



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALIĞINDA SİSTEİN
KATABOLİZMASI: NÖRODEJENERASYONDA SÜLFİT
MOLEKÜLÜNÜN OLASI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Yusuf EKBiÇ

**Temmuz 2016
DENİZLİ**

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER HASTALIĞINDA SİSTEİN KATABOLİZMASI:
NÖRODEJENERASYONDA SÜLFİT MOLEKÜLÜNÜN OLASI
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEKLİSANS TEZİ**

Yusuf EKBiÇ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY

**Temmuz 2016
Denizli**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Yusuf EKBİÇ tarafından Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY yönetiminde hazırlanan “Alzheimer Hastalığında Sistein Katabolizması: Nörodejenerasyonda Sülfid Molekülünün Olası Rolünün Araştırılması” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş olup, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Osman GENÇ
Dumlupınar Üniversitesi

Üye(DANIŞMAN): Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Günfer TURGUT
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sebahat TURGUT
Pamukkale Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 4.8.16
Tarih ve 15.17 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zekiye Melek BOR KÜÇÜKATAY

Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Yusuf EKBIÇ

İmza

: 

ÖZET

ALZHEİMER HASTALIĞINDA SİSTEİN KATABOLİZMASI: NÖRODEJENERASYONDA SÜLFİT MOLEKÜLÜNÜN OLASI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Ekbiç, Yusuf
Yüksek lisans Tezi, Fizyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY

Temmuz 2016, 61 Sayfa

Nörodejeneratif hastalıkların önemli bir ortak özelliği bozulmuş kükürt içeren aminoasit metabolizmasıdır. Bu bozukluğun kanıtı ise yine bu hastaların plazmalarında artmış olarak bulunan homosistein düzeyidir. Nörodejenerasyonda homosisteine ilaveten plazma sistein düzeyinin arttığı, sülfat düzeyinin ise azaldığı bilinmektedir. Sistein katabolizmasının son reaksiyonu olan sülfid'in sülfata çevrilme aşamasında bir bozukluk olabileceği hipotezi ile Alzheimer Hastası (AH) (32) ve kontrol grubu (31) olarak belirlediğimiz sağlıklı bireylerden kan örnekleri alındı. Plazma sülfid düzeyleri Ultra Performanslı Sıvı Kromatografi–Tandem Kütle Spektrometresi (UPLC-MS/MS) kullanılarak ölçüldü. Aynı kanlardan elde edilen serumdan ise sülfat, total antioksidan düzeyleri (TAD), total oksidan düzeyleri (TOD) ticari kitler ile ölçüldü. TAD ve TOD değerleri kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplandı. TAD açısından AH ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. TOD ise kontrol grubunda AH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuşsa da, OSİ'nin AH grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. AH grubunun sülfat düzeyi ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük iken, sülfid düzeyinin önemli oranda arttığı bulunmuştur. Özetle, çalışmamızda AH'da artmış bir oksidan stres bulunmazken, artmış sülfid ve azalmış sülfat düzeylerinin bulunmuştur. Bu bulgular AH'da transsülfürasyon yolağında bir sorun olabileceğini güçlü bir şekilde vurgulamıştır.

Anahtar Kelimeler: Nörodejenerasyon, Alzheimer Hastalığı, Oksidatif Stres, Sülfid, Sülfat.

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
Tarafından desteklenmiştir (Proje No:2014SBE017).**

ABSTRACT**CYSTEINE CATABOLISM IN ALZHEIMER'S DISEASE: INVESTIGATION OF POSSIBLE ROLE OF SULFITE MOLECULE ON NEURODEGENERATION**

Ekbiç, Yusuf

M. Sc.Thesis in Physiology

Supervisor: Prof. Vural KÜÇÜKATAY

July 2016, 61 Pages

Neurodegenerative disease shares one important feature that is a disorder in metabolism of sulfur-containing amino acids. The evidence for this disorder is elevated plasma levels of homocysteine in patients with neurodegenerative disease. In addition to elevated plasma homocystein level, Some clinical studies have also found increased plasma cystein and decreased sulphate level in patients with Motor neuron disease, Parkinson's and Alzheimer's disease. The aim of this study was to investigate a possible defect the transsulfuration pathway which convert to sulfite to sulfate. For this purpose, Alzheimer's disease (AD) (32) and healthy control groups (31) were used. blood samples were taken from groups and The following parameters were evaluated: plasma total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS) and sulfate level by using a commercial kit. The ratio of TOS to TAS was accepted as OSI. Plasma levels of sulfide were measured using an ultraperformance liquid chromatographic tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). There is no statistically significant difference between the AD and control groups in terms of TAS. Although TOS value in AD group were found to be statistically significantly higher compared to the control group, OSI value did not chance in all groups. While sulfate level of the AH group were statistically significantly lower compared to the control group, levels of sulfites was found to be significantly increased. In summary, these findings strongly emphasized that might be a problem with the pathway transsulphuration in AD

Key Words: Neurodegeneration, Alzheimer's disease, oxidative stress, sulfite, sulfate

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers. 2014SBE017.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim tecrübelerinden yararlandığım, tezimin sürdürülmesi ve sonlandırılmasında büyük katkıları bulunan, yalnızca tez danışmanım olarak değil her konuda fazlasıyla yardımcı olan, ilgi, sevgi ve güler yüzünü hiçbir zaman eksik etmeyen, kendisini her konuda örnek aldığım başta değerli tez danışman hocam Prof. Dr.Vural KÜÇÜKATAY'a,

Yüksek lisanseğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen, kritik yorumlarını paylaşan Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof.Dr.Günfer TURGUT'a, Prof.Dr.Melek BOR-KÜÇÜKATAY'a, Prof.Dr.Sebahat TURGUT ve Prof.Dr.Sadettin ÇALIŞKAN'a,

Tezimin laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Doc.Dr.Fatma DEMİRKAYA-MİLOĞLU'na, tezimin ön hazırlık sürecinde yardımını esirgemeyen Fatih TÜTÜNCÜ'ye Fizyoloji A.B.D. asistanlarına;

Bana her an sonsuz destek olan, inanan ve varlığıyla yaşamıma anlam katan sevgili eşim Hadice Kübra EKBİÇ'e bu süreç boyunca bana sabır gösteren bitanecik kızım Irmak EKBİÇ'e

Ve beni bugünlere getiren, canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla
Temmuz - 2016
Yusuf EKBİÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI	4
2.1.Nörodejenerasyon Tanım ve Özellikleri.....	4
2.1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar	4
2.1.2. Alzheimer Hastalığı.....	4
2.1.3. Alzheimer Hastalığında Gözlenen Değişiklikler.....	5
2.2. Aminoasitler	6
2.2.1. Kükürt İçeren Aminoasitler	7
2.3. Homosistein.....	7
2.3.1. Kanda Homosistein Seviyeleri	8
2.3.2. Homosistein Metabolizması.....	9
2.3.2.1. Remetilasyon Yolu.....	11
2.3.2.2. Transsülfürasyon Yolu	12
2.3.2.3. Homosistein Hidrolizi	12
2.3.3. Homosistein Metabolizmasındaki Bozukluklar.....	13
2.3.4. Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri	14
2.3.4.1. Yaşam Tarzı.....	15
2.3.4.2. Genetik Faktör.....	15
2.3.4.3. Klinik Hastalıklar, Kullanılan İlaçlar ve toksinler	16
2.3.4.4. Fizyolojik Nedenler.....	16
2.4. Sülfid	17
2.4.1. Sülfid'in Eksojen Ve Endojen Kaynakları.....	17
2.4.2. Sülfid Toksisitesi.....	18
2.4.3. Sülfid'in Oksidatif ve Oksidatif olmayan Metabolizması.....	19
2.5. Hipotezler.....	20

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Hastaların Belirlenmesi ve Ön Çalışma.....	21
3.2. Standardize Mini Mental Test.....	22
3.3. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	22
3.4. Total Oksidan ÖlçümüYöntemi.....	22
3.5. Total Antioksidan Ölçüm Yöntemi.....	23
3.6. Oksidatif Stres İndeksi.....	24
3.7. Sülfat Ölçüm Yötemi.....	24
3.8. Plazma Sülfat Ölçümü.....	25
3.8.1. Kimyasal Maddeler	25
3.8.2. Cihazlar.....	25
3.8.3. Ultra Performansli Sıvı Kromatografi – Tandem Kütle Spektrometresi (Uplc-Ms/Ms) Yöntem Şartları.....	26
3.8.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	27
3.8.5. Sülfat-Biman Komplekslerinin Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması.	28
3.8.6. Örnek Hazırlama	28
3.9. İstatiksel Analiz	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Deney Gruplarının Demografik Verileri.....	31
4.2. Total Antioksidan Ölçümleri.....	32
4.3. Total Oksidan Ölçümleri.....	33
4.4. Oksidatif Stres İndeksi.....	34
4.5. Sülfat Ölçümleri.....	35
4.6. Sülfat Ölçümleri.....	36
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇLAR.....	47
7. KAYNAKLAR.....	48
8. ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Aminoasitlerin Genel Yapısı.....	6
Şekil 2.2 Kükürt İçeren Aminoasitlerin Yapısı.....	7
Şekil 2.3 Transsülfürasyon Yolağı.....	13
Şekil 2.4 Homosistein Metabolizması.....	14
Şekil 2.5 Sistein Katabolizması Esnasında Sülfid Oluşumu.....	18
Şekil 2.6 Metionin Katabolizması Esnasında Sülfid Oluşumu.....	19
Şekil 2.7 Sülfid Oksidaz Tarafından Katalizlenen Reaksiyonun Şematik Gösterimi	20
Şekil 3.1 Kütle Spektrometresi İle Sülfid Dibiman Bileşiğinin Belirlenmesi ve Parçalanması.....	29
Şekil 4.1 Kontrol ve Alzheimer Grubundaki Total Antioksidan Düzey Sonuçları.....	32
Şekil 4.2 Kontrol ve Alzheimer Grubundaki Total Oksidan Düzey Sonuçları	33
Şekil 4.3 Kontrol ve Alzheimer Grubundaki Oksidatif Stres İndeksi Sonuçları	34
Şekil 4.4 Kontrol ve Alzheimer Grubundaki Sülfat Sonuçları	36
Şekil 4.5 UPLC-MS/MS Kromatogramları.....	38
Şekil 4.6 Kontrol ve Alzheimer Grubundaki Sülfid Sonuçları	39

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Plazma Hcy Ve HHcy Seviyeleri.....	9
Tablo 2.2 Total Plazma Homosistein Komponentleri Ve Yüzdeleri.....	9
Tablo 2.3 Homosistein Yolağında Görev Yapan Enzim Ve Genler.....	19
Tablo 3.1 Kullanılan Cihazlar	22
Tablo 3.2 Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisinin Çalışma Şartları.....	26
Tablo 4.1 Çalışmaya Katılan Kontrol Ve Hasta Grubundaki Deneklerin Demografik Verileri.....	31
Tablo 4.2 Sülfitin Plazma Çalışma Çözeltilerinin Kalibrasyon Eğrilerinin Analiz Değerleri.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α_1 -AP	α_1 -antiproteinazı
AH	Alzheimer hastalığı
ALS	Amiyotrofik Lateral Skleroz
BHMT	Betain homosistein metil transferaz
CAT	Katalaz
CBS	Sistation β sentaz
CDO	Sistein dioksijenaz
Cys	Sistein
FHMT	5-metiltetrahidrofolat homosistein metil transferaz
FR β	Folat reseptör β
FR	Folat reseptör
GCPII	Glutamat karboksipeptidaz II
GPx	Glutatyon peroksidaz
GSSO ₃	S-sulfoglutatyon
GSH	Glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
Hcy	Homosistein
ILBD	Incidental Lewy Body hastalığı
kDa	Kilodalton
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MS	Multipl skleroz
MTS	Metiyonin sentaz
MTHF	Metiltetrahidrofolat
MTHFD1	Metilentetrahidrofolat dehidrogenaz
MTHFR	Metilentetrahidrofolat redüktaz
MTR	Metiyonin sentaz redüktaz
$\cdot O_2$	Süperoksit radikali
ONOO-	Peroksinitrit anyonu
ORT	Ortalamalar
RFC1	Redüklenmiş folat taşıyıcısı
PDO	Polifenol oksidazı
PGH sentaz	Prostaglandin hidroperoksidaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	Rate per Minute
SAH	S-Adenozil Homosistein
SAM	S-Adenozilmetiyonine
SHMT	Serin hidroksi metiltransferaz
SO ₃ ⁻	Sülfit
SO ₄ ⁻	Sülfat
SOX	Sülfit oksidaz enzimi
TC	Transkobalamin
UPLC	Ultra Performanslı sıvı kromatografisi
VKİ	Vücut kitle indeksi

1. GİRİŞ

Homosistein (Hcy; HSCH₂CH₂CH(NH₂)CO₂H, 2-amino-4-merkaptobütirik asit) dışarıdan besinle alınamayan, metiyonin aminoasidinin metabolizması esnasında bir ara ürün olarak oluşan, proteinlerin yapısına katılmayan, sülfür içeren bir amino asittir (Lehninge vd. 2000, Finkelstein 2000). Homosistein (Hcy) ilk olarak 1932 yılında Amerikalı biyokimyacı Vincent Du Vigneaud tarafından bulunmuştur (Finkelstein 2000). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, plazma total homosistein seviyesinin; böbrek yetmezliği, koroner kalp hastalığı, periferik arteriyel hastalık, diyabet, sistemik lupus eritematozis ve venöz tromboembolizm gibi hastalıklara sahip bireylerde olası kardiyovasküler olayların ve bu olaylar sonucunda mortalitenin iyi bir prediktörü olduğu bildirilmektedir (Finkelstein 2000, Selhub 1999, Mattson vd. 2002). Artmış plazma homosistein düzeyi nörolojik, psikiyatrik, renal bozukluklar gibi oldukça geniş bir yelpazedeki klinik patoloji ile ilişkilidir (Martignoni vd. 2007, Muller vd. 2005, Applebaum J. vd. 2004, Bostom ve Culleton 1999). Bunlar arasında nörolojik patolojiler neredeyse ilk sırada yer almaktadır. Bu aminoasit ile nörolojik bozukluklar arasındaki ilişki ilk olarak altmışlı yılların ortalarında methionin metabolizmasındaki bir enzim olan sistasyonin beta sentaz enzim yetersizliği olan ve beyin atrofisi, mental retardasyon ve nöbetlerle karakterize klinik bulguları olan hastalarda gösterilmiştir (Brattström L vd. 1988, Mattson vd. 2002). Sonraki yıllarda bu hastalara ilaveten Alzheimer, Parkinson, Demans, inme, orta düzeyde bilişsel bozulma (Mild Cognitive Impairment) gibi pek çok nörolojik bozukluğa sahip hastada artmış plazma homosistein düzeyi bulunmuştur (Jochemsen 2013, Seshadri vd. 2002, Obeid vd. 2006). Ayrıca bu artmış düzeyin sayılan hastalıkların klinik belirtilerinin görülmesinden seneler önce ortaya çıkabildiği ve bu patolojilerin oluşmasında rol alan diğer faktörlerden bağımsız olarak hastalık gelişme riskini arttırdığı gösterilmiştir (Seshadri vd. 2002, Medina vd. 2001, Jochemsen 2013, Mattson vd. 2000). Son zamanlardaki çalışma verilerine dayanarak potansiyel bir biyomarker özelliği gösteren Hcy' nin bilinç bozukluğu ile bir ilişki göstermesine rağmen bunun nedensel rolü doğrulanamamıştır. Bununla birlikte plazma Hcy seviyesindeki her 5 µmol/L artışın, demansta %40 oranında bir artışa yol açtığı bildirilmektedir (Herrmann ve Obeid 2011). Yukarıda anlatılan çeşitli toksik özellikleri nedeniyle homosistein metabolizmasının hücre içinde sıkı bir şekilde düzenlenmesi hayati önem taşır. Bu nedenle homosistein oluştuktan sonra temel olarak remetilasyon

ve transsülfürasyon olmak üzere 2 yolla metabolize edilerek bahsedilen toksik etkilerinden korunulmaya çalışılır. Remetilasyon, methionin sentaz enzimi tarafından katalizlenen geri dönüşümlü bir yoldur. Bu yolda metiltetrahidrofolat'tan (MTHF) alınan metil grubu methionin sentaz ile homosistein'e aktarılır ve tekrar methionin oluşturulur (Medina MA. vd. 2001). Transsülfürasyon ise geri dönüşümsüz bir yoldur. Sistatyonin beta sentaz enzimi homosistein ile serin'i birleştirerek daha sonra sistein'e dönüştürülecek olan sistatyonin'i oluşturur (Brosnan 2006). İlk yoldaki bir geri dönüşüm reaksiyonunu, ikincisi ise fazla homosistein'in katabolize edilerek ortamdan uzaklaştırılmasını ifade eder.

Yapılan çalışmalar nörodejeneratif hastalıklarda homosistein'e ilaveten plazma sistein düzeyinin arttığını, sülfat düzeyinin ise azaldığını göstermiştir (Taoka S. vd. 1998). Bu homosistein metabolizmasında remetilasyon yolağında bir problemin olmasına rağmen transsülfürasyon yolağının sağlam olduğunu işaret etmektedir. Sistein katabolizmasının son ürünü olan sülfat, sülfid adı verilen molekülden sülfid oksidaz enzimi aracılığı ile oluşur. Güçlü bir nörotoksik bileşik olan sülfid (SO_3^-)'in direkt veya dolaylı olarak pek çok etkisi bildirilmiştir (Mudd SH vd. 1967, McFadden SA 1996, Agar A vd. 2000, Heafield MT vd. 1990). Motor nöron hastalığı, Parkinson ve Alzheimer gibi çeşitli nörolojik hastalıklarda bozulmuş kükürt metabolizması rapor edilmiştir. Bu hastalarda, sistein aminoasit'inin plazma düzeyinin arttığı bulunmuştur. Bu aminoasit, endojen SO_3^- oluşumunda üretilen SO_3^- 'in ana kaynağıdır. Yine aynı hastalarda ksenobiyotiklerin SO_4^- 'la konjugasyonunda bir bozukluk ve artmış sistein/ sülfat (SO_4^-) oranı saptanmıştır (Heafield MT vd. 1990). Bunun anlamı, organizmanın hem SO_3^- 'in hem de SO_4^- 'la detoksifiye edilecek olan çeşitli ksenobiyotiklerin zararlı etkisine karşı savunmasız kalmasıdır. SO_4^- oluşumunun önemli bir kaynağı, daha önce anlatıldığı gibi SO_3^- 'in sülfid oksidaz enzimi (SOX) ile katabolizmasıdır (Cohen HJ vd. 1971). Bu hastalarda SOX aktivitesi ve SO_3^- düzeyinin ne olduğu bilinmese de, hastalıklarının patogeneğinde SO_3^- metabolizmasındaki bir defektin rol alabileceği bildirilmiştir (Heafield MT vd. 1990).

1.1. Amaç

Bu çalışmadaki amaç, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda bozulmuş kükürt içeren aminoasit metabolizmasında; bu bozukluğun şu ana kadar çalışılmamış yönü olan ve yine kükürt içeren bir aminoasit olan sistein katabolizmasının Alzheimer Hastalığında araştırılmasıdır. Bu katabolizmanın belki de en önemli basamağı, sistein yıkımı esnasında oluşan sülfid molekülünün sülfid oksidaz enzimi ile sülfata

dönüştürülmesidir. Bu basamak sülfidin başlıca nöronlara olmak üzere pek çok hücreye son derece toksik etkileri olan bir molekül olması ve hızla ortamdan uzaklaştırılmasının zorunlu olmasından dolayı önemlidir. Bu detoksifikasyonun yapılamaması veya yeterli etkinlikte olmaması sülfid toksisitesine neden olacağı gibi, organizmanın pek çok çevresel toksinin detoksifikasyonu için ihtiyaç duyduğu sülfat molekülünün de yetersizliğine yol açar. Bu durum organizmanın hem endojen hem de eksojen nörotoksik ajanların etkisine açık kalacağı anlamını taşır. Tıbbi literatür de artmış sistein azalmış sülfat plazma değerleri bildirilmişse de sülfid molekülü ile ilişkisi kurulmamış, çalışmalar yine kükürt içeren aminoasitlerden oluşan homosistein metabolizmasının remetilasyon yolağı üzerine yoğunlaşmıştır. Tüm bunlar göz önüne alındığında, bu tip rahatsızlıklarda gözlenen nörotoksosite ile olası artmış sülfid düzeyi kolaylıkla ilişkilendirilebilir. Böyle bir ilişkinin kurulmasını sağlayacak çıktılar bu tip hastalıklarda tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI

2.1. Nörodejenerasyon Tanım ve Özellikleri

Nöron ve ilişkili sistemlerin anatomik ve fizyolojik olarak çeşitli nedenlerle etkilenip bozulması nörodejenerasyon olarak tanımlanmaktadır. Doku kaybı ve dejenerasyon terimleri nöron sistemleri veya alt gruplarında gözlenen olayları içermekte, kalıtsal ve edinsel sinir sisteminin tüm hastalıklarını kapsamaktadır (Du J. vd 2009). Hücresel düzeyde nöronal dejenerasyon ile sonlanan birbirinden farklı birçok mekanizma yer almaktadır. Alzheimer, Parkinson, Huntington Koresi ve ALS gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda hatalı protein üretimi, oksijen radikali yapımında artış, hücre içi kalsiyum artışı gibi mekanizmalarla gerçekleşen apoptozun nöron kaybına yol açtığı gösterilmiştir (Bredesen DE. vd. 2006). Bir diğer mekanizma da nörodejeneratif bozuklukların birçoğunda toksik etkilere sahip agregasyona yatkın proteinlerin birikimiyle oluşan nöronal hasardır. (Olanov CV. ve McNaught 2006). Nöronların yavaş kaybıyla oluşan tüm patolojik süreçlerde sadece hücre gövdeleri değil dendritler, aksonlar ve miyelin kılıflar da etkilenerek hasara uğrar ve ortamdan kalkar. Ancak sürecin yavaşlığı nedeniyle şiddetli bir doku reaksiyonu veya hücresel yanıt yoktur (Du J. vd 2009, Komatsu M. vd. 2006).

Alzheimer hastalığında patolojik değişiklikler daha az seçici ve daha yaygın olsalar da, hasar hala büyük oranda serebral korteks nöronları ile sınırlı kalır (Du J. vd 2009).

2.1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Multipl skleroz (MS), ALS, Alzheimer, Parkinson, Huntington, Pick, motor nöron hastalıkları nörodejeneratif hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Özellikle Alzheimer, MS ve Parkinson yaygın olarak gözlenen nörodejeneratif hastalıklardandır.

Dejeneratif hastalıkların; herediter veya genetik faktörü bilinenler dışında etiyolojik olarak sınıflandırmaları olanaksız olduğundan pratik olması için klinik belirtilere ve patolojilerine göre ayırmak daha uygun bulunmuştur (Allan HR. ve Robert

HB. 2006). Bu sınıflandırmaya göre; Alzheimer hastalığı ilerleyici demans belirtileri gösteren yaygın serebral atrofi grubuna girmektedir.

2.1.2. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı duyu ve davranış bozukluklarının eşlik ettiği bilişsel işlevlerde ilerleyici hasar ile karakterize olan, tedavisi olmayan önemli bir nörodejeneratif hastalıktır. İlk kez 1907 yılında Alois Alzheimer tarafından belirlenmiştir. Alzheimer hastalığı 40'lı yaşlarda ortaya çıksada ortalama görülme yaşı 65 ve üzeridir (Maurer K. vd. 1997).

Alzheimer hastalığı kişide kavrama işlevinde artan gerileme, aktivitelerinin büyük ölçüde bozulması ve bunama ile kendini göstermektedir. Hastalığın tanımlanmasından sonraki yaşam süresi ortalama 2 ile 20 yıl arasındadır. Hastalığın görülme sıklığı 60-69 yaş grubu insanlarda yaklaşık binde 3'tür, 70-79 yaş grubu insanlarda binde 32, 80 yaş üzerindeki insanlarda binde 108'dir. Alzheimer hastalarının yaşam süreleri beklenenin yarısına inmiştir. Bunun nedeni temel olarak solunum ve kardiyovasküler sistem bozuklukları ile yetersiz beslenme ve henüz sebebi net olarak bilinmeyen başka nedenlere bağlıdır (Schoenberg B. vd. 1987).

Alzheimer hastalığında genetik faktörlere bağlı ailesel geçişe dikkat çekilmektedir. Hastalık başlangıcı 45 yaş ve altında ise genellikle otozomal dominant geçişten söz edilmektedir ve en sık olarak PS1 gen mutasyonu neden olarak gösterilmektedir (Nee LE. vd. 1987). Hastalığın başlangıcında yakın hafızada, hastalığın ilerleyen dönemlerinde olarak uzak hafızada bozulma ortaya çıkar. Hastalık ileri evrelere ulaşana kadar uyanıklık, uyarılabilirlik ve motor işlevlerde belirgin hasar görülmemektedir. Hasta bireyler hastalığın ileri seviyelerinde bilinçlerini tamamen kaybederler bu aşamaya kadar hastalık aralıksız devam eder (Knopman DS. vd. 2001).

Günümüzdeki çalışmalar Alzheimer Hastalığında klinik bulguların ortaya çıkmadan 15-20 yıl önce patolojik değişikliklerin olduğunu ortaya koymuştur.

Alzheimer hastalığının tedavisinde ise primer amaç hastalığın bilişsel belirtilerini düzeltmedir, bu olmazsa hastalığın gidişatını durdurmak, en son durumda ise ilerleyişini yavaşlatmaktır (Reisberg B. vd. 2003).

2.1.3. Alzheimer Hastalığında Gözlenen Fizyolojik Değişiklikler

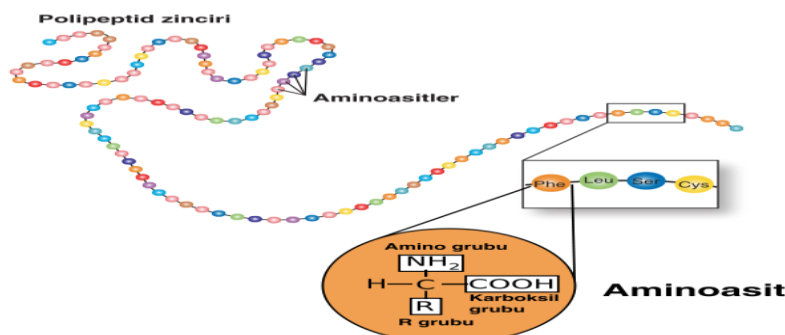
Hastalığının ileri evrelerinde beyinde meydana gelen yoğun doku atrofisi ile beyin ağırlığının %20' den fazlası kaybedilir. Serebral kıvrımlar daralır ve sulkuslar genişler. Üçüncü ve lateral ventriküller değişen derecelerde simetrik olarak genişler.

Atrofi süreci özellikle frontal, temporal ve pariyetal loblarda belirgin bir şekilde kendini gösterir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) incelemesinde en önemli bulgu aşırı hipokampus atrofisidir (Scahill R.I. vd. 2002).

Mikroskopik incelemede ise yaygın sinir hücresi kaybı vardır. Anterior talamik ve septal çekirdekler, diagonal Broca bandı, amigdala ve monoaminerjik beyin sapı alanları da kayba uğrar. Serebral kortekste, hücre kaybı temel olarak büyük piramidal nöronları etkiler. Rezidüel nöronlar hacim ve ribonükleoprotein kaybına uğrar. Dendritleri kaybolur, sinaps ve nöropil kaybı nedeniyle hücreler kümeleşirler (Delacourte A. vd. 1999). Bunlara ilave olarak hastalığa özgü mikroskopik üç bulgu söz konusudur. Birincisi, nöronların granülovaküolar dejenerasyonudur ve en çok hipokampusun piramidal tabakasında belirgindir. Nöritik plaklar ve nörofibriler değişikliklere tüm serebral kortekste rastlanır. Demansın şiddeti, nörofibriler yumak ve nöron kaybının şiddetiyle doğru orantılıdır. İkincisi, sinir hücresinin stoplazması içinde kalın lif şeklinde gümüşle boyanan şeritler gözlenir. Bunlar genellikle yumak şeklindedirler. Bu şekiller mikrotübüller tau proteininin hiperfosforile formlarından oluşurlar. Üçüncü değişiklikte ise küresel, şekilsiz materyal depolanmaları serebral korteksin tümüne dağılmıştır. Agregatların merkezi amiloid proteindir ve çevreleri dejeneratif sinir terminalleri ile sarılmıştır. Bunlar senil veya nöritik plakalar olarak da adlandırılır. Amiloid proteinler serebral korteks boyunca olgunlaşmamış ve yaygın bir şekilde organizasyonsuz ve kor oluşumu yapmaksızın dağılmışlardır ve temel olarak immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenirler (Arriagada PV. vd. 1992).

2.2. Aminoasitler

Yapılarında hem amin ($-NH_3$) hem de karboksil ($-COOH$) fonksiyonel gruplarını içeren moleküllerdir. Aminoasitlerin peptit bağlarıyla uç uca eklenmesiyle oluşturdukları kısa polimer zincirler peptid, uzun polimer zincirler ise polipeptid veya protein olarak adlandırılırlar (Şekil 2.1).

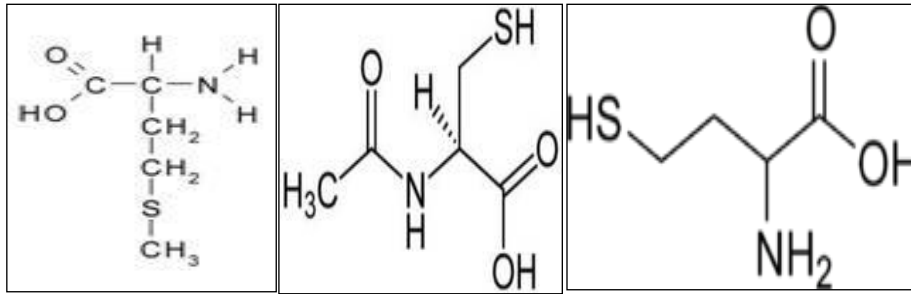


Şekil 2.1 Aminoasitlerin genel yapısı.

2.2.1.Kükürt içeren Aminoasitler

Kükürt içeren aminoasitler içerisinde en çok bilineni sistein, metiyonin ve metiyoninin katabolizması sırasında oluşan homosisteindir. Bu aminoasitlerden sadece sistein ve metiyonin proteinlerin yapısına katılır ve hücre metabolizmasında kritik rol alırlar (Şekil 2. 2) (John T. 2006).

Sistein (Cys) proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Yan zincirinde kükürt grubu içerir. Polar özelliktedir, ancak fizyolojik pH'da yüksüzdür. Non esansiyel ve glukojeniktir. 20 aminoasit arasında sadece sistein yan zincirinde fonksiyonel bir thiol grubu bulundurur. Thiol gruplarının okside olmasıyla iki sistein arasında disülfid bağı oluşturulabilir. Bu bağı oluşumu geri çevrilebilir bir reaksiyondur. Disülfid bağlarını oluşturabilmesi sebebiyle sistein birçok proteinin üç boyutlu yapısının oluşturulmasında belirleyici rol oynar (M.K.R. Harper Biyokimya, 25, N.Dikmen,T.Özgüner, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2004-877).



METİYONİN

SİSTEİN

HOMOSİSTEİN

Şekil 2.2. Kükürt İçeren Aminoasitlerin Yapısı

Metiyonin tiyoeter türevi esansiyel bir aminoasittir. Bütün Proteinlerin yapılarında vardır. Üç şekilde oluşabilir, endojen proteinlerin bozulması sonucu veya homosisteinin remetilasyonu ya da diyetle. Bu esansiyel aminoasitin biyolojik önemi; çeşitli biyolojik moleküller için S-Adenozilmetiyonine (SAM) çevrilerek metil kaynağı olmasından, transsülfürizasyon yolu ile sistein aminoasidinin oluşumunu sağlamasından, kaynaklanmaktadır (Finkelstein 2000).

2.3. Homosistein(Hcy)

Homosistein ilk olarak 1932 yılında bulunmuş kükürt içeren bir aminoasittir (De Vigneaud VE 1932). Esansiyel bir aminoasit olan methionin'in katabolizması esnasında oluşan, herhangi bir protein yapısına katılmayan ve 135.2 dalton ağırlığında

olan bu aminoasidin oluşumundaki ilk basamak methionin'in metionin adenzil transferaz (MAT) enzimi ile adenillenmesidir (Lehninger AL 2000). Bu reaksiyon sonucu S-adenozilmethionin (SAM) oluşur. Bu molekül bilinen tüm biyolojik metilasyon işlemlerinde metil vericisi olarak görev yapmaktadır (Clarke S. 2001). Katabolizmanın bir sonraki reaksiyonu SAM molekülünün metil transferaz (MT) enzimi ile demetilasyonu sonucu S-adenozilhomosistein (SAH) oluşumudur. Homosistein oluşumundaki son basamak ise SAH'in SAH hidrolazlar ile homosistein'e çevrilmesidir (Lehninger AL 2000). Homosistein'in NMDA reseptörlerininin agonisti olması (Lipton SA, vd. 1997), oksidatif stres'e neden olması (Ho PI, vd. 2003), metilasyon kapasitesini azaltması (Kruman II 2000), nörotoksik amiloid peptidin hücre içi ve dışında birikimine neden olması (Kruman II 2002), endoplazmik retikulum stresine yol açması (Sai X 2002) ve hücrede programlanmış hücre ölümünü aktive etmesi (Kruman II 2000), gibi çeşitli toksik özellikleri nedeniyle, metabolizmasının hücre içinde sıkı bir şekilde düzenlenmesi hayati önem taşır. Bu nedenle homosistein oluşuktan sonra temel olarak remetilasyon ve transsülfürasyon olmak üzere 2 yolla metabolize edilerek bahsedilen toksik etkilerinden korunulmaya çalışılır. Remetilasyon, methionin sentaz enzimi tarafından katalizlenen geri dönüşümlü bir yoldur. Bu yolda metiltetrahidrofolat'tan (MTHF) alınan metil grubu methionin sentaz ile homosistein'e aktarılır ve tekrar methionin oluşturulur. Transsülfürasyon ise geri dönüşümsüz bir yoldur. Sistasyonin beta sentaz enzimi homosistein ile serin'i birleştirerek daha sonra sistein'e dönüştürülecek olan sistasyonin'i oluşturur (Şekil 2.2.) (Brosnan JT 2006). İlk yolda bir geri dönüşüm reaksiyonunu, ikincisi ise fazla homosistein'in katabolize edilerek ortamdaki uzaklaştırılmasını ifade eder.

2.3.1. Kanda Homosistein Seviyeleri

Plasma ve serumdaki total Hcy miktarı kandaki Hcy miktarını belirler. Total Hcy' nin normal değerleri, yetişkinlerde plasmada 5-15 µmol/L, serumda ise 13-18 µmol/L olarak kabul edilir. Pediatrik dönemde bu değer daha düşüktür (Tablo2.1.) (3.7-10.3 µmol/L). Ancak kandaki Hcy seviyeleri birçok nedenden etkilenebilir. Bunlar arasında yaş, cinsiyet ve kadınlardaki postmenapozal dönemleri sayabiliriz. Hcy'nin plasmada 10 µmol/L seviyesinin üzerine çıkması beraberinde sağlık risklerini de arttırabileceği belirtilmiştir (Gerritsen T vd. 1962,Corrales FJ vd. 2002, Boztepe Derici Ü ve Altok Reis K 2002).

Tablo 2.1. Plazma Hcy ve HHcy seviyeleri (Schulz RJ. 2007)

Hcy	
Normal aralık	5-15 $\mu\text{mol/L}$
Arzu edilen değer	<10 $\mu\text{mol/L}$
HHcy	
Hafif form	15-25 $\mu\text{mol/L}$
Orta form	25-50 $\mu\text{mol/L}$
Şiddetli form	50-500 $\mu\text{mol/L}$

Tablo 2.2. Total plazma homosistein komponentleri ve yüzdeleri (Refsum H vd. 1998, Jacobsen DW. vd. 1998).

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

2.3.2. Homosistein Metabolizması

Homosistein metabolizmasında remetilasyon ve transsülfürasyon yolları arasında sıkı şekilde düzenlenen bir denge vardır (McCully KS 1969). Sağlıklı kişilerde remetilasyon ve transsülfürasyon arasındaki bu denge nedeniyle düşük düzeyde (5–10 $\mu\text{mol/L}$) plazma homosistein konsantrasyonları izlenir (Frosst P vd. 1995). Artmış plazma homosistein düzeyleri ise bu aminoasidin hücre içi metabolizmasındaki bir bozukluğu gösterir. Bozukluk genellikle bu yollarda görev yapan enzimlerin genetik

defektlerine (Kluijtmans LA. vd. 1996, Troen AM. 2005) ve/veya çalışmaları için gerekli olan çeşitli vitaminlerin (B6, B12 ve folik asit) eksikliğine (Selhub J. 2000) bağlı olarak gelişebilir ve neticede hücre içi homosistein düzeyleri artar. Bu artışa yanıt olarak ta toksisiteden korunmak amacı ile homosistein'in hücre içinden dışına verildiği ileri sürülmüştür (Martignoni E. 2007). Bu mekanizma hücrenin kendisinin toksisiteden korunmasına neden olurken oluşan hiperhomosisteinemi tüm dokuların potansiyel toksisitesine neden olacaktır. Sebebi ne olursa olsun artmış plazma homosistein düzeyi nörolojik (Martignoni E. vd. 2007), psikiyatrik (Applebaum J. vd. 2004), renal bozukluklar (Bostom AG.,Culleton BF. 1999) gibi oldukça geniş bir yelpazedeki klinik patoloji ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca homosistein artışının bu bozuklukların nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu henüz kesin olarak bilinmemektedir. Bunlar arasında nörolojik patolojiler neredeyse ilk sırada yer almaktadır.

Bu aminoasit ile nörolojik bozukluklar arasındaki ilişki ilk olarak methionin metabolizmasındaki bir enzim olan sistasyonin beta sentaz enzim yetersizliği olan ve beyin atrofisi, mental retardasyon ve nöbetlerle karakterize klinik bulguları olan hastalarda gösterilmiştir (Grieco AJ. 1977, Mudd SH. vd. 1985). Sonraki yıllarda bu hastalara ilaveten Alzheimer hastalığı ve benzer demans tabloları (Seshadri S. vd. 2002), Parkinson hastalığı (Martignoni E. 2007), inme, hafif bilişsel bozukluk (Mild Cognitive Impairment) (Obeid R. 2006) gibi pek çok hastalıkta artmış plazma homosistein düzeyi bulunmuştur. Ayrıca bu artışın bahsedilen hastalıkların klinik belirtilerinin görülmesinden seneler önce ortaya çıkabildiği ve bu patolojilerin oluşmasında rol alan diğer faktörlerden bağımsız olarak hastalık gelişme riskini arttırdığı bildirilmiştir (Seshadri S. vd. 2002). Yapılan çalışmalarda yine bu hastalıkların pek çoğunda homosistein'e ilaveten plazma sistein aminoasidinin arttığı ve sülfat düzeyinin azaldığı bulunmuştur (Heafield MT. vd. 2006. Woolsey PB. 2008). Artmış sistein düzeyi, homosistein'in remetilasyonla methionin'e dönüşmemesine rağmen transsülfürasyon ile sisteine dönüşebildiğini işaret etmektedir. Bununla uyumlu olarak homosistein metabolizmasındaki temel 2 enzim olan methionin sentaz ve sistasyonin beta sentaz aktivitelerinin hücrenin oksidatif çevresinden etkilendikleri bulunmuştur (Finkelstein JD. 2001). Şöyleki, methionin sentaz enziminin artmış oksidatif strese aktivitesini azaltarak homosistein'in methionin'e çevrilmesini azalttığı gösterilmiştir. Sistasyonin beta sentaz enziminin ise zıt olarak oksidatif çevrede aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (Taoka S. vd. 1998). Oksidatif stres ise homosistein'in nörotoksik etkilerini açıklamaya çalışan önemli bir mekanizmadır. Her iki durum beraber düşünüldüğünde artmış oksidatif stres'in remetilasyon sürecini baskılayıp transsülfürasyon sürecini arttıracığı ve bu hastalarda izlenen artmış plazma sistein düzeylerine sebep olacağı akla uygun görülmektedir. Bu da büyük bir ihtimalle artmış oksidatif strese verilen

fizyolojik bir yanıttır (Mosharov E. vd. 2000). Organizma oksidatif strese cevaben önemli bir antioksidan olan glutasyonu oluşturan 3 aminoasitten (glutamat, glisin ve sistein) biri ve hız kısıtlayıcı prekürsörü olan sistein aminoasidinin sentezini arttırmaktadır.

Birçok doku N5 metiltetrahydrofolatı metil kaynağı olarak kullanıp, FHMT(5-metiltetrahydrofolat homosistein metil transferaz) enzimi aracılığıyla homosisteini metiyonine metabolize eder (Fontecave M. vd. 2004, Stabler SP vd 1993). Yalnız karaciğerde homosisteinin büyük kısmı, metil kaynağı olarak betaini kullanıp BHMT enzimi aracılığıyla metiyonine metabolize edilir (Woolsey PB. 2008). Metil kaynağının oluşumu ise besinlerle alınan N5-N10 metilentetrahydrofolata bağlıdır (Fontecave M vd. 2004).

Metiyonin metabolizması sırasında transmetilasyonla homosistein oluştuktan sonra organizmada Hcy konsantrasyonlarını düşük tutmak ve vücut metabolik gereksinimlerini sağlamak için vücutta üç yolla metabolize olur. (Mineer 1997).

2.3.2.1. Remetilasyon Yolu

Metiyonin sentaz enzimi tarafından katalizlenen geri dönüşümlü bir yoldur. Hcy'den yeniden metiyonin aminoasidinin sentezlendiği yoldur (Stabler 1993). Bu yol kısa ve uzun olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir.

BHMT enzimi ile gerçekleşen kısa yol folik asit ve/veya B12 vitamin eksikliğinde SAM sentezi için gerekli olan metiyoninin yeterli miktarda dokulara sağlamada kullanılır. Betain, metil vericisidir ve kolinin katabolizması sonucu oluşur. Betain metil grubunu Hcy'e aktararak metiyonin oluşumu sağlar. Bu sırada kendisinde N,N-dimetilglisin (DMG)' e dönüşür (McKeever 1991, Chadwick 2000, Şen 2009).

Folik asidin plazmadaki bir formu olarak karşımıza çıkan 5-metiltetrahydrofolat (5-MTHF), uzun yolda metil grubu vericisi olarak rol oynar. Folat, remetilasyon siklusunda hem kofaktör hem de koenzim olarak 5-MTHF metil grubunu, kofaktörü B12 vitamininin bir formu olan metil kobalamine bağlı olarak çalışan MTS enzimi ile Hcy'ne aktararak metiyonin sentezini gerçekleştirir. Diğer taraftan da tetrahydrofolat (THF) oluşur. THF ise daha sonra kofaktörü vitamin B2 (riboflavin) olan 5,10-metilen tetrahydrofolat redüktaz (5,10-MTHFR) enzimi ile 5,10- Metilen Tetra Hidro Folat' a (5,10- MTHF) dönüşür. 5-MTHF'den metil grubunun Hcy'ne transferinde vitamin B12 aracı durumundadır. Böylece bu reaksiyonda folik asit ve B12 vitamininin metabolizması birbirine bağlanmış olur. 5-MTHF'in THF'a dönüşebilmesi için B12

vitaminine ihtiyaç vardır. B12 vitamini eksikliğinde bu dönüşüm olamaz (Şen 2009, Langman 1999, Seshadri 2000).

2.3.2.2. Transsülfürasyon Yolu

Geri dönüşümsüz bir yoldur. Sistatyonin beta sentaz (CBS) enzimi Hcy ile serin'i birleştirerek daha sonra sisteine dönüştürülecek olan sistatyonin'i oluşturur. Ortamda fazla miktarda metiyonin varlığında veya sistein sentezi gerektiğinde, Hcy transsülfürasyon yoluna girer. Hcy'nin katabolizması ile başlayarak sistein oluşur. Oluşan sistein ya glutatyonun yapısına girer ya da sülfata dönüşerek glikozaminlerin yapısına katılır. Karaciğerde oluşan glutatyonun en önemli temel kaynağında bu yoldur (Obeid 2006). Transsülfürasyon yolunda glutatyonun dışında CO₂, NH₄, piruvat, taurin, sülfat, α-keto bütirat da oluşur (Şekil 2.3) (Mattson 2003).

Bu yolda Hcy'nin serin aminoasidi ile birlikte sistatyonin beta sentaz enziminin (CBS) katalizörliğünde ilk gerçekleşen oluşum sistatyonin sentezidir. Oluşan sistatyonin daha sonra başka bir B6 vitamin bağımlı gama sistatyonaz (CGL) enzimi ile sistein, α-keto bütirat ve NH₄'e metabolize olur. Sistein hücreler tarafından sentezlenen proteinlerin yapısına girer, sülfata dönüşerek glikozaminoglikanların sentezinde kullanılır veya idrarla atılır. Sistein karışık disülfid sistein-homosistein formunu oluşturmak için homosistein ile birleşir (Finkelstein 1998).

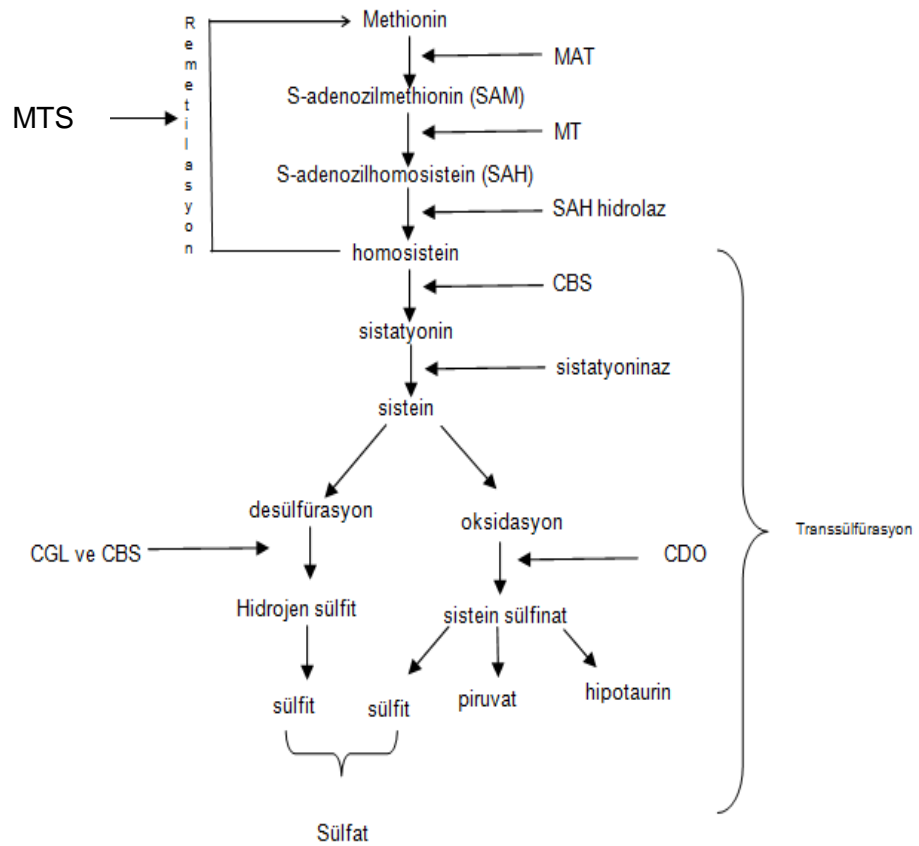
Transsülfürasyon yolu öncelikle karaciğer olmak üzere, böbreklerde, ince bağırsakta ve pankreasta aktiftir. Sisteini hızlı kullanan glutatyon siklusunun olduğu böbrek, bağırsak, karaciğer ve pankreas gibi dokularda aynı zamanda transsülfürasyon yolunun her iki enzimide bulunur (Brosnan 2006). Ancak beyin dokusunda CBS enzimi bulunup CGL enzimi bulunmadığından dolayı sistatyoninin birikir ve glutatyonun sentezi için glial sistein kullanılır. Bu nedenle santral sinir sistemi oksidatif strese diğer dokulara göre daha duyarlıdır (Finkelstein 2000). Bazı hücrelerde ise transsülfürasyon yolu bulunmaz. Bu hücrelerin sistein için eksojensistejin kaynağına ihtiyaçları vardır (Finkelstein 1990).

2.3.2.3. Homosisteinin Hidrolizi

Geri dönüşümsüz bir yoldur. Metiyoninden sistein oluşması sırasında α-ketobütirat oluşur; α-ketobütirat da propiyonil-CoA ve metilmalonil-CoA üzerinden süksinil-CoA'ya dönüşerek gerçekleşir (Scott vd. 1994).

Çok karışık gözükten homosistein metabolizması aslında oldukça düzenli bir feedback mekanizmasına sahiptir. Eger metiyonin dengesi bozulmuşsa ve SAM düşük

konsantrasyonda bulunuyorsa, homosistein öncelikle metiyonin oluşumu için MTS'nin görev aldığı remetilasyon yoluna yönelir.



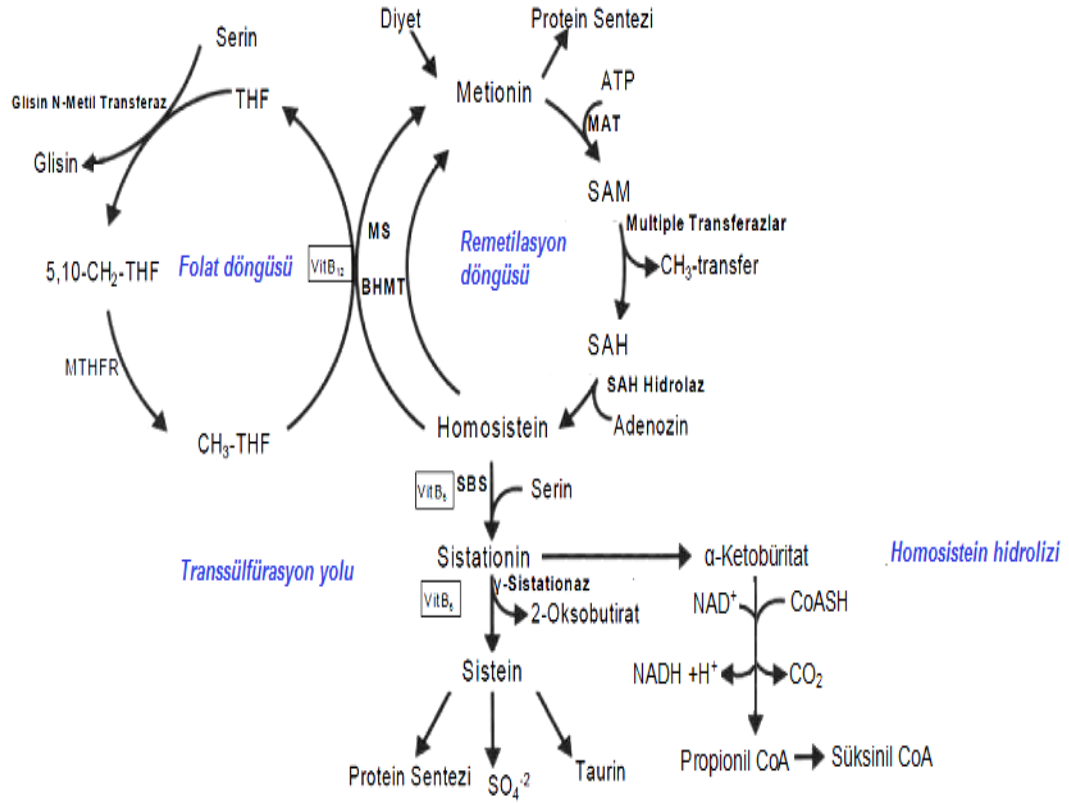
Şekil:2.3. Transsülfürasyon yolağı.

Homosistein düzeyi yükseldiğinde S-Adenozilhomosistein miktarı artar. Çok sayıda metabolik etkilere sahip olan SAH, farklı bağlanma bölgelerinde SAM ile rekabet içindedir ve bu özelliği ile metilasyonu engelleyebilir. Bu engelleme SAM/SAH oranına bağlıdır ayrıca bu orandan indikatör olarak metilasyon döngüsünde de yararlanılabilir (Şekil 2.4.) (Mudd vd. 2001). Metilentetrahidrofolat metiyoninin homosisteine dönüşümünde MS için substrat olması nedeniyle önemli bir işleve sahiptir. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enziminin katalizlediği bir reaksiyon sonucu oluşur. Bu yüzden homosistein remetilasyonu üzerinde MTHFR'nin, güçlü bir etkisi vardır (Tablo 2.3.) (Bloom vd. 1995).

2.3.3. Homosistein Metabolizmasındaki Bozukluklar

Başlıca iki nedenden dolayı plazmada homosistein miktarı artabilir. Bunlardan birincisi homosistein metabolizmasında görev yapan enzimin genetik defekti ikincisi ise vitamin kofaktör eksikliğine yol açan nedenlerdir. Hiperhomosistenemi formlarının önemli farklılıklarına göre sınıflandırılması üç grupta olur: Düşük

metilentetrahidrofolat ile homosistein metilasyonundaki bozukluk, sistasyon sentazdaki bozukluk, normal veya yüksek metilentetrahidrofolat düzeyleriyle homosistein metilasyonundaki bozukluk (Mosharov vd. 2000).



Şekil 2.4. Homosistein metabolizması (Mayer EL. vd. 1996).

Homosistein birikimi ardından her iki yolda geri dönüşümün sağlanmasında SAM etkin bir rol oynar (Meister 1994). B12 vitamini ve folik asit eksikliğinde oldukça yüksek homosistein seviyeleri saptanmıştır. Sağlıklı insanlarda homosistein seviyesi ile B12, B6 vitamini, folik asit arasında negatif bir korelasyon tesbit edilmiştir (Selhub vd. 1992) B vitamini eksikliğinin tüm hiperhomosisteinemi vakalarının en az 2/3'ünden sorumlu olduğu öne sürülmektedir (Harker vd. 1974).

2.3.4. Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri

Hcy'nin plasmada 10 µmol/L seviyesinde olması gerektiği ve bu değerdeki artışların sağlık risklerini de arttırabileceği bildirilmektedir (Gerritsen T vd. 1962, Corrales FJ vd. 2002, Boztepe Derici Ü. ve Altok Reis K. 2002). Plazmadaki total Hcy

seviyeleri Tablo 2.2' de verilmiştir (Corrales FJvd 2002). Hiperhomosisteinemi inme, aterosklerozis, demans, bipolar bozukluk, şizofreni, paranoid psikoz, depresif rahatsızlıklar, duygulanım bozuklukları, miyarkard enfarktüsü, Alzheimer hastalığı, psikiyatrik rahatsızlıkları ve hamile kadınlardaki doğum kusurlarındaki riski artırdığı belirtilmiştir.

2.3.4.1.Yasam Tarzı

Vitamin B12, B6 ve folat eksikliği hiperhomosisteinemili hastaların 2/3 'ünde ilgili vitaminlerden bir veya daha fazlasının eksik olduğu belirtilmektedir. B6, B12 vitaminleri ve folat düzeyi ile homosistein düzeyi arasında ters bir orantı vardır. Hcy, meyve sebze tüketiminin artışı ile anlamlı derecede düşer. Vücut kitle indeksi ile Hcy arasında da zayıf bir ilişki vardır. Aşırı sigara, alkol ve kafeinli kahve içen kişilerde homosistein düzeyi yükselirken fizyolojik aktivite ile bu düzey düşer. Bu tür hayat tarzı faktörlerinin etkisikadınlarda erkeklerden daha belirgindir. Ayrıca kadınlar, erkeklerden daha düşük homosistein düzeyine sahiptir ve düzey yaşla artar. Bunun yanında kadınlarda plazma homosistein seviyeleri menapozdan sonrada artar. Kronik alkoliklerde, etanolün vitamin durumunu etkilemesi sonucu homosistein düzeyi artarken, orta derecede etanol tüketenlerde homosistein düzeyi düşmektedir.

2.3.4.2.Genetik Faktörler

Homosistein metabolizmasında yer alan yollardaki enzimatik anormallikler konjenital veya kazanılmış olabilir. Bu anormalliklerde hiperhomosisteinemi'nin nedenidir. Bu enzimlerden MS, CBS ve MTHFR enzimlerinin hatalı veya eksik sentezlenmesinden dolayı homosisteinemi ve homosisteinürinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Carey 1968, Malinow 1989).

Nörolojik bozukluklar ile Hcy arasındaki ilişki metiyonin metabolizmasındaki CBS enziminin yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklarda gösterilmiştir. CBS eksikliğinin homozigot formu konjenital homosistinüri olarak adlandırılan ağır hiperhomosisteineminin en sık karşılaşılan genetik nedenidir. Bu enzim geninde en yaygın görülen mutasyon 844 ins 68'dir. Konjenital homosistinüri; otozomal resesif geçişli bir hastalık olup 1/200000 doğumda görülür. Bu hastalığın homozigot formunda Hcy düzeyi 400 µmol/L'ye kadar çıkabilir (D Angelo 1997). Heterozigot formu yaklaşık %1 ile %2 sıklıkta ortaya çıkar ve hiperhomosisteinemi düzeyi daha az yükselir (Clarke 1991, Malinow 1989, Frosst 1995).

Hiperhomosisteineminin bir diğere yaygın nedenide CBS'e göre daha kötü prognoza sahip olan MTHFR enzim eksikliğidir. MTHFR' nin homozigot formu nadir görünen ve otozomal resesif geçen bir hastalıktır. Bu hastalığın etkin bir tedavisi yoktur ve ciddi ya da orta hiperhomosisteinemi ile erken ölümler görülür. MTHFR geninde alanin yerine valin aminoasitinin şifrenemesine neden olan en yaygın mutasyon 677'nci kodondaki CT değişimidir. Bu polimorfizmin homozigot sıklığı %5-10 oranındadır. C677T homozigot mutasyonlu hastalarda plazma homosistein seviyesi genelde 20-40 µmol/L ve enzim aktivitesi %20'nin altındadır (Frosst 1995).

Bir diğere genetik hiperhomosisteineminin nedeni ise MS enzim eksikliğidir. MS genindeki mutasyon tromboembolik olaylar için genetik bir risk faktörü olarak karşımıza çıkar. MS enzim genindeki mutasyonlar popülasyonlar arasında homojen bir dağılım gösterir ve bu enzim geninde en yaygın olarak A2756G mutasyonu görülür. MS enziminin CBS enzimine zıt olarak artmış oksidatif strese aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Ogier de Baunly 1998).

2.3.4.3. Klinik Hastalıklar, Kullanılan İlaçlar ve Toksinler

B12 ve folat eksikliği hiperhomosisteineminin temel nedenidir. Hiperhomosisteinemi bazı ilaçlarla özellikle homosistein metabolizmasını etkileyen vitaminlerle azalır (Temel ve Özerol 2002). Ancak Metotreksat, fenitoin, kolestipol ve niasin folat metabolizmasını etkileyerek, nitröz oksit vitamin B12 metabolizmasını bozarak, Teofilin ve sigara, Piridoksal metabolizmasını antagonize ederek Hcy seviyelerini arttırır (Vermaak WJ. 1990).

2.3.4.4. Fizyolojik Nedenler

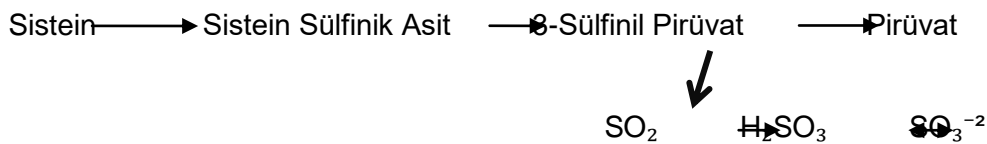
Plazma Hcy konsantrasyonunun yaş ve cinsiyet ile yakından ilişkisi vardır (Cito 2010). Sağlıklı kişilerde Hcy düzeyi orta yaşlara kadar sabitken özellikle 40 yaşından sonra hızlıca yükselir. Bu artış renal fonksiyon ve enzim düzeylerinde azalmayla ilişkili olabilir. Renal fonksiyon hiperhomosisteineminin güçlü bir göstergesidir. Bu, minör olan üriner ekstraksiyondan ziyade renal metabolizmayla ilgili olabilir. Renal fonksiyonlardaki fizyolojik azalma kısmen yaşın etkisini de açıklayabilir. Ayrıca yaşlılarda yükselmiş Hcy seviyesi ile kardiyovasküler olaylarda ki artış arasında da bağlantı vardır (Refsum 1998). Genç hastalarda homosisteinemiden kaynaklı hastalıkların genetik olma olasılığı daha yüksektir. Bununla beraber yaşın ilerlemesiyle ortaya çıkan, homosisteinemiden kaynaklanan hastalıkların nedeni genellikle edinseldir (Henry 1998).

2.4. Sülfid (SO_3^{-2})

Sülfür içeren aminoasitlerin metabolizması sırasında vücut içinde sürekli oluşturulan sülfid yaygın bir şekilde koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca vücutta Hcy metabolizması sırasında sisteinden oluşan nörotoksik bir anyondur. Sülfidin bu toksik etkilerinden korunmak için vücuda alınınca sülfid oksidaz (SOX) enzimi tarafından sülfat iyonuna yükseltgenir (Lester MR. 1995).

2.4.1. SO_3^{-2} 'in Eksojen ve Endojen Kaynakları

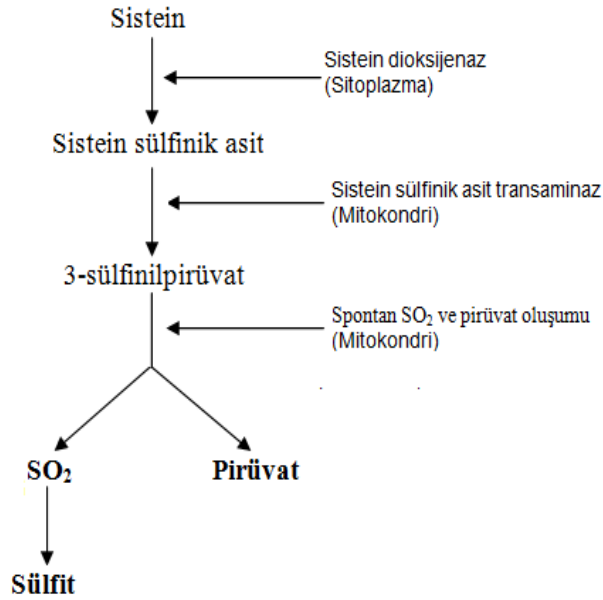
Normalde SO_3^{-2} in hücre içi konsantrasyonu SOX enzimi tarafından sülfata oksitlendiği için düşüktür (Wouters MG. vd. 1995). SOX enziminin bu faaliyeti olmasaydı sülfür içeren aminoasitlerin ve diğer sülfürlü bileşiklerin normal katabolizmaları sırasında ortaya çıkan SO_3^{-2} , hücre içi konsantrasyonu çok fazla arttıracaktır. Endojen kaynakların en önemlilerinden biri sistein katabolizmasıdır. Bu olay sistein dioksijenaz (CDO) ile sistein sulfinik aside çevrilmesi ile başlar. Son aşamada bu molekül spontan olarak pirüvata ve SO_2 dönüşür (Gunnison 1987, Cooper 1983). Daha sonra ise SO_2 tan sülfid meydana gelir. Şekil 2.5.'te sistein katabolizması sonucu oluşan sülfid verilmiştir. Sistein ayrıca metionin katabolizması sırasında oluşan sülfidin de kaynağıdır. Stoplazmada gerçekleşen birtakım enzimatik olaylar sonucu metionin sistatyonine dönüşür. Sonra sistatyonin γ -ligaz enzimi ile sistatyonin sisteine dönüşür (Wouters MG. Vd. 1995). Şekil 2.6.'da metionin katabolizması sırasında oluşan sülfid gösterilmiştir. Bir diğer eksojen kaynak ise Cys katabolizması sırasında oluşan SO_3^{-2} 'dir. Sülfid oluşumunda en çok kullanılan yol Cys katabolizmasıdır. Bu reaksiyon Cys' in, sistein sülfid asite oksidasyonu ile başlamaktadır.



Yukarıda gösterildiği gibi son olarak oluşan SO_2 , hidrasyon ve protonun ayrılması ile SO_3^{-2} ' e dönüşür (Wouters MG. Vd. 1995).

SO_3^{-2} eksojen kaynaklarına baktığımız zaman ise en çok karşımıza çıkan SO_2 ' li kirliliği ile hava ile alınan SO_3^{-2} olduğunu görüyoruz. Havadaki SO_2 ' in çok büyük bir kısmını fosil enerji kaynaklarının yakılmasına bağlı olarak atmosfere katılan SO_2

oluşturur (Amdur 1969). Diğer eksojen SO_3^{-2} kaynağı ise kullanılan ilaçlardır. Epinefrin, lokal anestezikler, kortikosteroidler, antibiotikler, anajezikler gibi ilaçlarda kullanılmaktadır (Simon 1986). SO_3^{-2} , renk ve kıvam koruyucu olmasından ve antimikrobik etkisinden dolayıda gıda sanayinde kullanılmaktadır (Çiftci H. vd. 2009, McEvily 1992).



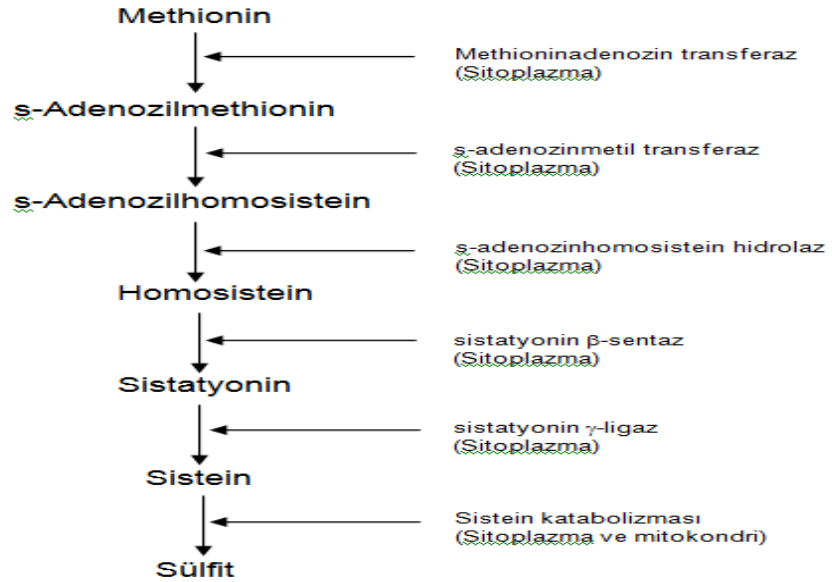
Şekil 2.5. Sistein katabolizması esnasında sülfir oluşumu (Finkelstein JD. ve Martin JJ. 2002).

2.4.2. SO_3^{-2} Toksisitesi

SO_3^{-2} günlük alımı maruz kalınan eksojen kaynaklardan dolayı oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Vücudumuzda SO_3^{-2} ve metabolizmasındaki ara ürünlerden oluşan serbest radikaller, hücredeki nükleik asitler, protein ve lipitleri de kapsayan çeşitli sıvısal ve hücresele bileşenlerle reaksiyona girerek toksisiteye neden olabilmektedir. SO_3^{-2} 'in nörotoksik etkileri nöronlarda çok düşük dozlardaki birikimi ile oluşabilmektedir. SO_3^{-2} 'in genetik enzim yokluğuna bağlı şiddetli nörolojik disfonksiyonlara, mental gerilik ve erken ölüme (Cecil R. 1963), görsel ve somatosensoryel uyarılma potansiyellerinde latens uzamasına (Hoffer LJ. 2005, Reist M. 1998) ve hücre canlılığı üzerine olumsuz etkileri birçok çalışmada belirtilmiştir (Küçükkatay V. 2008, Oztürk OH. 2006).

Genetik materyalde sitozin ve urasil bazları ile reaksiyona girerek hasar ve mutasyonlara sebebiyet verdiği, lipit ve proteinler ile reaksiyona girdiği gösterilmiştir (Southernland 1982, Hayatsu 1972, Rencuzogullar 2001, Shi 1994, Cecil 1963). Beyinde SO_3^{-2} nörotoksitesine bağlı hipopokampal CA1 ve CA3-2 bölgelerinde

piramidal nöron kayıpları gösterilmiştir. SO_3^{-2} in Na-K-ATP az aktivitesini değiştirmedeği ve lipit peroksidasyonunda artışa, antioksidan enzimlerin etkisinde azalışa, oksidatif stresin indüklenmesine, beyin beyaz cevherinde miyelinizasyon kaybına ve nöron ölümlerine yol açtığı bildirilmektedir (Carson NA., 1963, Heafield MT.,1990).



Şekil 2.6. Metionin katabolizması esnasında sülfid oluşumu (Finkelstein JD, Martin JJ. 2002).

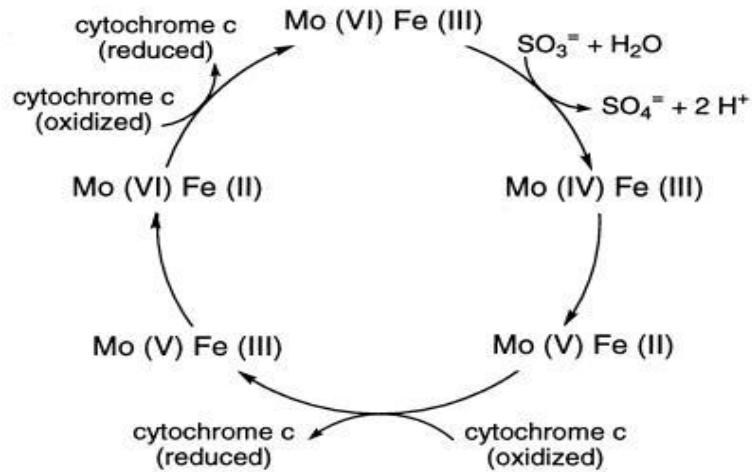
2.4.3. SO_3^{-2} 'in Oksidatif ve Oksidatif Olmayan Metabolizması

SO_3^{-2} e maruz kalındığında SO_3^{-2} 'in detoksifiye edilmesi gerekir. Bunun için oksidatif olmayan SO_3^{-2} metabolizması ve oksidatif SO_3^{-2} metabolizması olmak üzere 2 temel yolak vardır.

Oksidatif olmayan SO_3^{-2} metabolizmasında SO_3^{-2} 'in detoksifikasyonunda sülfitten S-sülfonat oluşturmak için $(\text{R-S-S-R} + \text{SO}_3^{-2} \longrightarrow \text{R-S-SO}_3^{-2} + \text{RS})$ sülfid, sistin ve okside glutatyon (GSSG) gibi proteinlerle disülfid bağları aracılığı ile reaksiyona girer (Finkelstein JD, Martin JJ. 2002). Bunun dışında tiyosülfat ile idrardan küçük miktarda atılabilir. Burada tiyosülfat redüktaz enziminin büyük rolü vardır (Finkelstein JD, Martin JJ. 2002).

Ancak SO_3^{-2} 'in detoksifikasyonundaki temel mekanizma oksidatif metabolizmadır. Bu metabolizmada yer alan olan SOX enzimi eksojen ve endojen SO_3^{-2} in sülfata oksidasyonunu sağlayan son basamakta görev alır. Normalde idrar ile atılan inorganik sülfatın yaklaşık % 90'ı SOX enzim aktivitesinden kaynaklanır. SO_3^{-2} ,

enzimin aktif bölümüne bağlanarak molibdenyumun iki elektron kaybetmesi ile sülfata dönüşür (Lussier S. Vd.1996). SOX enzimi molibdenyum kofaktörüdür (Catoni GL.1953, Andreotti F. vd. 2000, Kolling J. vd. 2011). Şekil 2.7. Sülfite oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonun göstermektedir (Rees MM. 1993). SOX enzimi birçok dokuda bulunsa da SOX aktivitesinin en yüksek olduğu dokular karaciğer, böbrek ve kalp dokularıdır. Beyin, dalak ve testis dokusunda ise çok düşük oranda bulunmaktadır (Aksoy Ş.N 2006).



Şekil 2.7. Sülfite oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonun şematik gösterimi (Rees MM. 1993).

2.5. Hipotezler

Çalışmamız aşağıdaki hipotezleri deneysel çalışmalarla aydınlatılabilmek için planlanmıştır.

1. Nörodejeneratif hastalıklarda homosistein artışının direkt toksik etkisinden ziyade, nöronların çeşitli toksik etkilere karşı savunmasız kalmasına neden olur.
2. Nörodejeneratif hastalıklarda homosistein artışı ile beraber artmış sistein azalmış sülfat düzeyi, transsülfürasyon basamağında bir bozulmanın varlığını gösterir.
3. Transsülfürasyon yolağındaki bozulma nörodejeneratif hastalıklarda çeşitli patolojilerle izlenen toksisitenin önemli bir komponentidir.
4. Homosisteine atfedilen nörotoksitede sülfite molekülünün olası katkısı izlenen nörotoksitede ilk defa ortaya konan biyokimyasal bir yoldur.
5. Homosistein düzeylerinin artışına sülfite molekülündeki artışın da eklenmesi nörodejeneratif rahatsızlıkların tanısında önemli bir belirteç olarak kullanılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hastaların Belirlenmesi ve Ön Çalışma

“Alzheimer hastalığında Sistein Katabolizması: Nörodejenerasyon da Sülfid Molekülünün Olası Rolünün Araştırılması” başlıklı çalışma etik açıdan uygun olup, yapılmasına Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu tarafından 07/01/2014 tarihli ve 01 nolu oturumunda onay verilmiştir (2014SBE017). Çalışma klinik değerlendirme ve nöropsikolojik testler sonucunda özel yaşlı bakım evlerinde kalan Diagnostic and Statistic Manuel of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM- IV) kriterlerine göre Alzheimer tipi demans tanısı alan hasta grubu ve sağlıklı kontroller üzerinde gerçekleştirilmiştir. Gruplara eğitim düzeyine göre standardize edilmiş mini mental test uygulanmış, sonuçları psikiyatri uzmanı tarafından incelenip değerlendirilmiştir.

Araştırmaya dahil olma kriterleri:

1) Mini Mental Durum Testi ölçümlerinin; kontroller için 28-30/30, hastalar için için <24 olması.

Hasta dışlama kriterleri:

1) İnme yada travma geçirmiş, epilepsisi ya da bilişsel işlevleri etkileyen nöropsikiyatrik rahatsızlığı olan hastalar.

Çalışmaya alınan kişilerden biyokimya ve hemogram tüplerine toplam 14 ml kan alınmış, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji laboratuvarına hızlıca buzun içerisinde getirilip 7000 RPM'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Biyokimya tüplerinden elde edilen serum ve hemogram tüplerinden elde edilen plazma örnekleri ependorfların içerisine 1'er ml olarak konulup çalışılacak zamana kadar -80 derecede muhafaza edilmiştir.

3.2. Standardize Mini Mental Test (SMMT)

Standardize Mini Mental Test ilk kez Folstein ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Test global olarak bilişsel düzeyin saptanmasında kullanılabilir, kısa, kullanışlı ve standardize bir metottur. Mini Mental Test, kısa bir eğitim almış hekim, hemşire ve psikologlarca 10 dakika gibi bir süre içinde, poliklinik koşulları ya da yatak başında uygulanabilir bir testtir. Yönelim, kayıt hafızası, dikkat ve hesaplama, hatırlama ve lisan olmak üzere beş ana başlık altında toplanmış on bir maddeden oluşmakta ve toplam puan olan 30 üzerinden değerlendirilmektedir. Türkçe geçerlik ve güvenilirlik çalışması Güngen ve ark. tarafından yapılmıştır. Geçerlik ve güvenilirlik çalışmasında 23/24 eşik değeri SMMT'in Türk yaşlılarında hafif demansın tanısında oldukça yüksek duyarlık ve özgüllüğe sahip olduğu bulunmuş. Uygulayıcılar arası güvenilirlik incelemesinde r: 0,99, kappa değeri ise 0,92 olarak elde edilmiş.

3.3. Çalışmalarda Kullandığımız Cihazlar ve Kimyasallar

Tablo3.1. Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	Markaları
Santrifüj	Hettich Universal 320
Santrifüj	Hettich Mikro 200
Otomatik Mikropipetler (10,100,1000ml'lik)	Axygen
Biyokimya Tüpü	Brant
Vorteks	Heidolph
Plate okuyucu	thermo

3.4.Total Oksidan Düzeyi (TOD) Ölçüm Yöntemi

Ölçümün prensibi örneğin içindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyon dönüşünü sağlaması ve bunun da asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girerek absorbands artışına sebep olmasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak izlenen absorbands artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru

orantılıdır. Grupların total oksidan düzeyi ticari bir kit (TOD, Rel Assay) aracılığıyla ölçüldü ve $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein başına ifade edildi. Yöntem özetle; 96 kuyucuklu plate her kuyucukta 215 μL olacak şekilde kit içindeki reagent 1'den koyuldu. Üzerine ilk iki kuyucuğa kit içerisindeki standart solusyonundan, diğer kuyucuklara numunelerden her numune için 2 kuyucuk olacak şekilde 30 μL koyuldu. ELİSA Reader ile 530 dalga boyunda okundu. Elde edilen değerler 1. absorbans ölçümü olarak kaydedildi. Daha sonra her bir kuyucuğun üzerine 10 μL reagent 2 den koyularak 10 dk beklendi ve ELİSA Reader ile 530 dalga boyunda okundu ve elde edilen değerler 2. absorbans ölçümü olarak kaydedildi. Örneklerin TOD değeri ise aşağıdaki formüle göre hesap edildi.

$$\text{TOD Değeri} = \frac{\Delta \text{ absorbans örnek}}{\Delta \text{ absorbans standart}} \times 20$$

3.5. Total Antioksidan Düzeyi (TAD) Ölçüm Yöntemi

Ölçümün prensibi örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi-yeşil ABTS radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Örneğin absorbansındaki değişiklik onun antioksidan düzeyi ile orantılıdır. Çalışma gruplarımızdaki total antioksidan düzeyi ticari bir kit (TOD, Rel Assay) aracılığıyla ölçüldü. Sonuçlar $\mu\text{mol Equiv/mg}$ olarak ifade edildi. Yöntem özetle, 96 kuyucuklu plate her kuyucukta 215 μL olacak şekilde kit içindeki reagent 1'den koyuldu. Üzerine her numune için 2 kuyucuk olacak şekilde 14 μL koyuldu ve ELİSA Reader ile 660 dalga boyunda okundu. Elde edilen değerler 1. absorbans ölçümü olarak kaydedildi. Daha sonra Her bir kuyucuğun üzerine 30 μL reagent 2 den koyularak 10 dk beklendi ve ELİSA Reader ile 660 dalga boyunda okundu ve elde edilen değerler 2. absorbans ölçümü olarak kaydedildi. Kit manueline göre kitle birlikte verilen standartlarda çalışılarak, TAD düzeyi aşağıdaki formüle göre hesap edilmiştir. Total antioksidan seviye ölçümünün kısa sürmesi, kolay uygulanabilmesi, güvenilir ve duyarlı olması, yüksek doğrusalılık göstermesi, serum ve EDTA'lı, sitratlı, heparinli plazma örnekleriyle, plevra sıvısı, beyin omurilik sıvısı, amnios sıvısı, semen plazması, tükürük ve idrar gibi

vücut sıvılarında, doku örneklerinde, bitki ve gıda ekstraktlarında ve yağlarda çalışılabilme gibi avantajları vardır.

$$\text{TAD Değeri} = \frac{[(\Delta \text{ abs std1}) - (\Delta \text{ abs örnek})]}{[(\Delta \text{ abs std1}) - (\Delta \text{ abs std 2})]}$$

3.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Oksidatif stres indeksi, oksidatif stres derecesinin bir göstergesidir ve aşağıdaki formül uyarınca total oksidan seviyenin total antioksidan seviyeye bölünmesinin 100 ile çarpılması ile elde edilmiştir.

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

3.7. Sülfat Ölçüm Yöntemi

Biz çalışmalarımız için hazır bir kit olan Sulfate Assay Kit (Quantichrom DSFT 200, Bioassay systems) kullandık. Bu kit plazma, serum ve idrar gibi biyolojik sıvılarda sülfat konsantrasyonunu ölçmek için tasarlanmıştır. Ölçüm özetle aşağıdaki şekilde çalışılmıştır.

Standart için kit içerisinde bulunan sülfat standartı (2 mM) kullanılmıştır. Standart seri dilüsyonlara uğratarak standart grafiği elde edilmiştir. Çalışacağımız örneklerden 400 µl ependorf tüplerin içerisine konmuş, üzerine 200 µl TCA koyup 5 dk 14000 rpm'de santrifüj edilerek deproteinize edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen

süpernatantdan her numune için 2 kuyucuk olacak şekilde 200 µL koyularak üzerine 100 µl çalışma reaktifi ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dk daha inkübasyonu takiben ELİSA Reader ile 600 nm dalga boyunda okundu. Plazma sülfat düzeyi elde edilen absorbans değerlerinden aşağıdaki formüle göre hesap edilmiş ve mM cinsinden ifade edilmiştir.

$$\text{Sulfat (mM)} = (\text{ODörnek} - \text{ODH}_2\text{O}) / \text{slope}$$

3.8.Plazma Sülfat Ölçümü

3.8.1.Kimyasal Maddeler

Sodyum sülfat, tris, monobromobiman, Tris-HCl ve sodyum hidroksit Sigma-Aldrich'den temin edildi. Sodyum bor hidrid, Merck'den temin edildi. Deneylede çözeltilerin hazırlanması amacıyla kullanılan saf su Milli-Q saflıkta olup EASY püre RF cihazı kullanılarak elde edildi.

Kimyasal çözücü olarak HPLC saflıkta formik asit (Sigma-Aldrich, France), perklorik asit (Sigma-Aldrich, France), asetonitril (Sigma-Aldrich, France), hidroklorik asit (Merck, Germany) ve formik asit (Riedel-de Haen, Germany), etil asetat (Sigma-Aldrich, France), Amonyum format (Sigma-Aldrich, France) kullanıldı.

3.8.2. Cihazlar

Çalışmada kromatografik ölçümler, ultra performanslı sıvı kromatografi (agilent technologies 1100 series) – tandem kütle spektrometresi (UPLC-MS/MS) (agilent 6400 series triple quadrupole b.07.10) kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada pH metre (schott), santrifüj (hettich,16000rpm), terazi (metler toledo ad 104-5), çalkalamalı su banyosu (nüve) karıştırıcı vorteks (ika) ve etüv (memmert) cihazları kullanıldı.

3.8.3.Ultra Performanslı Sıvı Kromatografi–Tandem Kütle Spektrometresi (UPLC-MS/MS) Yöntem Şartları

MRM modunda pozitif Elektrosprey İyonizasyon (-ESI) kullanarak Ultra Performanslı Sıvı Kromatografi – Tandem Kütle Spektrometresi (UPLC-MS/MS) bir kromatografi yöntemi geliştirilmiştir (Tablo 3.2). Kromatografik analiz, UPLC C18 (50 mm × 2.1mm, 1.8 µm) kolonunun %0.1 formik asit içeren asetonyril ve suda %0.1 formik asit ve 1 nM amonyum format içeren hareketli faz ile basamaklı gradiyent sistemi kullanarak elue edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Plazmada sülfitin belirlenmesine yönelik uygulanan kromatografik yöntem şartları sırasıyla aşağıda verildi.

Tablo 3.2. Ultra performanslı sıvı kromatografisinin çalışma şartları.

UPLC ŞARTLARI	
Kolon	ZORBAX Eclipse Plus C ₁₈ (50 mm × 2.1mm, 1.8 µm)
Dedektör	Tandem MS
Mobil faz	A: %0.1 formik asit içeren 1 mM amonyum format sulu çözeltilisi B: %0.1 formik asit içeren asetonitril 0-1 dakika %100 A, 1-1.10 dakika %100 B, 1.10-5 Dakika %100 B, 5-5.10 Dakika %100 A, 5.10-6 Dakika %100 A
Kolon sıcaklığı	Değişken
Kolon akış hızı	0.3 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	5 µL
MS/MS ŞARTLARI	
İyon kaynağı	Pozitif ESI
Fragmentor Voltage	120 V
collision energy	20
Drying gas flow	10L/min
Nebulizer	450 psig
ESI needle voltage	5000 V
Drying gas temperature	400°C
MRM ions	415 → 193 (sülfid dibiman)

3.8.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Sodyum Sülfid Stok Çözeltisi

Sodyum sülfid stok çözeltisi (1 mmol/L) için 12.6 mg tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye koyuldu. Bir miktar su ile madde çözölüp 100 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti +4°C'de saklandı.

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

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

0.212 M NaBH₄ Çözeltisi

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

46 mM Monobromobiman Çözeltisi

50 mg monobromobiman tartıldı ve 4 mL'lik balon jøjeye koyuldu. Bir miktar asetonitril ile madde çözölüdü ve 4 mL'ye asetonitril ile tamamlandı.

1.5 mM HClO₄ Çözeltisi

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

3.8.5. Sülfid-Biman Komplekslerin Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Eppendorf tüpüne 100 µL blank plazma örneği koyuldu sülfid için final derişimi 0.5-100 µmol/L (nihayi derişimi 3.3-102.8 µmol/L çünkü çalışılan boş plazma 2.8 µmol/L endojen sülfid içermektedir) olacak şekilde uygun derişimlerde 50 µL sülfid çözeltisi ve 100 µL su eklendi ve karıştıırıldı. Bu karışıma 70 µL 0.212 M NaBH₄ çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkube edildi (plazma proteinlerine bağılı

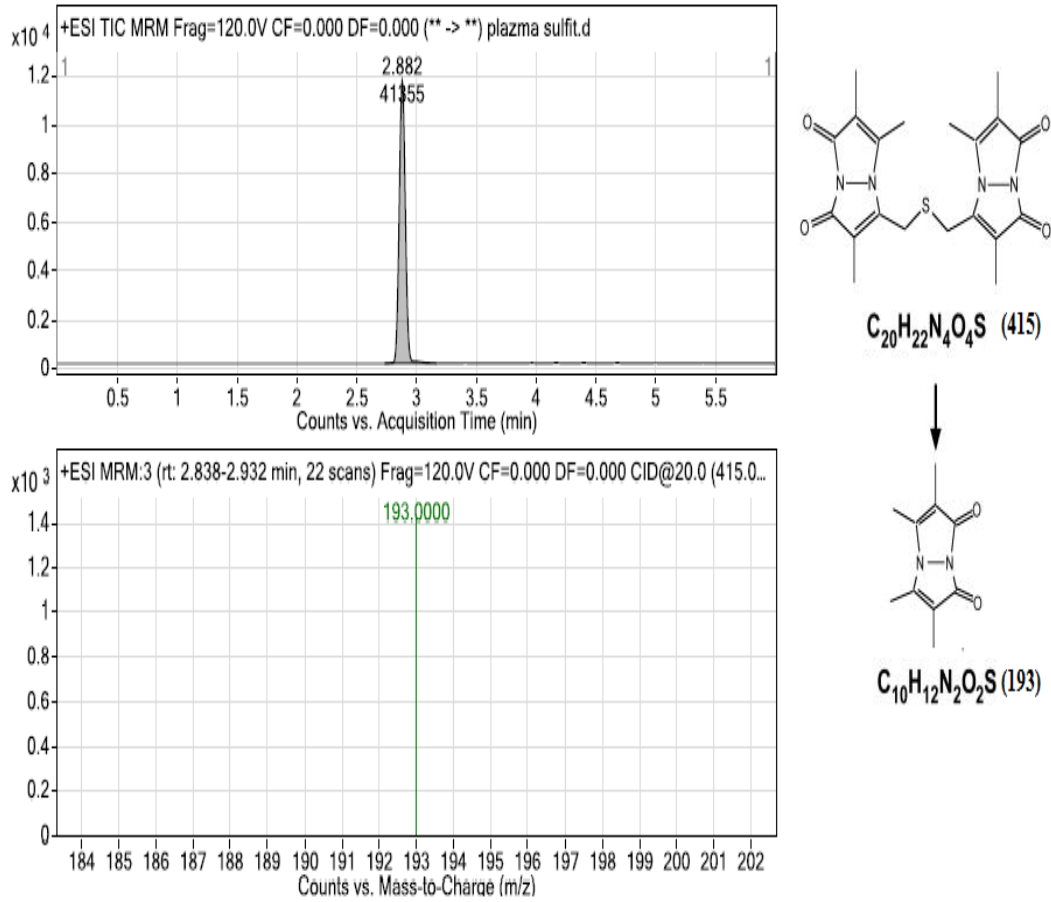
sülfiti serbest hale getirmek için) ve 10 µL 46 mM monobromobiman eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra elde edilen çözelti 10 dakika 42°C de inkube edildi. Daha sonra karışım soğutuldu ve 50 µL HClO₄ çözeltisi ilave edildi. Ağzı kapatılarak 25°C'de 12400 g de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çözelti 20 µL 2 M tris ile nötralize edildikten sonra tekrar 12400 g de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çözülden analit 2 mL etil asetat ile ekstrakte edildi. Daha sonra süpernatant uçuruldu ve daha sonra etil asetatın tamamen uzaklaştırılması için 200 µL asetonitril eklenerek tekrar uçuruldu. Elde edilen kalıntı 1 mL asetonitrilde çözüldü. Daha sonra bu çözülden 100 µL alınarak toplam hacim asetonitril ile 1 mL olacak şekilde viallere koyuldu ve UPLC/MS/MS sistemine 5 µL enjeksiyon yapıldı.

3.8.6 Örnek Hazırlama

Eppendorf tüpüne 100 µL plazma örneği koyuldu ve 150 µL deiyonize su eklendi ve karıştırıldı. Bu karışıma 70 µL 0.212 M NaBH₄ çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkube edildi (plazma proteinlerine bağlı sülfiti serbest hale getirmek için) ve 10 µL 46 mM monobromobiman eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra elde edilen çözelti 10 dakika 42°C de inkube edildi. Daha sonra karışım soğutuldu ve 50 µL HClO₄ çözeltisi ilave edildi. Ağzı kapatılarak 25°C'de 12400 g de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çözelti 20 µL 2 M tris ile nötralize edildikten sonra tekrar 12400 g de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çözülden analit 2 mL etil asetat ile ekstrakte edildi. Daha sonra süpernatant uçuruldu ve daha sonra etil asetatın tamamen uzaklaştırılması için 200 µL asetonitril eklenerek tekrar uçuruldu. Elde edilen kalıntı 1 mL asetonitrilde çözüldü. Daha sonra bu çözülden 100 µL alınarak toplam hacim asetonitril ile 1 mL olacak şekilde viallere koyuldu ve UPLC/MS/MS sistemine 5 µL enjeksiyon yapıldı.

3.8.7. Sülfid-biman kompleksinin belirlenmesi

Plazmaya spike edilip UPLC-MS/MS yöntemi ile elde edilen plazma çözeltilerinde sülfid dibiman kompleksi oluşturularak üçlü kuadrapol tandem MS'de pozitif ESI kullanılarak MRM modunda m/z 451 > 193 geçişi ile saptanmıştır (Şekil 4.1) Elde edilen kromatogramların incelenmesinde sülfid-dibiman kompleksinin alıkonma zaman 2.88 dakika olarak belirlendi.



Şekil 3.1. Kütle spektrometresi ile sülfite dibenzimidazol bileşiğinin belirlenmesi ve parçalanması.

3.9. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 18.0 paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama (\pm) standart hata (SH) olarak verilmiştir. Ölçümler arasındaki bağımsız ikili grup karşılaştırmalarında Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Bağımlı grup karşılaştırmalarında Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değerleri önemli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Deney Gruplarının Demografik Verileri

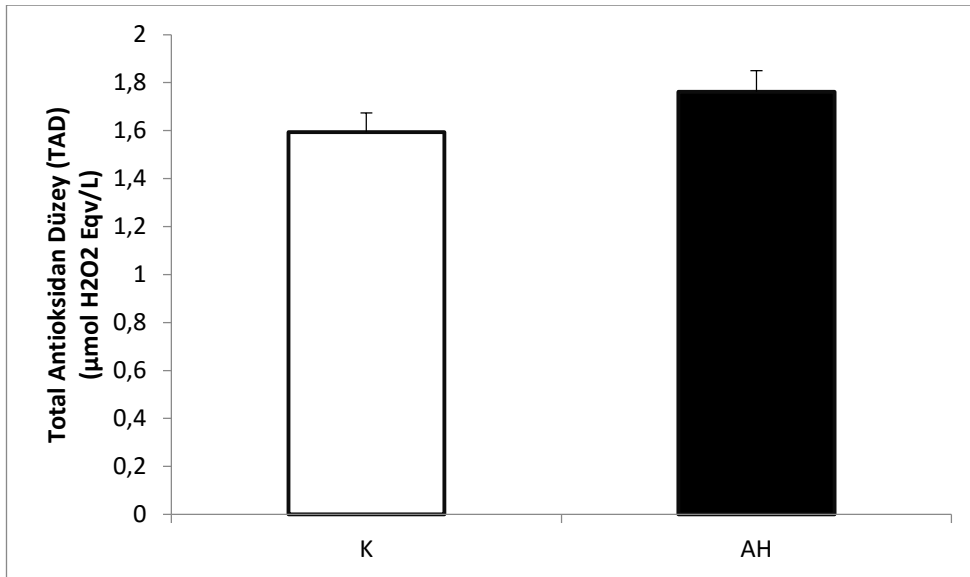
Çalışmamıza katılan kontrol grubundaki bireylerden 10'u kadın ve 21'i erkektir. Alzheimer Hastalığı (AH) grubunda ise 18 kadın ve 14 erkek bulunmaktadır. Kontrol grubunun yaş ortalaması 74 olup, yaş ortalaması 79 olan AH grubuna göre çok az düşüktür, istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark yoktur. Vücut kitle indeksine baktığımızda ise AH grubunun VKİ 21.3, kontrol grubunun vücut kitle indeksi ise 25.8'dir. Ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Standardize minimal skorlarının ortalamasına baktığımızda kontrol grubu 27 ve AH grubunda ise ortalama 4 olarak tesbit edilmiştir. Tablo 4.1. çalışmamızdaki grupların demografik verilerini göstermektedir.

Tablo 4.1. Çalışmaya katılan kontrol ve hasta gruplarındaki deneklerin demografik verileri.

	Kontrol	AH
Yaş	74	79
Cinsiyet	10-K,21-E	18-K, 14-E
VKİ	25,8	21,3
MMS	27	4

4.2.TAD ölçümleri.

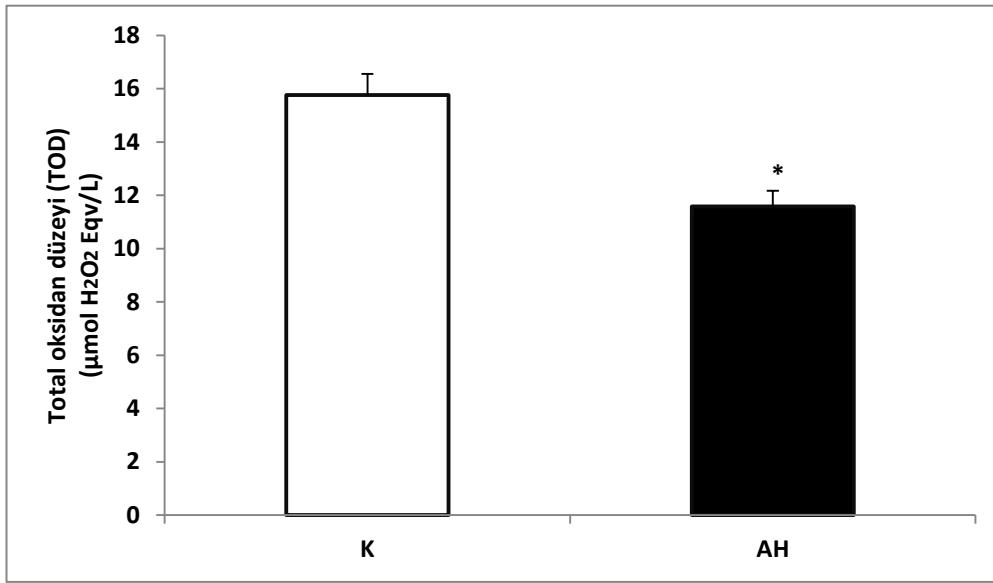
Şekil 4.1 Kontrol ve deney gruplarındaki bireylerin total antioksidan düzeylerini göstermektedir. Deneye katılanların serum örneklerinden ticari bir kit yardımıyla çalışılan total antioksidan düzeyleri açısından bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.1.Kontrol (K) ve Alzheimer (AH) gruplarındaki Total Antioksidan Düzey (TAD) sonuçları. (Kontrol için n=31, AH için n=33)

4.3.TOD Ölçümleri.

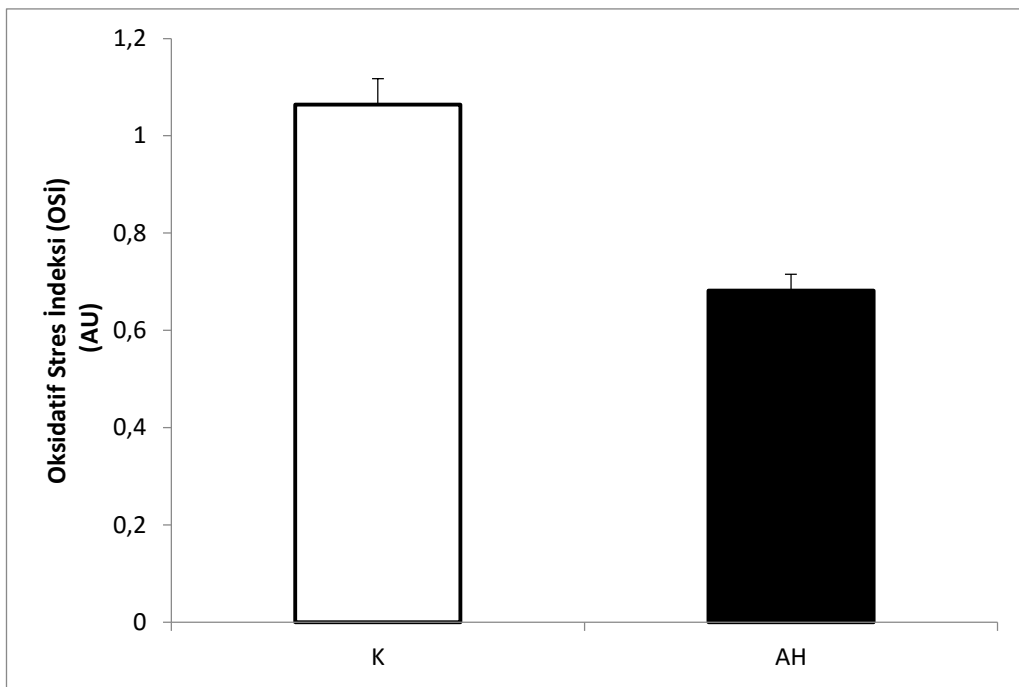
Şekil 4.2. kontrol ve deney grupları arasındaki bireylerin total oksidan düzeylerini göstermektedir. Çalışmamıza katılanların serum örneklerinden ticari bir kit yardımıyla ölçülen total oksidan düzeylerinde kontrol grubunun total oksidan düzeyleri AH grubuna göre daha yüksek ölçülmüştür ($p < 0,05$).



Şekil 4.2.Kontrol (K) ve Alzheimer (AH) gruplarındaki Total oksidan Düzey (TAD) sonuçları. (*: $p < 0,05$ Kontrolden fark., kontrol için $n=31$, AH için $n=33$)

4.4.OSİ Değerleri.

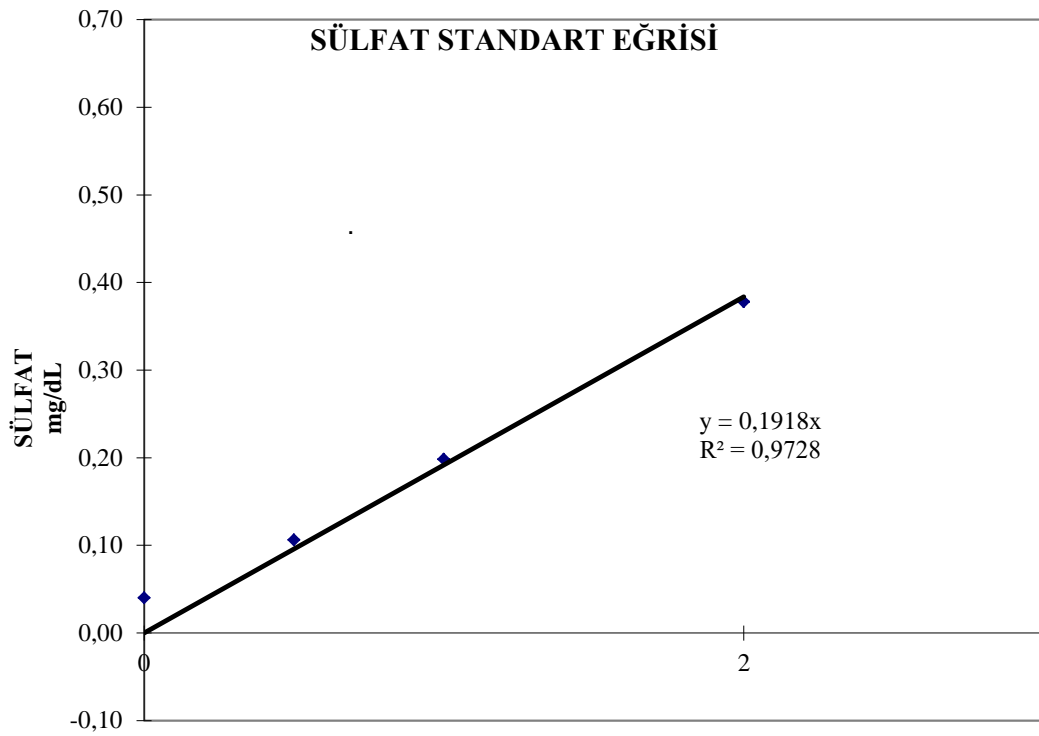
Şekil 4.3. te kontrol ve AH grupları arasındaki bireylerin oksidatif stres indeksleri gösterilmiştir. TAD ve TOD değerleri kullanılarak yapılan matematiksel hesaplama sonucu oksidatif stres indekslerinde gruplar arasında bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.3. Kontrol (K) ve Alzheimer (AH) gruplarındaki oksidatif stres indeksi (OSİ) sonuçları. (Kontrol için n=31, AH için n=33)

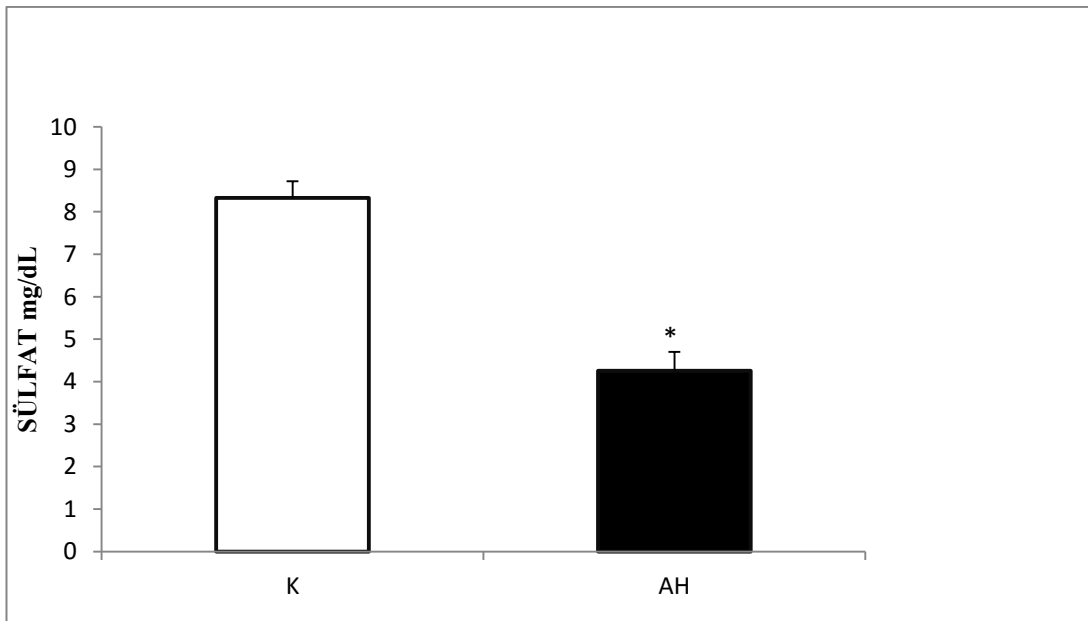
4.5.Sülfat Ölçümleri.

Grafik 4.1. kit içerisindeki prosedüre göre çalışılan standart değerlerinin korelasyon eğrisini göstermektedir. Hesaplamalar sonucu $R^2=0,9728$ bulunmuştur. Deney gruplarının plazmalarının çalışılmasıyla elde edilen sülfat değerleri Grafik 4.1. deki standartlar referans alınarak hesaplanmıştır.



Grafik 4.1. Sülfat Standart Korelasyon Eğrisi.

Şekil 4.4'te kontrol ve AH grubundaki bireylerin çalışılan sülfat değerleri gösterilmiştir. Çalışmamıza katılan bireylerin plazma örneklerinden ticari bir kit yardımıyla ölçülen sülfat değerlerinde, kontrol grubunun sülfat düzeyi AH grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.4. Kontrol (K) ve Alzheimer (AH) gruplarındaki sülfat sonuçları. (*: $p < 0,05$ kontrolden fark., kontrol için $n=26$, AH için $n=27$)

4.6. Sülfite Ölçümleri

Sülfite ölçümlerinde öncelikle sülfitin doğruluk çalışma aralığı belirlendi. Tablo 4.2.'de plazmaya spike edilip ve plazmadan elde edilen plazma çözeltilerinden 0.5-100 $\mu\text{mol/L}$ (endojen sülfite ile nihai derişim 3.3-102.8 $\mu\text{mol/L}$) derişim aralığında

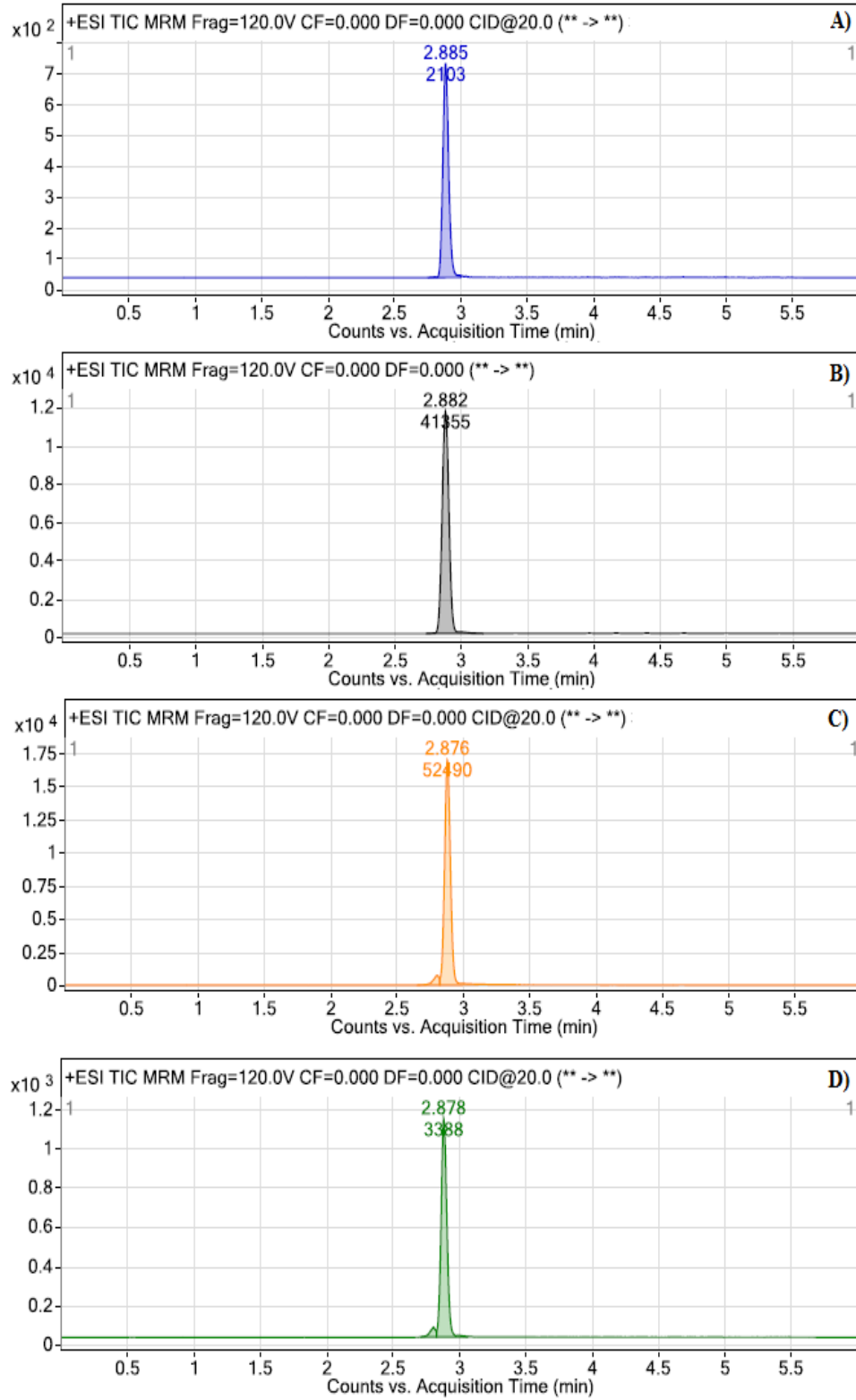
sülfitin derişimine karşı pik alanları grafiğe geçirilerek elde edilen kalibrasyon eğrileri istatistik değerlendirmesi verilmiştir.

Tablo 4.2. Sülfitin plazma çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

Etkin Madde	A ($\mu\text{mol/L}$)	LR ^a	R ²
Sülfit	0.5-100	Y=843.31x +346.93	0.999 8

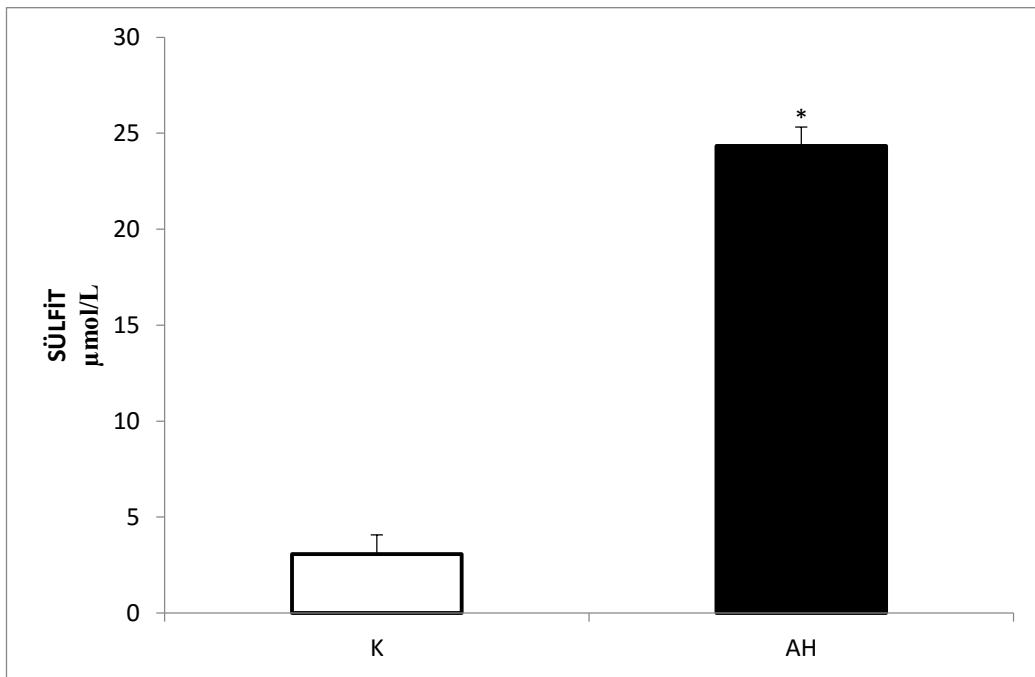
A: Çalışma aralığı, a:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı.

Deney gruplarından alınan plazma örnekleri ekstrakte edilerek UPLC-MS/MS sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı. şekil 4.5. Toplam sülfit analizi sonucu elde edilen kromatogramları göstermektedir.



Şekil 4.5. UPLC-MS/MS kromatogramları: A) Blank plazma B) 50 µmol/L Sülfite eklenen standard plazma çözeltisi C) AH plazma D) K plazma

Şekil 4.6.'da kontrol ve AH grubundaki bireylerin plazmalarında çalışılan sülfid değerleri gösterilmiştir. Çalışmamıza katılan bireylerin plazma örneklerinden UPLC-MS/MS yöntemi ile elde edilen toplam sülfid derişimlerine göre AH grubunun sülfid düzeyi kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4.6. Kontrol (K) ve Alzheimer (AH) gruplarındaki sülfid sonuçları. (*: $p<0.05$ kontrolden fark. (Kontrol için $n=26$, AH için $n=27$))

5. TARTIŞMA

Günümüzde gelişen bilim, iyileşen yaşam şartları ve teknolojinin sağladığı kolaylık ile insan ömrü uzamıştır. Ömür uzunluğunun artması, birçok araştırmaya göre yaşlanma ile ilişkili olan Demans, Alzheimer Hastalığı, Parkinson gibi hastalıklarında toplumda görülme sıklığını arttırmıştır (Billion S vd. 2002). Bu hastalıkların birçok ortak özellikleri vardır. Biyolojik belirteçleri, yaşlanmayla birlikte görülme sıklığı, nedenlerinin tam bilinmemesi, uzun süren prelinik periyotları, aralıksız ilerleyici olmaları ortak özellikleridir (Martignoni E vd. 2007, Muller UJ. vd. 2005).

Bilindiği gibi nörodejenerasyon, nöron ve ilişkili sistemlerin anatomik ve fizyolojik olarak çeşitli nedenlerle etkilenip bozulması olarak tanımlanmaktadır. Doku kaybı ve dejenerasyon terimleri; kalıtsal ve edinsel sinir sisteminin tüm hastalıklarını kapsamaktadır (Du J. vd 2009). Alzheimer hastalığı duyu ve davranış bozukluklarının eşlik ettiği bilişsel işlevlerde ilerleyici hasar ile karakterize olan, tedavisi olmayan önemli bir nörodejeneratif hastalıktır (Maurer K. vd. 1997). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda artmış plazma homosistein düzeyi başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere kardiyovasküler, psikiyatrik ve endokrin gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiş ve bu hastalıkların gelişiminde bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir (Finkelstein JD. 2000).

Alzheimer hastalığındaki bazı olgularda kalıtsal faktörler bulunmaktadır. Böyle durumlarda hastalığın oluşumuna katılan genlerde normal kişilerde bulunmayan mutasyonlar görülmektedir (Mayeux R. vd. 1998). Bu güne kadar AH'nın genetik etiolojisinde yer aldığı düşünülen dört lokus tanımlanmıştır. Bunlar 21. kromozomdaki amiloid prekürsör protein, 14. kromozomdaki presenilin 1 (PS1) geni, 1. kromozomdaki presenilin 2 (PS2) ve 19. kromozomdaki APOE4 lokusudur. APOE4'nin AH yatkınlığı oluşturduğu tarzındaki görüşler birçok yerde kabul görmüştür. APOE4, riski artırıp başlangıç yaşını düşürür. Bu dört lokus (APP, PS1, PS2, APOE4) Alzheimer hastalığının toplam genetik etiolojisinin yarısını oluşturur ve daha netleştirilmesi gereken AH lokuslarının mevcut olduğunu düşündürür (Tanzi 1997).

Alzheimer hastalığının tedavisinde son yıllarda birçok terapötik ajanlar denenmiş ancak hiç birinden büyük faydalar elde edilememiştir. Alzheimer hastalığı için önerilen serebral vazodilatörler, L-dopa, yüksek doz B, C, E vitaminleri ve uyarıcıların tedavi edici olduğuna dair yeterli kanıt yoktur. Oral fizostigmin, kolin ve lesitin uygulamaları da genellikle olumlu sonuç vermemiştir. Sıklıkla kullanılan takrin donepezil gibi asetil kolin esteraz inhibitörlerinin kolinerjik agonistlerin etkilerinin de fazla olmadığı ileri sürülmektedir, ancak bu tip ilaçların 6-12 kullanımından sonra hastanın bağımsız yaşamını sürdürebilme yetisini hafifçe arttırsada hafıza üzerine iyileştirici etkisi belirlenmemiştir (Courtney C. vd. 2004).

Bu çalışmamız ile kükürt içeren aminoasit metabolizmasının bozulduğu gösterilmiş çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda, bu bozukluğun şu ana kadar çalışılmamış yönü olan ve yine kükürt içeren bir aminoasit olan sistein katabolizmasının yerinin araştırılmasını hedefledik.

Plazma homosistein düzeyi başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere kardiovasküler, psikiyatrik ve endokrin gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiş ve bu hastalıkların gelişiminde bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir. Buna rağmen homosistein'in toksik etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca bu güne kadar detaylı olarak çalışılan, artmış plazma homosistein ile nörodejeneratif hastalık arasındaki ilişkinin henüz açıklanmamış pek çok yönü vardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda homosisteinin nöronlar üzerine toksik etkisinin, diğer nörotoksik moleküllerin etkisini arttırmak sureti ile olduğu gösterilmiştir (Schoneich vd 1995). Nörodejeneratif hastalıklarda sisteininde artmış olması göz önüne alındığında homosistein'in nörotoksik etkilerine, sistein katabolizmasının son ürünlerinden biri olan sülfid molekülünün de aracılık edebileceği üzerine hipotezimizi planladık.

Homosistein'in katabolizmasının transsülfürasyon yolağında özellikle de sülfid'in sülfata detoksifikasyon basamağında bir bozukluk veya yetersizlik olabilir. Bunun neticesinde homosistein artışına eşlik eden artmış plazma sülfid düzeyi izlenen nörotoksitenin önemli bir bileşeni olabilir.

Sülfid molekülü pekçok hücrenel yapıyla etkileşerek toksik etkiler ortaya çıkarsa da en belirgin etkisi nöronlar üzerine olanıdır. Sülfidin bu toksik etkilerinden korunmak için vücutta sülfid oksidaz (SOX) enzimi tarafından sülfat iyonuna yükseltgenir (Lester MR. 1995). Bu reaksiyonun önemi genetik olarak bu enzim eksikliğinin gözleendiği vakalar ile anlaşılmıştır. İlk olarak 1967 yılında Mudd ve arkadaşları tarafından rapor edilmiş ve otozomal resesif olarak geçtiği gösterilmiş SOX eksikliği sendromunda (Brosnan JT. ve Brosnan ME. 2006, Rees MM. ve Rodgers GM. 1993) şiddetli beyin hasarı, mental gerilik, körlük, spastik kuadrupleji ve serebral atrofi

gibi çeşitli nörolojik bulgular ile karakterizedir. Sendromun laboratuvar bulgularında ise idrarla yoğun bir şekilde atılan s-sulfosistein, SO_3^{-2} , tiosülfat ve normalden daha az miktarda çıkarılan SO_4^{-2} nedeniyle bozulmuş kükürt metabolizmasını işaret ediyordu.

Sülfid detoksifikasyonunun yapılamaması veya yeterli etkinlikte olmaması sülfid toksisitesine neden olacağı gibi, organizmanın pek çok çevresel toksinin detoksifikasyonu için ihtiyaç duyduğu sülfat molekülünün de yetersizliğine yol açar. Bu durum organizmanın hem endojen hem de eksojen nörotoksik ajanların etkisine açık kalacağı anlamını taşır. Sistein katabolizmasının son ve en önemli ürünü olan sülfat'ın bu yolla oluşmasındaki bir bozukluk bu hastaların sülfid molekülünün zararlı etkisine maruz kalacağı anlamını taşır. Sülfid molekülü nöronlar üzerine son derece toksik bir moleküldür ve detoksifikasyonunun yapılamaması hayatla bağdaşmamaktadır (Reist M. vd. 1998). Tüm bunlar göz önüne alındığında, bu tip rahatsızlıklarda gözlenen nörotoksikite ile olası artmış sülfid düzeyi kolaylıkla ilişkilendirilebilir. Böyle bir ilişkinin kurulmasını sağlayacak çıktılar bu tip hastalıklarda tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Alzheimer Hastalığı gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda hatalı protein üretimi, oksijen radikali yapımında artış, hücre içi kalsiyum artışı gibi mekanizmalarla gerçekleşen apoptozun nöron kaybına yol açtığı gösterilmiştir (Bredesen D.E. vd. 2006). Hücresel düzeyde ciddi miktarda üretilen serbest oksijen radikallerinin yol açtığı toksik etkiler vücuttaki antioksidan savunma sistemiyle yok edilmeye çalışılır. Antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan oksidatif stres, yaşlanma ve birçok hastalığın oluşum sürecinde önemli rol oynar (Demircan G. vd. 2005.)

Oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan singlet oksijen, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi aktive olmuş oksijen türleri oldukça reaktiftir ve organlarda toksik etkilere yol açar (Singal PK. vd. 1998). Serbest oksijen radikalleri, hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürür, membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engeller; çekirdek membranını yararak çekirdekdeki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirir; immün sistemdeki hücreleri yok ederek immün sistemi bozar. Sonuçta, oksidatif stres DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve hastalıkları gibi hasarlara neden olur. Moleküler, hücresel ve doku düzeyindeki oksidatif hasarın en aza inebilmesi için oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge sağlanmalıdır (Demircan G. vd. 2005.).

Süper oksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi çeşitli reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri Alzheimer gibi pek çok nörodejeneratif hastalığın patogenezinde rol almaktadır (Reynolds A. vd. 2007). ROT'nin mitekondrial

DNA'ya zarar verip kendinin üretimini daha da arttırarak dejenerasyon döngüsünün tetikleyicisi ve devam ettiricisi olduğu düşünülmektedir. Beyin yüksek oksijen tüketimi, kolayca okside olan poliansatüre yağ asitleri açısından zengin bir doku olmasına ilaveten, düşük antioksidan kapasitesi açısından da oksidan strese karşı oldukça hassastır (Floyd R. A. 1999).

Sisteini hızlı kullanan glutasyon siklusunun olduğu böbrek, barsak, karaciğer ve pankreas gibi dokularda aynı zamanda transsülfürasyon yolunun her iki enzimide bulunur (Brosnan 2006). Ancak beyin dokusunda CBS enzimi bulunup CGL enzimi bulunmadığından dolayı sistatyoninin birikir ve glutasyonun sentezi için glial sistein kullanılır. Bu nedenle santral sinir sistemi oksidatif strese diğer dokulara göre daha duyarlıdır (Finkelstein 2000).

Farklı oksidan türlerin çeşitli doku ve/veya biyolojik sıvılardaki konsantrasyonları ayrı olarak ölçülebilir fakat ölçümler, zaman alan, yoğun iş gücü gerektiren, pahalı ve karmaşık teknikler gerektirir. Bu nedenle araştırmamızda ölçümünün kısa sürmesi, kolay uygulanabilmesi, güvenilir ve duyarlı olması, yüksek doğrusallık göstermesi, serum ve plazma örnekleriyle, doku örneklerinde çalışılabilme gibi avantajları olmasından dolayı Total Oksidan Düzeyi (TOD) ölçümü yaptık. Bunun yerine bir numunenin toplam antioksidan kapasitesi ölçülür.

Ölçümün prensibi örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi-yeşil ABTS radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Örneğin absorbansındaki değişiklik onun antioksidan düzeyi ile orantılıdır.

Total antioksidan seviye ölçümünün kısa sürmesi, kolay uygulanabilmesi, güvenilir ve duyarlı olması, yüksek doğrusallık göstermesi, Serum ve EDTAlı, sitratlı, heparinli plazma örnekleriyle, plevra sıvısı, beyin omurilik sıvısı, amnion sıvısı, semen plazması, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarında, doku örneklerinde, bitki ve gıda ekstraktlarında ve yağlarda çalışılabilme gibi avantajları vardır.

TOD düzeyi açısından beklenenin aksine deney grubunda değil, kontrol grubunda istatistiksel olarak artmış bir değer bulduk. Bu haliyle alzheimer hastalarında oksidan stresin var veya yok olduğu söylenemez. Serbest radikaller çeşitli metabolik ve fizyolojik süreçlerde üretilirler. Bu zararlı ürünlere karşı biyolojik sistemlerin enzimatik ve non enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları vardır.

Oksidan ve antioksidan defans sistemleri arasında normal şartlarda mükemmele yakın bir denge durumu söz konusudur. Pek çok hastalık durumunda bu dengenin oksidanlar lehine bozulduğu ve oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Freeman BA., Crapo JD. 1982). Bu yüzden TAD ve OSİ ile birlikte değerlendirildiğinde kontrol ve AH grubunda oksidan stres açısından bir fark bulunamamıştır.

SO_3^{-2} 'in toksik etkilerinin ortaya çıkmasındaki en önemli mekanizmanın kükürt ve O_2 merkezli radikaller olduğu için ve serbest radikallerin hücre hasarındaki rollerinin büyük olmasından dolayı oksidan stresin rolünü araştırmak için TOS, TAS ve OSİ parametrelerini kullandık. Oksidatif stres açısından AH ve kontrol grubunu karşılaştırdığımızda ise TAD değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulamadık. TOD değerlerinde ise kontrol grubu AH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek çıktı. OSİ değerinin hesaplanması sonucu AH grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulamadık. Beklentimiz AH grubunun kontrol grubuna göre TAD değerlerinin daha düşük, TOD değerlerinin daha yüksek ve OSİ değerlerinin yüksek olmasıydı. Ancak anlamlı bir fark bulunamadı.

AH toplumda 40 yaşından sonra görülmeye başlansada genelde daha ileri yaşlarda ortaya çıkan bir hastalıktır. Yaş ortalamasının birbirine mümkün olduğu kadar yakın olması için kontrol grubunu da ileri yaşlardaki bireylerden seçtik. Yaş ilerledikçe vücutta antioksidanların azaldığı ve oksidanların birikmeye başladığı bilinmektedir. Bundan dolayı da yaşlı bireylerin vücutlarında oksidatif stres artmaktadır. Ayrıca AH hastası olan grubun tamamı ilginç bir şekilde vücut kitle indeksi bakımından sağlıklı sayılan değerler içindeydi ve AH dışında genel olarak başka hastalıkları da bulunmuyordu. Kontrol grubunun vücut kitle indeksi ortalaması ise aşırı şişman grubundaydı ve neredeyse tamamına yakınında nörodejeneratif rahatsızlık hariç birçok hastalık mevcuttu. Fazla kilonun oksidatif stres üzerine olumsuz etkileri vardır. İlerleyen yaş ile birlikte birçok hastalığın ortaya çıkması kaçınılmaz bir durumdur. Bu yüzden bu yaş ortalamasına sahip hiçbir hastalığı olmayan birey sayısı toplumda çok az olduğundan kontrol grubu oluştururken birçok hastalığı dışlama kriterine koyamadık.

Bunların yanında AH hastası bireylerin sosyal hayattan biraz soyut yaşaması çevreden kaynaklı, oksidatif stresi arttırıcı etkilere karşı azda olsa korunma sağlamış olabilir. Bunların dışında oksidatif stres alınan gıdalarla, çalışılan iş ile yaşanan ortamla ile değişebilmektedir. Bütün bu bilgiler bağlamında baktığımız zaman kontrol grubunda oksidatif stresi arttırıcı daha fazla etkenin olması AH grubu ile kontrol grubu arasında oksidatif stres açısından istatistiksel olarak bir farkın bulunmamasını açıklar.

Çalışmamızda sülfite ölçümleri AH grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek çıktı. Bu bulgu Alzheimer grubunda sülfite düzeyinin kontrole göre 5 kat daha yüksek olması nedeniyle araştırmamızın en çarpıcı sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Kontrol grubundaki değeri literatürle uyumlu olarak bulunmuştur (Kajiyama H. vd. 2000).

Kontrol grubunun sülfat değerleri ise AH grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Sülfitin AH grubunda, sülfatin da kontrol grubunda yüksek olması, AH grubundaki bireylerde sülfitin sülfata detoksifikasyonunda bir sorun olduğunu gösterebilir ve hipotezimizi doğrular nitelikte bir sonuçtur. AH grubunda sülfitin sülfata dönüşmemesindeki sorun büyük ihtimalle sülfitin sülfata dönüşümünde rol alan SOX enzimindeki bir defekten kaynaklanabilir.

Vücutta endojen olarak oluşan sülfid, sülfid oksidaz (SOX) enzimi ile derhal organizmada çeşitli biomoleküllerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alan sülfat molekülüne çevrilmektedir (Cohen HJ. 1971, Hoffer LJ. vd. 2005). SOX enziminin çalışması ile hem endojen olarak yararlı bir bileşik elde edilir (sülfat) hem de son derece toksik yine endojen bir molekül (sülfid) ortadan kaldırılır (Mudd SH vd. 1967). Ayrıca yaşla birlikte SOX aktivitesinin azaldığı bilinmektedir. Bu azalma Alzheimer Hastalarında genetik bir polimorfizme bağlı olarak daha fazla olabilir. Nitekim kanser hastalarında yapılan bir çalışmada tesadüfen bulunan SUOX -628G→A polimorfizminin Alzheimer Hastalarında azalmış aktiviteye sebep olabileceği düşünülmüştür (Steinberg KK vd. 2007).

İnorganik sülfat memeli plazmasında en çok bulunan anyonlardan biridir. Sülfatin insan vücudunda birçok önemli fizyolojik rolü vardır. Ksenobiyotik, steroid, nörotransmitter, detoksifikasyon ve safra asitlerinde aktif görev üstlenir. Sülfat glikozaminoglikanların biyosentezi için gerekli olan sülfat, serebrosid sülfat ve heparin sülfattır. İnsanda kalıtsal osteokondrodizplazi hastalığı proteoglikanlardaki sülfatla ilişkilendirilir. Sülfatin memelilerde homeostazı böbrekler ile düzenlenir. Böbreklerden süzülen sülfatin çoğunluğu da proksimal tübüllerden emilir. Böbreklerden süzülen plazmanın da % 5-20 idrarla atılır.

1962 yılında Carson ve Neil yaptıkları çalışmalarda hastalıklar ve yüksek homosistein seviyeleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır. Mental geriligi olan çocuklardan alınan idrarda homosistein seviyesinin yüksek olduğunu saptamışlardır (Carson ve ark. 1963). Yüksek homosistein seviyesini çocukluk çağı da dahil olmak üzere hastaların %25'inin damar tıkanıklığı sonucu oluşan kardiyovasküler hastalıklardan ölmesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Gibson 1964). Homosisteinürinin nedeninin ise homosistein metabolizmasındaki bazı enzim eksikliklerinden kaynaklandığı bulunmuştur (Gerritsen vd. 1962). 1969'da homosistein, aterosklerozlu hastaların patogeneğinde rol oynayabilecek önemli bir aminoasit olarak ileri sürülmüştür (McCully 1969). 1964'te sistation β sentaz (CBS) enzimindeki genetik eksikliklerin, homosisteinüriye sebep olduğu ve plazma homosistein seviyesini artırdığı tespit

edilmiştir (Mudd vd. 1964). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda homosistein metabolizmasında görev alan metiyonin sentaz (MTS) ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gibi enzimlerde eksikler saptanmıştır (Mudd vd. 1972, McGill vd. 1990, Rozen 1996). 1988 yılında yapılan çalışma da kobalaminin, metil kobalamine dönüşmesindeki bozukluk sonucu MTS aktivitesini azalttığı ve multiple sklerozisi gösteren bulgular elde edilmiştir (Carmel vd. 1988).

Yapılan çalışmalarda nörodejeneratif hastalıkların pek çoğunda homosistein'e ilaveten plazma sistein aminoasidinin arttığı ve sülfat düzeyinin azaldığı bulunmuştur (Heafield MT. vd. 2006. Woolsey PB. 2008).

Sonuç olarak, elde edilen sonuçlar homosisteine atfedilen ancak tam olarak anlaşılamayan nörodejenerasyondaki nörotoksik etkiyi açıklayabilir. Çünkü in vitro olarak toksik etkili bulunan homosisteinin normal plazma düzeyinin 3 katı dozda farelerin dorsal hipokampusüne infüze edilmesi, herhangi bir nörotoksik etki oluşturmamışken, MPTP gibi nörotoksik ajanların etkisini potansiyelize ettiğini göstermiştir (Kruman II vd. 2000).

Nörodejenerasyonda artan homosistein düzeyi beraberinde sülfid miktarını da arttırarak sülfidin nörotoksik etkisini potansiyelize edebilir. Ayrıca birçok nörotoksik ajanın detoksifikasyonu için gerekli sülfatın AH grubundaki bireylerde az olması, bunları toksisiteye daha açık hale getirmiştir denebilir.

6.SONUÇLAR

1) Çalışmamıza 10'u kadın ve 21'i erkek toplam 31 adet sağlıklı kontrol, 18 kadın ve 14 erkek toplam 32 adet Alzheimer hastası denek katılmıştır. Grupların yaş ortalamaları sırası ile 74 ve 79, vücut kitle indeksleri 25.8 ve 21.3 Standardize minimal skorları 27 ve 4 olarak tesbit edilmiştir. Bu değerlerin hiçbirinde istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark yoktur.

2) SerumTOD sonuçları Alzheimer grubunda kontrole göre daha düşük bulunmuşken TAD açısından iki grup arasında bir fark bulunamamıştır.

3) Biyolojik organizmalarda oksidan stresin düzeyini belirlemede bireysel oksidan veya antioksidanların ölçülmesi yerine TOD ve TAD değerlerinden Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplanır. Çalışmamızda OSİ değeri açısından gruplar arasında fark olmadığı saptanmıştır. Bu bulgu aynı zamanda gruplar arasında oksidan stres açısından bir fark olmadığını da göstermiştir.

4) Hipotezimize uygun olarak hasta grubunda yaklaşık 8 kat artmış sülfat düzeyi yine yaklaşık yarıya inmiş sülfat düzeyi bulunmuştur.

Bu sonuçlar literatürde cevabı olmayan nörodejeneratif hastalıklarda sülfat düzeyinin ne olduğu sorusunu yanıtlamıştır. Azalmış sülfat düzeyinin beraberliğinde sülfat molekülünün nörodejenerasyona katkıda bulunan bir biyobelirteç olabileceği sonucuna varılabilir.

7. KAYNAKLAR

Abedinzadeh Z. Sülfür-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. **Can J Physiol Pharmacol** 2001; 79:166-70.

Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. **Cell** 1997; 88:615-26.

Agar A, Kucukatay V, Yargicoglu P, Aktekin B, Kipmen-Korgun D, Gumuslu S, Apaydin C. The effect of sulfur dioxide inhalation on visual evoked potentials, antioxidant status and lipid peroxidation in Alloxan-induced diabetic rats. **Arch Environ Contam Toxicol** 2000; 39: 257-264.

Aksoy ŞN, Geyikli İ, Saygılı Eİ. Sağlıklı Kişilerde Plazma Homosistein Düzeyinin Belirleyicileri. **Türk Biyokimya Dergisi** 2006; 31(4);175-81

Allen H.R., Robert H.B. Adam's and Victor's Pirinciples of Neurolojy 8. Baskı **Güneş Kitabevi** 2006; 895-900.

Amdur MO. Toxicologic appraisal of particulate matter, oxides of sulfur, and sulfuric acid. **J Air Pollut Control Assoc** 1969;19:638-44.

Andreotti F, Burzotta F, Manzoli A, Robinson K. Homocysteine and risk of cardiovascular disease. **J Thromb Thrombolysis** 2000;9;13-21.

Applebaum J.,Shimon H., Sela BA., Belmaker RH., Levine J., Homocysteine levels in newly admitted schizophrenic patients. **J Psychiatr Res** 2004; 38, 413-6.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. **Neurology** 1992; 42(3 Pt 1):631-9.

Ataie A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Hajizadeh Moghaddam A, Ataie R, Nasiraei Moghaddam Sh. An investigation of the neuroprotective effects of Curcumin in a model of Homocysteine - induced oxidative stress in the rat's brain. **Daru** 2010; 18: 128–36.

Bagi Z, Cseko C, Tóth E, Koller A. Oxidative stress-induced dysregulation of arteriolar wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2003;285: H2277-83.

Baydas G, Ozer M, Yasar A, Tuzcu M, Koz ST. Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. **Brain Res** 2005;1046:187-94.

Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. **Neuroscience** 2005; 135:879-86.

Benevenga NJ. Evidence for alternative pathways of methionine catabolism. **Adv Nutr Res** 1984; 6:1-18.

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol** 1973; 232:331-56.

Bolander, C.G. Focus On Homocysteine And The Vitamins Involved In Its Metabolism. **Springer Business Media GmbH** 2002; 262, France.

Boldyrev AA. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. **Review Biochemistry** 2009; 74(6):589-98.

Bolshakov VY, Golan H, Kandel ER, Siegelbaum SA. Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP-dependent late phase of LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus. **Neuron** 1997; 19:635-51.

Bostom, A.G. Lathrop, L. Hyperhomocysteinemia In Endstage Renal Disease: Prevalence, Etiology And Potential Relationship To Arteriosclerotic Outcomes. **Kidney Int** 1997; 52; 10-20.

Bostom AG., Culleton BF., Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease, **J Am Soc Nephrol** 1999; 10, 891-900.

Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. **Cell** 1994;79:59-68

Boztepe Derici Ü, Altok Reis K. Hiperhomosisteinemi ve kronik böbrek yetmezliği. **Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi** 2002; 3:129-34

Böhmer AE, Pochmann D, Sarkis JJ. In vitro effect of homocysteine on nucleotide hydrolysis by blood serum from adult rats. **Chemico-biological Interactions** 2006;160:159-64.

Brattström L, Israelsson B, Lindgärde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. **Metabolism** 1988; 37:175-78.

Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. **Nature** 2006; 19;443(7113):796-802.

Brosnan JT, Brosnan ME, The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview, **J Nutr** 2006;136:1636-40.

Brown, K. Kluijtmans, L. Young, I. McNulty, H. Mitchell, L. Yarnell, J. Woodside, J. Boreham, C. McMaster, D. Murray, L. Strain, J. Whitehead, A., The Thymidylate Synthase Tandem Repeat Polymorphism Is Not Associated With Homocysteine Concentrations In Healthy Young Subjects. **Hum Genet** 2004; 114; 182–185.

- Cabre F, Marin C, Cascante M, Canela EI. Occurrence and comparison of sulfite oxidase activity in mammalian tissues. *Biochem Med Metab Biol* 1990; 43:159–62.
- Carmel, R. Watkins, D. Goodman, S.I. Rosenblatt, D.S., Hereditary Defect Of Cobalamin Metabolism (Cblg Mutation) Presenting As A Neurologic Disorder In Adulthood. *N Engl J Med* 1988; 318 (26); 1738-41.
- Carson, N. Cusworth, D. Dent, C. Field, C. Neill, D. Westall, R. Homocystinuria: A Newborn Error Of Metabolism Associated With Mental Deficiency. *Arch Dis Child* 425.
- Catoni GL. S-Adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 1953;204:403-16.
- Chai GS, Jiang X, Ni ZF, Ma ZW, Xie AJ, Cheng XS, Wang Q, et al. Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine. *J Neurochem* 2013;124:388-96.
- Chamulitrat W. Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase of intestinal lymphocytes produces highly reactive free radicals from sulfite. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 411-21.
- Chiarani F, Bavaresco CS, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wyse AT. Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in brain of rats. *Metab Brain Dis* 2008; 23:123–32.
- Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hiperhomocysteinemi an independent risk factor for vaskuler disease. *N Eng J Med* 1991; 324;1149-53
- Cohen HJ, Fridovich I, Rajagopalan KV. Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J Biol Chem* 1971; 246:374-82.
- Courtney, C., Farrell, D., Gray, R., Hills, R., Lynch, L., Sellwood, E. Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. *Lancet* 2004; 365 (9427), 2105-2115.
- Corrales FJ, Pérez-Mato I, Sánchez Del Pino MM, Ruiz F, Castro C, GarcíaTrevijano ER, et al. Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. *J Nutr* 2002; 132:2377-81.
- Cooper A.J. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:187-222.
- Çiftçi H, Yıldız E, Mercanligil SM. Depresyon Ve Beslenme Tedavisi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2008; 28:369-77.
- De Vigneaud VE. Trial of research in sulfur chemistry and metabolism and related fields. *Cornell university pres* 1932; 135-39.
- Demircan G, Diraman E, Demircan S: Kalp hastalıklarında oksidatif stresin rolü. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi* 2005; 33:488- 492.
- Do KQ, Tappaz ML. Specificity of cysteine sulfinat decarboxylase (CSD) for sulfur-containing amino-acids. *Neurochem int* 1996; 28:363-71.

Due To N Homocystinuria (5,10)-Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. ***Pediat Res*** 6: 395.

Eren İ, Sütçü R, İnanlı İÇ, Özçankaya R, Delibaş N. Alzheimer Hastalarında Kan B12 Vitamini, Folat ve Homosistein Seviyeleri. ***Türkiye'de Psikiyatri Dergisi*** 2007; 9(3):154-9.

Fazio T, Warner CR. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. ***Food Addit Contam*** 1990; 7:433-54.

Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. ***The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*** 2000; 32:385-89.

Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine, pathways and regulation. ***Eur J Pediatr*** 1998; 157:40–44.

Finkelstein JD, Methionine metabolism in mammals. ***J Nutr Biochem*** 1990; (1):228-37.

Finkelstein JD. Regulation of homocysteine metabolism. In: Carmel R, Jacobsen DW (editors). Homocysteine in health and disease. Cambridge: ***Cambridge University Press*** 2001; 92–9.

Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. ***Clin Chem Lab Med*** 2007; 45:1694-99.

Floyd R.A., "Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders," ***Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*** 1999; vol. 222, no. 3, pp. 236–245,

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. ***Lab Invest*** 1982; 47:412–26.

Friedman, A.N. Bostom, A.G. Selhub, J. Levey, A.S. Rosenberg, I.H, The Kidney And Homocysteine Metabolism. ***J Am Soc Nephrol*** 2001; 12; 2181-2189.

Fontcave M, Atta M, Mulliez E. S-Adenosyl methionine: nothing goes to waste Trends ***Biochem Sci.*** 2004; 29:243–49.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. ***Nat Genet*** 1995; 10:111-3.

Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. ***Oxid Med Cell Longev*** 2012; 1-11

Garrett RM, Johnson JL, Graf TN, Feigenbaum A, Rajagopalan KV et al. Human sulfite oxidase R160Q: identification of the mutation in a sulfite oxidase-deficient patient and expression and characterization of the mutant enzyme. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1998; 95:6394-98.

Gerritsen T, Vaughn Jg, Waisman Ha. The Identification Of Homocystine In The Urine. ***Biochem Biophys Res Commun*** 1962; 9:493-6.

Gharib A, Chabannes B, Sarda N, Pacheco H. In vivo elevation of mouse brain S-adenosyl-homocysteine after treatment with L-homocysteine. **J Neurochem** 1983; 40:1110–12.

Ghetti B., Hutton M. ve Wszolek Z.K.: Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 associated with tau gene mutations International Society Of **Neuropathology Press** 2003; FTDP-17T

Gibson WB, Strong FB. Metabolism and elimination of sulphite by rats, mice and monkeys. **Fd Cosmet Toxicol** 1973; 11:185-98.

Giustarini D, Donne ID, Milzani A, Rossi R. Oxidative stress induces a reversible flux of cysteine from tissues to blood in vivo in the rat. **FEBS Journal** 2009; 276:4946–58.

Grieve A, Butcher SP, Griffiths R. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. **J Neurosci Res** 1992; 32:60–8.

Griffiths R, Grieve A, Allen S, Olverman HJ. Neuronal and glial plasma membrane carrier-mediated uptake of L-homocysteate is not selectively blocked by beta-chlorophenylglutamate. **Neurosci Lett** 1992; 147:175–78.

Golembiewski JA, Allergic reactions to drugs: implications for perioperative care. **J Perianesth Nurs** 2002; 17:393-08.

Gunnison AF, Farruggella TJ, Chiang G, Dulak L, Zaccardi J, Birkner J. A Sulphite-Oxidase-Deficient Rat Model: Metabolic Characterization. **Fd Cosmet Toxicol** 1981; 19: 209-20.

Gunnison AF, Jacobsen DW. Sulfite Hypersensitivity, A Critical Review. **CRC Crit Rev Toxicol** 1987; 17:185-214.

Halaby SF, Mattocks AM. Absorption of Sodium Bisulfide from Peritoneal Dialysis Solutions. **J Pharm Sci** 1965; 54:52-5.

Hankey, G. Eikelboom, J.W. Homocysteine And Vascular Disease. **The Lancet**. 1999; 354(31); 407-413.

Harker, L.A. Slichter, S.J. Scott, C.R. Ross, R., Homocysteinemia:Vascular InjuryAnd Arterial Thrombosis. **N Engl J Med** 1974; 291: 537-43.

Hawkins RD, Kandel ER, Siegelbaum SA. Learning to modulate transmitter release: themes and variations in synaptic plasticity. **Annu Rev Neurosci** 1993; 16:625-65.

Heafield MT, Fearn S, Steventon GB, Waring RH, Williams AC, Sturman SG. Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** 1990; 110: 216-220.

Henry J, Barnett JP, Mohr, Bennett M. Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. **Churchill Livingstone** 1998; 3:142-3.

Herrmann W, Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. **Clin Chem Lab Med** 2011; 49:435–41.

Herrmann W, Obeid R. *Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. Clin Chem Lab Med* 2011; 49:435–41.

Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 2003; 14:32–42.

Hoffer LJ. Homocysteine remethylation and trans-sulfuration. Metabolism Sweatt JD. Mechanisms of memory. *Academic Press* 2003; 53:1480-3. San Diego, CA:

Hölscher C, Gigg J, O'Mara SM. Metabotropic glutamate receptor activation and blockade: their role in long-term potentiation, learning and neurotoxicity. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23(3):399-410.

Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998; 44:1833-43.

Jochemsen HM, Homocysteine, progression of ventricular enlargement, and cognitive decline. The Second Manifestations of ARterial disease-Magnetic Resonance study, *Alzheimer's & Dementia* 2013; 9:302-9.

Johnson JL, Rajagopalan KV, Cohen HJ. Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of tungsten on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat. *J Biol Chem*. 1974; 249:859-66.

Kajiyama H, Nojima Y, Mitsuhashi H, Ueki K, Tamura S, Sekihara T, Wakamatsu R, Yano S, Naruse T. Elevated levels of serum sulfite in patients with chronic renal failure. *Am Soc Nephrol* 2000; 11(5):923-7.

Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, Dole VS, Loscalzo J, Handy DE et al, Elevated levels of homocysteine compromise blood–brain barrier integrity in mice. *Blood* 2006;107:591–93.

Karaman Y. Plasma homocysteine, folate and B12 vitamin levels in Alzheimer disease, vascular dementia and mild cognitive impairment. *Journal of Neurological Sciences* 2006; 3:75-84.

Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse AT. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. *Cardiovasc Toxicol* 2011; 11(1):67-73.

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; 441(7095):880-4.

Kluijtmans LA., van den Heuvel LP., Boers GH., Frosst P., Stevens EM., van Oost BA., den Heijer M., Trijbels FJ., Rozen R., Blom HJ., Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease, *Am J Hum Genet* 1996; 58, 35-41.

Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology** 2001; 56(9):1143-53.

Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. **J Neurosci** 2000; 20:6920-6.

Kucukatay V, Agar A, Yargicoglu P, Gumuslu S, Aktekin B. Changes in somatosensory evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in experimental diabetes: effect of sulfur dioxide. **Arch Environ Health** 2003; 58:14-22.

Küçükatay V, Savcıoğlu F, Hacıoğlu G., Yargıçoğlu P, Açar A. Effect of sulfite on cognitive function in normal and sulfite oxidase deficient rats. **Neurotoxicol Teratol** 2005; 27:47-54.

Langman LJ, Cole DE., Homocysteine. **Crit Rev Clin Lab Sci** 1999; 36(4): 365-406.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry (3rd ed.), New York: **W. H. Freeman** 2000; ISBN 1-57259-153-6.

Lee WJ, Teschke K., Kauppinen T, Andersen A, Jappinen P, Szadkowska Stanczyk I, et al. Mortality from lung cancer in workers exposed to sulfur dioxide in the pulp and paper industry. **Environ Health Perspect** 2002; 110:991-5.

Lester MR. Sulfite sensitivity: significance in human health. **J Am Coll Nutr** 1995; 14:229-32.

Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94(11):5923-8.

Li L. Antioxidant response in liver of the phytoplanktivorous bighead carp (*Aristichthys nobilis*) intraperitoneally-injected with extracted microcystins. **Fish Physiol Biochem** 2010 Jun; 36(2):165-72. doi: 10.1007/s10695-008-9228-z.

Lussier S, Cacan S, Xhignesse M. Plasma Total Homocysteine in Healthy Subjects: Sex Specific Relation with Biological Traits. **Am J Clin Nutr** 1996; 64:587-93.

Marshall KA, Reist M, Jenner P, Halliwell B The Neuronal activity of sulfite plus peroxynitrite is enhanced by glutathione depletion: implications for Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med** 1999; 27: 515-520.

Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci** 2003; 26:137-46.

Martignoni E., Tassorelli C., Nappi G., Zangaglia R., Pacchetti C., Blandini F., Homocysteine and Parkinson's disease: a dangerous liaison. **J Neurol Sci** 2007 ; 257, 31-7.

Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, Wong PW, Coull B, Inahara T, et al. Prevalence of Hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. **Circulation** 1989; 79:1180-8.

Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. **Ageing Res Rev** 2002; 1:95-111.

Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. **Ageing Res Rev** 2002; 1:95-111.

Maurer K, Ihl R, Dierks T, Frölich L. Clinical efficacy of Ginkgo biloba special extract EGb 761 in dementia of the Alzheimer type. **J Psychiatr Res** 1997; 31(6):645-55

Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol** 1996; 27:517-27.

Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, Hyman BT, Crain B, Tang MX, Phelps CH. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. **Engl J Med** 1998; 338(8):506-11

McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am J Pathol** 1969; 56:111-28.

McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM. Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. **Clin Sci** 1991; 81:551-6.

McFadden SA. Phenotypic variation in xenobiotic metabolism and adverse environmental response: focus on sulfur-dependent detoxification pathways. **Toxicology** 1996; 111(1-3):43-65.

Medina MA, Urdiales JL, Amores-Sánchez MI. Roles of homocysteine in cell metabolism old and new functions. **Eur J Biochem** 2001; 268:3871-82.

Muller UJ., Frick B., Winkler C., Fuchs D., Wenning GK., Poewe W., Mueller J., Homocysteine and serum markers of immune activation in primary dystonia, **Mov Disord** 2005; 20, 1663-7.

Mudd SH., Skovby F., Levy HL., Pettigrew KD., Wilcken B., Pyeritz RE., Andria G., Boers GH., Bromberg IL., Cerone R., The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. **Am J Hum Genet** 1985; 37, 1-31.

Mudd SH, Irreverre F, Laster L. Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. **Science** 1967; 156:1599-602.

Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of trans-sulfuration, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease, McGraw-Hill. **New York** 1995; pp. 1279-327.

M.K.R. Harper Biyokimya, 25, N.Dikmen, T.Özgüven, **Nobel Tıp Kitabevi** İstanbul, 2004-877

Miller JW, Nadeau MR, Smith J, Smith D, Selhub J. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's coordinate regulation of homocysteine metabolism. **Biochem J** 1994; 298:415-19.

Mineer SE, Evrovski J, Cole D. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism. An Update. **Clin Bioch** 1997; 30:189-201.

Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by 77 the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. **Biochemistry** 2000; 39:13005-1.

Nee Le, Eldridge R, Sunderland T, Thomas Cb, Katz D, Thompson Ke, Weingartner H, Weiss H, Julian C, Cohen R. Dementia Of The Alzheimer Type: Clinical And Family Study Of 22 Twin Pairs. **Neurology** 1987; 37(3):359-63.

Nguyen, T.T. Hayakawa, T. Tsuge, H. Effect Of Vitamin B6 Deficiency On The SynthesisAnd Accumulation Of S-Adenosylhomocysteine And S-Denosylmethionine In RatTissues. **J Nutr Sci Vitaminol** 2001; 47(3):188-94.

Nicolas JJ, Richard-Forget FC, Goupy PM, Amiot MJ, Aubert SY. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Crit Rev Food Sci Nutr** 1994; 34:109-57.

Nygård, O. M.D., Nordrehaug, J.E. M.D., Refsum, H. M.D., Ueland, P.M. M.D., Farstad, M. M.D., Vollset, A.S.E. M.D., Plasma Homocysteine Levels And Mortality In Patients With Coronary Artery Disease Dr.P.H. **N Engl J Med** 1997; 337(4); 230-6.

Obeid R., Herrmann W., Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia, **FEBS Lett** 2006; 580, 2994-3005,).

Oda Y, Isohama Y, Kai H, Okano Y, Takahama K, Miyata T. Increased production and/or Secretion of Pulmonary Surfactant in Rats by Long Term Sulfur Dioxide Exposure. **J Pharmacobiodyn** 1989; 12:726-30.

Olanow C.V., McNaught K.S. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. **Movement Disorders** 2006; 21. 1806-1823

Olney JW, Misra CH, de Gubareff T. Cysteine-S-sulfate: brain damaging metabolite in sulfite oxidase deficiency. **J Neuropathol Exp Neurol** 1975; 34(2):167-77.

Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, Sparrow D, Spiro A 3rd, Tucker KL, et al. Traffic-related particles are associated with elevated homocysteine: the VA normative aging study. **Am J Respir Crit Care Med** 2008; 178(3):283-9.

Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. Toxicity of cysteine and cysteine sulphinic acid to human neuronal cell-lines. **J Neurol Sci** 1997;152: 62-6.

Pirchl M, Ullrich C, Humpel C, Differential effects of short- and long-term Hyperhomocysteinaemia on cholinergic neurons, spatial memory and Microbleedings in vivo in rats. **Eur J Neurosci** 2010;32:1516-27.

Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Arning E, Winick NJ. Effects of intraventricularmethotrexate on folate, adenosine, and homocysteine metabolism in cerebrospinal fluid. **J Pediatr Hematol Oncol** 2004; 26:386-88.

Reed GA, Curtis JF, Mottley C, Eling TE, Mason RP. Epoxidation of (+/-)- 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene during (bi)sulfite autoxidation: activation of a procarcinogen by a cocarcinogen. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1986; 83(19):7499-502.

Rees MM, Rodgers GM. Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. **Thrombosis Research** 1993; 71(5):337-59.

Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. **Annu Rev Med** 1998; 49:31-62.

Refsum H, Fiskerstrand T, Gnttormsen AB, Ueland PM: Assessment of homocysteine status. **J Inherit Metab Dis** 1997; 20:286-94.

Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Achmit, F., Ferris, S., Möbius, H.J. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine** 2003; 348, 1333-1341.

Reist M, Marshall KA, Jenner P, Halliwell B.. Toxic Effects of Sulphite in Combination with Peroxynitrite on Neuronal Cells. **J Neurochem** 1998; 71:2431-2438.

Reynolds A., C. Laurie, R. LeeMosley, and H. E. Gendelman, "Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders," **International Review of Neurobiology** 2007; vol. 82, pp.297–325.

Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factor for systemic atherosclerosis. **Jama** 2001; 285:2481-5.

Rimm EB, Willentt WC, Hu FB. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. **Jama** 1998; 279:359-64.

Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Petersen RC, Dickson D, Der SD, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA, St George-Hyslop P. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. **Nat Genet** 2007; 39(2):168-77.

Rusinek H, De Santi S, Frid D, Tsui WH, Tarshish CY, Convit A, de Leon MJ. Regional brain atrophy rate predicts future cognitive decline: 6-year longitudinal MR imaging study of normal aging. **Radiology** 2003 Dec;229(3):691-6

Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, et al. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. **Circulation** 1995; 92:2825-30.

Rozen, R. Molecular Genetics Of Methylene-tetrahydrofolate Deficiency. **J Inherit Metab Dis** 1996; 19; 589-94.

Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, et al, Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environ Health Perspect** 1998;106:1229-34.

Selhub, J. Miller, J.W. The Pathogenesis Of Homocysteinemia: Interruption Of The Coordinating Regulation By S-Adenosylmethionine Of The Remethylation And Transsulfuration Of Homocysteine. **Am J Clin Nutr** 1992; 55:131-138.

Selhub J. Homocysteine metabolism. **Annu Rev Nutr** 1999; 19:217-46.

Seshadri N, Robinson K., Homocysteine, B vitamins, and coronary artery disease **Med Clin North Am** 2000; 84:215-37.

Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques PF., Rosenberg IH., D'Agostino RB., Wilson PW., Wolf PA., Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease, **N Engl J Med** 2002; 346, 476-83.

Scahill RI, Schott JM, Stevens JM, Rossor MN, Fox NC. Mapping the evolution of regional atrophy in Alzheimer's disease: unbiased analysis of fluid-registered serial MRI. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 2002; 99(7):4703-7.

Scott, J.M. Molloy, A.M. Kennedy, D.G. Kennedy, S. Weir, D.G., Effects Of The Disruption Of Transmethylation In The Central Nervous System: An Animal Model. **Acta Neurol Scand Suppl** 1994; 154; 27-31.

Schoenberg BS, Kokmen E, Okazaki H. Alzheimer's disease and other dementing illnesses in a defined United States population: incidence rates and clinical features. **Ann Neurol** 1987; 22(6):724-9.

Schulz RJ. Homocysteine as a biomarker for cognitive dysfunction in the elderly, **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 2007; 10, 718-23.

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Ann Neurol** 1994; 36(3):348-55.

Shi X, Mao Y. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA damage induced by sulfur trioxide anion radicals. **Biochem Biophys Res Commun** 1994; 205(1):141-7.

Shih, V.E. Salem, M.Z. Mudd, S.H. Uhlendorf, B.W. Adams, R.D. **A New Form Of** 1972

Simon RA. Sulfite sensitivity **Ann Allergy** 1986; 56(4):281-8.

Singal PK, Khaper N, Palace V, et al: The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. **Cardiovasc Res** 1998; 40:426-432.

Stefanello FM, Monteiro SC, Matté C, Scherer EB, Netto CA, Wyse AT. Hypermethioninemia increases cerebral acetylcholinesterase activity and impairs memory in rats. **Neurochem Res** 2007; 32:1868-74.

Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse ATS. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. **Behav Brain Res** 2004; 153:377-81.

Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. **Blood** 1993; 81(12):3404-13

Steinberg KK, Relling MV, Gallagher ML, Greene CN, Rubin CS, French D, Holmes AK, Carroll WL, Koontz DA, Sampson EJ, Satten GA. Genetic studies of a cluster of acute lymphoblastic leukemia cases in Churchill County, Nevada. **Environ Health Perspect** 2007; 115(1):158-64.)

Surtees R, Bowron A, Leonard J. Cerebrospinal fluid and plasma total homocysteine and related metabolites in children with cystathionine beta-synthase deficiency: the effect of treatment. **Pediatr Res** 1997; 42:577-82.

Squire LR, Kandel ER. Memory: mind to molecules. New York: **Sci Am Lib** 1999; 12.

Şenbil N, Tosun MS, Ezgü FS, Gürer YKY. İzole sülfid oksidaz eksikliği **Türk Pediatri Arşivi** 2005; 40: 105- 08.

Şen S, Durat G, Atasoy I. Vitamin B 12 ve Folik Asit Eksikliğinin Psikiyatrik ve Nörolojik Bozukluklarla İlişkisi, **Türk Klinik Biyokimya Derg** 2009; 7: 31-6.

Tan WC, Cripps E, Douglas N, Sudlow MF. Protective effect of drugs on bronchoconstriction induced by sulphur dioxide. **Thorax** 1982; 37(9):671-6.

Taoka S, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R. Evidence for hememediated redox regulation of human cystathionine β -synthase activity. **J Biol Chem** 1998; 273:25179-84.

Tanzi E. Alzheimer Disease: Biology, Diagnosis, and Therapeutics. K Iqbal (Ed). **John Wiley&Son Ltd** 1997; s.63-111.

Temel İ., Özerol E. Homosistein Metabolizma Bozuklukları ve Vasküler Hastalıklarla ilişkisi. **İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi** 2002; 9; 149-57.

Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 2005; 29:1140-51.

Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2005; 289:2649-56.

Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease and drug therapy. **J Lab Clin Med** 1989; 114:473- 501

Ueland PM Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. I Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications, **Clin Chem** 1993; 39:1764-79.

Vermaak WJ, et al Vitamin B6 nutrition status and cigarette smoking. **Am J Clin Nutr** 1990; 51:1058 – 61

Vincent AS, Lim BG, Tan J, Whiteman M, Cheung CN, Halliwell B, Wong KP. Sulfite-mediated oxidative stress in kidney cells. **Kidney Int** 2004; 65(2):393-402.

Wang X. Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci** 2010; 2:1-13.

Woolsey PB. Cysteine, sulfite, and glutamate toxicity: a cause of ALS. **J Altern Complement Med** 2008; 14, 1159-64.

Wouters MG, Moorrees MT, Van der Mooren MJ. Plasma homocysteine and menopausal status. **Eur J Clin Invest** 1995; 25:801-5.

Yamaguchi K, Sakakibara S, Asamizu J, Ueda I. Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver. II. The measurement of cysteine metabolism in vivo and the activation of in vivo activity of cysteine oxidase. **Biochim Biophys Acta** 1973; 297:48-59.

Zhang X, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. **J Biol Chem** 2004; 279:43035–45.

8.ÖZGEÇMİŞ

11.08.1986 tarihinde Kırıkhan/Hatay'da dünyaya gelen Yusuf EKBİÇ ilk öğrenimini Ziya GÖKALP İlköğretim ve 70. Yıl İskan İlköğretim okulunda, lise öğrenimini ise Belen Lisesinde tamamladı. 2010 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirdi. 2011 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksekisans eğitime başladı ve 2013 yılında buradan ayrıldı. Tekrar 2013 yılı eylül ayında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksekisans eğitime başladı. 2016 yılında Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Laboratuvar ve Veteriner Sağlık bölümünden mezun oldu. Evli ve 1 çocuk babasıdır.