımı, yiyecek, içecek ve ilaçlarla alımandan çok daha azdır. İnhalasyon ile alınan SO₂ vücutta SO₃⁻², bisülfirik iyonları ile sülfüröz asite dönüşür. Bu nedenle, SO₂ konsantrasyonu 24 saatlik bir süre için ortalama 0.14

ppm'i, 1 yıllık süre için ortalama 0.03 ppm'i geçmeyecek şekilde standardize edilmiştir (8).

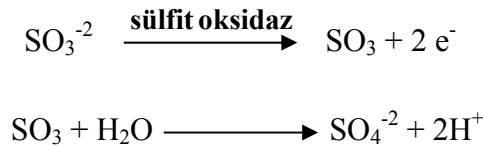
2.3.3. Sülfitin Metabolizması

Endojen veya ekzojen yolla alınan SO_3^{-2} 'nin temel detoksifikasyonu oksidatif metabolizmadır ve bu detoksifikasyon mitokondriyal bir enzim olan sülfite oksidaz (SOX) ile yapılmaktadır. Sülfite oksidaz enzimi 104 kDa ağırlığında bir molibdohemoprotein olup, SO_3^{-2} 'nin zararsız bir bileşik olan inorganik sülfata dönüşümünü katalizler (Şekil 2.7) (2). Mitokondrinin membran arası boşluğunda lokalize, dimerik bir yapıya sahip olan SOX kofaktör olarak Mo (Molibdenyum) kullanır. Hem içeren N-terminal sitokrin b_5 bölgesi ve yapısında Mo ihtiva eden C terminaline sahiptir.



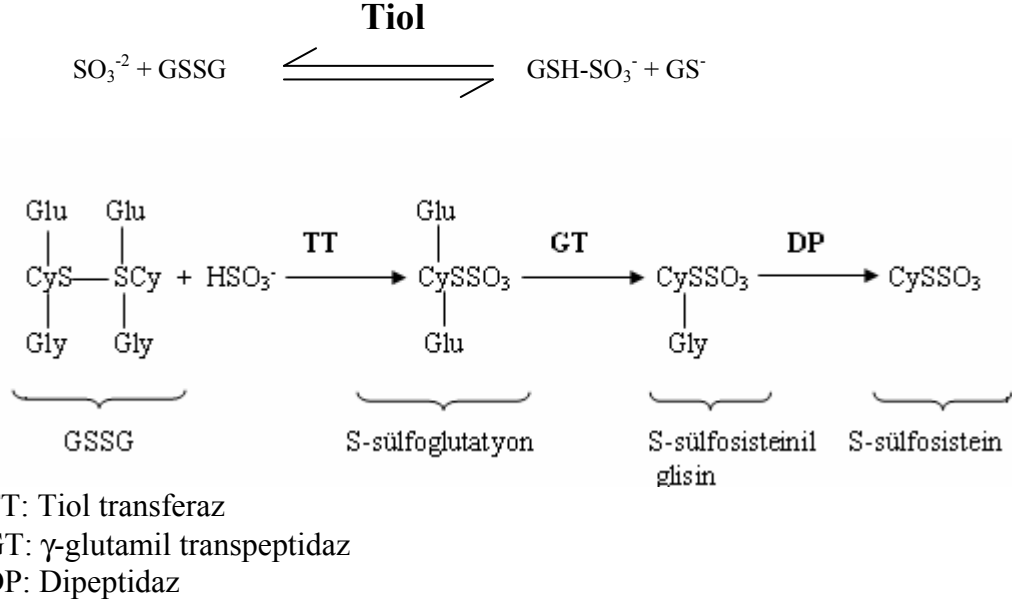
Şekil.2.6. Sülfite oksidazın sülfite sülfata oksitlemesi

Bu enzim, SO_3^{-2} 'den $2 e^-$ alarak enzimin Mo-VI bölgesine, oradan sitokrom b_5 ve son olarak da solunum zincirindeki ferrisitokrom c'ye transfer eder. Bu sırada, okside olan 1 mol SO_3^{-2} başına bir mol ATP üretilir (8).



İdrarla atılan sülfatın %90'ı SOX enzimi tarafından oluşturulur (8). Normal fizyolojik metabolizma da sülfite, SOX tarafından etkili bir biçimde okside edilebilmesi, dokularda SO_3^{-2} 'nin çok düşük konsantrasyonlarda tutulmasını sağlayan etkili bir mekanizmadır (8). Sülfite oksidaz enziminin eksikliğinde veya çok fazla SO_3^{-2} 'ye maruz kalındığında, SO_3^{-2} , sistein GSSG gibi düşük moleküler ağırlıktaki tiyollerin veya protein gibi makro moleküllerin disülfid bağlarıyla

sülfitoliziz denen reaksiyona girerek S-sülfonatları oluşturur. (187). Glutasyon disülfidinin sülfitolizisininin tiol transferaz enzimi ile katalize edildiğini ve oluşan S-sulfoglutasyonun, transhidrojenaz enzimi yardımıyla indirgenmiş glutasyonla reaksiyona girerek SO_3^{-2} ve okside GSSG oluşturduğu bilinmektedir (85). Sülfitin S-sülfosisteine dönüşmesi Şekil 2.8’de özetlenmiştir.

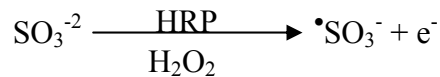


Şekil 2.7. Glutasyonun S-sülfosisteine dönüşümü

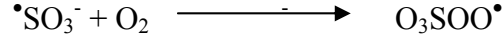
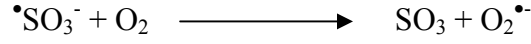
Sülfitin diğer bir metaboliti ise idrarla düşük miktarda atılan thiosülfattır ($32 \pm 13 \mu\text{mol/gün}$). Thiosülfat, sülfidinin thiosistein veya 3-merkaptopiruvat (sisteinin bir ürünü) ile reaksiyonu sonucu oluşur (8).

2.3.4. Sülfid radikallerinin oluşumu

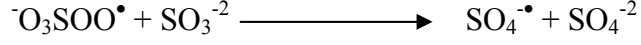
Sülfitin sülfata oksidasyonu non-enzimatik serbest radikal mekanizmaları ile de gerçekleşir. Yüksek SO_3^{-2} konsantrasyonu ve düşük SOX aktivitesinde SO_3^{-2} 'nin oksidasyonu peroksidazlar tarafından katalizlenir. Sülfitin bu enzimler tarafından katalizlenen oksidasyonu sonucunda sülfür merkezli bir radikal olan sülfür trioksit anyon ($\bullet\text{SO}_3^-$) radikali oluşur (9).



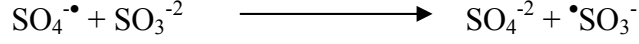
Sülfür trioksit anyon radikali oluşuktan sonraki zincir reaksiyonları, otokatalitik olarak iki aşamada gerçekleşir. Oluşan $\bullet\text{SO}_3^-$, moleküler oksijenle reaksiyona girerek $\text{O}_2^{\bullet-}$ veya $\text{O}_3\text{SOO}^{\bullet}$ oluşturur, fakat bu reaksiyonda daha çok $\text{O}_3\text{SOO}^{\bullet}$ meydana gelmektedir. (9).



Peroksil ile SO_3^{-2} 'nin reaksiyonu sonucu $\text{SO}_4^{\bullet-}$ oluşur (9).

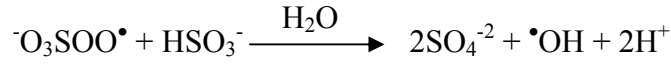
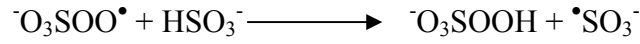


Sülfat anyon radikali ayrıca hızlı bir şekilde SO_3^{-2} 'yi okside eder ve sonuçta $\bullet\text{SO}_3^-$ 'yi oluşturur (9).

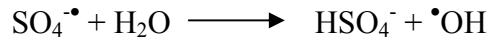


Oluşumu oksijene bağımlı olan $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 'nin, $\bullet\text{OH}$ kadar reaktif olması nedeniyle karsinojenik etkilerinin olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ diğer moleküllerle kolayca çift bağ oluşturabilir. Yüksek reaktivitesinden dolayı, methionin ve triptofanın oksidasyonundan, klorofil ve β -karotenin tahrip olmasından, lipid peroksidasyonundan ve membran hasarlarından kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir (9).

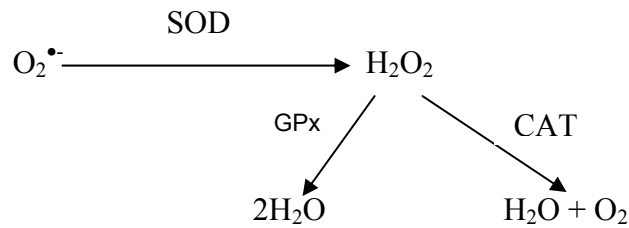
Sülfitin peroksil radikali ile olan reaksiyonu yanı sıra iki önemli reaksiyonu daha bulunmaktadır. Bisülfitin peroksil ile olan reaksiyonu sonucunda, $\bullet\text{SO}_3^-$ ve $\bullet\text{OH}$ ortaya çıkar.



Ayrıca $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 'nin su ile reaksiyona girmesiyle de $\bullet\text{OH}$ oluşabilir. Ancak bu reaksiyon, zincir reaksiyonlarının ilerlemesinde önemli bir reaksiyon değildir, çünkü $\text{SO}_4^{\bullet-}$ bu reaksiyonların yerine daha çok SO_3^{-2} oluşturmayı tercih eder (9).



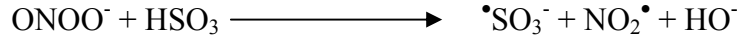
Sülfitin serbest radikal oluşturma mekanizması içerisinde öne sürülen en önemli etkilerinden biri de GSH depleksiyonuna neden olmasıdır. GSH bilindiği gibi, serbest radikallere karşı antioksidan savunma sisteminin önemli bir ögesidir. Süperoksit anyon radikalının SOD ile enzimatik yıkımı sonucu oluşan H_2O_2 'nin suya çevrilmesini ve detoksifiye edilmesini GPx ve CAT enzimleri gerçekleştirir (86).



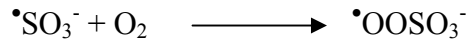
Glutasyon peroksidaz bu işlevini yaparken GSH, GSSG'a döner. Redükte glutasyon ise, GR ile tekrar GSH'a dönüştürülür (86). Bu siklusun SO_3^{-2} iyonları tarafından bozulabileceği gösterilmiştir. Sülfid iyonu GSSG ile reaksiyona girerek GSSO_3 oluşumuna neden olur. Bu molekül ise GR tarafından tekrar GSH'a dönüştürülemediğinden transpeptidazlar ile parçalanarak tiosülfat haline çevrilir (87). Oluşan tiosülfat da idrarla atılmaktadır. GSH' nin bu mekanizma ile tüketilmesi nöronları radikallerin hasarına karşı savunmasız bırakmaktadır. (87).

Sülfidin Peroksinitrit ile Olan Reaksiyonu

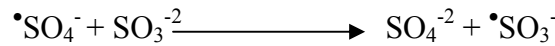
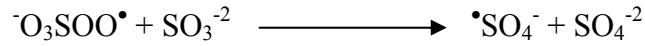
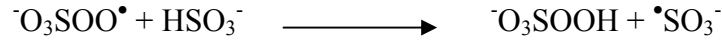
Nitrik oksit ile O_2^{\bullet} arasındaki reaksiyon sonucu oluşan peroksinitrit(ONOO^-), HSO_3^- ile reaksiyona girerek $\bullet\text{SO}_3^-$ oluşturur (10).



Sülfid radikali ve oksijenin reaksiyonu ile OOSO_3^- oluşur (10).

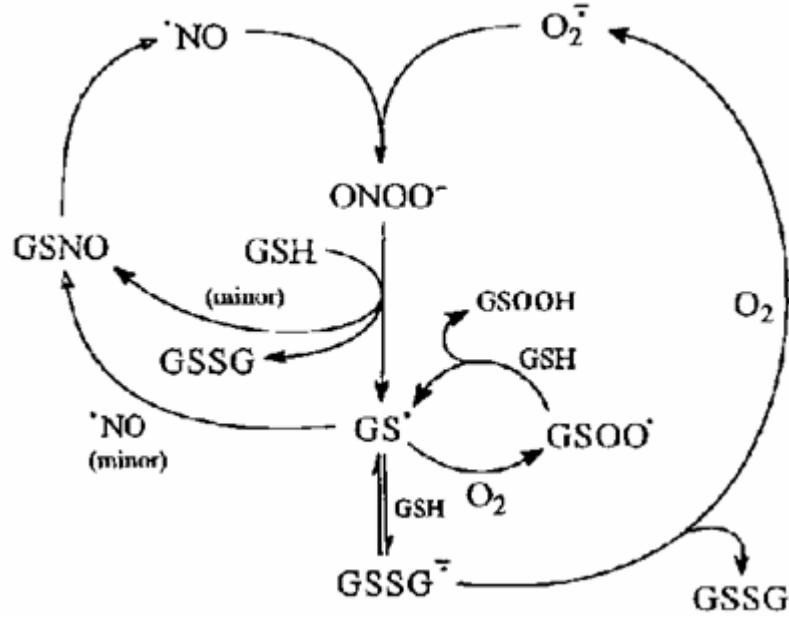


Bu reaksiyonu takip eden diğer reaksiyonlar ve radikal oluşumları aşağıda özetlenmiştir.



Ayrıca peroksinitrit ile tioller (glutasyon) arasındaki reaksiyonlar bir dizi tiyl radikallerinin oluşumunu sağlar (şekil 2.8).

Peroksinitrit GSH' ın oksidasyonunu sağlayarak glutathionyl radikalini (GS^{\bullet}) oluşturur. Glutathionyl radikalinin moleküler oksijenle reaksiyonu sonucu glutasyon tiylperoksil radikali (GSOO^{\bullet}), GS^- ile reaksiyonu sonucu glutasyon disülfid anyon radikali (GSSG^{\bullet}) meydana gelir. Glutasyon disülfid anyon radikalinin, moleküler oksijenle reaksiyonu sonucu ise O_2^{\bullet} ve GSSG ortaya çıkar (10).



Şekil 2.8. Glutasyonun zincir reaksiyonları, GSNO: S-nitrosoglutasyon, GSSG: glutasyon disülfid, GSOOH: glutasyon sülfenil hidroperoksit

2.3.5. Sülfıt Toksısıtesı

Sülfıt içeren ilaçlar ya da yiyecekler alındığında ağızda ve midede SO₂ gazı oluşur. Midede yüksek miktarlarda SO₂ oluşması ile ortaya çıkan şişkinlik, vagal uyarı ve gastrin salınımına neden olur. Vagal uyarı kolinerjik ürtiker, bradikardi, hipotansiyon ve bronkokonstrüksiyonun yanısıra abdominal ağrı, şişkinlik, kramp ve ishal gibi gastrointestinal şikayetlere de yol açar. Gastrin salınımı ise bazofillerden histamin salınımına neden olarak allerjik reaksiyonlara aracılık eder (21). Solunum sisteminde başta bronkokonstrüksiyon olmak üzere, alveol kalınlaşması, alveol hiperplazisi, akciğer ödemi, akciğer kanserine yatkınlık gibi pek çok direkt etkisi gösterilmiştir (88).

Oldukça reaktif bir molekül olan SO₃⁻²'nin solunum sistemi dışında, *in vitro* ve *in vivo* olarak başta nükleik asitler olmak üzere çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek toksik etki yarattığı gösterilmiştir. Rencüzoğulları ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada SO₂ türevlerinin, insan lenfositlerinde kromozomal aberasyonlar, kardeş kromatid değiş tokuşu ve mikroçekirdek oluşumuna neden olurken (11), farelere verilmesi durumunda çeşitli organlarda (beyin, akciğer, kalp, dalak, böbrek, kemik iliği) DNA hasarına yol açabildiği gösterilmiştir (89). Ayrıca, *in vitro* çalışmalarda, SO₃⁻²'in DNA'daki sitozin ve RNA'daki urasil ile reaksiyona girdiği, serbest radikal mekanizmalarıyla DNA ve RNA zincirlerine zarar verdiği ve sülfür içeren proteinlerin disülfid bağlarının parçalanmasına sebep olduğu saptanmıştır (90). Bunun yanında, SO₂ inhalasyonunun sıçan ve farelerin akciğer, kalp ve beyinlerinde oksidasyona bağlı hasarın yanısıra, DNA hasarına da yol açabileceği ileri sürülmüştür (91).

Sülfitin birçok dokuda olduğu gibi nöronlar üzerine de toksik etkileri söz konusudur. Genetik olarak SOX eksikliği olan hastalarda yapılan çalışmalarda, endojen SO_3^{-2} 'ye maruz kalma sonucu şiddetli nörolojik disfonksiyon ve erken ölümle karakterize vakalar bildirilmiştir (92). Ayrıca, SO_2 türevleri olan SO_3^{-2} ve metabisülfitin sıçan hippokampal CA1 nöronları ve dorsal kök gangliyonlarının sodyum ve potasyum akımlarını değiştirdiği de tespit edilmiştir (93). Bu bulgular, SO_2 'nin yalnızca solunum sistemini etkilemediğini, sistemik bir toksik ajan olduğunu göstermektedir.

2.4. Apoptozis

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevredeki diğer hücrelere zarar vermeden programlı olarak öldürülmesidir. Bu süreç enerji kullanılarak, hücresel yaralanma ve inflamasyon olmaksızın gerçekleşir (94, 95). Apoptozis embriyonik dönemden başlayarak, yaşlanmaya dek süren gelişim sürecinde homeostazise katkıda bulunur (95).

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak çevredeki diğer hücrelerde inflamasyon oluşturan hücre ölümü "nekrozis" olarak tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozisten daha farklı bir hücre ölümü gösterilmiş ve buna Yunancada apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş, sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelen "apoptozis" adı verilmiştir (94).

2.4.1. Apoptozis Morfolojisi

Ölümcül bir uyarıdan sonra apoptozisin başlama süresi, hücre tipine göre değişiklik gösterir. Ancak, bütün hücre tiplerinde, apoptozise ait morfolojik değişiklikler benzerdir ve çekirdek, sitoplazma ve hücre yüzeyinde meydana gelen değişimler birbiri ile uyumludur. Bu değişiklikler üç evrede gerçekleşir;

I. evre: Hücre büzülmesi ve çekirdek yoğunlaşması,

II. evre: Hücre tomurcuklanmasını takiben "apoptotik cisimciklerin" oluşumu ,

III. evre: Apoptotik cisimciklerin fagositozsidir (96).

Birinci evrede apoptozise gidecek olan hücreler komşu hücrelerden ayrılır ve membran yapısı bozulur. Çekirdekte ise endonükleaz enzimlerinin aktive olmasıyla DNA 180-200 baz çifti uzunluğunda kırılmaya başlar ve çekirdek kromatini dağılır. Çekirdek kromatini, çekirdek zarındaki porları kapatacak şekilde çekirdek zarının altında yoğunlaşarak farklı boyutlarda ve şekillerde çekirdeğin iç yüzeyine yapışır (96). Bundan dolayı çekirdek zarı bölünerek parçalara ayrılır. Sitoplazmik proteinlerin yoğunlaşması ve hacmin azalmasına bağlı olarak hücrede büzülme ortaya çıkar. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarının aktivasyonunun bozulmasına bağlıdır (94). Dolayısıyla apoptotik hücreler sağlıklı hücrelerden daha küçük gözlenir. Daha sonra hücre zarlarında çıkıntılar ve kıvrımlar oluşurken, endoplazmik retikulum (ER) genişler ve hücre zarı ile birleşerek yüzeyde kraterler oluşturur fakat bu süreçte mitokondrilerin yapısında önemli bir değişiklik görülmez (96).

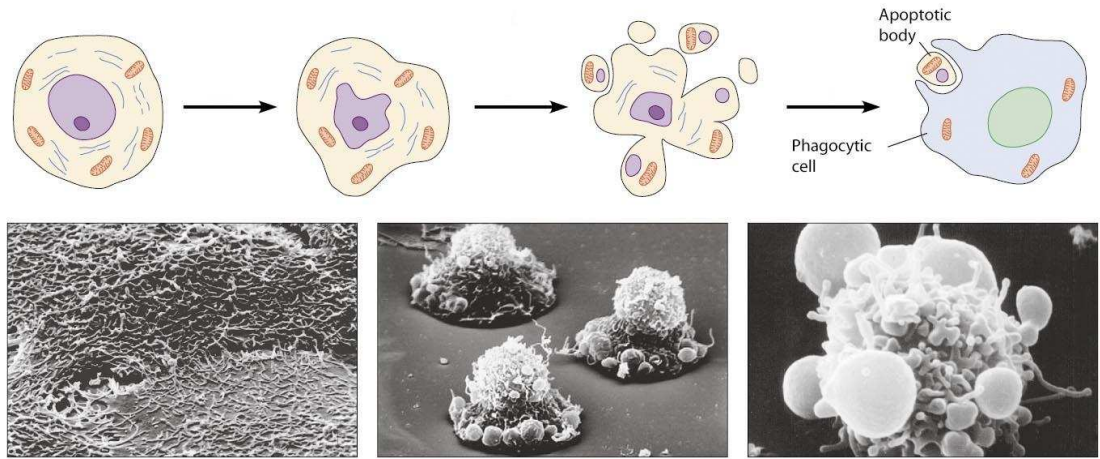
İkinci evrede hücre zarında büzülmenin artmasıyla bleblerin oluşumu gözlenir. Bunun devamında hücre, sitoplazma, organel ve çekirdek parçaları içeren

zarla çevrili apoptotik cisim olarak adlandırılan parçalara ayrılır. Apoptotik cisimlerin bir kısmı yoğun olarak hücre organellerini içerirken, bir kısmında çekirdek kalıntıları mevcuttur (94).

Üçüncü evrede ise apoptotik cisimler buldukları hücreler arası alanlarda makrofajlar ve komşu hücreler tarafından hızlıca fagosite edilirler (94).

Apoptozis sırasında hücrede gözlenen morfolojik değişiklikler şekil 2.9.' da gösterilmiştir.

Apoptozis sırasında hücre içi makromoleküller dışarı çıkmadığından herhangi bir inflamatuvar cevaba neden olmaz ve komşu hücrelerde zarar oluşturmaz (97). Bu evreler sırasında apoptozisin deneysel olarak saptanması ancak 2. ve 3. evrelerde mümkündür (98, 99, 100).



Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

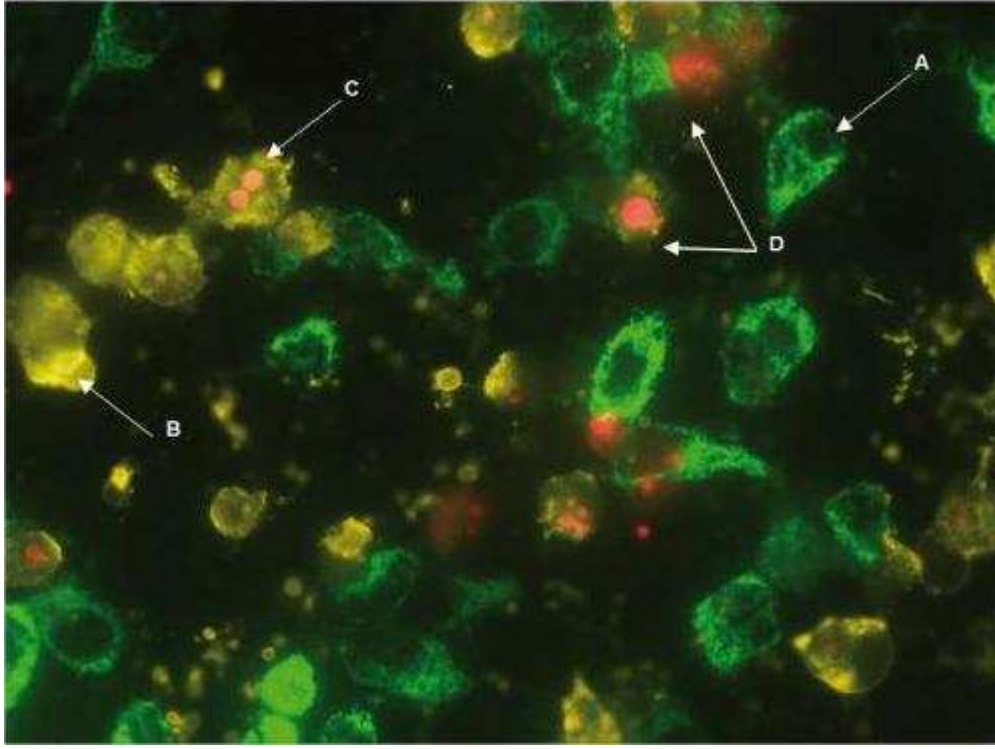
Şekil 2.9. Apoptozisin hücre morfolojisi

2.4.2. Apoptozis ve Nekrozis farkı

Apoptozis, nekrozdan oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekrozis, kontrolsüz ve pasif bir süreçtir, fizyolojik bir olay değildir (patolojik) ve genelde geniş alanları, hücreleri etkiler. Aksine apoptozis kontrollü, enerji bağımlı bir süreçtir, hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir ve tek bir hücreyi veya hücre grubunu etkiler. Nekrozis de ise hücrede enerji desteği kesilir ve direkt hücre zarının hasara uğradığı gözlenir (101). Bu hasara bağlı olarak hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken “cell swelling”, apoptotik hücre tam tersine küçülür “cell shrinkage” (101). Apoptotik ve nekrotik hücreler şekil 2.10.' da gösterilmiştir. Apoptozis nekrozis farkı tablo 2.1. de ayrıntılı olarak özetlenmiştir.

| ÖZELLİK | NEKROZİS | APOPTOZİS |
|-------------------------|--|---|
| Morfolojik özellikler | Hücre zarı bütünlüğünün kaybı Kromatin flokülasyonu Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücren lizisi | İntakt hücre zarı fakat zarı bleblerin oluşumu Kromatinin nükleer zar civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücrenin mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren zarla çevrili apoptotik cisimlere parçalanması |
| Biyokimyasal özellikler | Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) DNA rastgele parçalanır Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında) | Kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır DNA fragmentasyonu |
| Diğer özellikler | Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur | Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez |

Tablo 2.1. Apoptozis ve nekrozis farkı



Şekil 2.10. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin immünohistokimyasal görüntüleri
(A) sağlıklı hücre, (B) apoptotik hücre, (C) apoptozisin geç evresindeki hücre, (D) nekrotik hücre

2.4.3. Apoptozis yolağı

Birçok fizyolojik ve patolojik durum veya faktör apoptozise neden olabilir. Fakat her hücre aynı faktöre apoptozisle cevap vermez (101). Apoptozise yol açan nedenler; büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, viral enfeksiyonlar, kanser ilaçları, radyasyon, yüksek doz glukokortikoid, Fas veya tümör nekrozis faktör reseptörü-1 (TNFR-1) reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfositler, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53' ün aktive olması, hücre içi Ca^{+2} miktarındaki artış ve oksidatif stres olarak sıralanabilir (101).

Apoptozis araştırmalarında birbirini etkileyebilen iki ana yolak olduğu gösterilmiştir:

- 1) Ekstresek veya ölüm reseptör yolağı
- 2) İntrensek veya mitokondriyal yolak

Ekstresek ve intrensek yolaklar aynı son noktada yani infaz yolağında birleşirler. Bu yolak kaspaz-3 ayrımıyla başlar ve DNA parçalanması, hücre iskeletinin ve çekirdek proteinlerinin yıkılması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak da hücrenin fagositozu ile sonuçlanır (102).

Ekstresek veya ölüm reseptör yolağı

Ekstresek yolak, transmembran reseptör-aracılı etkileşimler ile başlar ve bu reseptörler TNF reseptör ailesinin üyeleri olan “ölüm reseptörleri” dir (103). TNF reseptör ailesi üyeleri, sistinden zengin hücre dışı bağlanma bölgeleri (domain) ve yaklaşık 80 aminoasitten oluşan hücre içi “ölüm bağlantı bölgesi” (death domain)

adı verilen bağlama bölgelerinden meydana gelir (104). Bu ölüm domaini apoptotik sinyali hücrenin dış yüzeyinden hücre içi sinyal yolağına iletmekle görevlidir. Günümüzde en iyi tanımlanan ligand ve reseptörler; FasL/ FasR, TNF- α / TNFR1, APO-3L/ DR-3, APO-2L/ DR-4, APO-2L/ DR-4'dir (104, 105, 106).

Apoptozisin ekstrinsek yolağında meydana gelen olaylar dizisi en iyi FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri ile tanımlanmıştır. Bu modellerde reseptör ve bunlara bağlanan ligandların etkileşimi ve sonrasındaki olaylar bir dizi halinde meydana gelir. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanmasıyla FADD (Fas associated death domain), TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanmasıyla TRADD (TNFR1 associated death domain) adı verilen sitoplazmik adaptör proteinleri, bu reseptörlerin membran iç yüzeylerine bağlanırlar (107). Bunu takiben ölüm efektör bağlantı bölgesinin dimerizasyonu sonucunda prokaspaz-8 ile etkileşime girerek, prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan bir ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (death inducing signaling complex (DISC)) oluştururlar (108).

İntrensek veya mitokondriyal yolak

İntrensek yolak doğrudan hücre içi hedeflere etki eden reseptörden bağımsız, mitokondriyal başlangıçlı olaylar zinciridir. Hücre içindeki büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve hormonların eksikliği, radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller intrinsek yolağı başlatabilir (101). Tüm bu uyarılar, mitokondriyal membran geçirgenliğinin değişmesine, mitokondriyal transmembran potansiyelinde bozukluğa ve sit-c, Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI), serin proteaz HtrA2/Omi (High-temperature requirement) adı verilen pro-apoptotik proteinlerin intermembran boşluklardan sitozole salınmalarına neden olurlar (109). Bu proteinler kaspaz aracılı mitokondriyal yolağı aktive ederler. Sitokrom-c, prokaspaz-9' a ve Apaf-1' e bağlanarak "apoptozom" oluşumunu sağlar (110, 111). Bu molekülün asıl oluşma nedeni kaspaz-9'u aktive etmektir.

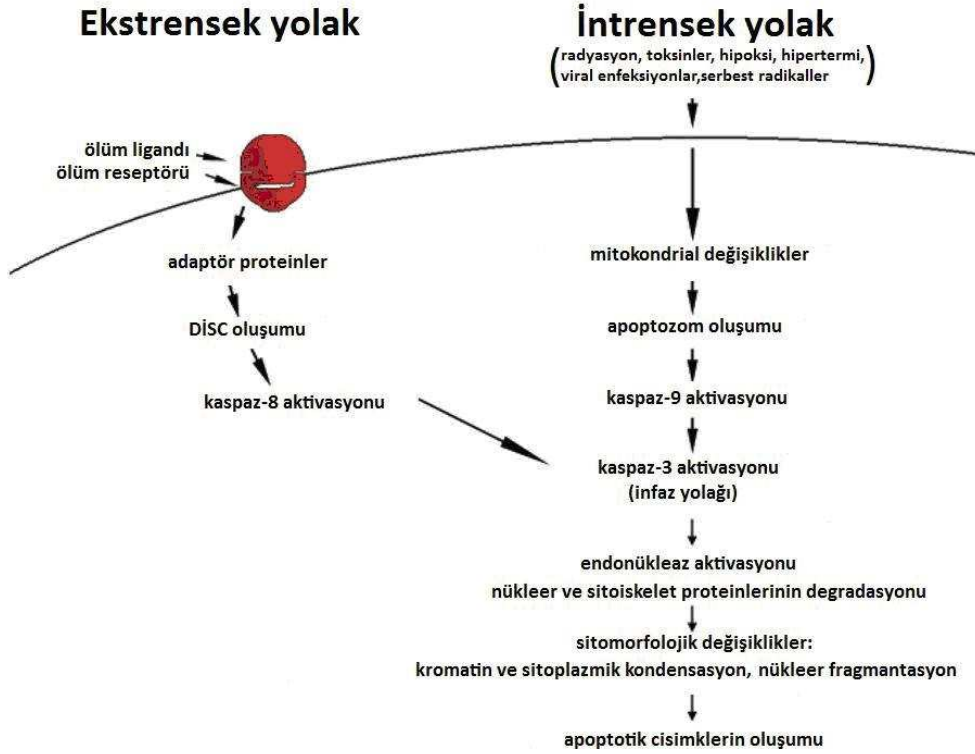
Diğer pro-apoptotik proteinler olan kaspazla aktive edilen DNAaz (CAD = Caspase- Activated DNase) apoptozis süresince mitokondriden salınır, fakat Apoptozisi indükleyen faktör (AIF) hücre ölüme teslim olduktan sonra salınır. Apoptozisi indükleyen faktör, DNA' nın parçalara ayrılmasına ve periferik nükleer kromatinin yoğunlaşmasına neden olur (112). Kaspazla aktive edilen DNAaz, kaspaz-9 ile etkileşime girerek oligonükleozomal DNA parçalanmasına ve ilerlemiş kromatin yoğunlaşmasına neden olur (113).

Mitokondriyal apoptotik yolakların kontrolü ve regülasyonu Bcl-2 protein ailesi üyeleri tarafından yapılır (114). Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 ailesi proteinlerinin düzenlenmesinde önemlidir. Bcl-2 protein ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirir ve sit-c salınması için düzenleyici rol oynar. (115). Bu proteinlerin mitokondri membranına etkisi, hücrenin apoptozise gideceğinin ya da apoptozis sürecinin bozulacağına belirlenmesi yönünden özel öneme sahiptir (115).

İnfaz yolağı

Ekstresek ve intrinsek yollarının ikisi de apoptozisin son yolağı olarak düşünölen infaz (execution) fazında sonlanırlar. Bu faz, efektör kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu sonucu başlar. Efektör kaspazlar, proteazları aktive ederek nükleer ve sitoplazmik hücre iskelet proteinlerini parçalarlar. Dolayısıyla hücrede apoptozise ait morfolojik ve biyokimyasal değışikliklere neden olurlar (116). Kaspaz-3 en önemli efektör kaspazlardan biridir ve başlatıcı kaspazla (kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10) aktive olarak proteolitik kaskadın başlamasına neden olur. Kaspaz-3 aktivasyonu, kaspazla aktive edilen DNAaz inhibitörü (ICAD=Inhibitor of Caspase-Activated DNase) ile birleşik halde bulunan endonükleaz CAD'ı inhibitöründen ayırarak aktive eder. Takiben CAD çekirdekdeki kromozomal DNA' yı parçalar ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur (117).

Apoptotik hücrelerin fagositozisi apoptozisin son basamağıdır. Bu hücrelerin yüzeyinde fosfolipid asimetrisi ve fosfatidilserinin membran iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması, diğer hücrelerin fagositozis için uyarılmasını sağlar ve non-inflamatuar fagositik tanıma kolaylaşarak hücreler erkenden ortadan kaldırılırlar (118). Apoptozis yolları şekil 2.11. 'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Apoptozis yolları

2.4.4. Apoptozisde görev alan araçlar

p53: Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, apoptozise neden olabilmektedir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. Bir tümör supresör geni olan p53 proteini nükleusta lokalizedir ve harekete geçtiğinde esas fonksiyonu, pek çok diğer genin transkripsiyonunu kontrol ederek DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu indüklemektir (119). Bu nedenle p53' ün mutasyonu veya homozigot kaybı sonucu DNA hasarlanması tamir edilemez (120). Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni, apoptotik sinyal sonucu aktif hale geldiğinde ve DNA hasarını tamir edebilecek düzeydeyse, hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesine engel olmakta ve hücreye DNA'yı tamir etmek için zaman kazandırmaktadır. Eğer, DNA hasarı tamir edilemeyecek düzeydeyse, hücre siklusundaki blok ortadan kalkar ve hücre hasarının tamiri başarılı olmaz. Bunu takiben p53 geni bcl-2 grubu proteinlerden bax proteinini aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar (119).

Bcl-2 protein ailesi: Mitokondriyal yolda işlev gören ve apoptoziste çok önemli rol oynayan moleküllerdendir. Apoptozisteki regülasyonu büyük ölçüde mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesi ile meydana gelir (121). Bcl-2 ailesi, birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur: üyelerinin bir kısmı apoptozisi indüklerken (Pro-apoptotik üyeler: Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), diğer bir kısmı ise apoptozisi inhibe eder (Anti-apoptotik üyeler: Bcl-2, Bcl-X_l). Hücrenin hayatta kalması, pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin rölatif oranına bağlıdır. Dolayısıyla oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır.

Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada por oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sit-c ve AIF' in mitokondriden sitozole çıkmasını sağlayarak apoptozisi indükler (122).

Anti-apoptotik Bcl-2 gen ailesi (Bcl-2, Bcl-X_l), pek çok proteinin sitozolden intrasellüler membrana dağılımını düzenleyen adaptör bir protein olarak etki göstererek kaspazların aktivasyonuna yardım eden sit-c' nin ve AIF'in mitokondriden çıkışını engeller ve böylece apoptozisi inhibe eder (122).

Kaspazlar: Apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan ve aktif merkezinde sistein bulunduğundan "sistein proteazlar" olarak adlandırılan enzimlerdir. Aspartik asitten sonraki peptid bağını kırmakla görevlidirler (123). Hücrede inaktif proenzim olarak sentezlenirler. Aktivasyonları sırasında aspartat bağının ayrılmasıyla proenzimden, subünitler içeren aktif enzim oluşur ve birbirlerini aktifleştirerek proteolitik kaskada neden olurlar (124). Bu enzimlerin, apoptozis sürecinde genomik DNA'nın 50-200 kb parçalar halinde kırılması, proteinlerin parçalanması, fosfotidilserinin hücre zarı iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması gibi farklı evrelerde rol aldığı gözlemlenmiştir (125, 126).

Kaspazların tüm alt tiplerinin, proteolitik kısımları yüksek oranda homoloji göstererek 20 kDa (p20) ve 10 kDa (p10) ağırlığındaki iki alt bölümden

oluşmaktadır. Bazı prokaspazların yapısında iki alt üniteyi birbirinden ayıran 10 aminoasitlik bağlayıcı bölge mevcuttur (125, 126).

Kaspazlar fonksiyonlarına göre üç gruba ayrılırlar:

1. Başlatıcı Kaspazlar: Bu grup kaspaz 2, 8, 9 ve 10'u içerir ve bu kaspazlar pro-apoptotik sinyali alarak, yolağın devamındaki diğer kaspaz üyelerinin aktive olmasını sağlarlar. Her biri 100 aminoasitten oluşan başlatıcı kaspazlar, transmembran reseptörleri veya sitotoksik moleküller ile etkileşerek aktif hale geçerler. Daha sonra efektör kaspazları aktifleştirirler ve apoptotik mekanizmanın hücre içerisinde farklı yollarda devam etmesine neden olurlar (127).

2. Efektör Kaspazlar: Bu gruba kaspaz 3, 6 ve 7 dahildir. Bu kaspazlar çeşitli hücre içi proteinleri parçalayarak ve apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (128).

3. Sitokinleri Aktive Eden Kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14' den oluşan bu grup ise hücre sinyal iletiminde önemli role sahip sitokinlerin aktivasyonları için gereklidir. Bu gruba dahil olan Kaspaz 1, interlökin-1 β dönüştürücü enzim (ICE) olarak bilinmekte ve öncül interlökin-1 β 'nin aktif hale geçmesine neden olmaktadır (129).

2.4.5. Apoptozis ve oksidatif stres

Organizmada ROS'un oluşum hızı ile bunların intrasellüler ve ekstrasellüler ortamdan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır. Bu dengenin bozulması sonucu oksidatif stres meydana gelir. ROS' lar hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşenlerinin yapılarının bozulmalarına neden olurlar (130).

Birçok hücrede ROS'un primer kaynağı mitokondridir (131). Mitokondriyal ROS'un aşırı üretimi ve/ veya mitokondriyal redoks homeostazisinin bozulması mitokondriyal membran geçirgenliği (mitokondriyal membran permeabilizasyonu =MMP)'nin bozulmasına yol açar. Buna bağlı olarak intrasellüler su homeostazisi bozularak mitokondriyal matriksin ozmotik olarak şişmesine neden olur (132).

Anormal ROS üretimi, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinde (Bax, Bid vb.) konformasyonel değişiklik meydana getirir. Bu değişiklik sonucu, MMP bozulur ve apoptozis indüklenir (133, 134). Apoptozis sürecinde oluşan mitokondriyal disfonksiyon, aşırı ROS üretimini tetikler ve Bcl-2 ailesi üyelerinde redoks-aracılı değişiklikler meydana getirerek, hücredeki diğer mitokondrilerle etkileşime girer ve bu mitokondrilerin MMP' sini değiştirerek apoptozisi alevlendirilir (135).

Aynı zamanda ROS üretimi ve buna bağlı olarak oluşan oksidatif stres, redoks-aracılı olarak ER'den sitoplazmaya Ca⁺² salınımına neden olur. Böylece hücre içi serbest Ca⁺²'un artışı, Ca⁺² - bağımlı enzimlerin (endonükleazlar ve fosfolipazlar) aktivasyonunu değiştirerek birçok farklı mekanizma ile apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunur. Bununla beraber, intrasellüler Ca⁺² homeostazisindeki bozukluk, sitokinleri aktive eden kaspaz olan kaspaz-12'nin aktivasyonunu indükler. Kaspaz-12, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'u aktive ederek proteolitik kaspaz kaskadının başlamasına neden olur (136).

ROS üretimindeki artış, Ca^{+2} 'un hücre içine girişini arttırmasının yanı sıra, fosfatidilserinin (PS) oksidasyonuna ve plazma membranının dış yüzeyine translokasyonuna neden olarak hücreyi fagositik yolağa sokar. Dolayısıyla ROS'un fagositik yolda da görev aldığı ve apoptozisi indüklediği gözlenmiştir (137).

Sitoplazmik Ca^{+2} artışını ve PS translokasyonunu indükleyen diğer bir faktör seramid sentezinin artmasıdır (138). Seramid hücre membranında bol miktarda bulunan bir fosfolipid olan sfingomiyelinden sfingomiyelinaz enzimi aracılığıyla oluşur ve oksidatif stres, Fas ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak apoptozis aracı olarak görev yapar (139, 140). Aynı zamanda seramid artışı, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerini aktive ederek apoptozisi kaspaz-bağımsız olarak arttırır (138). Bununla birlikte ROS'un artması, sfingomiyelinaz enzimini aktive ederek seramid oluşumunu dolayısıyla apoptozis oluşumunu indükler (141).

2.5. Fosfolipaz A2 (PLA₂)

Fosfolipaz A₂ (PLA₂), membran gliserofosfolipidlerinden, serbest yağ asidi ve lizofosfolipid üretmek için gliserolün sn-2 pozisyonundaki açil ester bağımlı hidrolize eden esteraz enzim ailesinin bir üyesidir (142). Beyin dokusunda PLA₂'nin aktivitesi 1970'lerde tanımlanmıştır. Fakat PLA₂ gruplarının aktivitelerinin belirlenmesi 1990'larda gerçekleşmiştir (143). Fosfolipaz A₂ aktivitesi hücrenin alt fraksiyonlarında özellikle mitokondriyal ve sinaptosomal fraksiyonlarda gözlenmiştir (144). Fosfolipaz A₂'nin aktivasyonu membran fosfolipidlerini hidrolize ederek araşidonik asit (AA) salınmasına neden olur ve inflamatuvar mediatörlere (prostoglandin, lökotrien ve tromboksan) dönüşerek hücre membranının polarizasyonu, membran akışkanlığının değişimi, protein kinaz C (PKC) aktivasyonu, Ca^{+2} salınımının stimülasyonu, gen transkripsiyonu ve birçok enzim aktivitesinin regülasyonu gibi farklı mekanizmalarla nöronal hücre fonksiyonlarını modüle eder (145). Fosfolipaz A₂'nin katalizlediği reaksiyon ürünlerinden lizofosfolipidlerin büyük bir kısmı beyin gliserofosfolipidleri olarak tekrar yapılandırılırlar, bir diğer kısmı ise bir başka inflamatuvar mediatör olan PAF'ın sentezini sağlayarak inflamasyonu tetiklerler. Aynı zamanda PLA₂ tarafından sentezlenen serbest yağ asitleri serbest radikallerin oluşumuyla oksidatif stres indükler. Salınan serbest yağ asitleri, beynin normal fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için deaçilasyon ve reaçilasyon ile gliserofosfolipidlere geri dönüştürülür. Fakat PLA₂ enziminin kontrolsüz aktivasyonu, esansiyel gliserofosfolipidlerin kaybı, iyon homeostazisinin, nöronal membran permeabilitesinin ve akışkanlığının bozulması, serbest yağ asitlerinin artmasıyla lipid peroksidasyonunda artışa neden olur (146). Beyinde serbest radikallerin yüksek seviyede olması oksidatif stres yaratır ve buna bağlı olarak enerji metabolizmasının bozulmasıyla nörodejenerasyon gözlenir (147) (Şekil 2.14.).

2.5.1. Beyin dokusunda PLA₂ çeşitliliği

Fosfolipaz A₂ enzimi yapısına, enzimatik özelliğine, subsellüler yerleşimine ve hücre fonksiyonlarına göre sekretuar fosfolipaz A₂ (sPLA₂), sitozolik fosfolipaz A₂ (cPLA₂), Ca^{+2} -bağımsız fosfolipaz A₂ (iPLA₂) ve plazmalojen-

selektif fosfolipaz A₂ (Pls-EtnPLA₂) olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (148) (Şekil 2.12.).

2.5.1.1. Sekretuar fosfolipaz A₂ (sPLA₂)

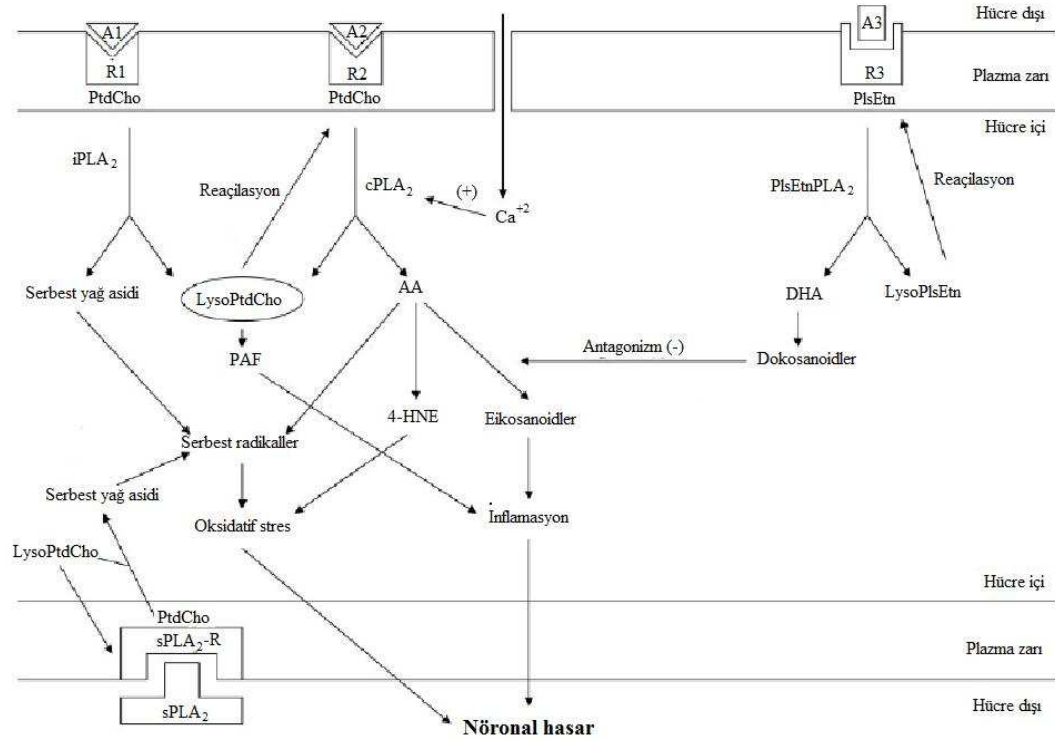
Sekretuar fosfolipaz A₂ 14-18 kDa ağırlığında aktif ve intrasellüler olarak sentezlenir. Bu enzim hücre dışına sekrete edilir ve reseptörüne bağlanarak membran fosfolipidlerinden, ekstrasellüler bileşenlere etki eden AA' i oluşturur.

Memelilerde iki çeşit yüzey reseptörü vardır:

N-tipi hücre yüzey reseptörü nöronlarda bulunan sPLA₂ reseptörü,

M-tipi hücre yüzey reseptörü ise iskelet kasında bulunan sPLA₂ reseptörüdür (149, 150, 151).

Memelilerde tanımlanan 14 alttipi vardır. sPLA₂ aktivitesi için mM düzeyinde Ca⁺² konsantrasyonuna ihtiyaç vardır. sPLA₂'nin yağ asidi spesifitesi yoktur. Bu enzim memeli beyninin bütün bölgelerinde bulunur fakat aktiviteleri, bulunduğu bölgelere göre değişir. Medulla oblongata, pons, hipokampus, talamus, hipotalamus ve serebral kortekste yüksek aktivite gösterirken, serebellum ve olfaktor bulbusta daha düşük aktivite gösterir (152).



Şekil 2.12. Fosfolipaz A₂ mekanizması. Sekretuar fosfolipaz A₂ (sPLA₂), sitozolik fosfolipaz A₂ (cPLA₂), Ca⁺²-bağımsız fosfolipaz A₂ (iPLA₂) ve plazmalojen-selektif fosfolipaz A₂ (Pls-EtnPLA₂), A1, A2, A3 farklı agonistler; R1, R2, R3 farklı reseptörler; sPLA₂-R, sekretuar PLA₂ reseptörü; PtdCho, fosfotidilkolin; PlsEtn, etanolamin plazmalojen; Lyso-PtdCho, lizofosfotidilkolin; AA, araşidonik asit; DHA, dokoheksaenoik asit; PAF, platelet aktive edici faktör; 4-HNE; 4-hidroksi-2-nonenal

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artması sPLA₂ aktivitesini stimüle ederek apoptozisi indükler (144) (şekil 2.12.). Ayrıca beyinde birçok sebeple glutamat seviyesinin artması voltaja bağlı Ca^{+2} kanallarının açılmasına ve hücrede Ca^{+2} bağımlı olarak çalışan sPLA₂ aktivitesinin zamana ve doza bağlı olarak stimüle olmasına sebep olur. Aynı zamanda mekanizması henüz bilinmemekle birlikte, sPLA₂ de glutaminerjik sinaptik aktiviteyi modüle ederek glutamat nörotoksitesinde görev alır (153, 154). Birçok mekanizmayla hücre dışına salınan glutamat, hücre içi Ca^{+2} inflaksını arttırarak, sPLA₂ aktivitesini doza ve zamana bağlı olarak stimüle eder (144). Bununla beraber kortikal nöronlarda sPLA₂ glutamat salınımını aktive ederek glutaminerjik sinaptik aktiviteyi modüle eder (155).

Sekretuar fosfolipaz A2 aktivasyonu ile başlayan yolakta üretilen ROS ve inflammatuar mediatörler hedef genlere etki ederek sitokin salınımını stimüle eder ve apoptozisi indükler (156).

Sekretuar fosfolipaz A2, nörotoksitede de görev alır. Salınan sPLA₂ presinaptik membrana bağlanır ve vezikülün geri alınması esnasında sinaptik vezikül lümenine girer ve sinaptik vezikülün iç kısmındaki gliserofosfolipitleri hidrolize ederek vezikülün fosfolipid bileşenini değiştirir. Böylelikle endositozu bloke eder ve presinaptik transmisyonda önemli role sahip vezikül agregasyonunu inhibe eder (157). Ayrıca, sPLA₂'nin reseptörüne bağlanmasıyla oluşan lizofosfotidilkolin nöronal büyümeyi indükler. Yapılan çalışmalarda mutasyonla sPLA₂ aktivitesinin inhibe edilmesi sonucu, nöronal büyümede azalma olduğu gözlenmiştir. Böylece sPLA'nin merkezi sinir sisteminde dolaylı olarak nörotrofin gibi görev yaptığı gösterilmiştir (158).

Sekretuar fosfolipaz A2, membrandaki yağ asitlerine seçicilik göstermemesine rağmen seramid, sPLA₂'yi araşidonil grubuna spesifik hale getirerek membran fosfolipitlerindeki substrat tercihini değiştirir. Aynı zamanda seramidin bu enzimin aktivitesini de arttırdığı gösterilmiştir (159).

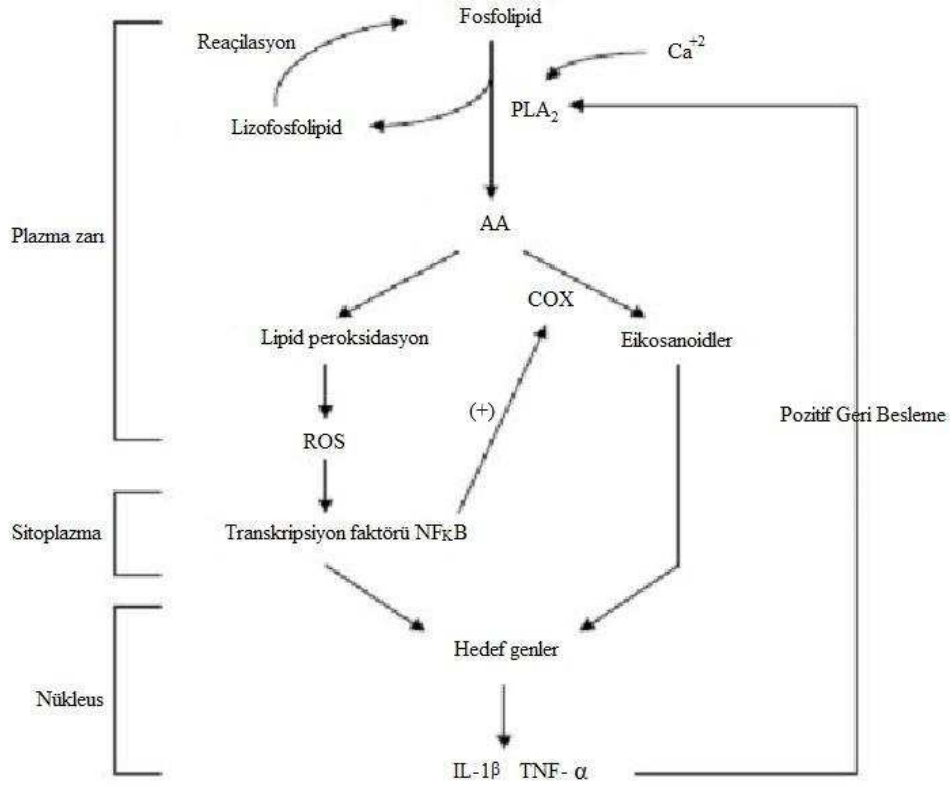
Serebral hasarda inflamasyon sürecinde meydana gelen interlökin-1 β (IL-1 β) ve TNF- α gibi inflammatuar faktörlerin astrositlerde PLA₂ sekresyonunu arttırdığı gözlenmiştir (160) (Şekil 2.13.).

2.5.1.2. Sitozolik fosfolipaz A2 (cPLA₂)

Hücre içi bir enzimdir. Dinlenme durumunda sitozolde bulunur fakat hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artmasıyla cPLA₂ membrana bağlanır ve aktive olur (161). Sıçan ve insan beyin dokusunda yaygın olarak bulunur ve serebral kortekste aktivitesinin fazla olduğu gözlenmiştir.

Molekül ağırlığına göre cPLA₂-H ve cPLA₂-L olmak üzere iki subtipi tanımlanmıştır. cPLA₂-H'nin moleküler ağırlığı 200- 500 kDa arasındadır ve aktivitesi Ca^{+2} tarafından inhibe edilir. cPLA₂-L'nin moleküler ağırlığı 100 kDa'dur ve membrana bağlanmak için mM düzeyde Ca^{+2} 'a ihtiyaç duymasına rağmen, kataliz için Ca^{+2} kullanmaz (162, 163, 164). N-terminalinde Ca^{+2} -bağımlı

fosfolipid bağlayıcı bir alanın varlığından dolayı cPLA₂ sitozolden nükleer veya diğer hücresel membranlara Ca⁺² bağımlı bir biçimde taşınır. Bu da cPLA₂'nin membran üzerindeki fosfolipid substratına ulaşmasını sağlar. Ancak, cPLA₂'nin ekstrasellüler uyaran tarafından nasıl aktive edildiği ve bu aktivasyonun spesifik bölgelerde mi olduğu henüz bilinmemektedir.

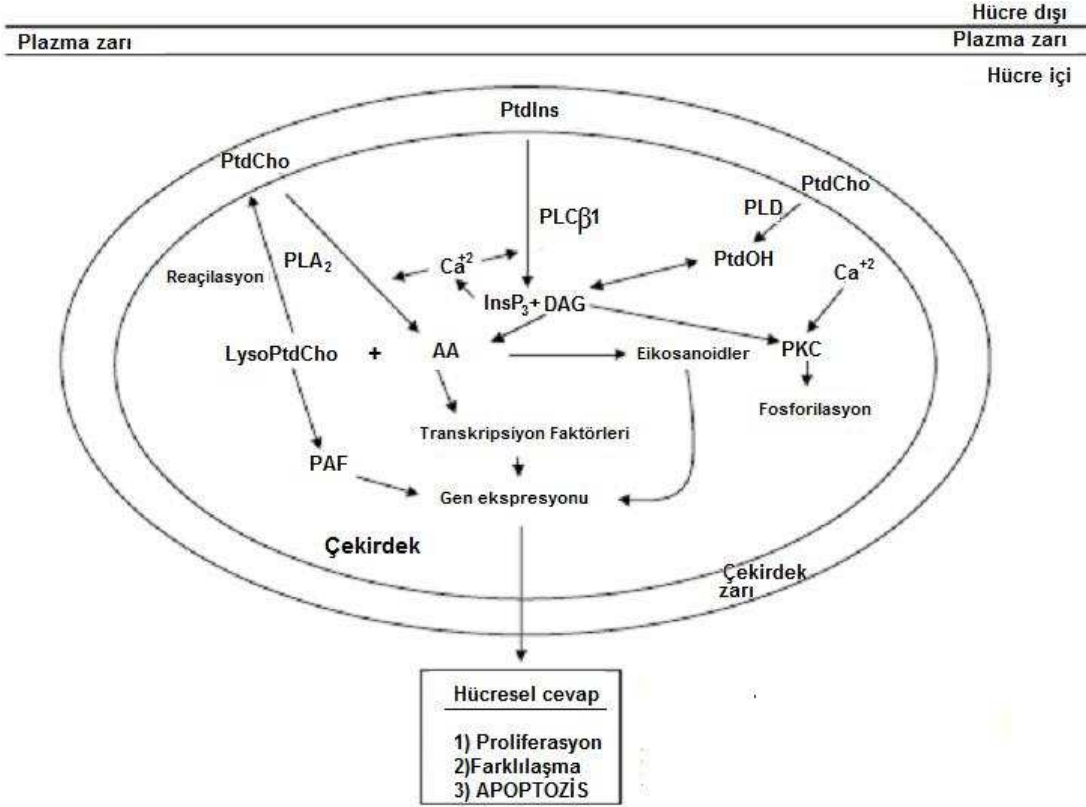


Şekil 2.13. Fosfolipaz A₂ yolu, PLA₂, Fosfolipaz A₂; AA, Araşidonik asit; Ca⁺², Kalsiyum; COX, Siklooksijenaz; ROS, Reaktif oksijen türleri; IL-1β, İnterlökin-1β; TNF-α, Tümör nekrozis faktör-α

Beyinde ve diğer nöronal dokularda, cPLA₂'nin cPLA₂-α, cPLA₂-β ve cPLA₂-γ olmak üzere üç paraloğu bulunur:

cPLA₂-α'nın moleküler ağırlığı 85 kDa'dur. Sn-2 pozisyonundaki açıl ester bağımlı hidrolize eder. Purkinje hücrelerinin soma ve dendritlerinde lokalize olmuşlardır. cPLA₂-α, ikinci habercilerin üretiminde, uzun süreli güçlenmede (Long-term potentiation=LTP)'da hafıza bellek mekanizmasında görev alır (165).

cPLA₂-β'nin molekül ağırlığı 114 kDa'dur. Serebellumda bulunur ve aminoasit dizilimi bakımından cPLA₂-α ile benzerdir. Sn-1 pozisyonundaki açıl ester bağına etki eder. Diğer cPLA₂ subtiplerine göre, fosfotidilkoline daha düşük aktivite gösterir (166).



Şekil 2.14. Hücre içi fosfolipaz A₂ yolağı. PtdCho, Fosfotidilkolin; PtdIns, Fosfotidilinozitol; LysoPtdCho, Lizofosfotidilkolin; PAF, Platelet aktive edici faktör; AA, Araşidonik asit; PLA₂, Fosfolipaz D; PKC, Protein kinaz C; PLCβ1, Fosfolipaz C; InsP₃, İnositol 3-fosfat; DAG, Diaçil gliserol; Ca⁺², Kalsiyum; PtdOH, Fosfatidik asit

cPLA₂-γ'nin molekül ağırlığı 61 kDa'dur. C-2 domaini yoktur. Lipid çapası görevi yapan ve prenil bağlayarak membrana bağlanmayı sağlayan parçası vardır. Fosfotidilkolinden, AA salınımını sağlar. cPLA₂-α'dan farklı olarak, gliserofosfolipitlerin sn-2 ve sn-1 pozisyonundaki açil ester bağına etki eder (167).

Sitozolik fosfolipaz A₂ paraloglarından daha sonra keşfedilen cPLA₂-δ'nin molekül ağırlığı 109 kDa'dur ve diğer cPLA₂ subtiplerinin tersine cPLA₂-δ, AA yerine linoleik asit salınımını sağlar (168).

cPLA₂ izoenzimlerinin stimulus aracılı AA salınımından sorumlu olduğu düşünülmesine rağmen, birçok çalışmada sPLA₂ aktivasyonunu da indüklediği gösterilmiştir (168).

2.5.1.3. Plazmalojen-selektif PLA₂ (Pls-EtnPLA₂)

Moleküler ağırlığı 39 kDa olan plazmalojen-selektif PLA₂, beyin total yağ asidi miktarının % 17'sinden fazlasını oluşturan (169) membran fosfolipidlerinden plazmalojeni sn-2 pozisyonundan hidrolize ederek dokosaheksaenoik asit (DHA) ve AA sentezler. İlk olarak sığır beyni sitozolünde tanımlanmıştır. cAMP ve Ca⁺² bu enzimi regüle eder ama katalizi için Ca⁺² ihtiyacı yoktur. Hüresel düzeyde transkripsiyonu nöron ve astrositlerde bulunur (170). Plazmalojen-selektif PLA₂

aktivitesi 2 mM ATP ve fazlası ile inhibe edilir. Dolayısıyla doza bağılı inhibisyon gerçekleşir. Aynı zamanda sitrat> sülfat> fosfat gibi çeşitli polivalent anyonlar ve Ag^+ (gümüş), Hg^{+2} (civa), Fe^{+3} gibi metal iyonları tarafından da doza bağılı olarak inhibe edilir (171). Fas, TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin cevabında apoptozis aracısı olarak meydana gelen seramid bu enzimin seviyesini azaltır. Ancak doza bağılı olarak aktivitesini inhibe eder (172).

2.5.1.4. Ca^{+2} -bağımsız fosfolipaz A2 (iPLA₂)

Nöronların sitozolünde bulunan ve 80 kDa ağırlığında olan bu enzim aktive olmak için Ca^{+2} 'a ihtiyaç duymaz (145). iPLA₂'nin beş izoformu bulunmaktadır (173). Yapısında bulundurduğu eksonlara göre iPLA₂-1, iPLA₂-2, iPLA₂-3, iPLA₂-ankrin-1, iPLA₂-ankrin-2 olarak sınıflandırılır. Eksonlar, hidrofobik aminoasitleri kodlarlar bu nedenle bağlanma bölgelerini belirlerler (165, 173). Substrat olarak fosfatidilkolini sn-2 pozisyonundan hidrolize ederek linoleoyl > palmitoyl > oleoyl > AA meydana getirir. iPLA₂ sitriatum, hipotalamus, ve hipokampusta en yüksek aktiviteye sahip olmak üzere tüm beyin bölgelerinde mevcuttur (145). Ca^{+2} -bağımsız fosfolipaz A2 (iPLA₂) öğrenmede, hafızada, nöronal proliferasyonda ve apoptoziste görev alır (174, 175).

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik, Biyokimya, Histoloji ve Deneysel Hayvanlar Ünitesinde gerçekleştirilen çalışmamızda 40 adet 3 aylık, ortalama 250-300 gr ağırlığında, erkek Wistar sıçan kullanılmıştır.

3.1. Gruplandırma

Deneysel Hayvanlar Ünitesinden üçer gün ara ile rastgele alınan toplam 40 adet sıçan her grupta 10 hayvan olacak şekilde dört grup oluşturulmuştur.

Grup 1: Kontrol grubu (K)

Grup 2: Sülfid grubu (S)

Grup 3: Quinacrine grubu (Q)

Grup 4: Quinacrine-Sülfid grubu (QS)

3.2. Deneysel protokolü

35 günlük deneysel süresi boyunca, hayvanlar her kafeste 5 hayvan olacak şekilde, 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulmuşlardır. Bu süre içinde hayvanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir.

Deneysel süresince;

- i) K grubuna musluk suyu gavajla ve serum fizyolojik intraperitoneal enjeksiyon ile
- ii) S grubuna 100 mg/kg/gün $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ gavajla ve serum fizyolojik intraperitoneal enjeksiyon ile
- iii) Q grubuna 10 mg/kg/gün Quinacrine intraperitoneal enjeksiyonla ve musluk suyu gavajla
- iv) QS grubuna 100 mg/kg/gün $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ gavajla ve 10 mg/kg/gün Quinacrine intraperitoneal enjeksiyon ile verilmiştir.

3.3. Somatosensoryel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi:

35 günlük deneysel süresinin bitiminde (36. gün) somatosensoryel uyarılma potansiyelleri, sıçanlar eter anestezisi altındayken kafalarına yerleştirilen iğne elektrotları (NE-223S, 5 mm Nihon Kohden) ile Biopac MP 100 Data Acquisition cihazında kaydedilmiştir. Elektrotlar aktif elektrot serebral korteksin sol somatosensoryel alanının üzerinde (bregmanın 0.4 cm soluna), referans elektrot orta hatta bregmanın 1cm önünde, toprak elektrodu hayvanın kuyruğunda olacak şekilde yerleştirilerek, SEP kaydı için sıçanın ayak bileğinden, sağ posterior tibial sinire transkutanöz yolla 3/sn kez sabit voltajlı kare dalga şeklinde elektriksel uyarı verilmiştir. Uyarı zamanı 0,5 ms, analiz zamanı 150 ms, örnekleme hızı 1 kHz, yükseltecin bant genişliği 1-3000 Hz, kazanç 50000 seçilmiş ve kayıt sırasında sıçanların vücut sıcaklıkları 37 - 37,5°C'de sabit tutulmuştur. SEP kaydı sırasında

200 cevabın ortalaması alınıp cevabın tekrar oluşabilirliğinden emin olmak için en az iki kez tekrarlanmıştır (13).

3.4. Biyokimyasal Yöntemler

Grupların SEP' leri kayıt edildikten bir gün sonra hayvanlara ürethan anestezisi uygulanmış ve abdominal aorttan heparinize kan örnekleri alınmıştır. Bu işlemi takiben heparinli izotonik kullanılarak kardiyak perfüzyon ile beyin dokuları kandan arındırılmış ve çıkarılan beyin dokuları sıvı nitrojen içerisinde dondurularak -80 °C'de saklanmıştır.

3.4.1. Plazma-S-Sülfonat tayini

Plazma-S-Sülfonat ölçümü Gunnison ve Palmes'in yöntemi modifiye edilerek ölçülmüştür (85). Yöntem alkali ortamda potasyum siyanür (KCN) plazma proteini+SO₃⁻² kompleksi olan S-sulfonattan SO₃⁻²'i koparması bu SO₃⁻²'in de parorasanil reaktifiyle birleşip 560 nm'de absorban artışına sebep olması esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Malzemeler:

- 1- 0.125 mmol potasyum siyanür (KCN)
- 2- Glisin – NaOH tamponu (0.01 M, pH = 10.2)
- 3- HCl (0.15 N)
- 4- Sodyum tetrakloromercurat solüsyonu (0.18 M)
- 5- Parorasanil reaktifi
- 6- Formaldehit reaktifi

Daha öncede belirtildiği gibi hayvanlara deney sonunda ürethan anestezisi uygulanmış ve abdominal aortlarından kanları alınmıştır. Alınan heparinize kanlar 1400xg'de 6 dakika santrifüj edilerek plazmaları elde edilmiştir. Plazmadan 1 ml alınarak, 200 µl KCN ile karıştırılmış ve 36 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda karışımın 1ml'si dializat torbasına aktarılmış ve 5 ml glisin-NaOH tamponu içerisinde 4 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra dializat torbasının dışındaki solüsyondan 1.4 ml bir tüpe aktarılarak üzerine sırası ile aşağıdaki reaktifler ilave edilmiştir.

- 1- 0.15 N HCl (200 µl)
- 2- Sodyum tetramerkurat solüsyonu (200 µl)
- 3- Distile su (200 µl)
- 4- Formaldehit reaktifi (200 µl)
- 5- Parorasanil reaktifi (200 µl)

İşlemleri takiben karışım vortekslenmiş ve 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda spektrofotometrede 560 nm'de absorban okunarak kaydedilmiştir.

Plazma-S-Sülfonat Miktarlarının Hesaplanması: Deney gruplarına verilen sülfid miktarları baz alınarak standart grafiği oluşturulmuştur. Plazmadaki S-Sülfonat düzeyleri bu grafik yardımıyla hesaplanmış ve sonuçlar µmol sülfid/ml olarak verilmiştir.

3.4.2. Doku Tiobarbitirik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Ölçümleri

Beyin dokularında TBARS ölçümleri, Wasowicz ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (177). Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA'nın, 2-tiyobarbitirik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin butanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

Kullanılan Malzemeler:

- 1- 29 mM tiobarbitirik asit (Sigma-T5500): 0.418 g TBA, 50 ml distile su ve 50 ml glacial asetik asit(Acetic acid glacial extra pure, Merck-56) içinde çözülmüştür.
- 2- 5 M HCl (Hydrochloric acid, Merck-314)
- 3- n-bütanol (n-Butanol, Merck-329)
- 4- Standart solüsyonu: Tetraetoksipropan (1,1,3,3-tetraethoxy-propane, Sigma-T9889) stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

Perfüze edilerek çıkarılan ve -80 °C' de saklanan beyin dokularının bir hemisferi randomize olarak TBARS ölçümleri için ayrılmış ve ayrılan beyin dokuları 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K₂HPO₄ (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde (Biofuge15R, Heroeus, Germany) homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 4 °C'de, 10000 x g'de, 15 dakika, santrifüj edilerek süpernatantlar elde edilmiştir.

Bir ml distile su içeren tüpe 50 µl doku süpernatantı konulduktan sonra, 1 ml TBA (29 mmol/L) eklenmiştir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra, 1 saat süreyle 95-100 derece arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra 25 µl HCl (5 mol/L) ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek vortekslenmiş ve bu işlemi takiben 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofotometrede okunmuştur.

TBARS miktarının hesaplanması: 1,1,3,3,-tetra-metoksi-propan standardı numune gibi çalışılarak standard grafiği oluşturulmuştur. Dokuların TBARS miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/g protein olarak saptanmıştır.

3.4.3. sPLA₂ düzeyinin tayini

Western Blot analizi için beyin homojenatlarından elde edilen proteinler sekonder antikor ilave edilerek immünoreaktif bantlar kemilüminesans yöntemle gözlenmiştir.

İşlemler: Beyin doku örneklerinin üzerine 200 mg doku başına, içinde 10 µl proteaz inhibitör kokteyli (Sigma, P2714) bulunan 600 µl lizis tamponu (İnvitrogen, FNN0011) eklenmiş ve buz içinde sonike edilmiştir. Sonikasyon işleminden sonra numuneler 14000 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantları ayrılarak yeni bir tüpe aktarılmıştır ve western blot analizi yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

Süpernatantlardaki protein miktarları, modifiye Bradford yöntemine dayanan kit ile ölçülmüştür.

Eşit konsantrasyonlarda doku lizatları, yükleme tamponu (Laemmli tamponu, Sample Buffer 2X, Sigma, S3401) ile karıştırılıp 95°C'de 10 dakika kaynatılmış ve sPLA₂'nin molekül ağırlığına uygun konsantrasyonda olacak şekilde %15'lik SDS-poliakrilamid jellere yüklenip elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforezde numuneler ilk önce 100 V 30 mA'de 15 dakika, sonrasında ise 80 V 30 mA'de jelin sonuna kadar yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel plakalardan uzaklaştırılmış ve transfer sistemine alınarak nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi 100 V, 350 mA ve 4°C'de 1 saat olarak gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin nitroselüloz membrana transferinden sonra, Ponceau S (Ponceau S Solution, Sigma P7170) boyaması yapılarak proteinlerin membrana transfer olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ponceau membrandan uzaklaşınca kadar pH'sı 7.4 olan, % 0.1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solüsyonu (TBS-T) ile yıkama yapılmıştır. Ardından membran 30 dakika süre ile oda ısısında TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile bloklanmıştır. Bloklama aşamasından sonra membran, 1:100 oranında dilüe edilmiş sPLA₂ antikoru ile +4°C'de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Primer antikor aşamasını takiben membran, TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanmıştır. Böylece ortamdaki zayıf bağlanan veya bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılmıştır. Yıkama aşamalarından sonra membran, sekonder antikor ile oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanmıştır. Ardından SuperSignal Chemiluminisans (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, 34079) ile 5 dakika karanlıkta inkübe edilip karanlık odada membrandaki protein bantları hiperfilme aktarılmıştır. Film developer (Developer, ILFORD Multigrade, 757855) ve fiksatiften (Rapid Fixer, ILFORD Hypam, 1758285) geçirilmiş, distile su ile yıkanmış ve ardından kurutulmuştur. Elde edilen bantlar dansitometre ile okunarak protein miktarları belirlenmiştir. İnternal standart olarak beta-aktin kullanılmıştır.

3.4.4. Protein Tayini:

Beyin dokularında protein tayini modifiye Bradford yöntemine dayanan bir kit ile yapılmıştır (178).

Kullanılan Malzemeler:

- 1- Standart solüsyon: 2 µg/ µl bovin serum albümin (Albümin Bovina, Sigma, A-8022)
- 2- CPPA reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210)

1 µl doku süpernatantı 999 µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA reaktifi eklenmiş ve 595 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans okunmuştur. Standart çalışması ise, numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır.

Protein Miktarının Hesaplanması: Dokulardaki protein miktarı, bovin serum albumin ile oluşturulan standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5. Histolojik Parametreler

3.5.1. Doku Takibi

Çıkarılan beyin dokuları immünohistokimya ve TUNEL yöntemlerinde kullanılmak üzere %10 formalin solüsyonunda yaklaşık 1 gün süreyle bekletilmiştir. Ertesi gün 4 saat akan su altında yıkanarak formalinin fazlasının uzaklaşması sağlandıktan sonra yükselen alkol serilerine yarım gün maruz bırakılmıştır (%70, %80, %90, %100). Dört saat %100'lük alkolde bekletildikten sonra ksilol de şeffaflaştırılmış ve dokular parafine gömülüp, 5'er mikronluk kesitler alınarak önceden hazırlanmış poly-L-Lizinli lamlara yapıştırılmıştır. Hem kaspaz-3 hemde TUNEL reaksiyonlarına başlamadan 1 gece önce slaytlar 45 derecelik etüvde bekletilerek dokunun lamlara iyice yapışması sağlanmıştır.

3.5.2. Kaspaz 3 İmmünofloresan Boyama Yöntemi

Kaspaz 3 ekspresyonunun bulunduğu yerleri floresan boyama ile doğrulamak için kullanılan bir yöntemdir.

Kullanılan Malzemeler:

- 1- Bloklama Solüsyonu: Ultra V Block (TA-1250UB; LabVision)
- 2- Primer Antikor: Anti-tavşan aktif kaspaz 3 antikor (Cell signalling)
- 3- Sekonder Antikor: At-anti tavşan Aleksa 488 sekonder antikor (İnvitrogen)
- 4- Slayt Kapatma Solüsyonu: DAPI'li kapatma solüsyonu (Vector Lab. H-1200)

Normal immünohistokimya yapılı gibi 5µm kalınlığında kesitler alınmış ve deparafinize edilmiştir. Kesitler tek tek değerlendirilerek somatosensoryel alana denk gelen kısma ait olan slaytlar immün boyamalar için kullanılmıştır. Seçilen slaytlara sitrik asit uygulanarak fiksatifin oluşturduğu sıkı aldehit bağları kopartılmıştır. Ardından UV blok kullanılarak, non-spesifik reaksiyonlar baskılanmıştır. 1/250 dilüsyon oranında anti-kaspaz 3 antikor damlatılan slaytlar gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün PBS ile yıkamaların ardından floresan işaretli sekonder antikor (At-anti tavşan Aleksa 488 sekonder antikor (İnvitrogen)) ile muamele edilen kesitler 1 saat oda ısısında inkübe edilmiş, devamında PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine DAPI'li kapatma solüsyonu damlatılarak kapatılmış ve floresan mikroskopunda boyanmalar değerlendirilmiştir.

3.5.3. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labelling) Metodu

İn vitro ortamda apoptozise giren hücrelerin miktarını belirlemek için kullanılmıştır.

Kullanılan Malzemeler:

- 1- Tunel kit (Roche#11684795910)
- 2- PBS
- 3- Permeabilizasyon Solüsyonu: 10 ml. 1x PBS içerisine 200 µl. Triton-X 100 ilave edilmiş ve oda ısısında saklanmıştır.
- 4- Floresan boyanmaya spesifik DAPI'li kapatma solüsyonu (Vector lab # H1200)

İn vitro koşullarda apoptozisi göstermek amacıyla TUNEL kiti kullanılmıştır. Kit, hücre popülasyonunda apoptozise uğrayan ve apoptozis için özgül olan DNA kırıklarının 3-OH ucuna, terminal deoksinükleotid transferaz (TdT) enziminin floresan işaretli 12-dUTP'nin katılımı ile apoptotik hücrelerin floresan mikroskobu altında tespit edilmesine imkan tanımaktadır.

Seri kesitler, 5-7µm kalınlığında Poli-L lizin kaplı lamlara alınıp, 24 saat ya da daha uzun süreyle oda ısısında kurutma yapılmıştır. Boyanmanın uygulanacağı günden 1 gece önce, kesitler 45°C'lik etüvde gece boyu ve uygulamadan 1 saat önce de 60°C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyonun (2 kez, 5'er dakika ksilol solüsyonunda) ardından, rehidratasyon işlemi (Alçalan alkol derecelerinde (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika sürelerle) uygulanmıştır. Devamında PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkanan kesitler, 100 ml distile su +100 µl Triton-X hazırlandıktan sonra, içinde 0.1 gr sodyum sitrat çözülerek hazırlanan permeabilizasyon solüsyonunda +4°C'de (buzdolabında ya da oda ısısında buz üzerinde) 8 dakika bekletilmiştir. Tekrar PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapılmış kesitlere 50µl enzim solüsyonu+ 450 µl işaretleme solüsyonu+ 500 µl TUNEL dilüsyon tamponu (pozitif sinyaller için) eklenerek hazırlanan TUNEL (reagent) solüsyonu damlatılarak 37°C'de, karanlık ve nemli ortamda (humidified chamber), 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapılmış ve DAPI'li kapatma solüsyonu ile kapatılıp floresan mikroskobunda incelenmiştir.

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uymayan veriler için nonparametrik olan Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. P<0.05'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

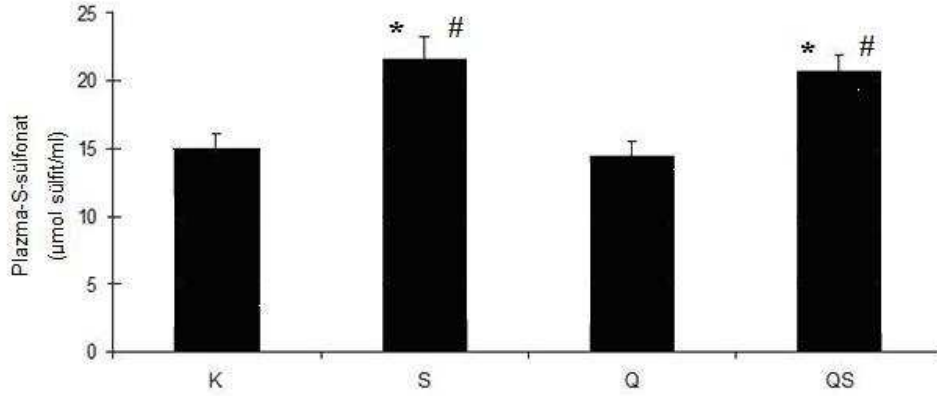
BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

Deney süresince hayvanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

4.2. Plazma-S-Sülfonat Aktivite Sonuçları

Kontrol ve deney gruplarının Plazma-S-Sülfonat düzeyleri Şekil 4.3' de sunulmuştur. K grubu ile karşılaştırıldığında S ve QS gruplarının plazma-S-Sülfonat düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artışın olduğu saptanmıştır. Ayrıca Q grubu ile S ve QS gruplarının plazma-S-Sülfonat düzeyleri karşılaştırıldığında her iki grubun değerlerinde de yine anlamlı bir artışın olduğu dikkat çekmiştir.



Şekil 4.1. Plazma-S-Sülfonat düzeyleri

*: $p < 0.05$ K grubundan fark, #: $p < 0.05$ Q gruplarından fark

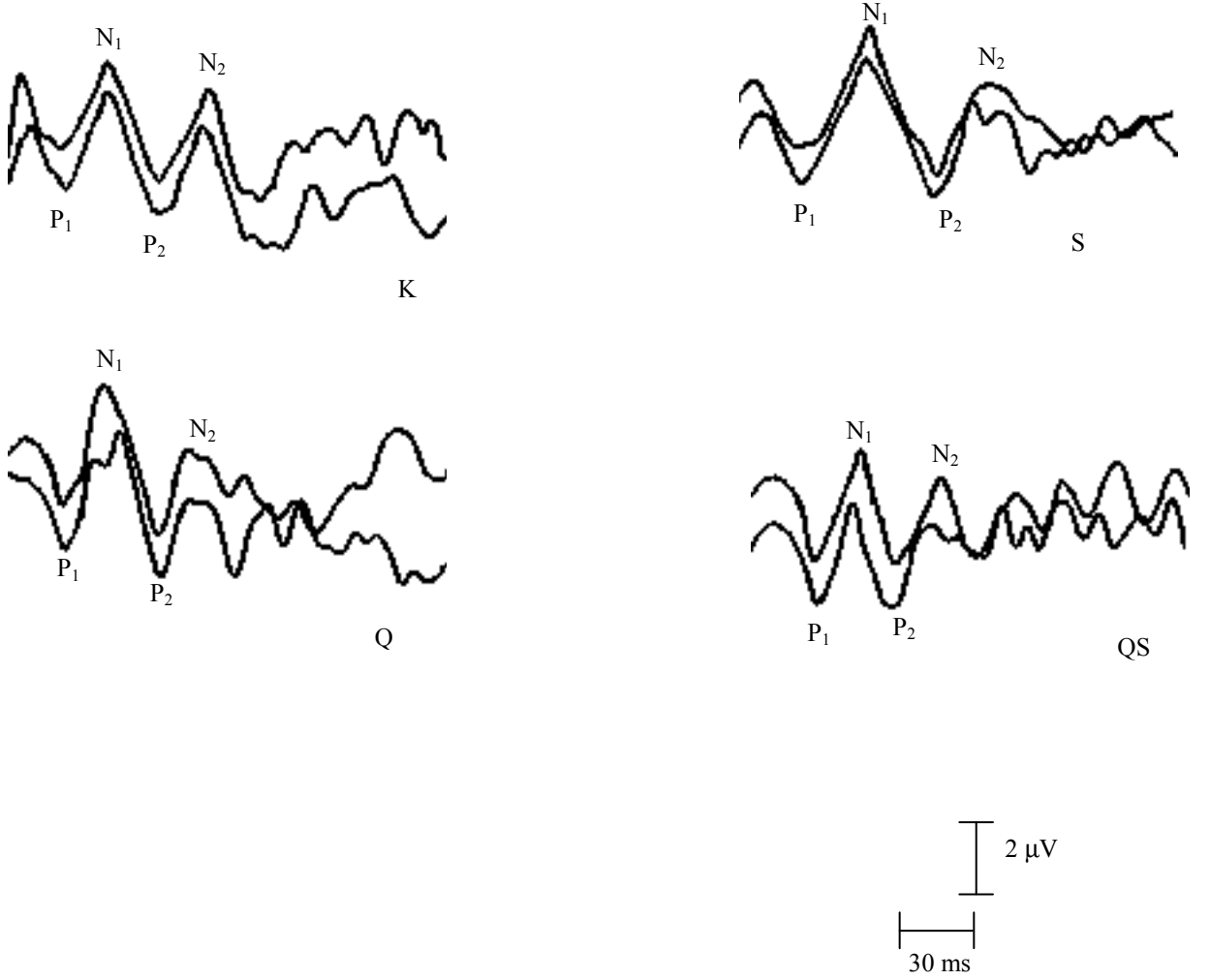
4.3. SEP Sonuçları

Deney gruplarından elde edilen SEP' lere ait örnekler Şekil 4.2' de sunulmuştur.

SEP' lerin latens ve genliklerinin ortalama değerleri, standart sapma sonuçları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de görülmektedir. Kontrol grubuyla S grubunun SEP latensleri karşılaştırıldığında S grubunun tüm SEP bileşenlerinin latenslerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu, fakat kontrol grubuyla Q grubu latensleri karşılaştırıldığında latenslerin değişmediği saptanmıştır. K grubuyla karşılaştırılan QS grubu SEP latensleri bileşenlerinden P1 ve N1' in kontrol grubu latenslerine göre uzadığı görülmüştür. S grubu ile QS grubu karşılaştırıldığında N1, P2 ve N2 bileşenlerinin S grubuna göre azaldığı, Q grubu ile QS grubu

latensleri karşılaştırıldığında ise QS grubu latenslerinin P1 ve N1 bileşenlerinin latenslerinde Q grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur.

Tepeden tepeye genlik değerleri incelendiğinde, QS grubu ile K, S ve Q grubunun karşılaştırılması sonucunda genliklerinin N1P2 bileşeninde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir (Tablo 4.2).



Şekil 4.2. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen SEP'ler ve bileşenleri

| Gruplar | P ₁ (ms) | N ₁ (ms) | P ₂ (ms) | N ₂ (ms) |
|---------|--------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| K | 21.9±1.44 | 41.9±1.91 | 62.8±3.48 | 81.09±4.1 |
| S | 27.7±1.7 K* | 53.6±3.68 K* | 81.1±9.79 K* | 99.7±8.01 K* |
| Q | 23.5±3.62 | 39.66±3.84 | 61.77±4.65 | 78.11±1.36 |
| QS | 27.77±3.27 K** Q** | 45.77±2.48 K** S* Q** | 59.77±2.94 S* | 79.77±3.03 S* |

Tablo 4.1. Kontrol ve Deney grubu hayvanlarından kaydedilen SEP latensleri (ms)
* p<0.001, **:p<0.01

| Gruplar | P ₁ N ₁ (µV) | N ₁ P ₂ (µV) | P ₂ N ₂ (µV) |
|---------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| K | 2.62±0.66 | 4.36±1.44 | 2.13±0.59 |
| S | 2.92±0.47 | 3.69±0.87 | 2.4±0.37 |
| Q | 3±0.43 | 3.75±1.31 | 2.27±0.38 |
| QS | 2.57±0.54 | 2.34±0.48 K** S** Q** | 2.1±0.5 |

Tablo 4.2. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen genlikler (µV)
**:p<0.01

4.4. Doku Tiobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS) Sonuçları

Beyin TBARS sonuçları Tablo 4.3’ de gösterilmiştir. K grubu ile karşılaştırıldığında tüm deney gruplarının beyin TBARS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu gözlenmiştir. Ancak diğer deney gruplarının birbirleriyle karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

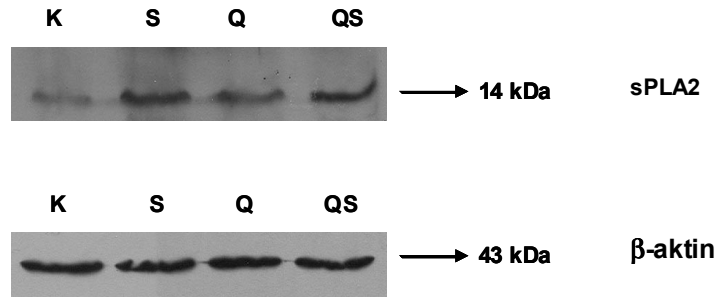
| GRUPLAR | BEYİN TBARS nmol/g protein |
|------------------------------|-------------------------------|
| Kontrol | 0,09 ± 0.02 |
| Sülfit (100 mg/kg/gün) | 0,14 ± 0,02 K* |
| Quinacrine (10 mg/kg/gün) | 0,13 ± 0,02 K** |
| Quinacrine-Sülfit | 0,13 ± 0,01 K** |

Tablo 4.3. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının beyin TBARS değerleri

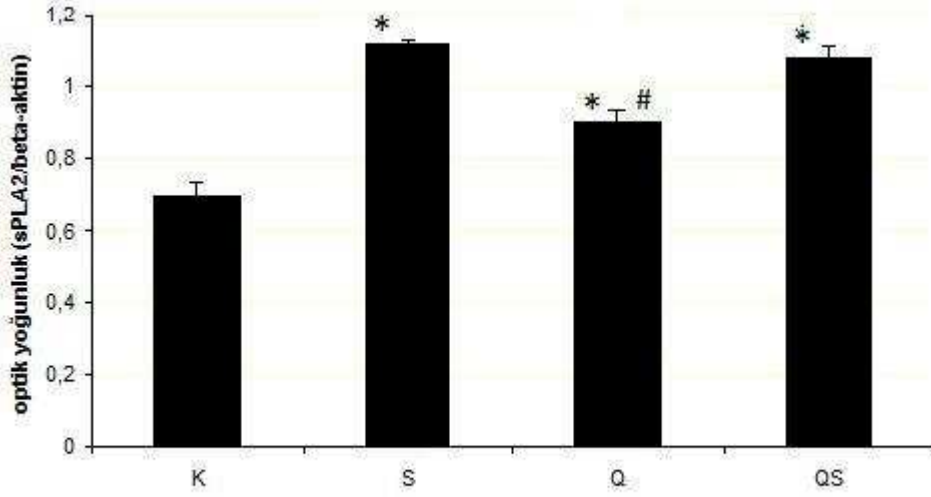
*: p<0.001, **:p<0.01

4.5. sPLA₂ Miktarı Sonuçları

Kontrol ve deney gruplarının beyin dokularında gerçekleştirilen sPLA₂ miktarı western blot ve dansitometrik analizleri Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.’te verilmiştir.



Şekil 4.3. Beyinde sPLA₂ Western Blot analizi



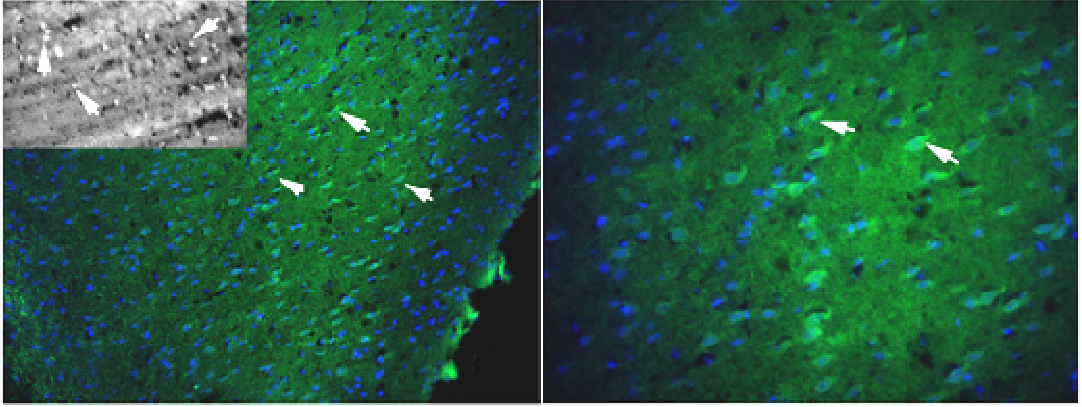
Şekil 4.4. Beyinde sPLA₂ Western Blot dansitometrik analizleri
(*:p<0.05 Kontrol grubundan fark, #:p<0.05 Sülfite grubundan fark)

K grubu ile karşılaştırıldığında tüm deney gruplarının beyin sPLA₂ miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu, S grubu ile karşılaştırıldığında ise Q grubunun beyin sPLA₂ miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

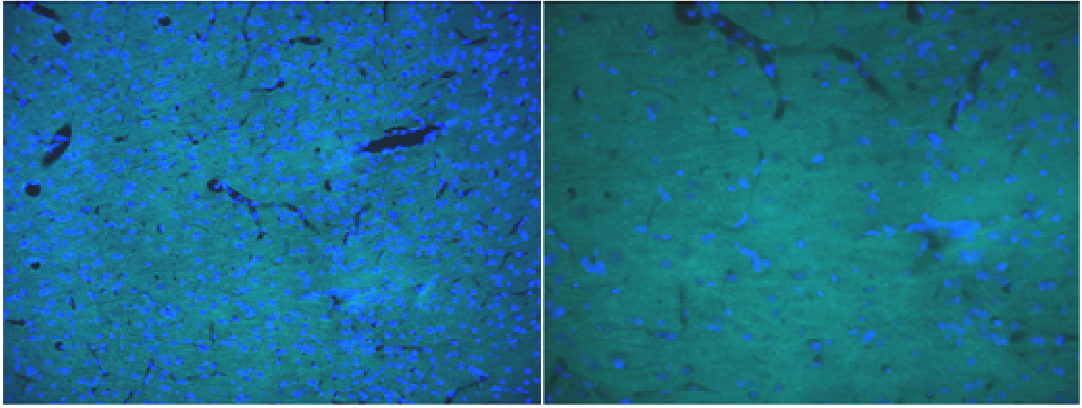
4.6. Kaspaz 3 İmmünohistokimyasal Analizi Sonuçları

Oluşturulan modele ve kontrol gruplarına ait beyin dokularından alınan seri kesitlerde somatosensoryel alandan geçen kesitler seçilmiş ve bu alanda kaspaz-3 immünreaksiyonunu gösterebilmek için immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. Bu immünreaksiyonlar gruplara göre değerlendirildiğinde, sülfite grubunun somatosensoryel alanındaki birçok nöronda kaspaz 3 immünoreaktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.5. Sülfite grubu, oklar).

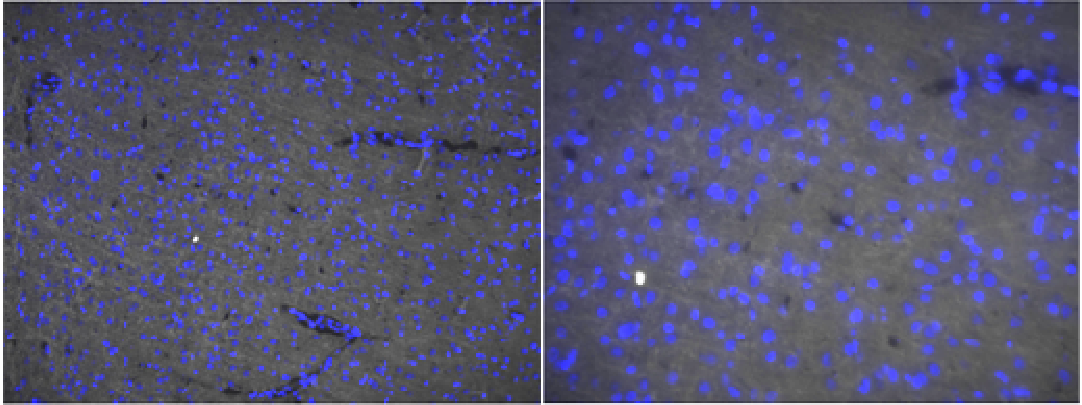
Sulfit Grubu



Kontrol Grubu



Negatif Kontrol

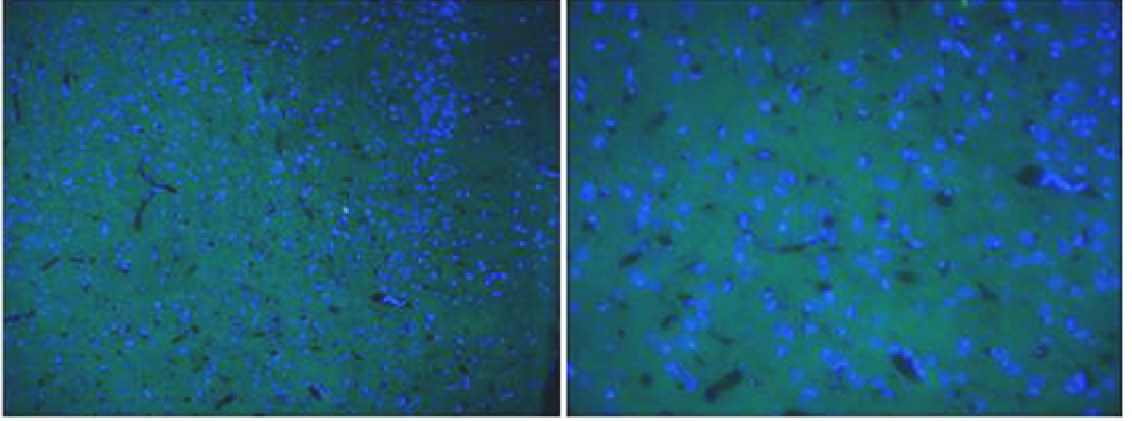


Şekil 4.5. Kontrol ve Sülfid grubuna ait somatosensoryel alandan alınan kesitlerde kaspaz-3 immünreaktivitesi Kaspaz-3 immünoreaktivitesi. Alexa 488 ile yeşil renkte boyanmış ve oklarla bu boyanmalar işaret edilmiştir. Bu alandaki tüm hücreleri göstermek amacıyla da DAPI ile nükleuslar maviye boyanmıştır.

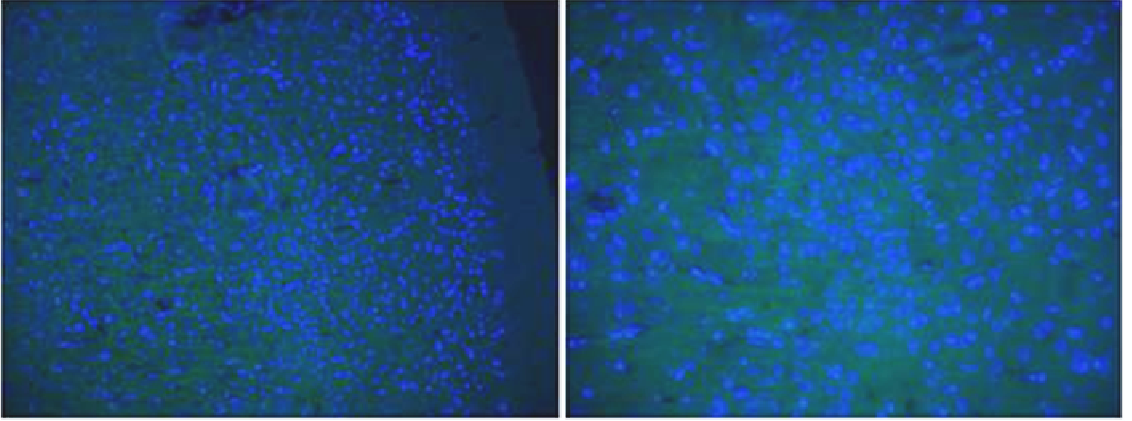
Bu immünreaksiyon, kontrol (Şekil 4.5.), Q (Şekil: 4.6.) ve QS (4.6.) gruplarına ait somatosensoryel alandan alınan kesitlerde gözlenmemiştir. QS gruplarına ait somatosensoryel alandan alınan kesitlerde az da olsa kaspaz-3 immunreaksiyonuna rastlanması beklenirken herhangi bir immünreaksiyonun olmaması quinacrine'nin etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca sülfid gruplarında

çok yoğun immünboyanmanın olmaması da bu alanda çok yoğun bir hasarın meydana gelmediğinin bir göstergesi de olabilir.

Quinacrine Grubu



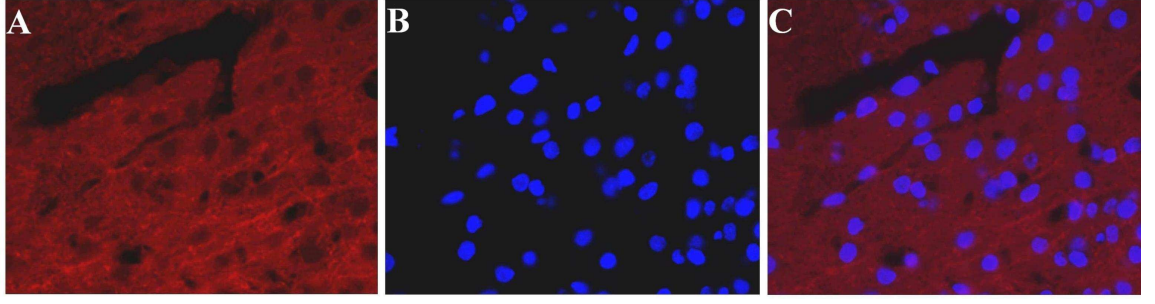
Quinacrine + Sülfid Grubu



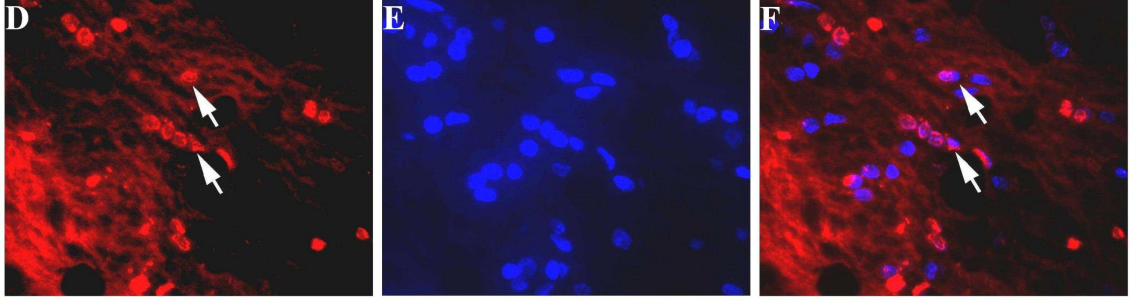
Şekil 4.6. Quinacrine ve Quinacrine-Sülfid grubuna ait somatosensoryel alandan alınan kesitlerde kaspaz-3 immünreaktivitesi. Somatosensoryel alandan alınan kesitlerde bu alandaki nöronlarda herhangi bir kaspaz-3 immünreaktivitesine rastlanılmamıştır. DAPI ile yapılan nükleus boyanması da bu alandaki nöronları belirlemek için kullanılmıştır.

4.7. TUNEL Analizi Sonuçları

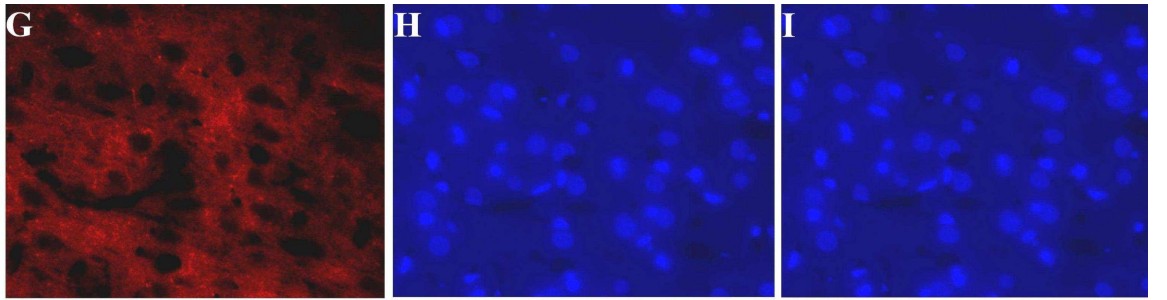
Kaspaz 3 immünohistokimyasına ek olarak, ölüm yoluna girmiş hücreleri belirleyebilmek için TUNEL analizi de yapılmıştır. TUNEL analizi sonucunda elde edilen verilerimiz de kaspaz 3 bulgularımızla uyumlu bulunmuştur. Sülfid gruplarında somatosensoryel alanda TUNEL pozitif hücreler işaretli alanda (A,D) belirlenmiş ve G,L figürlerinde de hücreler ok ile işaretlenmiştir. DAPI yapılan nükleus boyanmaları ile TUNEL reaksiyonları birleştirildiğinde nükleer lokalizasyonun pembeye döndüğü alanlar olarak gösterilmiştir (K,N). Diğer gruplarda da aynı kaspaz 3 immünreaksiyonlarında olduğu gibi TUNEL pozitif hücrelere rastlanılmamıştır.



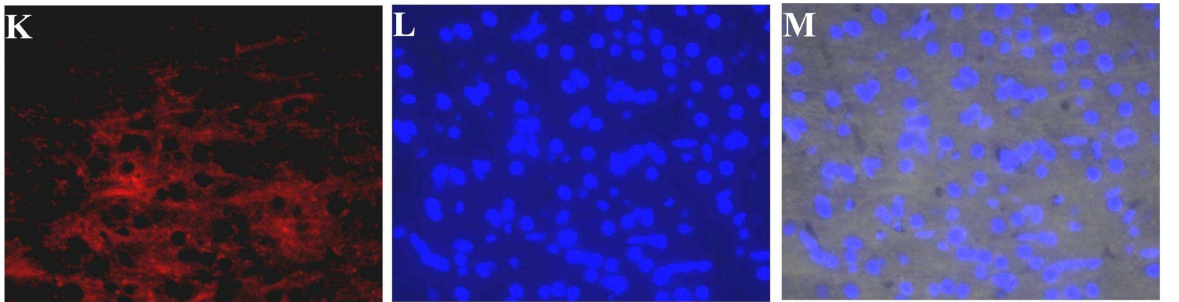
Şekil 4.7. Kontrol grubu somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde TUNEL immünreaktivitesi



Şekil 4.8. Sülfid grubu somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde TUNEL immünreaktivitesi



Şekil 4.9. Quinacrine grubu somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde TUNEL immünreaktivitesi



Şekil 4.10. Quinacrine-Sülfid grubu somatosensoriyel alandan alınan kesitlerde TUNEL immünreaktivitesi

TARTIŞMA

Sülfite kimyasal, biyolojik ve endüstriyel nedenlerle havanın kirlenmesi sonucunda atmosferde bulunmakta ve inhalasyon yoluyla vücuda alınmaktadır. Aynı zamanda sülfite ilaç sanayinde ve bakteri üremesini engellemek için gıda ürünlerinde kullanılmaktadır. Yaygın kullanımına karşın SO_3^{-2} 'in pek çok yan etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle FDA tarafından, yiyeceklerde kullanılan SO_3^{-2} miktarının 15 mg/gün'ü geçmemesi bildirilmiş, sülfite ette kullanımı yasaklanmış, şarapta 350 ppm ve karideste 100 ppm olarak kullanımı sınırlandırılmıştır. Bununla birlikte Dünya Sağlık Örgütü Besin Katkı Maddeleri Komitesince kabul edilebilir günlük doz 0.7 mg/kg SO_3^{-2} olarak belirlenmiş ve bu dozun üzeri toksik olarak kabul edilmiştir (19). Bu doz Til ve arkadaşlarının (18) sıçanlarda yaptığı çalışmada kullandıkları ve herhangi bir zararlı etki bulamadıkları 72 mg/kg SO_3^{-2} alımına karşılık gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün ilgili komitesi buna 100 katlık bir güvenlik faktörünü de ekleyerek 0.7 mg/kg SO_3^{-2} alımının zararlı etkisinin olmayacağını bildirmiştir. Daha önceki çalışmada besinlerle alınan farklı dozlardaki (10, 100, 260 mg/kg/gün) sülfite etkisi incelenmiş ve bu nedenle çalışmamızda 100 mg/kg/gün SO_3^{-2} dozu seçilmiştir (179). Gavajla 100 mg/kg/gün SO_3^{-2} verdiğimiz çalışmamızda beklendiği üzere plazma-S-sülfonat düzeylerinin sülfite verilen gruplarda arttığı tespit edilmiştir.

Sülfite sistemik oksidan hasara bağlı olarak pek çok etki yarattığı gösterilmiştir (180). Bu etkiler bazı kanserlerin görülme sıklığında artış, VEP ve SEP latenslerinde uzama, eritrositlerde lipid peroksidasyon artışı olarak sıralanabilir (13,180, 181, 182). Ekibimiz tarafından (179) farklı dozlarda SO_3^{-2} 'in VEP üzerine etkileri çalışılmış ve 100 mg/kg/gün SO_3^{-2} 'nin VEP latenslerini uzattığı bulunmuştur. Bu verilerden yola çıkarak benzer şekilde bir uyarı sonucunda ortaya çıkan SEP'lerinde SO_3^{-2} 'den etkilenebileceği düşünülmüştür (13). Nitekim, daha önceki çalışmalarda (13, 183) inhalasyon yoluyla alınan SO_3^{-2} 'nin SEP bileşenlerinin latenslerinin uzamasına sebep olduğu gösterilmiştir. Önceki çalışmalara paralel olarak bu çalışmada da oral yolla verilen 100 mg/kg/gün dozundaki SO_3^{-2} 'in SEP latenslerini uzattığı tespit edilmiştir. Sülfite bu etkisinin beyinde yüksek düzeyde bulunan ve oksidatif stres oluşum sürecinde rol oynayan sPLA₂ enzimi aracılığıyla olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda sPLA₂ enzimini inhibe etmek için quinacrine verilmiş ve bu ajanın SEP latenslerindeki uzamayı belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir. Bu gözlemlerin ışığında sülfite bağlı SEP latenslerindeki değişikliklerde oksidatif hasara aracılık eden sPLA₂ enzim aktivitesinin önemli olabileceği kanısına varılmıştır. Somatosensoriyel uyarılma potansiyelleri genliklerinden N1P1 değerinin QS grubunda azaldığı gözlenmiş ve bu durumun SEP genliklerinin değişkenliği ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Çünkü yapılan çalışmada SEP genlik değerlerinin aynı bireylerde bile değişik zamanlarda farklı çıktığı rapor edilmiştir (47).

Çeşitli nedenlerle oluşan serbest radikallerin, lipid peroksidasyondan ve membran hasarlarından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu radikallerin biyolojik makromoleküllerde hasara ve hücre fonksiyonlarda kayba neden olduğu iyi

bilinmektedir. Özellikle hücre membranının yapısındaki lipidlerin oksidasyonu, membran yapısında değişikliklere neden olmaktadır. Yarı ömürlerinin kısa, konsantrasyonlarının düşük ve reaktif olmaları serbest radikallerin in vivo şartlarda ölçülmelerini zorlaştırmaktadır. Bu yüzden, oksidan stresin oluşturduğu ikincil ürünlerin ölçülmesine dayanan dolaylı yöntemler geliştirilmiştir. Çalışmamızda SO_3^{-2} 'e bağlı serbest radikal artışını dolaylı olarak göstermek için lipid peroksidasyon indeksi olarak kabul edilen MDA'yı ölçmeye dayalı bir yöntem olan TBARS kullanılmıştır. Bu yöntem, basit ve hızlı olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir.

Ekibimizin daha önceki çalışmasında (179) sıçanlara oral yolla verilen 100, 260 mg/kg/gün SO_3^{-2} 'nin beyin dokusu TBARS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde sonuçlar elde edilmiş 100 mg/kg/gün SO_3^{-2} 'nin gavajla verildiği deney gruplarının TBARS düzeylerinde anlamlı artış saptanmıştır. SO_3^{-2} metabolizması sonucu oluşan ROS'un meydana gelmesinde sPLA₂ enziminin rolü olduğunu düşündüğümüz çalışmamızda, quinacrine'nin TBARS değerlerini arttırdığı bulunmuştur. Bu artışın nedeniyle ilgili olarak yapılan literatür taramasında Fabisiak ve arkadaşları'nın (184) PLA₂ inhibitörü olan quinacrine'nin lipid peroksidasyon üzerine etkisini inceledikleri görülmüştür. Bu çalışmada Fabisiak ve arkadaşları (184) quinacrine'nin 10 ve 50 µM konsantrasyonunun yüksek olduğunu, hücreler üzerinde toksik etki yarattığını ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyonu arttırdığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kullandığımız 10 mg/kg/gün quinacrine miktarının yaklaşık olarak 21 µM konsantrasyona denk geldiği göz önünde bulundurulursa, verilen quinacrine nöronlar üzerinde koruyucu etki yerine toksik etki yaratmış olabilir. Bu toksik etki nedeniyle quinacrine uygulamasının TBARS değerlerinde artışa neden olduğu kanısına varılmıştır.

Fosfolipaz A₂'nin membran yağ asitlerine etki ederek AA oluşturduğu ve ROS üretimine neden olduğu daha önce yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (35, 186). Yagami ve arkadaşlarının (35) yaptığı çalışmalarda PLA₂ enziminin subtipi olan sPLA₂'nin aktive olmasıyla ROS'un oluştuğu ve oluşan ROS'un ise apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Sekretuar fosfolipaz A₂ yolağı dikkate alındığında, sülfid metabolizmasıyla açığa çıkan ROS'un oluşmasında, sPLA₂ enziminin rolü olabileceği düşünülmüş ve buradan yola çıkılarak sPLA₂ miktarına western blot analizi ile bakılmıştır. K grubuna göre SO_3^{-2} verilen gruplarda sPLA₂ miktarlarında artış olması TBARS ile bu enzimin miktarı arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Quinacrine'nin sPLA₂ enzim miktarında beklenen etkiyi göstermemesi quinacrine'nin bu dozda lipid peroksidasyonu arttırmasıyla ilişkili olabilir. Bilindiği üzere serbest radikal artışı sPLA₂ enziminin miktarını arttırmaktadır (156). Quinacrine-sülfid grubunda ise quinacrine'nin SO_3^{-2} 'in etkilerini potansiyalize edici katkısının olmadığı tespit edilmiştir.

Organizmada çeşitli sebeplerle oluşan oksidatif stres sonucu meydana gelen lipid peroksidasyon ürünlerinden lipid peroksitlerin nükleik asit ve proteinlere etki ederek hücre hasara neden olduğu bilinmektedir (67). Hipotezimize göre ROS ve lipid peroksitlerin oluşturduğu hücre hasara sPLA₂ enzimi aracılık etmekte ve sonuçta beyin dokusunda apoptozis oluşmaktadır. Nitekim Yagami ve arkadaşlarının (186) yaptığı çalışmada sPLA₂'nin hücre ölümünü apoptozis aracılığıyla tetiklediği gösterilmiş ve bu süreç sonunda hücrede küçülme, plazma

membranında bleblerin oluşması, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gibi apoptotik özellikler gözlenmiştir.

Apoptotik hücre ölümünde, intrensek ve ekstrensek olmak üzere iki yolak bulunur. Mitokondrial yolak olarak da bilinen intrensek yolda sit-c salınımı söz konusuysen, ölüm reseptör yolağı olarak da bilinen ekstrensek yolda ise TNF- α ve Fas gibi ligandların reseptörlerine bağlanması söz konusudur (101). Bu iki yolak, efektör kaspaz olarak bildiğimiz kaspaz-3 enzimini aktive ederek apoptozisin son yolağı olan infaz yolağında sonlanır. Kaspaz-3'ün aktivasyonu, nükleer yıkım ve hücre morfolojik değişimler ile sonuçlanır (101). Çalışmamızda, sülfid verilmesiyle oluşan ROS'un apoptozis oluşturup oluşturmadığı, kaspaz-3 enziminin immünohistokimyasal analiziyle değerlendirilmiştir. Sülfid verilen grupta immünboyanmanın olması bu alanda apoptozis meydana geldiğinin bir göstergesidir. Quinacrine-sülfid grubunda ait somatosensoryel alandan alınan kesitlerde az da olsa kaspaz-3 immünreaksiyonuna rastlanması beklenirken herhangi bir immünreaksiyonun olmaması quinacrine'nin etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Quinacrine'nin lipid peroksidasyonu artırıcı etkisine karşın apoptozisi inhibe edici özelliği ile ilgili olarak literatürde herhangi bir bilginin olmayışı, bu yolağın aydınlatılması için daha ileri çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir.

Bununla beraber apoptozise uğrayan hücreleri belirleyebilmek için apoptozisin bir karakteristiği olan DNA fragmentasyonuna Tunel analizi ile bakılmıştır. Tunel analizi sonucunda elde edilen verilerimiz de kaspaz-3 bulgularımızla uyumlu bulunmuştur. Yapılan literatür taramasında bizim bulgularımızı destekleyen çalışmalar mevcuttur (35, 186). Meng ve arkadaşları (89) tarafından yapılan çalışmada 14, 28, 56 mg/m³ oranında SO₂ inhalasyonunun apoptozisi indükleyip indüklediğini gözlemek amacıyla, apoptozis ile ilgili p-53 geni ve proapoptotik bir protein olan Bax miktarına bakılmıştır ve SO₂'nin p-53 geni mRNA miktarında ve Bax proteininde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ancak antiapoptotik bcl-2 protein miktarında azalma olduğu ve bu veriler ışığında SO₂'nin apoptozisi indüklediği saptanmıştır. Aynı zamanda Ercan ve arkadaşlarının (185) mide dokusunda yaptığı çalışmada 10, 100, 260 mg/kg/gün SO₃⁻² uygulanan sıçanlarda, apoptotik hücrelerin 10 mg/kg/gün verdikleri sıçanlarda oluşmadığı fakat 100 ve 260 mg/kg/gün verilen gruplarda olduğu gözlenmiştir. Bu etki araştırmacılar tarafından lipid peroksidasyonla ilişkilendirilmiştir ve SO₃⁻²'nin apoptozisi doz bağımlı olarak etkilediği şeklinde rapor edilmiştir.

Fabisiak ve arkadaşları (184) tarafından yapılan çalışmada PLA₂ inhibitörü olan quinacrine'nin apoptozis üzerine etkisine bakılmıştır. Apoptozis oluşturulan hücrelerde kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gözlenmiş ve apoptotik nükleilerin varlığına rastlanmıştır. Quinacrine'nin 1 ve 5 μ M konsantrasyonlarda verildiği gruplarda, quinacrine'nin apoptotik hücrelerin oluşmasında koruyucu etkilerinin olduğu ve DNA fragmentasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda quinacrine'nin 5 μ M konsantrasyonu, apoptozisin son evresinde meydana gelen PS oksidasyonunu ve takiben PS'nin hücre membranının dış yüzeyine translokasyonunu azaltarak, apoptozisi bloke etmiştir. Bizim bulgularımızda da sülfid verilen grubumuzda apoptotik hücrelerin arttığı gözlenirken, Q ve QS grubunda apoptotik hücrelere rastlanmamıştır. Bu veriler quinacrine'nin apoptozisi inhibe ettiğini gösteren diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Özetle elde edilen veriler günlük diyetle alınan SO_3^{-2} miktarının SEP değişikliklerine, beyin dokusunda serbest radikal artışına, apoptozise neden olabileceği ve saptanan bu etkilerde PLA_2 enziminin etkili olabileceğini göstermiştir.

SONUÇLAR

- 1) Oral yolla verilen SO_3^{-2} 'nin SEP latenslerini uzatması ve quinacrine'nin uzamayı belirgin şekilde azaltması SEP latenslerindeki değişikliklerde sPLA₂'nin etkisi olduğunu gösterir.
- 2) Sülfid verilen gruplarda TBARS düzeyinin artması SO_3^{-2} 'nin lipid peroksidasyona etkisi olduğunu gösterir. Quinacrine verilen gruplarda TBARS düzeyinin artması quinacrine'nin doza bağlı olarak toksik etki göstermesiyle ve TBARS değerlerini arttırmasıyla ilişkili olabilir.
- 3) Sülfid verilen gruplarda sPLA₂ düzeylerinin artması ROS'un meydana gelmesinde sPLA₂'nin etkisinin olduğunu bir göstergesidir. Quinacrine verilen gruplarda sPLA₂ düzeylerinin artması ise quinacrine'nin oksidatif strese görev almasının yanında oksidatif stres sonucunda da pozitif geri beslemeyle tekrar aktive olmasından kaynaklanıyor olabilir.
- 4) Sülfid verilen grupta Kaspaz-3 ve DNA fragmentasyonunun meydana gelmesi SO_3^{-2} 'nin apoptozis meydana getirdiğini, quinacrine verilen gruplarda ise apoptozisin gözlenmemesi quinacrine'nin apoptozisi inhibe ettiğini işaret etmiştir.

KAYNAKLAR

1. Cooper AJ. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 187-222, 1983.
2. Yang WH. Adverse reactions to sulfites. *Purchase EC. C.M.A.J.* 133: 865-67, 1985.
3. Altland K, Winter P. Potential treatment of transthyretin-type amyloidoses by sulfite. *Neurogenetics* 2: 183–88, 1999.
4. Gunnison AF, Benton AW. Sulfur dioxide: Sulfite. Interaction with mammalian serum and plasma. *Arch. Environ. Health.* 22: 381-88, 1971.
5. Cohen HJ, Fridovich I. Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 246: 359–66, 1971.
6. Cabre F, Marin C, Cascante M, Canela EI. Occurrence and comparison of sulfite oxidase activity in mammalian tissues. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 43: 159–62, 1990.
7. Woo WH, Yang H, Wong KP, Halliwell B. Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 619–23, 2003.
8. Gunnison AF, Jacobsen DW. Sulfite hypersensitivity. A critical review. *CRC Crit Rev. Toxicol.* 17: 185-214, 1987.
9. Mottley C, Mason RP. Sulfate anion free radical formation by the peroxidation of (bi) sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 267: 681-689, 1988.
10. Karoui H, Hogg N, Frejaville C, Tordo P, Kalyanaraman B. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 271: 6000-6009, 1996.
11. Rencuzogullari E, Ila HB, Kayraldiz A, Topaktas, M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutat. Res.* 20: 107-12, 2001.
12. Agar A, Kucukatay V, Yargicoglu P, Aktekin B, Kipmen-Korgun D, Gumuslu S. The effect of sulfur dioxide inhalation on visual evoked potentials, antioxidant status, and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 257– 64, 2000.
13. Kucukatay V, Agar A, Yargicoglu P, Gumuslu S, Aktekin B. Changes in somatosensory evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in experimental diabetes: effect of sulfur dioxide. *Arch. Environ. Health* 58: 14–22, 2003.
14. Aydın S, Yargicoglu P, Derin N, Alicıgüzel Y, Abidin İ, Agar A The effect of chronic restraint stress and sulfite on visual evoked potentials (VEPS): Relation to lipid peroxidation. *Food Chem. Toxicol.* 43: 1093-1101, 2005.
15. Desmedt JE, Cheron G. Central somatosensory conduction in man: neural generators and interpeak latencies of the far-field components recorded from neck and right or left scalp and earlobes. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol.* 50: 382-403, 1980

16. Araki S, Murata K. Determination of evoked potentials in occupational and environmental medicine: a review. *Environ. Res.* 63: 133-47, 1993.
17. Green JB, Price R, Woodbury SG. Short-latency somatosensory evoked potentials in multiple sclerosis. Comparison with auditory and visual evoked potentials *Arch. Neurol.* 37: 630-3, 1980.
18. Til HP, Feron VJ, De Groot AP. The toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 10: 291-310, 1972.
19. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Toxicological Evaluation of Certain Food Additives with a Review of General Principle and of Specifications. 17th Report. Food and Agriculture Organization. Rome, 1974.
20. Lester MR. Sulfite sensitivity: Significance in human health. *J. Am. Coll. Nutr.* 14: 229-232, 1995.
21. Simon RA. Sulfite sensitivity. *Ann. Allergy.* 56: 281-289, 1986.
22. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-62, 1995.
23. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157: 1415-30, 2000.
24. Cheng JZ, Singhal SS, Sharma A, Saini M, Yang Y, Awasthi S, Zimniak P, Awasthi YC. Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 392: 197-207, 2001.
25. Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.* 274: 2234-42, 1999.
26. Farooqui AA, Yang HC, Horrocks L. Involvement of phospholipase A2 in neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 30:517-22, 1997.
27. Katsuki H, Okuda S. Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance *Prog. Neurobiol.* 46: 607-36, 1995.
28. Farooqui AA, Yang HC, Rosenberger TA, Horrocks LA. Phospholipase A2 and its role in brain tissue. *J. neurochem.* 69: 889-901, 1997.
29. Kalyvas A, David S. Cytosolic phospholipase A2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. *Neuron.* 41:323-35, 2004.
30. Phillis JW, O'Regan MH. A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 44:13-47, 2004.
31. Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A₂ in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases *J. Lipid Res.* 45: 205-13, 2004.
32. Chakraborti S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. *Cell Signal.* 15: 637-65, 2003.
33. Hanasaki K, Arita H. Phospholipase A₂ receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A₂. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:71-82, 2002.
34. Thwin MM, Ong Wy, Fong CW, Sato K, Kodama K, Farooqui AA, Gopalakrishnakone P. Secretory phospholipase A₂ activity in the normal and kainate injected rat brain and inhibition by a peptide derived from python serum. *Exp. Brain Res.* 150: 427-433, 2003.
35. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Hata S, Kuroda T, Sakaeda T, Takasu N, Tanaka K, Gemba T, Hori Y. Human group IIA secretory phospholipase A₂

- induces neuronal cell death via apoptosis. *Molecular Pharmacology*. 61: 114-126, 2003.
36. Kaas JH. What, if anything, is SI? Organization of first somatosensory area of cortex. *Physiological Reviews*. 63: 206-231, 1983.
 37. Nolte J. *The Human Brain. An introduction to its functional anatomy*, 2nd Edi. St. Louis, The C. V. Mosby Company, 1988.
 38. Carpenter MB. *Core Text of Neuroanatomy*, 4th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1991.
 39. Martin JH, Jessel TM. Anatomy of the somatic sensory system in Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (eds): *Principles of Neurol Science*, 3rd ed. New York, Elsevier, pp 353-366, 2001.
 40. Merzenich MM, Kaas JH. Principles of organization of sensory-perceptual systems in mammals. *Prog. Psycobiol. Physiol. Psychol.* 9: 1-42, 1980.
 41. Nakanishi T, Takita K, Toyokura Y. SEPs to tactile tap in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 34: 1-6, 1973.
 42. Pratt H, Star A. Mechanically and electrically evoked somatosensory potentials in humans. *Electroceph. Clin. Neurophysiol.* 51: 138-147, 1981.
 43. Dawson GD. Cerebral responses to electrical stimulation of peripheral nerve in man. *J. Neurosurg. Psychiatry.* 10: 137-147, 1947.
 44. Cunningham K, Halliday AM, Jones SJ. Simulation of 'stationary' SAP and SEP phenomena by 2-dimensional potential field modelling. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 65: 416-28, 1986.
 45. Panjwani GD, Mustafa MKY, Muhailan A. Effect of hyperthermia on somatosensory evoked potentials in the anaesthetized rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 80: 384-91, 1991.
 46. Çakmur R. Sensorimotor Korteks Alanlarının Fonksiyonel Anatomisinin değerlendirilmesinde Median Sinir Kortikal Somatosensoryel Uyarılmış Potansiyelleri. *Uzmanlık Tezi. İzmir*, 1993.
 47. Öge AE, Yayla V. Uyandırılmış potansiyeller, In “Nöroloji” Ed. A.E. Öge, 149-154, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2004.
 48. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 9, 145-152, 2004.
 49. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109: 33-44, 2000.
 50. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are Oxidative Stress – Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Diabetes*, 52, 1-8, 2003.
 51. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 91: 14-22, 1991.
 52. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 119(6):598-620, 1992.
 53. Trush MA., Kensler TW. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 10: 201-9, 1991.
 54. Kusterer K, Pihan G, Szabo S. Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH, or ischemia. *Am. J. Physiol.* 252: 811-816, 1987.
 55. Halliwell B. Oxidants and the central nervous system: Some fundamental questions. *Acta. Neurol. Scand*, 126: 23-33, 1989.
 56. Chessman KH and Slater TF. *An Introduction to Free Radical Biochemistry*. *Br. Med. Bull*, 49: 481-493, 1993.

57. Stahl W, Seis H. Reactive oxygen species. Research Monographs. 1-2, 2002.
58. Valentine JS, Miksztal AR, Sawyer DT. Methods for the study of superoxide chemistry in nonaqueous solutions. *Methods Enzymol.* 105: 71-81, 1984.
59. Stahl M, Bouw R, Jackson A, Pay V. Human Microdialysis. *Curr. Pharm. Biotechnol*; 3: 165-78, 2002.
60. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162, 1994.
61. Lunec J. Free radicals: their involvement in disease processes. *Ann Clin Biochem.* 27: 173-82, 1990.
62. Akkuş İ: Serbest radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
63. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by ion salts. *Proc R Soc London* 147: 332-351, 1934.
64. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit. Care Med.* 21: 1376-1386, 1993.
65. Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300, 1956.
66. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324: 1-18, 1997.
67. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87: 4533-4537, 1990.
68. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7: 153-163, 2000.
69. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am. J. Med.* 91: 23-30, 1991.
70. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. *Ann. Emerg. Med.* 15: 1075-83, 1986.
71. Koster JF, Biemond P, Stam H. Lipid peroxidation myocardial ischaemic damage: cause or consequence? *Basic Res. Cardiol.* 82: 253-60, 1987.
72. Halliwell B and Gutteridge JMG. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet.* 23: 1396-1397, 1984.
73. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. *Trends Biochem. Sci.* 15: 129-35, 1990.
74. Frank L, Massaro D. Oxygen Toxicity. *Am. J. Med.* 69: 117-26, 1980.
75. Chessman KH. Mechanisms and effect of lipid peroxidation. *Molec. Aspects. Med.* 14: 191-197, 1993.
76. Jones DP, Thor H, Smith MT, Jewell S, Orrenius S. Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca⁺² sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. *J. Biol. Chem.* 268: 6390-6397, 1983.
77. Çakatay U, Kayalı R. The clinical importance of protein oxidation. *Cerrahpaşa J. Med.* 35: 140-149, 2004.
78. Ganong WF., Review of Medical Physiology, Ed. Ganong W, 77, Section 3, Vision, pp: 287-354, 1996.
79. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, De Giuli F, Albertini A. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 215-222, 1991.
80. Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* 3;240: 1302-1309, 1988.
81. Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48: 1-19, 2003.

82. Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF. Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J. Nutr.* 108: 981-987, 1978.
83. Dalton-Bunnow MF. Review of sulfite sensitivity. *Am. J. Hosp. Pharm.* 42: 2220-2226, 1985.
84. Lavoie JC, Lanhance C, Chessex P. Antiperoxide activity of sodium metabisulfite. A double-edged sword. *Biochem Pharmacol.* 47: 871-876, 1994.
85. Gunnison F, Palmes ED. Persistence of plasma S-sulfonates following exposure of rabbits to sulfite and sulfur dioxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 24: 266-278, 1973.
86. Langley-Evans SC, Phillips GJ, Jackson AA. Sulphur dioxide: a potent glutathione depleting agent. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 114: 89-98, 1996.
87. Leung KH, Post GB, Menzel DB. Glutathione S-sulfonate, a sulfur dioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77: 388-94, 1985.
88. Atkinson DA, Sim TC, Grant JA. Sodium metabisulfite and SO₂ release: an under-recognized hazard among shrimp fisherman. *Ann. Allergy.* 71: 563-566, 1993.
89. Meng Z, Qin G, Zhang B, Geng H, Bai Q, Bai W and Liu C. Oxidative damage of sulfur dioxide inhalation on lungs and hearts of mice. *Environmental Research.* 93: 285-292, 2003.
90. Gunnison AF, Dulak L, Chiang G, Zaccardi J, Farruggella TJ. A sulphite-oxidase-deficient rat model: Subchronic toxicology. *Food. Cosmet. Toxicol.* 19: 221-232, 1981.
91. Du Z, Meng Z. Modulation of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by sulfur dioxide derivatives. *Brain Research.* 1010: 127-133, 2004.
92. Johnson JL, Rajagopalan KV. Human sulfite oxidase deficiency characterization of the molecular defect in a multicomponent system. *The Journal of Clinical Investigation.* 58: 551-556, 1976.
93. Meng Z, Qin G, Zhang B, Zhang J. Inhalation of sulfur dioxide on the DNA damage of brain cells in mice. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 36: 370-3, 2002.
94. Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus*; 1:1-19, 1998.
95. Guimaraes CA, Linden R. Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 271: 1638-1650, 2004.
96. Mountz JD and Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. In: Kopman WJ ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions.* Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
97. Willingham MC. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 47:1101-1109, 1999.
98. Robins SL and Kumar V. Cell injury and cell death. *Pathologic Basis of Disease.* Chapter 1; 18-25, 1999.
99. Nakano R. Apoptosis: Gene-Directed Cell Death. *Horm. Res.* 48: 2-4, 1997.
100. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267: 1456-1462, 1995.
101. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35:495-516, 2007.

102. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*; 2: 277–88, 2002.
103. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104: 487–501, 2001.
104. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305–8, 1998.
105. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. A new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 32401–10, 1997.
106. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas) - mediated apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 545–51, 1998.
107. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF kappa B activation. *Cell* 81: 495–504, 1995.
108. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo. J.* 14: 5579–88, 1995.
109. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, Van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23: 2861–74, 2004.
110. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.* 1: 5–15, 1999.
111. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo. J.* 23: 2134–45, 2004.
112. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga- Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 410: 549–54, 2001.
113. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391: 43–50, 1998.
114. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2: 647–56, 2002.
115. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 15; 64: 7183-90, 2004 .
116. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276: 7320–6, 2001.
117. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391: 96–9, 1998.
118. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* 272: 26159–65, 1997.
119. Lowe SW and Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 21: 485- 495, 2000.
120. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Cell Injury and Cell Death.* In: Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia. WB Saunders. 18-25, 1999.

121. Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck*. 23: 409-25, 2001.
122. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular apoptosis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, 88: 386-401, 1996.
123. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell*, 87: 171 1996.
124. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6: 1028-1042, 1999.
125. Chang, HY and Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiology and Mol. Biol. Rev.* 64, 821–846, 2000.
126. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br. Med. Bull.* 53 (3), 478-490, 1997.
127. Krauss, G. *Biochemistry of signal transduction and regulation*, Wiley- Vch, Darms, 456-467, 2001.
128. Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Momoi T, Srinivasan A, Nicholson DW, Lazebnik Y. and Flavell RA. Deficiency in caspase-9 and caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat. Med.* 6, 1241–1247, 2000.
129. Thornberry NA, Bull H G, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR and Aunins J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 356, 768–774, 1992.
130. Aliyev V. Sigara içenlerde oksidatif stres göstergelerinin degerlendirilmesi Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
131. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive species. *J. Physiol.* 522: 335–344, 2003.
132. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. *Trends Cell Biol.* 8: 267– 271, 1998.
133. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 100: 1810–1816, 2002.
134. Kim M, Park SY, Pai HS, Kim TH, Billiar TR, Seol DW. Hypoxia inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by blocking Bax translocation. *Cancer Res.* 64: 4078–4081, 2004.
135. Boya P, Morales MC, Gonzalez-Polo RA. The chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis through a mitochondrial pathway regulated by proteins from the Bcl-2 family. *Oncogene.* 22: 6220–6230, 2003.
136. Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y. ER stress induces caspase- 8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp. Cell. Res.* 283: 156–166, 2003.
137. Kagan VE, Gleiss B, Tyurina YY. A role for oxidative stres in apoptosis: Oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 169: 487–499, 2002.
138. Eisele K, Lang PA, Kempe DS. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol. Appl. Pharmacol. Toxicol Appl Pharmacol.* 210: 116-22. 2006.
139. Smyth MJ, Perry DK, Zhang J, Poirier GG, Hannun YA, Obeid LM. prICE: A downstream target for ceramide-induced apoptosis and for the inhibitory action of Bcl-2. *Biochem. J.* 316: 25– 28, 1996.

140. Goswami R, Kilkus J, Scurlock B, Dawson G. CrmA protects against apoptosis and ceramide formation in PC12 cells. *Neurochem. Res.* 27: 735–741, 2002.
141. France-Lanord V, Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: A putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 69: 12–21, 1997.
142. Leslie CC. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem. Cell Biol.* 82: 1–17, 2004.
143. Balboa MA, Varela-Nieto I, Lucas KK and Dennis EA. Expression and function of phospholipase A2 in brain. *FEBS Lett.* 531: 12–17, 2002.
144. Kim DK, Rordorf G, Nemenoff RA, Koroshetz WJ and Bonventre JV. Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A2 in brain cortical cultures. *Biochem. J.* 310: 83–90, 1995.
145. Molloy GY, Rattray M and Williams RJ. Genes encoding multiple forms of phospholipase A2 are expressed in rat brain. *Neurosci. Lett.* 258: 139–142, 1998.
146. Farooqui AA, Horrocks LA and Farooqui T. Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. *J. Mol. Neurosci.* 14: 123–135, 2000.
147. Farooqui AA and Horrocks LA. Excitotoxicity and neurological disorders: involvement of membrane phospholipids. *Int. Rev. Neurobiol.* 36: 267–323, 1994.
148. Farooqui AA, Yang HC, Rosenberger TA and Horrocks LA. Phospholipase A2 and its role in brain tissue. *J. Neurochem.* 69: 889–901, 1997.
149. Hanasaki K. and Arita H. Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69: 71–82, 2002.
150. Murakami M. and Kudo I. Secretory phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1158–1164, 2004.
151. Hanasaki K. Mammalian phospholipase A2: phospholipase A2 receptor. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1165–1167, 2004.
152. Thwin MM, Ong WY, Fong CW, Sato K, Kodama K, Farooqui AA and Gopalakrishnakone P. Secretory phospholipase A2 activity in the normal and kainate injected rat brain and inhibition by a peptide derived from python serum. *Exp. Brain Res.* 150:427–433, 2003.
153. Matsuzawa A, Murakami M, Atsumi G, Imai K, Prados P, Inoue K and Kudo I. Release of secretory phospholipase A2 from rat neuronal cells and its possible function in the regulation of catecholamine secretion. *Biochem. J.* 318:701–709, 1996.
154. DeCoster MA, Lambeau G, Lazdunski M and Bazan NG. Secreted phospholipaseA2 potentiates glutamate-induced calcium increase and cell death in primary neuronal cultures. *J. Neurosci. Res.* 67: 634–645, 2002.
155. Kolko M, Rodriguez de Turco EB, Diemer NH and Bazan NG. Secretory phospholipase A2-mediated neuronal cell death involves glutamate ionotropic receptors. *NeuroReport* 13: 1963–1966, 2002.
156. Lin TN, Wang Q, Simonyi A, Chen JJ, Cheung WM, He YY, Xu J, Sun AY, Hsu CY and Sun GY. Induction of secretory phospholipase A2 in reactive astrocytes in response to transient focal cerebral ischemia in the rat brain. *J. Neurochem.* 90: 637–645, 2004.
157. Wei S, Ong WY, Thwin MM, Fong CW, Farooqui AA, Gopalakrishnakone P and Hong WJ. Differential activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) in

- rat brain and effects of sPLA2 on neurotransmitter release. *Neuroscience*. 121: 891–898, 2003.
158. Nakashima S, Ikeno Y, Yokoyama T, Kuwana M, Bolchi A, Ottonello S, Kitamoto K and Arioka M. Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells. *Biochem. J.* 376: 655–666, 2003.
 159. Koumanov KS, Momchilova AB, Quinn PJ, Wolf C. Ceramides increase the activity of secretory phospholipase A2 and alter its fatty acid specificity, *Biochem. J.* 363: 45-51, 2002.
 160. Moses GS, Jensen MD, Lue LF, Walker DG, Sun AY, Simonyi A, Sun GY. Secretory PLA2-IIA: a new inflammatory factor for Alzheimer's disease, *Journal of Neuroinflammation*, 3: 28, 2006.
 161. Hirabayashi T, Murayama T and Shimizu T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1168–1173, 2004.
 162. Yoshihara Y. and Watanabe Y. Translocation of phospholipase A2 from cytosol to membranes in rat brain induced by calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 484–490, 1990.
 163. Yoshihara Y, Yamaji M, Kawasaki M and Watanabe Y. Ontogeny of cytosolic phospholipase A2 activity in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 350–355, 1992.
 164. Zanassi P, Paolillo M and Schinelli S. Coexpression of phospholipase A2 isoforms in rat striatal astrocytes. *Neurosci. Lett.* 24783–86, 1998.
 165. Shirai Y. and Ito M. Specific differential expression of phospholipase A2 subtypes in rat cerebellum. *J. Neurocytol.* 33: 297–307, 2004.
 166. Song C, Chang XJ, Bean KM, Proia MS, Knopf JL and Kriz RW. Molecular characterization of cytosolic phospholipase A2- β . *J. Biol. Chem.* 274: 17063–17067, 1999.
 167. Asai K, Hirabayashi T, Houjou T, Uozumi N, Taguchi R and Shimizu T. Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2 γ) — Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278: 8809–8814, 2003.
 168. Chiba H, Michibata H, Wakimoto K, Seishima M, Kawasaki S, Okubo K, Mitsui H, Torii H and Imai Y. Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase A2, cPLA2 δ , induced in psoriatic skin. *J. Biol. Chem.* 279:12890–12897, 2004.
 169. Hamano H, Nabekura J, Nishikawa M and Ogawa T. Docosahexaenoic acid reduces GABA response in substantia nigra neuron of rat. *J. Neurophysiol.* 75: 1264–1270, 1996.
 170. Farooqui AA, Yang HC and Horrocks LA. Plasmalogens, phospholipases A2, and signal transduction. *Brain Res. Rev.* 21: 152–161, 1995.
 171. Yang HC, Farooqui AA, Rammohan KW, Haun SE and Horrocks LA. Occurrence and characterization of plasmalogen-selective phospholipase A2 in brain of various animal species. *J. Neurochem.* 69: S205C, 1997.
 172. Latorre E, Collado MP, Fernández I, Aragonés MD and Catalán RE. Signaling events mediating activation of brain ethanolamine plasmalogen hydrolysis by ceramide. *Eur. J. Biochem.* 270: 36–46, 2003.
 173. Larsson PKA, Claesson HE and Kennedy BP. Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A2 and their effect on enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 273: 207–214, 1998.

174. Farooqui AA, Antony P, Ong WY, Horrocks LA and Freysz L. Retinoic acid-mediated phospholipase A2 signaling in the nucleus. *Brain Res. Rev.* 45: 179–195, 2004.
175. Akiba S. and Sato T. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1174–1178, 2004.
176. Wright CE, Harding GFA, Orwin A. The flash and pattern VEP as diagnostic indicator of dementia. *Doc. Ophthalmol.* 62: 89-96, 1986.
177. Wasowicz W, Jean N, Peratz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum. Importance of extraction pH and influence of sample, preservation and storage. *Clin. Chem.* 39: 2522-2526, 1993.
178. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
179. Öztürk N, Besinlerle Farklı Dozlarda Alınan Sülfid Görsel Uyarılma Potansiyelleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Antalya, 2008.
180. Meng Z. Oxidative damage of sulfur dioxide on various organs of mice: sulfur dioxide is a systemic oxidative damage agent. *Inhal. Toxicol.* 15: 181-95, 2003.
181. Aydın S, Yargicoglu P, Derin N, Aliciguzel Y, Abidin I, Agar A. The effect of chronic restraint stress and sulfite on visual evoked potentials (VEPs): relation to lipid peroxidation. *Food Chem. Toxicol.* 43: 1093-101, 2005.
182. Agar A, Kucukatay V, Yargicoglu P, Bilmen S, Gumuslu S, Yucel G. Effect of sulfur dioxide inhalation on erythrocyte antioxidant status and lipid peroxidation in experimental diabetes. *Diabetes Metab.* 26: 140-4, 2000.
183. Yargicoglu P, Agar A, Gümüşlü S, Bilmen S. and Oguz Y. Age-related alterations in antioxidant enzymes, lipid peroxide levels, and somatosensory-evoked potentials: effect of sulfur dioxide. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37(4):554-60, 1999.
184. Fabisiak JP, Kagan EV, Tyurina YY, Tyurin VA and Lazo JS. Paraquat-induced phosphatidylserine oxidation and apoptosis are independent of activation of PLA2. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 274: 793-802, 1998.
185. Ercan S, Ozturk N, Celik-Ozenci C, Gungor NE, Yargicoğlu P. Sodium metabisulfite induces lipid peroxidation and apoptosis in rat gastric tissue. *Toxicol. Ind. Health.* 2010.
186. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Hata S, Kuroda T, Sakaeda T, Tkasu N, Tanaka K, Gemba T, Hori Y. Human Group IIA Secretory Phospholipase A2 Induces Neuronal Cell Death via Apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 61: 114-126, 2002.
187. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250: 5475-5480, 1975.

ÖZGEÇMİŞ

Ceren KENCEBAY, 1983 yılında İstanbul’ da doğdu, ilk, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 2002 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde üniversite eğitimine başladı. Lisans diplomasını 2006 yılında aldı ve 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce’ dir.