

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

**HOMOSİSTEİN TOKSİSİTESİNE SÜLFİT MOLEKÜLÜNÜN OLASI KATKISI VE  
OKSİDATİF STRESİN ROLÜNÜN NÖROBLASTOMA HÜCRE DİZİSİNDE  
İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. GÜLŞAH GÜNDOĞDU**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. VURAL KÜÇÜKATAY**

**DENİZLİ - 2012**

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

**HOMOSİSTEİN TOKSİSİTESİNE SÜLFİT MOLEKÜLÜNÜN OLASI KATKISI VE  
OKSİDATİF STRESİN ROLÜNÜN NÖROBLASTOMA HÜCRE DİZİSİNDE  
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. GÜLŞAH GÜNDOĞDU**

DANIŞMAN

**Doç. Dr. VURAL KÜÇÜKATAY**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin  
.....201... tarih ve .....nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ - 2012**

Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY danışmanlığında Dr. GÜLŞAH GÜNDOĞDU tarafından yapılan “**Homosistein Toksisitesine Sülfid Molekülünün Olası Katkısı Ve Oksidatif Stresin Rolünün Nöroblastoma Hücre Dizisinde İncelenmesi**” başlıklı tez çalışması 17/10/2012 Tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim/Bilim Dalı’nda TIPTA /YANDAL UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**BAŞKAN: Prof. Dr. Günfer TURGUT**

**ÜYE: Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN**

**ÜYE: Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY**

**Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.  
26/11/2012.**

**Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı  
Prof. Dr. Mustafa KILIÇ**

## TEŞEKKÜR

Başta tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Vural Küçükataş olmak üzere her birinin eğitimime sonsuz katkısı bulunan Fizyoloji Anabilim Dalında görevli öğretim üyeleri Prof. Dr. Melek Bor-Küçükataş, Prof. Dr. Sebahat Turgut, Prof. Dr. Günfer Turgut, Prof. Dr. Osman Genç, Prof. Dr. Saadettin Çalışkan'a; tezimin her aşamasında emeği geçen Tıbbi Biyoloji öğretim üyesi Dr. Yavuz Dodurga'ya; tez çalışmam boyunca yardımlarını ve laboratuvarını benden esirgemeyen Histoloji ve embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çevik Tufan'a; tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan sevgili eşim Dr. Köksal Gündoğdu'ya; her konuda yardımcı olan abim Yrd. Doç. Dr. Alper Kürşat Demirkaya, ablam Yrd. Doç. Dr. Fatma Demirkaya Miloğlu ve eşi Yrd. Doç. Dr. Özkan Miloğlu'ya; her türlü manevi desteği nedeniyle Zuhal Güçlü'ye; asistan arkadaşlarıma; morfoloji binasında görev yapan temel bilimler öğretim elemanları ve çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak yaşamımın bana verdiği en değerli hediye olan ailemin, her bireyine teşekkürü borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI .....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
TABLolar DİZİNİ....	XV
ÖZET.....	XVI
SUMMARY.....	XVII
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
AMİNO ASİDLER.....	3
KÜKÜRT İÇEREN AMİNO ASİDLER .....	3
HOMOSİSTEİN .....	4
Homosistein Metabolizması .....	5
Remetilasyon Yolu .....	7
Transsülfürasyon Yolu .....	8
Homosisteinin Hidrolizi.....	9
Homosistein Metabolizmasının Regülasyonu.....	9

Plazmadaki Homosistein Formları .....	11
Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri .....	12
Homosistein Metabolizmasındaki Genetik Bozukluklar .....	13
Kronik Hastalıklar .....	14
Edinsel Nedenler .....	15
Fizyolojik Nedenler.....	17
İlaçlar .....	18
Hiperhomosisteinemi ile İlişkili Hastalıklar .....	18
SÜLFİTLER .....	19
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 'in Hücresel Sıvılarda Temel Kimyasal Reaksiyonu .....	20
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 'e Maruz Kalma.....	21
Endojen Maruz Kalma .....	21
Eksojen Maruz Kalma .....	22
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Toksisitesi .....	23
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 'in O <sub>2</sub> ve Kükürt Merkezli Radikaller Oluşturması .....	24
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Metabolizması.....	26
Oksidatif Olmayan SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Metabolizması.....	26
Oksidatif SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Metabolizması .....	26
İnsanlarda Gözlenen SOX Eksikliği .....	28
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 'in Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri .....	29
GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	33

<b>HÜCRE KÜLTÜRÜ AŞAMASINDA KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASALLAR.....</b>	<b>33</b>
<b>SH-SY5Y HÜCRELERİNİN KÜLTÜRE EDİLMESİ .....</b>	<b>34</b>
<b>SH-SY5Y Hücrelerinin Çoğaltılması ve Pasajlanması .....</b>	<b>35</b>
<b>SH-SY5Y Canlı Hücrelerinin Sayılması.....</b>	<b>36</b>
<b>SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması.....</b>	<b>38</b>
<b>Dondurulmuş SH-SY5Y Hücrelerinin Çözdürülmesi.....</b>	<b>38</b>
<b>SÜLFİT VE HOMOSİSTEİN SİTOTOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ İÇİN DENEY DÜZENEĞİNİN KURULMASI.....</b>	<b>39</b>
<b>XTT SİTOTOKSİSİTE TESTİ .....</b>	<b>39</b>
<b>OKSİDATİF STRES DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ.....</b>	<b>41</b>
<b>Total Oksidan (TOS) ve Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçüm Yöntemleri .....</b>	<b>41</b>
<b>TOS, TAS, OSİ, ve Comet Analizi İçin Deney Düzeneginin Kurulması ...</b>	<b>42</b>
<b>TOS, TAS, OSİ Değerinin Hesaplanması.....</b>	<b>42</b>
<b>Lowry Yöntemi.....</b>	<b>44</b>
<b>SÜLFİT VE HOMOSİSTEİN GENOTOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ.....</b>	<b>46</b>
<b>Komet Assay (Tek Hücre Elektrofrezisi) .....</b>	<b>47</b>
<b>Görüntü Analizi .....</b>	<b>48</b>
<b>İSTATİKSEL YÖNTEMLER.....</b>	<b>48</b>
<b>BULGULAR .....</b>	<b>49</b>
<b>SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ.....</b>	<b>49</b>

<b>Sülfit Sitotoksitesinin Belirlenmesi .....</b>	<b>49</b>
<b>Homosistein Sitotoksitesinin Belirlenmesi .....</b>	<b>50</b>
<b>Sülfit + Homosistein kombinasyonunun Sitotoksitesi .....</b>	<b>51</b>
<b>OKSİDATİF STRES İNDEKSİNİN BELİRLENMESİ.....</b>	<b>54</b>
<b>Total Oksidan Seviyelerinin Belirlenmesi (TOS).....</b>	<b>54</b>
<b>Total Antioksidan Seviyelerinin Belirlenmesi (TAS) .....</b>	<b>54</b>
<b>Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi (OSİ).....</b>	<b>55</b>
<b>GENOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ.....</b>	<b>56</b>
<b>Baş Uzunluğunun Belirlenmesi.....</b>	<b>57</b>
<b>Baş Yoğunluğunun Belirlenmesi.....</b>	<b>58</b>
<b>Kuyruk Yoğunluğunun Belirlenmesi.....</b>	<b>59</b>
<b>Kuyruk Uzunluğunun Belirlenmesi.....</b>	<b>60</b>
<b>Kuyruk Momenti ve migrasyonunun Belirlenmesi.....</b>	<b>61</b>
<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>63</b>
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>75</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>76</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha_1$ -AP	: $\alpha_1$ -antiproteinaz
$\cdot O_2^-$	: Süperoksil radikali
$^{\circ}C$	: Santigrat derece
$\mu mol$	: Mikromol
<b>5,10-MTHFR</b>	: 5,10- Metilen Tetra Hidro Folat
<b>5-MTHF</b>	: 5-metiltetrahidrofolat
<b>A <math>\beta</math></b>	: $\beta$ -amiloid
<b>AD</b>	: Alzheimer hastalığı
<b>ADMA</b>	: Asimetrik dimetil arginin
<b>AO</b>	: Akaidin oranj
<b>AOX</b>	: Aldehit oksidaz
<b>BHMT</b>	: Betain homosistein metiltransferaz
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CBS</b>	: Sistasyonin beta sentaz
<b>CDO</b>	: Sistein dioksijenaz
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbon dioksit
<b>COOH</b>	: Karboksil grup
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	: Bakır sülfat 5 sulu
<b>DF</b>	: Dilüsyon faktörü
<b>dL</b>	: Desilitre
<b>DMG</b>	: N,N-dimetilglisin
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>DTT</b>	: Dithiothreitol
<b>EB</b>	: Etidyum bomür
<b>FBS</b>	: Fötal sığır serum
<b>g</b>	: Gram

<b>GPx</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GR</b>	: Glutasyon redüktaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSSO<sub>3</sub></b>	: S-sulfoglutasyon
<b>GST</b>	: Glutasyon S-transferaz
<b>H</b>	: Hidrojen
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></b>	: Sülföröz asit
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>HL</b>	: Baş uzunluğu
<b>HPLC</b>	: Yüksek performans sıvı kromatografi
<b>HR</b>	: Horseradish peroksidaz
<b>HS<sup>-</sup></b>	: Hidra sülfid anyonu
<b>HSO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	: Bisülfid
<b>IgE</b>	: İmmünglobulin E
<b>IL 6</b>	: İnterlökin 6
<b>ILBD</b>	: Incidental Lewy Body hastalığında
<b>IL-β</b>	: İnterlökin β
<b>KBY</b>	: Kronik böbrek yetmezliği
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>KKH</b>	: Konjestif kalp hastalığı
<b>L</b>	: Litre
<b>LDL</b>	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>LMA</b>	: Düşük ısıda eriyen agaroz
<b>mA</b>	: Mili amper
<b>MAT</b>	: Metiyonin adenozil transferaz
<b>mg</b>	: Miligram
<b>Mg</b>	: Magnezyum
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mm<sup>3</sup></b>	: Milimetre küp

<b>MMA</b>	: Metilmalonik asit
<b>mmol</b>	: Milimol
<b>MPT sentaz</b>	: Molibtopterin Sentaz
<b>MS</b>	: Metiyonin sentaz
<b>Na/K-tartarat</b>	: Sodyum potasyum tartarat
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	: Sodyum karbonat
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	: Sodyum Metabisulphite
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>NH<sub>2</sub></b>	: Amino grup
<b>NH<sub>4</sub></b>	: Amonyum
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>NMA</b>	: Normal ısıda eriyen agoroz
<b>NMDA</b>	: N-metil- D-aspartat
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>˙O<sub>3</sub>SOO</b>	: Kükürt peroksit radikali
<b>OH</b>	: Hidroksil radikali
<b>ONOO-</b>	: Peroksitnitrit anyonu
<b>OSAHS</b>	: Obstruktif uyku apne/hipopne sendromu
<b>OSİ</b>	: Oksidatif Stres İndeksi
<b>PAH</b>	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponu
<b>PD</b>	: Parkinson hastalığı
<b>PDO</b>	: Polifenol oksidaz
<b>PGH sentaz</b>	: Prostaglandin hidroperoksidaz
<b>R</b>	: Amino asidlerin yan grubu
<b>RNA</b>	: Ribo nükleik asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SDMA</b>	: Simetrik dimetil arginin
<b>SO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	: İnorganik sülfat
<b>SO<sub>2</sub></b>	: Kükürt dioksit
<b>SO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	: Kükürt trioksit

<b>SOX</b>	:	Sülfit oksidaz
<b>TAS</b>	:	Total Antioksidan Seviye
<b>TBARS</b>	:	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri
<b>TL</b>	:	Kuyruk uzunluğu
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	:	Tümör nekroz faktör $\alpha$
<b>TOS</b>	:	Total Oksidan Seviye
<b>UV</b>	:	Ultraviole
<b>XO</b>	:	Ksantin oksidaz
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	:	Mikrogram

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
<b>Şekil 1.</b> Kükürt İçeren Amino Asitlerin Yapısı.....	3
<b>Şekil 2.</b> Homosistein Oluşumu.....	6
<b>Şekil 3.</b> Homosistein Çeşitli Yolaklar İle Metabolize Edilmesi.....	7
<b>Şekil 4.</b> Sistein Katabolizması Esnasında Sülfite Oluşumu.....	21
<b>Şekil 5.</b> Sülfite Oksidaz Enziminin Şematik Gösterimi .....	27
<b>Şekil 6.</b> Sülfite Oksidaz Tarafından Katalizlenen Reaksiyonun Şematik Gösterimi ....	27
<b>Şekil 7.</b> SH-SY5Y Hücrelerinin Mikroskopik Görüntüsü .....	33
<b>Şekil 8.</b> SH-SY5Y Hücrelerinin Yaklaşık 1 Hafta Sonraki Pasajlanma Öncesi Mikroskopik Görüntüsü.....	36
<b>Şekil 9.</b> Thoma Lamı .....	37
<b>Şekil 10.</b> XTT' nin Formazana Dönüşümü .....	40
<b>Şekil 11.</b> Lowry Protein Standart Eğrisi .....	45
<b>Şekil 12.</b> Artan sülfite dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi .....	49
<b>Şekil 13.</b> Artan homosistein dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi .....	50
<b>Şekil 14.</b> Artan homosistein dozlarına 0.1 mM sülfite ilavesiyle 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi .....	51
<b>Şekil 15.</b> Artan homosistein dozlarına 1 mM sülfite ilavesiyle 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi. ....	52
<b>Şekil 16.</b> Artan homosistein dozlarına 5 mM sülfite ilavesiyle 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi .....	53
<b>Şekil 17.</b> Yüksek sülfite (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat	

inkübasyonunu takiben belirlenen total oksidan düzeyi .....	54
<b>Şekil 18.</b> Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben belirlenen total antioksidan düzeyi .....	55
<b>Şekil 19.</b> Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben belirlenen oksidatif stres indeksi .....	55
<b>Şekil 20.</b> Grupların 24 saat inkübasyonunu takiben Comet analizi ile demonstratif olarak görüntüsü .....	56
<b>Şekil 21.</b> Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen baş uzunluğu değerleri .....	57
<b>Şekil 22.</b> Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen baş yoğunluğu değerleri .....	58
<b>Şekil 23.</b> Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk yoğunluğu değerleri .....	59
<b>Şekil 24.</b> Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk uzunluğu değerleri .....	60
<b>Şekil 25.</b> Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk momenti değerleri .....	61
<b>Şekil 26.</b> Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk migrasyonu değerleri .....	62

## TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
<b>Tablo 1.</b> Total Plazma Homosistein Bileşenleri ve Yüzdeleri.....	11
<b>Tablo 2.</b> Total Plazma Homosistein Dağılımı .....	12
<b>Tablo 3.</b> Hiperhomosisteinemi Nedenleri.....	13
<b>Tablo 4.</b> Hücre Kültürü Aşamasında Kullanılan cihazlar .....	33
<b>Tablo 5.</b> Hücre Kültürü Aşamasında Kullanılan kimyasal maddeler .....	34

## ÖZET

### **Homosistein Toksisitesine Sülfıt Molekülünün Olası Katkısı Ve Oksidatif Stresin Rolünün Nöroblastoma Hücre Dizisinde İncelenmesi**

Dr. Gülşah GÜNDOĞDU

Homosistein, Metiyonin metabolizması sırasında oluşan kükürt içeren bir amino asittir. Sağlıklı kişilerde plazma homosistein düzeyi, remetilasyon ile metiyonine, transsülfürasyon yolu ile sistein aminoasidine dönüşümünü sağlayan yollar aracılığıyla yaklaşık 5-15  $\mu\text{mol/L}$  gibi düşük bir düzeyde tutulur. Artmış plazma homosistein düzeyi başta nörolojik olmak üzere pek çok hastalık için risk faktörüdür. Nörodejeneratif hastalıklarda, homosisteine ilaveten plazma sistein düzeyi artmakta ve sülfat düzeyi azalmaktadır. Sülfat temel olarak güçlü bir nörotoksik molekül olan sülfıt molekülünden sülfıt oksidaz aracılığı ile oluşturulur. Sülfıtın sülfıt oksidaz enzimi ile sülfata çevrilerek detoksifiye edilmesi hayati önem taşır. Bu çalışmanın amacı, homosistein nörotoksitesine sülfıt molekülünün olası katkısı ve bu katkıda oksidatif stresin rolünü SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri kullanarak araştırmaktır. Çalışmamızda, homosistein ve sülfıtın oluşturduğu sitotoksosite XTT testi ile genotoksosite Comet yöntemi ile oksidatif stresin rolü TAS-TOS kiti ile incelendi. Sülfıt ve homosistein'in beraber uygulandığı hücre dizisinde tek başlarına oluşturdukları sitotoksositeye göre toksik etkilerinin istatistiksel olarak daha da önemli olduğu bulunmuştur. Bu etkide oksidan stresin oynadığı önemli rol oksidatif stres indeksinin beraber uygulandıklarında, diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunması ile ortaya konmuştur. Genotoksosite açısından ise en fazla hasarın yine homosistein+sülfıt grubunda olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasından çok önce izlenen homosistein artışına, benzer şekilde sülfıt artışında eşlik etmesi izlenen nörodejenerasyonun önemli bir bileşeni olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Homosistein, Sülfıt, Nörotoksosite, Nörodejeneratif hastalıklar.



## SUMMARY

### **Possible Contribution of Sulfide Molecule on Homocysteine Toxicity and Investigation of Role of Oxidative Stress in Neuroblastoma Cell Line**

Dr. Gülşah GÜNDOĞDU

Homocysteine is an amino acid, which is formed during methionine metabolism that contains sulfur. Plasma homocysteine level in healthy individuals is kept in a low level such as 5-15  $\mu\text{mol/L}$  by means of the pathways that ensure transformation to methionine via remethylation and to cystein amino acid through transsulfuration. An increased plasma homocysteine level is a risk factor for many diseases, particularly for neurological ones. In neurodegenerative diseases, the cystein level of plasma increases along with the homocystein, and the sulfate level decreases. Basically, Sulfate is formed from sulfite which is a strong neurotoxic molecule produced by sulfite oxidase enzyme. Transformation of sulfite to sulfate plays a vital role. The purpose of our study is to investigate the potential contribution of sulfite molecule to homocystein induced neurotoxicity and the role of oxidative stress in this process. In our study, the cytotoxicity caused by sulfide and homocysteine was investigated with XTT test in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Genotoxicity and the role of oxidative stress was also investigated with comet method and TAS-TOS kit, respectively. According to statistical calculations, simultaneous administration of sulfite and homocystein on SH-Sy5Y cell line was found to be significantly more toxic than the individual administration of them in terms of sitotoxicity. In this effect, the significant role of the stress of oxidant was declared by statistically significant results of that administration with respect to other groups when both of them were administrated at the same time. The maximum damage in terms of genotoxicity was also found in the homocysteine + sulfite group. In conclusison, Consequently, an elevation of sulfite accompanying that of the homocysteine increase observed before the occurrence of disease symptoms characterized with neurodegeneration, may be an important component neurodegeneration.

**Key words:** Homocysteine, Sulfide, Neurotoxicity, Neurodegenerative Diseases

## GİRİŞ

Homosistein (2-amino-4-mercaptobutirik asid) metiyoninin metabolizması esnasında oluşan kükürt taşıyan, proteinlerin yapısına girmeyen bir amino asittir ve ilk olarak 1932 yılında Amerikalı biyokimyacı Vincent Du Vigneaud tarafından bulunmuştur (1). Homosistein eksitatör bir aminoasittir ve nöronlar üzerine olan toksik etkileri bulunmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, plazma total homosistein seviyesinin; böbrek yetmezliği, koroner kalp hastalığı, periferik arteriyel hastalık, diyabet, sistemik lupus eritematozis ve venöz tromboemboli gibi hastalıklara sahip bireylerde olası kardiyovasküler olayların ve bu olaylar sonucunda mortalitenin iyi bir prediktörü olduğu bildirilmektedir (2,3,4).

Sağlıklı kişilerde plazma homosistein düzeyi, remetilasyon ile metiyonine, transsülfürasyon ile sistein aminoasidine dönüşümünü sağlayan yolaklar aracılığıyla yaklaşık 5–10 µmol/L gibi düşük düzeyde tutulur (3,5). Özellikle nörodejeneratif hastalıklarda izlenen artmış plazma homosistein düzeyi klasik bir risk faktörü olup, bu aminoasidin hücre içi metabolizmasındaki bir bozukluğun varlığını gösterir. Bu bozukluğun remetilasyon yolağında görev yapan enzimlerin ve folik asit gibi bu enzimlerce kullanılan kofaktörlerdeki yetersizliklere bağlı olarak geliştiği gösterilmiştir (6-8). Bu durumda homosisteinin, toksik etkilerinden hücrenin korunması amacı ile hücre dışına verildiği ve bu şekilde artmış plazma düzeylerinin izlendiği ileri sürülmektedir (7,8).

Nörodejenerasyon; Alzheimer, Parkinson Demans, Motor Nöron Hastalıkları gibi pek çok klinik bozukluğun ortaya çıkmasına sebep olan bir sinir sistemi patolojisidir. Farklı klinik tablolara sahip nörodejenerasyon temelli bu bozukluklar, birçok yönden ortak özelliği paylaşmaktadırlar. Hepsinde uzun bir prelinik period vardır ve yaşla birlikte görülme sıklıkları artmaktadır (9-11). Yapılan çalışmalar nörodejeneratif hastalıklarda homosisteine ilaveten plazma sistein düzeyinin arttığını, sülfat düzeyinin ise azaldığını göstermiştir. 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 (11-13) Sülfid

ise pek çok hücrenel yapı ile etkileşebilen, güçlü bir nörotoksik moleküldür. Sülfitin, sülfite oksidaz enzimi ile sülfata çevrilerek detoksifiye edilmesi hayati önem taşır. Bunun önemi genetik olarak sülfite oksidaz enzim yetersizliği olan çocuklarda izlenen beyin atrofi, mental retardasyon gibi nörolojik bulguların varlığı ile gösterilmiştir (14).

Klinik çalışmalarda, nörodejeneratif hastalıklardaki plazmada sistein aminoasidinde artma ve sülfat molekülünde azalma nedeninin homosisteinin katabolizması sırasındaki transsülfürasyon yolağında özellikle de sülfite'in sülfata detoksifikasyon basamağında bir bozukluk veya yetersizliğin olabileceği belirtilmektedir. Bu durumda başta nörodejeneratif hastalıklarda olmak üzere pek çok hastalıkta artan homosistein düzeylerine, sistein katabolizmasındaki bir bozukluk ve/veya yetersizlik sonucu oluşan ve güçlü bir nörotoksik molekül olan sülfite'in de eşlik etmesi, gözlenen toksisitenin önemli bir komponentidir. Bugüne kadar homosisteinin toksisitesine sülfitin katkısına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; Nörodejenerasyon gelişiminin daha iyi anlaşılması için homosistein ve sülfite moleküllerinin tek başlarına ve daha önce literatürde gösterilmemiş olan birlikte uygulanmaları durumunda ortaya çıkacak muhtemel potansiyel nörotoksik etkilerini araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanılarak, homosistein ve sülfite'in tek başına ve birlikte oluşturacakları muhtemel toksik etki, sitotoksikite ve genotoksikite açısından araştırılmış, ayrıca bu durumun oksidatif stresle olan ilişkisi tanımlanmaya çalışılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

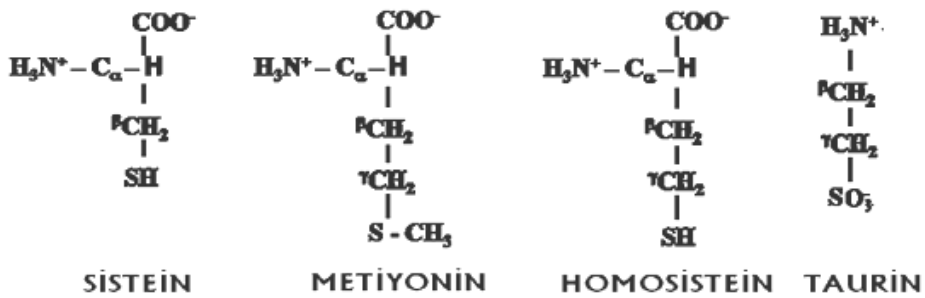
### AMİNO ASİTLER

Proteinler şekil, büyüklük, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal aktivite yönünden birbirlerinden farklı yirmi çeşit amino asidi ihtiva ederler. Amino asitler  $\alpha$ -karbonu adı verilen karbon atomuna bir amino gurubu (-NH<sub>2</sub>), bir karboksil grubu (-COOH), bir hidrojen atomu (-H) ve bir yan grubun (-R) bağlanmasıyla oluşan organik bileşiklerdir. Genel formülleri R-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH şeklindedir (15).

Amino asitler R grubuna göre birbirlerinden farklılaşırlar. R grubunun yapısı, büyüklüğü ve elektrik yükü gibi özellikleri amino asitlerin hidrofilik/hidrofobik (polar/nonpolar) özellik kazanmalarına neden olur. Aynı zamanda amino asitlerin sudaki çözünürlüklerini etkiler. Standart amino asitler organizmada yapıp yapılmadıklarına, metabolik sonlarına, R gruplarının çözünürlüklerine göre değişik şekilde sınıflandırılmaktadır. Yaygın olarak R gruplarına göre yapılan sınıflandırma kullanılmaktadır (16).

### KÜKÜRT İÇEREN AMİNO ASİTLER

Sistein, metiyonin, homosistein ve taurin dört yaygın kükürt içeren amino asittir fakat sadece sistein ve metiyonin proteinlerin yapısına katılır ve hücre metabolizmasında kritik rol oynar (16,17). Kükürt içeren amino asitlerin yapısı Şekil 1'de verilmiştir (15).



Şekil 1. Kükürt içeren aminoasitlerin yapısı (16)

Metiyonin bütün proteinlerin yapısal bileşeni olarak görev yapan tiyoeter türevi esansiyel bir aminoasit olup valin, izolösin ve treonin gibi süksinil CoA oluşturan dört aminoasitten biridir (15). Diyetle ve/veya endojen proteinlerin bozulması sonucu ya da homosisteinin remetilasyonu ile oluşur. Metiyonin, protein yapısına katılması, S-Adenozimetiyonine (SAM) çevrilerek çeşitli biyolojik moleküller için metil kaynağı olması, spermin ve spermidin gibi poliaminlerinin oluşumunu sağlaması ve transsülfürasyon yolu ile sistein aminoasidinin oluşumunu sağlaması gibi biyolojik öneme sahip esansiyel bir aminoasittir (6,18). Sistein, bir kükürt atomu taşıyan, metiyoninden elde edilen homosisteinin serin ile birleşerek sistatitinin ve bununda daha sonra  $\alpha$ -ketobütirat ve sisteine hidrolize olduğu iki ardışık reaksiyon ile sentezlenen bir amino asittir (15).

### **HOMOSİSTEİN**

Homosistein [Hcy;  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , 2-amino-4-merkaptobutirik asit] proteinlerin yapısına katılmayan metiyonin metabolizması sırasında ortaya çıkan, serbest tiyol (sülhidril) grubu taşıyan 135.2 dalton ağırlığında kükürtlü bir amino asittir. Tiyol grubunun pKa değerinin 8-9 civarında olmasından dolayı fizyolojik pH'da değişik disülfidler oluşturacak şekilde kolayca okside olurlar (18). Hcy, ilk olarak 1932 yılında De Vigneaud tarafından tanımlanmıştır (1). İnsan plazmasında Hcy, hem indirgenmiş (redükte) hem de yükseltgenmiş (okside) formda, serbest veya proteine bağlı olarak bulunur. Okside formlar, reaktif sistein kalıntıları içeren proteinlerle ve sisteinle oluşur. Hcy'nin okside formları karışık disülfidler olarak da adlandırılır (19).

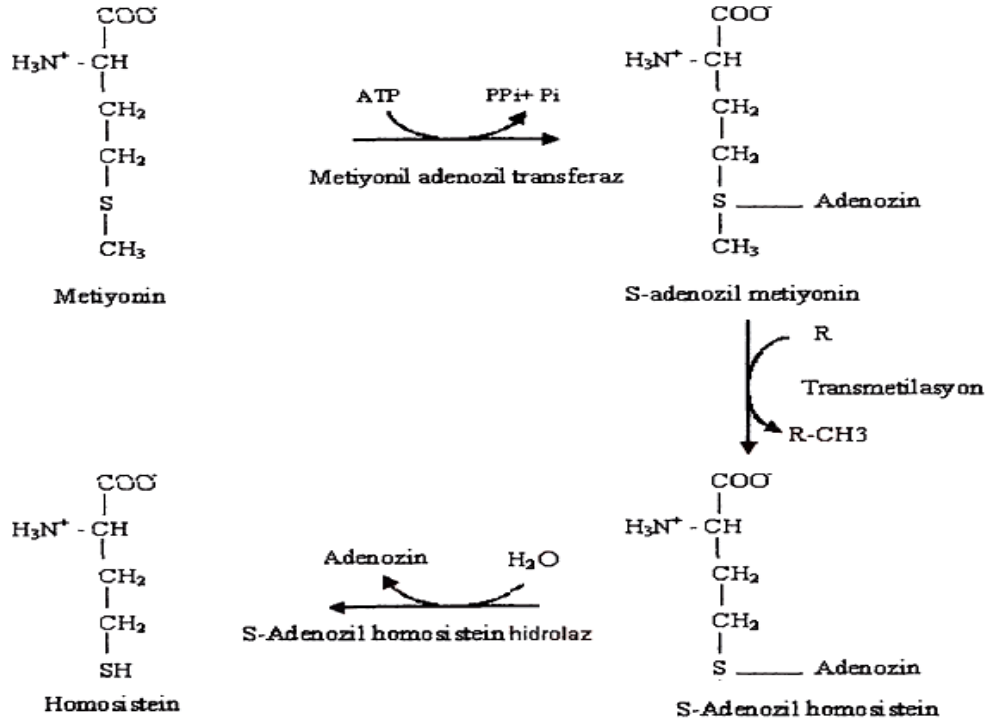
Hcy normal olarak diyetle alınmaz, vücuttaki tek kaynağı metiyoninidir ve metiyonin metabolizması sırasında oluşur. Hcy; sistatitinin, sistein ve diğer metabolitlerin prekürsörüdür. Kolin metabolizmasında gerekli olan betain homosistein metil transferaz (BHMT) reaksiyonunda metil donörüdür. Doku folatlarının döngüsünde gerekli bir substrat olarak yer alır (metiyonin sentaz enziminin metil tetra hidro folatı kullanan tek reaksiyonda yer alması ve bu reaksiyondaki bir bozuklukta dokulardaki folatın bu formda kalması) ve metiyoninin korunmasını sağlar (18). Bununla beraber, Hcy'nin metabolizmasının hücre içinde

sıkı bir şekilde düzenlenmesi hayati önem taşır. Çünkü Hcy, N-metil- D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin agonisti olması (20), oksidatif stres'e neden olması (21), metilasyon kapasitesini azaltması (22), nörotoksik amiloid peptidin hücre içi ve dışında birikimine neden olması (23), endoplazmik retikulum stresine yol açması (24) ve hücrede programlanmış hücre ölümünü aktive etmesi (22) gibi mekanizmalarla toksik etkilere neden olur. Bu nedenle Hcy oluşuktan sonra temel olarak remetilasyon ve transsülfürasyon olmak üzere iki yolla metabolize edilerek toksisitesinden korunulmaya çalışılır (16).

### **Homosistein Metabolizması**

Diyetle alınan metiyonin, metiyonin adenzil transferaz (MAT) enzimi ile metil vericisi olan SAM'a dönüşmektedir. SAM, ilk defa 1953 yılında Catoni tarafından tespit edilmiştir (25). Oluşumunda ATP kullanılan yüksek enerjili bir bileşiktir. SAM oluşumu ATP'nin üç fosfat bağının hidrolizi ile gerçekleşir. SAM, santral sinir sisteminde RNA, DNA, fosfolipitler ve nörotransmitterlerde gerçekleşen, ayrıca nöronları koruyan ve normal fonksiyon görmelerini sağlayan 35 adet transmetilasyon reaksiyonunda metil vericisi olarak görev yapmaktadır. SAM yapısındaki pozitif yüklü sülfonyum iyonu nedeni ile kolay bir metil vericisidir. Ayrıca SAM'ın, biyotin sentezinde amino grubu vericisi, spermidin ve spermin poliaminlerinin sentezinde aminoizopropil grup vericisi, siklopropil yağ asidi sentezinde ise metilen grubu vericisi ve 5-deoksiadenozil radikal vericisi olarak görev yapmaktadır. Ek olarak SAM, lipoik asit ve biyotin sentezi için gerekli olan kükürt kaynağını da oluşturması nedeniyle metiyonin metabolizmasının önemli bir ara ürünüdür (17,25,26).

SAM yapısında bulunan metil grubunu glisin gibi metil alıcılarına vererek çoklu transferaz enzimi ile S-Adenzilhomosisteine (SAH) dönüşmektedir. SAH, S-adenozilhomosistein hidrolaz enzimi tarafından hcy ve adenezine ayrılmakta, meydana gelen hcy remetilasyona girerek metiyonine, serin ile birleşerek sistatyonine dönüşmektedir (Şekil 2) (27).



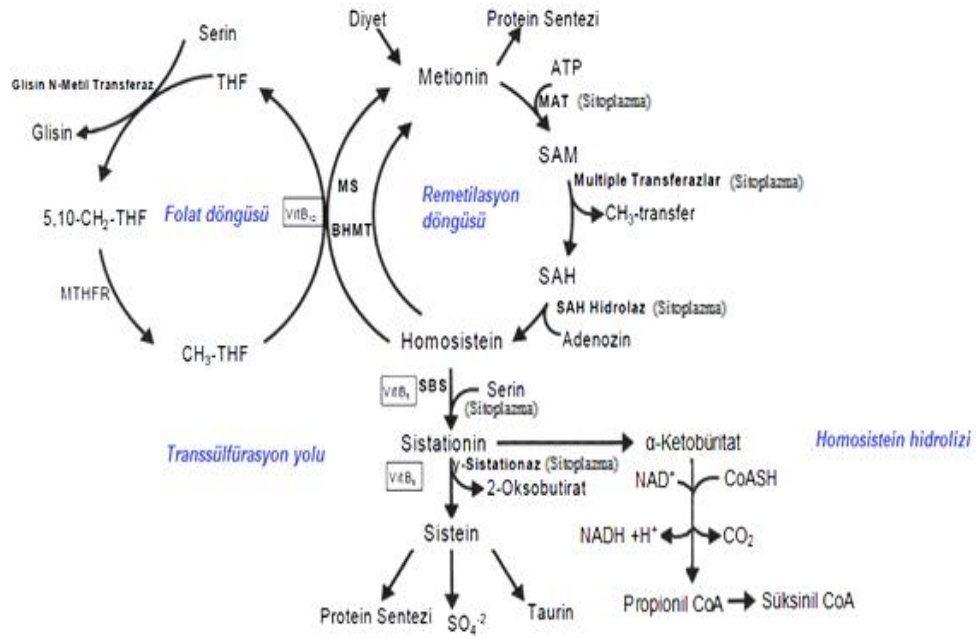
Şekil 2. Homosistein oluşum (27)

Metiyonin, metabolizması sırasında transmetilasyonla homosistein oluştuktan sonra metilasyon reaksiyonlarına engel olmak, organizmada Hcy konsantrasyonlarını düşük tutmak ve vücut metabolik gereksinimlerini sağlamak için vücutta üç yolla metabolize olur ( Şekil 3) (27).

**1. Remetilasyon yolu:** Metiyonin sentaz enzimi tarafından katalizlenen geri dönüşümlü bir yoldur.

**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.

**3. Homosisteinin hidrolizi:** Geri dönüşümsüz bir yoldur. Metiyoninden sistein oluşması sırasında  $\alpha$ -ketobütirat oluşur;  $\alpha$ -ketobütirat da propiyonil-CoA ve metilmalonil-CoA üzerinden süksinil-CoA'ya dönüşür.



**Şekil 3.** Homosisteinin çeşitli yollarla metabolize edilmesi

### **Remetilasyon Yolu**

Hcy'den yeniden metiyonin aminoasidinin sentezlendiği yoldur. Remetilasyonda görevli olan enzimler BHMT enzimi ile metiyonin sentaz (MS) (5-metiltetrahidrofolat-homosistein metiltransferaz) enzimidir. BHMT temel olarak karaciğerde bulunmasına rağmen az miktarda da böbrekte bulunur ve metil vericisi olarak betain kullanılır. Metiyonin sentaz enzimi ise dokularda yaygın olarak bulunur, metil vericisi olarak 5-metiltetrahidrofolatı, kofaktör olarak ise B12 vitaminini kullanılır (28). Bu yol kısa ve uzun olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir (Şekil 3).

Kısa yol, BHMT enzimi ile gerçekleşir. Bu yol, folik asit ve/veya B12 vitamin eksikliğinde SAM sentezi için gerekli olan dokulardaki metiyonin miktarını sağlar. BHMT beyinde tespit edilememiştir. Betain, metil vericisidir ve kolinin katabolizması sonucu oluşur. Betain metil grubunu Hcy'ye aktararak metiyonin oluşumu sağlarken kendisi de N,N-dimetilglisin (DMG) halini alır (29,30).

Uzun yolda ise folik asidin plazmadaki bir formu olan 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF), bir 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 MS enzimi ile Hcy'ye aktararak metiyonin sentezini gerçekleştirir. Diğer taraftan da tetrahidrofolat (THF) oluşur. THF ise daha sonra kofaktörü vitamin B2 (riboflavin) olan 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktaz (5,10-MTHFR) enzimi ile 5,10- Metilen Tetra Hidro Folat' a (5,10- MTHF) dönüşür. 5-MTHF'den metil grubunun Hcy'ye transferinde vitamin B12 aracı durumundadır. Böylece bu reaksiyonda folik asit ve B12 vitamininin metabolizması birbirine bağlanmış olur. B12 vitamin eksikliğinde ise 5-MTHF metabolizması etkisiz hale gelir ve çoğu kimyasal reaksiyonlarda tek karbon birimi alıcısı konumunda olan THF'a dönüşemez (29,31).

### ***Transsülfürasyon Yolu***

Ortamda fazla miktarda metiyonin varlığında veya sistein sentezi gerektiğinde, Hcy transsülfürasyon yoluna girer. Bu yol Hcy'nin katabolizması ile başlayan geri dönüşümsüz bir yoldur ve sistatyon, sistein oluşur. Oluşan sistein ya glutatyonun yapısına girer ya da sülfata dönüşerek glikozaminlerin yapısına katılır. Bu yol karaciğerdeki glutatyonun en önemli temel kaynağıdır (32). Glutatyon, organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. DNA ve protein sentezi, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı madde transportu gibi hücre fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında önemli rolü vardır (33). Transsülfürasyon yolunda ayrıca NH<sub>4</sub>, piruvat, taurin, α-keto bütirat, CO<sub>2</sub> ve sülfat da oluşmaktadır (34).

Transsülfürasyon yolundaki ilk oluşum sistatyonindir. Sistatyonin sentezi Hcy'nin serin amino asidi ile birlikte sistatyonin beta sentaz enziminin (CBS) katalizörlüğünde gerçekleşir. CBS enzimi, bir hem proteindir ve B6 vitamininin aktif bir formu olan 5-ridoksal fosfat kofaktörlüğünde işlev görür. Oluşan sistatyonin daha sonra başka bir B6 vitamin bağımlı gama sistatyonaz (CGL) enzimi ile sistein, α-keto bütirat ve NH<sub>4</sub>'e metabolize olur. α-keto bütirat kofaktör olarak pridoksal fosfatı kullanır. Sistein glutatyonun yapısına katılır, hücreler tarafından sentezlenen proteinlerin yapısına girer, sülfata dönüşerek glikozaminoglikanların (heparan sülfat, kondroitin sülfat gibi) sentezinde kullanılır veya idrarla atılır (Şekil

3). Sistein aynı zamanda homosistein ile birleşerek karışık disülfit sistein-homosistein formunu oluşturur (35).

Transsülfürasyon yolunun her iki enzimide böbrek, barsak, karaciğer ve pankreasta vardır. Aynı zamanda bu dokularda sisteini hızlı kullanan glutatyon siklusu vardır (16). Ancak beyin dokusunda CBS enzimi bulunmasına rağmen CGL enzimi yer almaz, sistatyoninin birikir ve glutatyonun sentezi için glial sistein kullanılır. Bu nedenle santral sinir sistemi oksidatif strese diğer dokulara göre daha duyarlıdır (18). Transsülfürasyon yolunun bulunmadığı hücreler ise eksojen bir sistein kaynağına gerek duyarlar (36).

### ***Homosisteinin Hidrolizi***

Hcy sistein oluşumunda sülfhidril grubu sağlayıcısıdır. Metiyoninden sistein oluşması sırasında  $\alpha$ -ketobutirat oluşur;  $\alpha$ -ketobutirat da propiyonil-CoA ve metilmalonil-CoA üzerinden süksinil-CoA'ya dönüşür.

### **Homosistein Metabolizmasının Regülasyonu**

Hcy metabolizmasının düzenlenmesinde; ara metabolitlerin miktarı, diyet içeriği gibi birçok faktör etkilidir. Örneğin; Hcy değişiminin SAH ve SAM gibi etkili metabolitler tarafından remetilasyon ve transsülfürasyon yollarıyla düzenlendiği görülür. Metiyonince zengin bir öğünün tüketimini takiben hepatik SAM düzeyi artar ve buda CBS enziminin aktivasyonu ile SAM fonksiyonunu artırır ve MTHFR inhibe olur. Bu nedenle Hcy remetilasyonu sınırlandırılır (37)

Hcy metabolizmasını düzenleyen enzimler metiyonini koruyan ve katabolize edenler olarak ayrılabilir. Metiyonini koruyan enzimler (MAT izoenzimleri, SAM bağımlı transmetilazlar, BHMT ve MS enzimi) kendi metabolitleri ve ürünleri tarafından inhibe edilmektedir. Bu enzimler ile birlikte adenozilhomosisteinaz enzimi metiyonin döngüsünün oluşmasını sağlar. (38). Metiyonini katabolize eden enzimler (Hepatik metiyonin S-adenozil transferaz, sistatyonaz, sistatyonin sentaz ve adenozilhomosisteinaz) ise kendi metabolitleri tarafından aktive olur ve diyetle alınan metiyonin miktarının artması ile karaciğerdeki düzeyleri artış gösterir (2,18). SAM, CBS enziminin allosterik aktivatörü, MTHFR enziminin ise allosterik

inhibitörüdür. Dokulardaki SAM konsantrasyonu homosisteinin remetilasyon veya transsülfürasyon yolunu belirlemekte ve SAM düzeyindeki artış transsülfürasyonu arttırırken remetilasyonu ise inhibe etmektedir (11,26,36,39). Antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki denge transsülfürasyon yolunu etkiler. Antioksidanlar transsülfürasyonu azaltırken, oksidanlar ise artmasına yol açar (40). Oksidatif durumda CBS enzimi aktif durumda iken MS enzimi ise inaktif hale gelir. Bunun sonucunda transsülfürasyon yolu ve dolayısıyla sistein ve glutatyon sentezi artar. Böylece glutatyon sentezine gerekli olan sistein miktarının en azından yarısı karşılanmaktadır (13,41).

İndirgenmiş glutatyon (GSH), içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur (42). Glutatyon peroksidaz (GPx) isimli enzimin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder. GSH, c-glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz enzimleri ile sistein, glutamat ve glisin amino asitlerinden hücre içinde sentezlenir. Sistein kaynağı doğrudan GSH sentezinin hızı ile ilgilidir. Çünkü hücresel sistein konsantrasyonu reaksiyon kinetiğinin düzenlemesinde (gama-glutamilsistein oluşumu) anahtar bir belirleyicidir. Hücre dışı sıvılarda sistein hızla sistine (CySS) oto-okside olur. GSH ve sistinin çeşitli dokular arasında sürekli bir akışı vardır ve çeşitli organları etkileyen diyet, açlık ve patolojiler bu durumda etkileyebilir. Dokularda sistein ve glutatyonun değişen miktarının oksidatif stresi etkilediği bilinmektedir (43).

Giustarini ve ark. (2009), organlar arasındaki sistein farkının, transsülfürasyon yol ile homosistein ve metiyoninden ve gamma-glutamil transferaz ile glutatyondan meydana geldiğini ve bu yolların oksidatif stresden etkilenebileceğini (33), Cunha ve ark. (2011), hiperhomosisteinemide, lipid peroksidasyonun ve proteinin oksidatif hasarın arttığını, antioksidan savunma sisteminin bozulduğunu ve nitrit seviyesininin değişmediğini (44), Cito ve ark. (2010) ise, total Hcy ve oksidatif stres belirteçlerinin seviyelerini inceledikleri B12 vitamini ve folat verilen alzheimer hastalarında (AD), hem kontrol grubu hemde AD'da hipoksantin, ksantin, homosistein ve sistein gruplarında bir artış olduğu fakat bu artışın hastalıklardan ziyade yaşla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (45). Lipton ve ark. (1997), homosisteinin inme, kafa

travması gibi patolojik durumlarda 10-100 µmol seviyesinde nörotoksik olduğunu ve NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması ile Hcy nörotoksitesinin homosistinüri ve orta hiperhomosisteinemi patogeneziine katkıda bulunabileceğini belirtmişler (20).

### Plazmadaki Homosistein Formları

İnsan plazmasında Hcy, Butz ve du Vigneaud tarafından yapılan kimyasal tanımlamayla redükte Hcy ve okside Hcy olarak adlandırılmıştır (46). Tablo 1. de total plazma hcy ve yüzdeleri gösterilmiştir (47).

Hcy'nin %70-80 kadarı plazmada disülfid bağları ile albümine bağlı olarak bulunur. Geri kalan hcy oksitlenerek dimerler (*homosistin*) veya sisteinle birleşerek karışık disülfidler oluşturur. Hcy, çok küçük bir oranda (<%1) dolaşımında serbest olarak bulunur (47). Total hcy düzeyleri ise bağlı ve serbest olan kısmın toplamını yansıtmakta, plazma ve serumdaki tüm hcy formlarını belirtmektedir (19,48). Plazmadaki hcy'nin çoklu formlarının isimlendirilmesinde henüz fikir birliği yoktur. Ancak "total hcy, indirgenmiş hcy, proteine bağlı hcy, serbest hcy ve hcy-sistein kompleksi" gibi kavramlar genel olarak kullanılmaktadır (19).

**Tablo 1.** Total Plazma Homosistein Bileşenleri ve Yüzdeleri (19)

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

Hcy seviyelerinin ölçümü, ilk defa 1962 yılında homosistinüri hastaların araştırılmasında tanı için kullanılmış (49) ve Hcy'nin vasküler hastalık oluşturduğuna dair ilk bulgu 1969 yılında McCully tarafından homosistinüri iki çocukta otopsi sonucunu değerlendirirken yaygın arteriyel tromboz ve ateroskleroz saptanması ile gösterilmiştir (50). Hcy düzeyleri genel olarak total plazma homosisteini veya total serum homosisteini olarak ölçülmektedir. Bu ölçüm serbest ve proteine bağlı kısım

içermektedir. Plazma Hcy düzeyi standardize edilememiş olmakla birlikte, genellikle 5-15  $\mu\text{mol/L}$  düzeyi normal olarak kabul edilmekte ve plazmada ortalama 10  $\mu\text{mol/L}$  seviyesinde olması gerekmektedir. 16 $\mu\text{mol/L}$  üzerindeki değerler hiperhomosisteinemi olarak kabul edilmektedir (51).

### **Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri**

Plazma hcy değerleri 16-30  $\mu\text{mol/L}$  arasında ise hafif hiperhomosisteinemiden, 31-100  $\mu\text{mol/L}$  arasında ise orta hiperhomosisteinemiden, >100  $\mu\text{mol/L}$  ise ciddi hiperhomosisteinemiden bahsedilir (Tablo 2). Ayrıca yaşa bağlı olarak homosistein plazma seviyesi hafif artma eğilimi gösterir ve aynı yaştaki erkeklerde kadınlardan %10 kadar yüksektir. Yapılan çalışmalarda plazma homosistein düzeylerinin yaşlanma, cinsiyet (erkeklerde) ve postmenopozal kadınlarda artış gösterdiği saptanmıştır (52).

**Tablo 2.** Total Plazma Homosistein Dağılımı

Normal	5-15 $\mu\text{mol/L}$
Beklenen	>10 $\mu\text{mol/L}$
Hafif Hiperhomosisteinemi	16-30 $\mu\text{mol/L}$
Orta Hiperhomosisteinemi	31-100 $\mu\text{mol/L}$
Ağır Hiperhomosisteinemi	>100 $\mu\text{mol/L}$

Hcy'nin plazma seviyesinin yüksekliği, arteriyel ve venöz trombozis, inme, miyokardiyal infarktüs ve kronik renal yetersizliği için önemli bir risk oluşturmaktadır (19,53-57). Birçok çalışmada yükselen Hcy düzeylerinin; demans, bipolar bozukluk, paranoid psikoz, depresif rahatsızlıklar, duygulanım bozuklukları, şizofreni, Alzheimer, Parkinson gibi psikiyatrik bozuklukların ve subakut kombine dejenerasyon, ataksi, spastisite, myelopati ve nöropati gibi çeşitli nörolojik bozuklukların patogenezinde katkıda bulunduğu belirtilmiştir (21,29,32,34,58,59). Tablo 3'de hiperhomosisteinemi nedenleri verilmiştir.

**Tablo 3. Hiperhomosisteinemi nedenleri (58)**

**1-Homosistein Metabolizmasındaki Genetik Bozukluklar**

- Transsülfürasyon yolunda  
CBS enzim eksikliği
- Remetilasyon yolunda:  
N5,N10-metilen-tetrahidrofolat redüktaz eksikliği  
Metiyonin sentaz enzim eksikliği

**2-Kronik Hastalıklar**

- Kronik böbrek yetmezliği
- Diyabet
- Hipotiroidizm
- Ciddi psöriazis
- Maligniteler (Akut lenfoblastik lösemi, over, meme, pankreas kanseri)
- Transplant alıcıları

**3-Edinsel Nedenler**

- Vitamin B12 eksikliği
- Folat eksikliği
- Vitamin B6 eksikliği
- Metiyonin alımının artması (hayvansal protein alımı)

**4-Fizyolojik nedenler**

- İleri yaş
- Erkek cinsiyet
- Sigara kullanımı
- Fiziksel inaktivite
- Menapoz

**5-İlaçlar**

- Metotreksat (dihidrofolat redüktaz inhibitörü)
- Fenitonin ve karbamezapin (folat antagonistleri)
- Nitröz oksit (vitamin B12 antagonisti)
- 6-azouridin triasetat (vitamin B12 antagonisti)

***Homosistein Metabolizmasındaki Genetik Bozukluklar***

Hcy ile nörolojik bozukluklar arasındaki ilişki ilk olarak metiyonin metabolizmasındaki bir enzim olan CBS enzim yetersizliğine sahip beyin atrofisi, mental retardasyon ve nöbetlerle karakterize klinik bulguları olan hastalarda gösterilmiştir. Hcy metabolizmasında görev alan enzimlerden CBS, MTHFR ve MS enzimlerinin hatalı veya eksik sentezlenmesi homosisteinemi ve homosisteinüriye neden olmaktadır (60). Bu enzimlerden en yaygın görüleni otozomal resesif geçiş özelliği gösteren CBS enzim eksikliğidir. Bu enzim geninde en yaygın görülen mutasyon 844ins68'dir. CBS'nin homozigot formu yaklaşık 1/200.000 sıklıkla ortaya çıkar. Ciddi hiperhomosisteinemiye neden olan ve nadir olarak görülen bu enzim eksikliği, popülasyonda yetişkin inme oluşumunda, MTHFR enzim

eksikliğine göre daha az etkilidir ve bu kişilerde açlık Hcy konsantrasyonu 200-400  $\mu\text{mol/L}$ 'dir. Heterozigot formu yaklaşık %1 ile %2 sıklıkta ortaya çıkar ve hiperhomosisteinemi düzeyi daha ılımlıdır (57). Sonraki yıllarda bu hastalara ilaveten AD ve benzer demans tabloları, Parkinson hastalığı, inme, hafif bilişsel bozukluk gibi pek çok hastalıkta artmış plazma homosistein düzeyi bulunmuştur (57,61).

Hiperhomosisteineminin bir diğer yaygın nedeni MTHFR enzim eksikliğidir. MTHFR'nin homozigot formu nadir görünen ve otozomal resesif geçen bir hastalıktır. Ciddi ya da orta hiperhomosisteinemi ve erken ölümler görülür. Tedavi seçeneklerinin pek olmaması CBS'e göre daha kötü prognoza sahip olmasına neden olmaktadır. MTHFR genindeki en yaygın mutasyon 677. kodondaki CT değişimidir. Bu durumda alanin aminoasiti yerine valin aminoasiti şifrelenir. Bu polimorfizmin homozigot sıklığı popülasyonlara göre değişiklik göstermekte olup %5-10 oranındadır. C677T homozigot mutasyonlu hastalarda plazma homosistein seviyesi genelde 20-40  $\mu\text{mol/L}$  ve enzim aktivitesi %0-20 arasındadır. (61,62)

MS enzim eksikliği de hiperhomosisteinemi nedenidir. MS genindeki mutasyonlar da tromboembolik olaylar için genetik bir risk faktörüdür. MS enzim geninde en yaygın olarak A2756G mutasyonu görülür. Bu genlerdeki mutasyonlar, farklı etnik gruplar ve coğrafik bölgeler arasında heterojen dağılım gösterirler. MS enziminin artmış oksidatif strese aktivitesini azaltarak homosisteinin metiyonine çevrilmesini azalttığı gösterilmiştir. CBS enziminin ise zıt olarak oksidatif çevrede aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (63,64).

### ***Kronik Hastalıklar***

Homosisteinin atılımı böbreklerden olduğundan böbrekleri etkileyen hastalıklar Hcy düzeylerini yükseltmektedir. Özellikle akut ve kronik böbrek yetmezliklerinde plazma Hcy düzeyleri oldukça yükselmektedir (65). Lösemi, lenfoma, over, meme ve pankreas gibi çeşitli kanserlerde hücreler tam olgunlaşmadan kana salındıklarından, Hcy metabolizmasında görev alan enzimler tam gelişmediğinden ve transforme hücreler endojen Hcy'yi metabolize edemediklerinden dolayı Hcy düzeyleri yükselmektedir (65). Psöriozisli vakalarda plazma Hcy düzeyleri artar ve nefropati, retinopati gibi komplikasyonlu diyabetik hastalarında da Hcy düzeyi daha yüksek

bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada diabetik hastalarda plazma Hcy düzeylerinin glomeruler filtrasyon hızı ile ters orantılı, serum kreatin düzeyleri ve sigara içimi ile ise doğru orantılı olarak arttığı bulunmuştur (66). Hipotroidli hastalarda da plazma Hcy düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda hipotroidik kişilerde glomerul filtrasyon hızının düştüğü ve buna bağlı olarak Hcy yeterince atılamadığı saptanmıştır (67).

### ***Edinsel Nedenler***

Hcy, folat, B12 ve B6 vitamin eksikliğinin hassas bir göstergesidir ve besinler ile alınan B6 ve B12 vitamini ve folatın eksikliği hiperhomosisteinemiye neden olabilir. Yapılan çoğu çalışmada serum B12 vitamini, folat ve B6 vitamini konsantrasyonları ile plazma Hcy konsantrasyonu arasında negatif bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir (4,20,30,63-67). Folik asit ve vitamin B12 Hcy metabolizmasında remetilasyon basamağında görev alan kofaktörlerdir. Besin alımında eksiklik, kullanım defektleri, malabsorbsiyon, kanser hastaları, gebelerde artan ihtiyaç, hemodiyalizde folat kayıpları ve aktif folat oluşumu için gerekli enzim veya kofaktör eksiklikleri gibi birçok faktör nedeniyle folik asit eksikliği meydana gelebilir (4). Vitamin B12 eksikliği ise, diyetle alım eksikliği, intrinsek faktör eksikliği, taşınmasını sağlayan transkobalamin yokluğu ile ince barsak patolojileri, ilaca bağlı emilim bozukluğu gibi birçok faktöre bağlı oluşabilir (61).

Folik asit ve vitamin B12 eksikliğinde; MS aktivitesi bozulacağından, plazma veya serum Hcy düzeyleri yükselir. Folik asit ve vitamin B12 eksikliği ile, Hcy konsantrasyonu yükselir. Bunun sonucunda hücreSEL SAM konsantrasyonunun düşmesi ile beraber merkezi sinir sistemindeki SAM bağımlı metilasyon reaksiyonlarının inhibe olmasına neden olur. Metilasyonun inhibe olması; nöronal membranlardaki fosfolipidlerin metilasyonunun azalması ve nöron hücre membranlarının stabilitesinin bozulması ile sonuçlanır. Ayrıca; dopamin, serotonin, nörepinefrin gibi nörotransmitterlerin sentezini ve düzeylerini de etkiler (28). Seshadri ve ark. (2002), beslenme ve vitamin eksiklikleri sonucu oluşan demans veya demans başlamadan önce Hcy seviyesinin yükselip yükselmediğini araştırmak için yapmış oldukları çalışmada plazma Hcy seviyesinin demans ve AD'nin gelişimi için güçlü, bağımsız bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir (10). Karaman ve ark.



(2006) ise, AD'da homosistein seviyelerini, vasküler demanslılara göre daha düşük; B12 vitamini seviyesini daha yüksek; folat değerlerini ise birbirine yakın olduğunu belirtmiştir (68).

Çiftçi ve ark. (2008), yapmış oldukları çalışmada, AD'da folat ve B12 vitamini kan düzeylerinin düşük olduğu ve beraberinde plazma Hcy düzeyinin yüksek seyrettiği (69), başka bir çalışmada da aynı şekilde AD'da folat düzeyinin düşük olduğunu bildirmişlerdir (70). Mattson ve ark. (2003) da, programlanan hücre ölümünde ve düzenleyici nörogenesizde önemli rol alan sinir sisteminin, normal gelişimi için diyetle alınan folata ihtiyaç duyulduğunu belirtmiş ve yaptıkları epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda, inme, AD ve PD dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalık ile artmış Hcy seviyesi ve folat eksikliği arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir (34). Başka bir çalışmada da folat eksikliği ile depresyonla ilişkili hiperhomosisteineminin biyokimyasal, nörokimyasal ve klinik korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir (55).

Folik asidin günlük ihtiyacı 50 µg'dır. Toplam vücutta 5 mg kadardır. Folik asit gereksinimi hemolitik anemilerde, alkolizmde, büyüme çağında, gebelikte ve laktasyonda artmaktadır (36). Ayrıca, 0.2-15 mg/d arasındaki folik asit dozlarının toksisiteye yol açmadan plazma hcy düzeyinin düşmesini sağlamaktadır (56). Günlük diyete 0.5 mg folik asit eklenerek hcy seviyeleri %25 azaltılabilmektedir (71). Bhargava ve ark. (2012) vasküler hastalıklı kişilerde folat ve B12 vitamini ile hiperhomosisteinemi arasındaki ilişkiyi incelediği çalışmada; plazma hcy konsantrasyonunu azaltmada sadece folat takviyesinin, folat ve kobalamin kombinasyonu kadar etkili olduğu belirtilmiş ve folat takviyesinin vasküler hastalıkların morbidite ve insidansını azaltacağı sonucuna varmışlardır (72).

Kolling ve ark. (2011), Hcy'nin lipid peroksidasyonu ve reaktif türlerin üretimini arttırdığı ve aynı anda folik asit uygulamasının antioksidan özelliğinden dolayı Hcy'nin etkilerini önlediğini gözlemlemişler, hiperhomosistemini oksidatif stres ile ortaya çıkabileceği ve Hcy nedenli kardiyovasküler değişikliklerde destekleyici tedavi olarak folik asit takviyesinin kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (73).

Vitamin B6'nın aktif formu olan pridoksal 5-fosfat hcy metabolizmasında transsülfürasyon yolundaki CBS ve CGL enzimlerinin kofaktörüdür bu nedenle eksikliği hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır (31).

### ***Fizyolojik Nedenler***

Plazma Hcy konsantrasyonu ile yaş ve cinsiyetin yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (44). Sağlıklı kişilerde Hcy düzeyi 40 yaşına kadar sabittir. 40 yaşından sonra (özellikle 70 yaşlarında) hızlıca yükselir. Bu artışın renal fonksiyon ve enzim düzeylerinde azalmayla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Yaşlılarda yükselmiş Hcy seviyesi ile kardiyovasküler olaylardaki artış arasında korelasyon vardır (74). Genç hastalarda orta homosisteinemi ile birlikte serebrovasküler hastalık gözlenmesinin genetik olma olasılığı fazlayken, yaşlı hastalarda homosisteinemi genellikle edinseldir (59).

Erkeklerde hcy düzeyi bayanlara göre az da olsa yüksektir (75). Hcy ile östradiol arasında negatif bir korelasyon olduğu ortaya konmuştur. Postmenopozal dönemdeki kadınlarda östrojen destek tedavisinde Hcy düzeyi önemli oranda düşer. Bu kadınlara uygulanan hormon replasman tedavisi ile Hcy düzeyleri azalmaktadır (75).

Hcy, meyve sebze tüketiminin artışı ile anlamlı derecede düşer. Vücut kitle indeksi ile Hcy arasında da zayıf bir ilişki vardır. Sigara içmeyenlerde az-orta içenlere ve ağır içenlere göre Hcy düzeyi daha düşüktür (76). Artmış plazma Hcy düzeylerinin özellikle yüksek serum kolesterol düzeyleri, yüksek kan basıncı ve sigara içmek gibi diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığında ateroskleroz için bağımsız risk faktörü olduğu bildirilmektedir (77).

Park ve ark. (2008) yaşlı erkeklerde (yaş ortalaması  $73.6 \pm 6.9$  yıl) plazma Hcy konsantrasyonu ve hava kirliliği arasındaki ilişkiyi incelediği çalışmada; Total Hcy'nin trafik kaynaklı parçacıklar (siyah karbon ve organik karbon) ile arasında pozitif bir ilişki bulmuşlar ve bu partiküllere maruziyetinin total Hcy seviyesini artıracağını bildirmişlerdir. Plazma folat ve B12 vitamin seviyesi düşük olan kişilerde siyah karbon ve organik karbon etkisinin daha belirgin olduğunu tespit etmişlerdir (78).

### ***İlaçlar***

Bazı ilaçlar plazma hcy konsantrasyonunu arttırıcı etkiye sahiptir. Bunlara örnek olarak metotreksat (mtx), metilksantin (vitamin B6 inhibitörü), 6-azauridin, tamoksifen, atorvastin, fenofibrat (79), antikonvulsanlar (epilepsiyi önleyiciler) (80), nikotinik asit (81), nitrik oksidi (NO, Metiyonin sentaz inhibitörü) (82), levodopa (parkinson tedavisinde kullanılan)'yı verebilir. Metotreksat (dihidro folat redüktaz inhibitörü); folat depolarını azaltarak homosisteinde geçici bir artışa neden olurken, Fenitoin (folat antagonist); folat metabolizmasını durdurarak, Teofilin (fosfodiesteraz inhibitörü) ve sigara kullanımı ise; piridoksal fosfat (vitamin B6) kullanımını antogonize ederek hiperhomosisteinemiye yol açarlar (66,80).

### **Hiperhomosisteinemi İle İlişkili Hastalıklar**

Hcy düzeyinin artması, nörodejeneratif etkiler için potansiyel bir kaynaktır (83). Epidemiyolojik çalışmalar, yaşlı insanlarda bilişsel performans ile plazma Hcy derişimi arasında lineer ters bir ilişki olduğunu ve plazma Hcy derişimindeki yükselme demans gelişiminde önemli bir etken olduğunu göstermektedir (84). Yapılan çalışmalarda, Hcy artışının, hem depresyon, hem de demans riskini arttırdığı, PD hastalarda yüksek Hcy düzeylerinin depresyonla ilişkili olduğu, AD ve PD hastalarında toplam Hcy konsantrasyonu anlamlı derecede yüksek bulunduğu belirlenmiştir (84,85)

Mccaddon ve ark. (2003), yapmış oldukları çalışmada, AD'da Hcy, sistein ve glutasyon seviyelerine bakmışlar, total Hcy ve sistein seviyelerinin AD'da yükseldiğini ve hastalarda homosisteinin transsülfürasyon yolu sağlam iken remetilasyon yolunda defekt olduğunu ve total plazma glutasyon seviyelerinin hastalarda kognitif skorla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (86). Muszalska ve ark. (2012), şizofreni hastalarında oksidatif stressin bazı parametrelerinin Hcy'nin yükselmiş seviyesine etkisini araştırdıkları çalışmada; Kontrol grubuna göre Şizofreni hastalarında plazma Hcy seviyesinin daha yüksek olduğunu ve oksidatif stres ve Hcy miktarındaki artış arasında bir kolerasyon olduğunu belirlemişlerdir (87).

Yapılan çalışmalarda Hcy'nin serebrovasküler, koroner ve periferik vasküler hastalığı olanlarda kontrollere göre daha yüksek düzeylerde bulunduğu gözlenmiştir ve yüksek hcy düzeyinin, koroner, serebrovasküler ve periferik ateroskleroz ve venöz tromboz için, diğer bilinen risk faktörleri olmaması durumunda dahi tek başına bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (49,88). Zinellu ve ark. (2010), kronik böbrek hastalarında LDL'ye bağlı hcy seviyesini araştırdıkları çalışmada; kontrol grubuna göre KBY hastalarında total plazma hcy, sistein, glutatyon ve glutamin sistein seviyesini daha yüksek olduğunu ve KBY hastalarında gözlenen Hcy'nin LDL'deki artmış seviyesi kardiyovasküler risk ile açıklanabileceği bildirmişlerdir. Ayrıca LDL S-homosisteinilasyonun kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olarak düşünülebileceğini belirtmişlerdir (89). Rocha ve ark. (2012), yapmış oldukları çalışmada, hiperhomosisteiminin nitrik oksit biyoyararlanımını azalttığını ve bu yüzden vasküler hastalık ve endotelial disfonksiyonda bağımsız bir risk faktörü olarak düşünülebileceğini belirtmişlerdir (90). Omrani ve ark. (2011), akut iskemik stroklu hastalarda strok ile serum homosistein, folat ve B12 vitamini seviyeleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmişler ve hiperhomosisteinin strokta bağımsız bir risk faktörü olarak rol alabileceğini bildirmişlerdir (91). Wang ve ark. (2010), yapmış oldukları çalışmada, olan Oksidatif stresin obstruktif uyku apne/hipopne sendromlu (OSAHS) yaşlı hastalarda serum homosistein seviyesini yükseltebileceği belirtmişlerdir (92).

## **SÜLFİTLER**

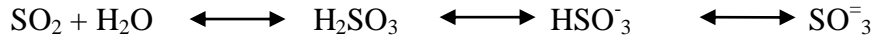
Sülfitin ( $\text{SO}_2$ ) hijyenik amaçlarla kullanımı eski çağlara kadar gitmektedir. Besin katkı maddesi olarak ilk defa 1664 yılında kullanılmıştır. Yaygın şekilde koruyucu maddeler olarak kullanılan sülfidler, sülfür içeren aminoasitlerin metabolizması sırasında vücut içinde sürekli oluşturulmaktadır. Sülfid; vücuda alınınca sülfid oksidaz (SOX) enzimi tarafından sülfat iyonuna yükseltgenir (93). Hava kirliliğinin önemli bir bileşeni olan  $\text{SO}_2$ 'nin toksik etkileri uzun zamandan beri bilinse de,  $\text{SO}_3^-$ 'in besin katkı maddesi olarak kullanımı ile ortaya çıkan zararlı etkileri son yıllarda önem kazanmaya başlamıştır.

Kükürt dioksit ve Na-metabisülfid ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), K- metabisülfid ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), Na bisülfid ( $\text{NaHSO}_3$ ), K-Sülfid ( $\text{K}_2\text{SO}_3$ ) ve Na -Sülfid ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) gibi çeşitli sülfid

tuzları içeren sülfütlü ajanlar sıklıkla gıda preparatlarında antioksidan gibi ve bakteriyel büyümenin önlenmesi ve istenmeyen renk değişikliklerini geciktirmek için gıda katkı maddesi olarak kullanılır (94). Sülfid iyonunun sülfütlü ajanlar içeren çeşitli yiyecek ve içeceklerin alınması durumunda vücut sıvılarında kükürt dioksit ve sülfid tuzları ile oluştuğu gösterilmiştir (94). Endojen sülfid aynı zamanda kükürt içeren amino asitlerin vücudun normal işlevleri sonucu olarak oluşturulabilir (93). Her iki şekilde de sülfid toksik bir moleküldür ve detoksifiye edilebilir. Bu amaçla, memeli dokuları SOX enzimi içerir. SOX 2 elektron oksidasyonu ile sülfidin sülfata detoksifikasyonunu katalizler. Böylece memeli hücrelerine sülfidin toksik etkilerinden korunur (95).

### **SO<sub>3</sub>'in Hücresel Sıvılarda Temel Kimyasal Reaksiyonu**

Gerek endojen gerekse de eksojen yolla alınan SO<sub>2</sub> vücutta su ile reaksiyona girerek labil bir asit olan sülföröz aside (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) döner. H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> özellikle yüksek pH ve 37 °C'da kolayca bisülfid (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) iyonuna dönüşür. HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> ise daha yüksek pH'larda SO<sub>3</sub><sup>=</sup> iyonuna dönüşmektedir. Fizyolojik pH'larda HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve SO<sub>3</sub><sup>=</sup> iyonlarının birbirlerine kolayca dönüşebildikleri gösterilmiş, bu yüzden SO<sub>3</sub> her iki iyon için de ortak isim olarak kullanılmıştır.



Reaksiyonda görüldüğü gibi ağız ve mide gibi asidik ortamlarda besinler ile alınan SO<sub>3</sub><sup>=</sup> tuzları kolayca ve hızlı bir şekilde H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>'e dönüşmekte bu asit de fizyolojik pH'da SO<sub>3</sub><sup>=</sup>'e dönüşmektedir (96)

Toksik özelliği olan SO<sub>3</sub>'in vücutta etkin bir şekilde metabolize olması gerekir. SO<sub>3</sub> metabolizmasındaki temel yol enzimatik oksidasyondur. Bu yoldaki mitokondrial bir molibdohemoprotein olan SOX enzimi SO<sub>3</sub>'in zararsız bir bileşik olan inorganik sülfata (SO<sub>4</sub>) dönüşümünü katalizler (96).

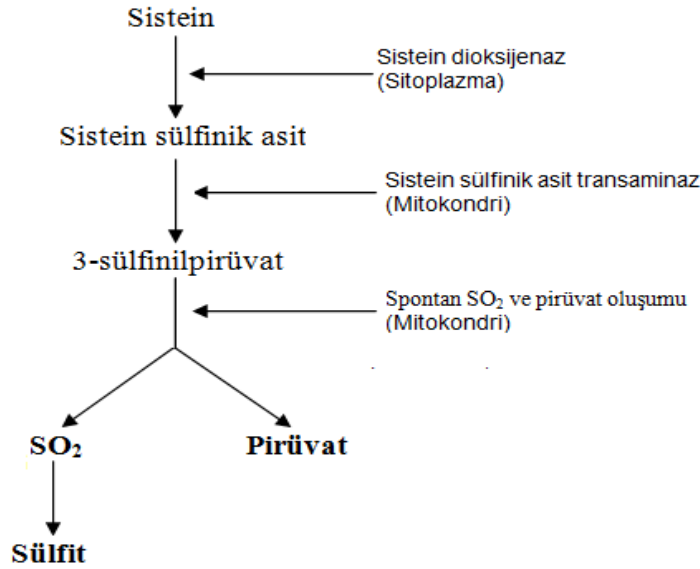
### **SO<sub>3</sub><sup>=</sup>'e Maruz Kalma**

SO<sub>3</sub>'lere endojen ve eksojen olmak üzere 2 şekilde maruz kalınmaktadır.

### **Endojen Maruz Kalma**

SO<sub>2</sub> ve SO<sub>3</sub><sup>-</sup> tuzlarının dışında SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'e endojen olarak da maruz kalınmaktadır. Patolojik endojen sülfid birikimi, diyabette insülin sekresyonunu azaltabilmesinin yanı sıra, etilmalanik ansefalopati, ağır nöronal yetmezlik, dolaşım bozukluğu ve kronik diareye neden olur (97). Vücutta kükürt içeren amino asitlerin ve diğer SO<sub>3</sub><sup>-</sup> içeren bileşiklerin katabolizması esnasında önemli düzeyde SO<sub>3</sub><sup>-</sup> oluşur. Endojen SO<sub>3</sub><sup>-</sup> üretiminde en önemli yolak sistein ve Metiyonin amino asitlerinin katabolizmasıdır (17).

Sistein katabolizması sisteinin, sistein dioksijenaz (CDO) ile sistein sülfirik aside çevrilmesi ile başlar. Bu enzim sitoplazmada bulunduğu için reaksiyon da burada başlamaktadır. Daha sonra sistein sülfirik asit, mitokondriye giderek orada sistein sülfirik asit transaminaz enzimi ile transaminasyona uğrayarak 3-sülfirnilpirüvat oluşturur. Son aşamada bu molekül spontan olarak SO<sub>2</sub> ve pirüvata dönüşür (17,96). SO<sub>2</sub> ise hidrate olarak SO<sub>3</sub><sup>-</sup> oluşturmak üzere H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>'e dönüşür. Şekil 4' de sistein katabolizması esnasında sülfid oluşumu verilmiştir.



**Şekil 4.** Sistein katabolizması esnasında sülfid oluşumu

Metionin katabolizmasında da SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in kaynağı sisteindir. Metionin bir sitoplazmik enzim olan, Metiyonin s-adenozin transferaz ile SAM'a dönüşür. Bu da s-adenozinmetil transferaz ile SAH'a döner. Daha sonra bu bileşik s-adenozin

homosistein hidrolaz ile Hcy'ne bu da CBS ile sistatyonine dönüşür. Bunu sistatyoninin CGL ile sisteine dönüşümü izler. Bu reaksiyon zinciri sonucu oluşan sistein ise daha önce tarif edildiği şekilde bir dizi reaksiyon sonucu  $SO_3^-$  oluşturmaktadır (98). Bunlara ilaveten hipotaurin katabolizması ve hidrojen kükürt ( $H_2S$ ) oksidasyonu da daha az önemli oldukları düşünülen diğer endojen  $SO_3^-$  oluşum mekanizmalarıdır (96). Şekil 3'da Metiyonin katabolizması sırasında sülfid oluşumu verilmiştir.

### ***Eksojen Maruz Kalma***

Eksojen  $SO_3^-$  maruz kalma; hava kirliliği, ilaçlar, yiyecek ve içecekler ile olmak üzere 3 ana başlık altında toplanır.

***a) Hava kirliliği ile maruz kalma:*** Fosil enerji kaynaklarının yakılmasına bağlı olarak atmosfere katılan  $SO_2$ , bilindiği gibi hava kirliliğinin önemli bir bileşenidir (99).  $SO_2$ 'in solunum sisteminde başta bronkokonstrüksiyon olmak üzere alveol kalınlaşması, alveol hiperplazisi, akciğer ödemi ve akciğer kanserine yatkınlık gibi toksik etkileri gösterilmiştir (100,101).

$SO_2$ 'e hava kirliliği ile maruz kalmanın solunum sistemindeki bahsedilen etkilerine ek olarak kan ve beyin dokusunda da çeşitli etkileri rapor edilmiştir. Bu etkiler, beyin tümörlerinin görülme sıklığında artış, görsel ve somatosensorial uyarılma potansiyelerinde izlenen latens uzaması, eritrosit antioksidan defans sistemi ve lipid peroksidasyonundaki değişiklikler olarak sınırlanabilir (102,103).

***b) İlaçlar ile maruz kalma:***  $SO_3^-$  ilaç endüstrisinde çeşitli dozlarda ilaç etkinliğinin azalmasına neden olan oksidasyonu önlemek amacı ile kullanıldığı gibi, suda eriyebilirliği olmayan çeşitli ilaçlara ilave edilerek eriyebilirlik kazandırmak içinde kullanılmaktadır (104). İlaçlara ilaveten total parenteral beslenme sıvıları, periton diyaliz sıvıları yine  $SO_3^-$  içermekte ve kullanımları esnasında oldukça yüksek oranda bu maddeye maruz kalınmaktadır (105).

***c) Yiyecek ve içeceklerle maruz kalma:***  $SO_3^-$ 'in bir başka kullanım alanı yiyecek ve içeceklerin korunması ve dayanıklılığının arttırılması amacı ile gıda endüstrisidir. İlk olarak karışık fonksiyonlu bir enzim olan ve pek çok gıdada

bulunan Polifenol oksidazı (PDO) inhibe ettiğinin bulunması,  $SO_3^-$ 'in gıda sanayisinde kullanılmasına neden olmuştur (106).  $SO_3^-$ 'in bu amaçla kullanılması diğer besin katkı maddelerinde olduğu gibi olası toksik etkilerine karşı bir takım düzenlemelerin ve kuralların ortaya konmasına neden olmuştur (107).

Günlük alınan pek çok besin değişik düzeylerde  $SO_3^-$  içermektedir (108). Beslenme alışkanlığına göre günlük  $SO_3^-$  tüketimi kolayca kabul edilebilir düzeyin üzerine çıkabilir. Bu  $SO_3^-$  içeren bileşiklerin besinlerdeki oranları, çeşitli deneysel çalışmalar sonucunda Dünya Sağlık Örgütü Besin Katkı Maddeleri Uzman Komitesince (WHO Expert Committee on Food Additives) belirlenmiş ve 1974 yılında açıklanmıştır (109). Bu komiteye göre günlük kabul edilebilir süfit alımı (The Acceptable Daily Intake=ADI) 0.7 mg/kg olarak belirlenmiştir.

### **$SO_3^-$ Toksikitesi**

Günlük  $SO_3^-$  tüketiminin, yiyecek ve içeceklerle alınan miktarına, hava kirliliği ve ilaç endüstrisi yoluyla alımının da katılması ile oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Besinlerle  $SO_3^-$  alımının zararlı etkileri ilk olarak 1973 yılında rapor edilmiştir (110). Bu tarihten şimdiye dek, daha çok allerjik ve astımlı bireylerde olmak üzere normal bireylerde de oldukça yoğun olarak  $SO_3^-$  hipersensitivitesi rapor edilmiştir (93,94,105,111). Bu hipersensitivite hastalarda başta bronkokonstrüksiyon olmak üzere ürtiker, laringeal ödem ve/veya anjioödem olarak ortaya çıkmaktadır. Bu şikayetlerle başlayan ve sonu ölümlle biten anafilaktik şok vakası rapor edilmiştir (111). Bu etkilerin ortaya çıkış mekanizmaları aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

1.  $SO_3^-$ 'in alımını takiben su ile birleşip  $H_2SO_3$  oluşumu ve bu asidin direk iritatan etkisi (112)
2. İritatan reseptörlerin ve pulmoner C liflerinin uyarılması sonucu çeşitli pulmoner nöropeptidlerin salınımı (113)
3. Mast hücre degranülasyonu (114)
4. Nöral kolinerjik refleks mekanizmanın uyarılması (115)
5. İmmünglobulin E aracılı (IgE) immün yanıt (93)



Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile bu maddenin allerjik yan etkilerine ilaveten özellikle yüksek dozlarda, pek çok hücre sel yapı ile etkileşebildiği gösterilmiş ve toksik özellikleri daha iyi tanımlanmaya başlanmıştır. Genetik materyalde sitozin ve urasil bazları ile reaksiyona girerek hasar ve mutasyonlara sebebiyet verdiği, lipit ve proteinler ile reaksiyona girdiği gösterilmiştir (116,117). Bu etkilerde direk veya dolaylı olarak oksijen ( $O_2$ ) ve kükürt merkezli radikaller en önemli mekanizmadır (117,118). Bunlara ilaveten elastaz gibi serin proteinazların inhibitörü olan  $\alpha_1$ -antiproteinazı ( $\alpha_1$ -AP) aktivitesini engelleyerek, akciğer hasarı oluşturduğu bildirilmiştir (119).

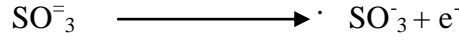
$SO_3^-$ 'in genetik enzim yokluğuna bağlı şiddetli nörolojik disfonksiyonlara, mental gerilik ve erken ölüme, görsel ve somatosensoryel uyarılma potansiyellerinde latens uzamasına (120), tek başına ve peroksinitrit anyonu ( $ONOO^-$ ) ile beraber hücre canlılığı üzerine olumsuz etkilere (121) ve nöronlarda redükte glutatyon (GSH) içeriğinin azalmasına neden olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir (122). Ayrıca çeşitli motor nöron hastalıkları, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda kükürt içeren amino asit metabolizmasında anormallikler saptanmış olması  $SO_3^-$ 'in nörotoksisite açısından önemini göstermektedir (123).

$SO_3^-$ 'in zararlı etkilerine rağmen birçok deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü Besin Katkı Maddeleri Uzman Komitesince güvenli kabul edilen maddeler sınıfında yer almıştır (124).

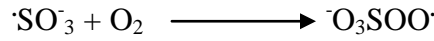
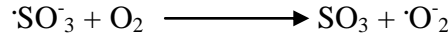
### **$SO_3^-$ 'in $O_2$ ve Kükürt Merkezli Radikaller Oluşturması**

Sülfitin, memeli hücrelerindeki olumsuz etkileri yayınlanmış olmasına rağmen hücre toksisitesini indükleyici mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Yaygın olarak kabul edilen fikre göre hücrelerdeki sülfid toksisitesindeki esas rolü kükürt ve oksijen kökenli serbest radikaller oynayabilir (117,125). Serbest radikallerin hücre hasarındaki rolleri de çok iyi bilinen bir konudur.  $SO_3^-$ 'in toksik etkilerinin ortaya çıkmasındaki en önemli mekanizmanın kükürt ve  $O_2$  merkezli radikaller olduğu düşünülürse bu maddenin metabolize edilerek detoksifiye edilmesinin ne kadar önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

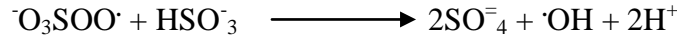
Bu radikaller temel olarak  $\text{SO}_3^-$ 'in enzimatik olmayan otooksidasyonu, "Horseradish" peroksidaz (HRP) ve Prostaglandin hidroperoksidaz (PGH sentaz) gibi çeşitli peroksidazlar tarafından enzimatik oksidasyonu esnasında oluşur (126,127). Peroksidazların enzimatik oksidasyonu esnasında  $\text{SO}_3^-$ 'in tek elektron kaybı sonucu oluşan ilk radikal kükürttrioksit radikalidir ( $\cdot\text{SO}_3^-$ ) (126).



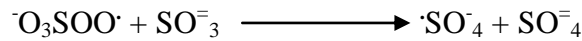
$\cdot\text{SO}_3^-$  radikali aynı zamanda nonenzimatik olarak çeşitli iyon ve diğer radikallerin varlığında da oluşmaktadır. Bu radikal moleküler  $\text{O}_2$  ile reaksiyona girerek büyük oranda oldukça reaktif olan kükürt peroksil radikali ( $\cdot\text{O}_3\text{SOO}\cdot$ ) ve daha az miktarda süperoksit radikali ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) oluşturur (127).



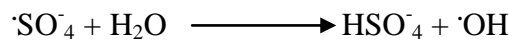
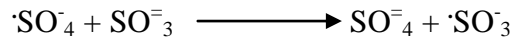
$\cdot\text{O}_3\text{SOO}\cdot$ 'nin  $\text{HSO}_3^-$  ile reaksiyona girerek hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) radikali oluşturduğu bilinmektedir (126,127).



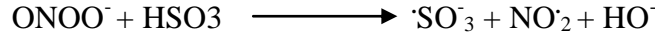
Oluşan bu  $\cdot\text{O}_3\text{SOO}\cdot$ 'nin karsinojenik benzo ( $\alpha$ ) piren molekülü ile reaksiyona girerek kokarsinojenik etkisi olduğu ve  $\text{SO}_3^-$  radikali oluşumunu aşağıdaki reaksiyonlarda gösterildiği gibi hızlandırdığı bilinmektedir (128).



Bu reaksiyon sonucu oluşan  $\text{SO}_4^-$  radikali bir yandan ortamdaki  $\text{SO}_3^-$  iyonları ile tepkimeye girerek yeni  $\cdot\text{SO}_3^-$  radikallerinin oluşumuna sebep olurken diğer yandan su ile birleşip OH oluşumuna neden olmaktadır (127).



$\cdot\text{SO}_3^-$ 'nin oluşmasındaki bir başka reaksiyon ise  $\text{SO}_3^-$ 'in  $\text{ONOO}^-$  ile verdiği tepkimedir.



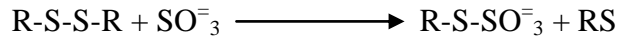
$\text{SO}_3^-$ 'in yukarıdaki reaksiyonlarca kükürt ve  $\text{O}_2$  radikalleri oluşturmaya ilaveten nötrofillerde NADPH oksidaz enzimini aktive ederek  $\text{O}_2$  radikali oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (129).

### **$\text{SO}_3^-$ Metabolizması**

Gerek endojen oluşan gerekse de eksojen maruz kalınan  $\text{SO}_3^-$ 'in detoksifiye edilmesi gerekir. Bunun için 2 temel yolak vardır. Bunlar;

#### ***Oksidatif Olmayan $\text{SO}_3^-$ Metabolizması***

$\text{SO}_3^-$  detoksifikasyonunda oksidatif metabolizmaya göre daha az öneme sahiptir.  $\text{SO}_3^-$ 'in bu şekildeki detoksifikasyonunda sülfitolizis reaksiyonu önemli yer tutar.  $\text{SO}_3^-$  bu reaksiyon ile sistin, okside glutatyon (GSSG) gibi küçük veya daha büyük molekül ağırlıklı proteinlerle disülfid bağları aracılığı ile birleşir ve s-sulfonat adı verilen bileşiği oluşturur. Bu bileşiğin idrarda bulunmaması,  $\text{SO}_3^-$ 'in bu yolla metabolizmasının oldukça az bir öneme sahip olduğunu düşündürmektedir (130).



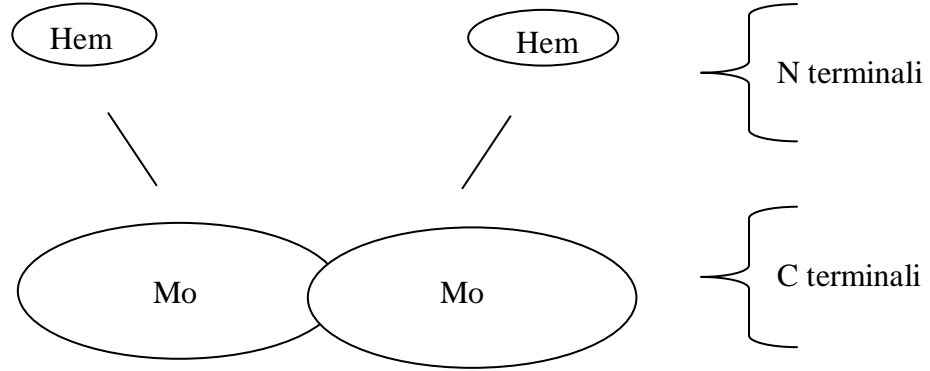
Oksidatif olmayan bir diğer  $\text{SO}_3^-$  metabolizması yolağı tiosülfattır. Tiosülfat  $\text{SO}_3^-$  ve 3-merkaptoprövatın reaksiyona girmesi ile oluşan bir bileşiktir ve  $\text{SO}_3^-$  bu yolla idrarla atılmaktadır. Ayrıca  $\text{SO}_3^-$ 'in, tiosistein ile reaksiyona girerek tiosülfat oluşturduğu bildirilmiştir (130).

#### ***Oksidatif $\text{SO}_3^-$ Metabolizması***

Oksidatif  $\text{SO}_3^-$  metabolizması  $\text{SO}_3^-$ 'in temel detoksifikasyon mekanizmasıdır. Bu işlem vücutta SOX enzimi aracılığı ile yapılmaktadır. SOX, (EC 1.8.3.1) molekül ağırlığı 104 kilodalton (kDa) olan bir molibdohemoproteindir ve memelilerde kofaktör olarak Mo kullanan 3 enzimden birisidir (131). Diğer Mo kullanan enzimler ksantin oksidaz (XO, EC 1.2.3.2) ve aldehit oksidazdır. (AOX, EC 1.2.3.1) (132).

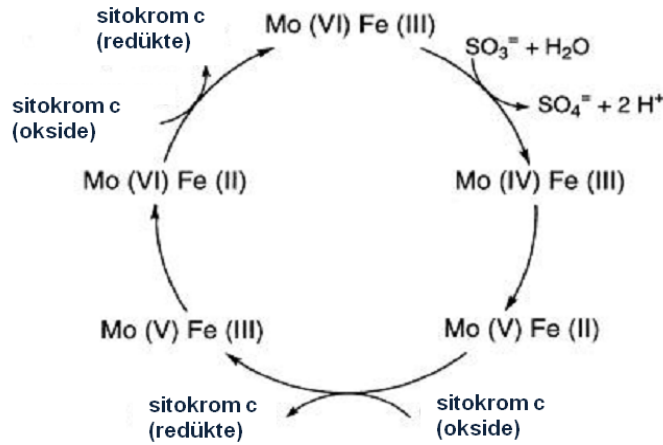
SOX birbirine benzer her biri 52 kDa'luk 2 subünitten oluşmuş dimerik bir yapıya sahiptir ve mitokondrinin iç membranında lokalize olmuştur. 52 kDa'luk bu

subünitler, Hem içeren küçük bir N terminaline ve Molibden (Mo) içeren büyük bir C terminaline sahiptir (133). Bu yapının SOX etkinliğini Mo içeren büyük C terminali gösterir (Şekil 5).



Şekil 5. Sülfat oksidaz enziminin şematik gösterimi.

SOX  $\text{SO}_3^-$ 'i okside ederek  $\text{SO}_4^-$ 'a dönüştürür. İdrarla atılan inorganik  $\text{SO}_4^-$ 'ın yaklaşık % 90'ının SOX enzimi tarafından oluşturulduğu gösterilmiştir.  $\text{SO}_3^-$ 'in, enzimin aktif bölgesine bağlanması Mo'un iki elektron kaybı ile sonuçlanırken  $\text{SO}_3^-$   $\text{SO}_4^-$ 'a çevrilir. Enzimin yeniden görev yapması sitokrom c'nin molekül içi elektron transferi yapmasına bağlıdır (134). Bu işlem de iki basamakta yapılarak enzimin etkinliği tekrar kazandırılır (Şekil 6).



Şekil 6. Sülfat oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonun şematik gösterimi

## İnsanlarda Gözlenen SOX Eksikliği

SO<sub>3</sub>'in, detoksifiye edilmesinin önemi genetik olarak bu enzim eksikliğinin gözleendiği vakalar ile anlaşılmıştır. İlk SOX eksikliği vakası 1967 yılında Mudd ve arkadaşları tarafından rapor edilmiş ve otozomal resesif olarak geçtiği gösterilmiştir (133,134). Mudd (1967) yapmış oldukları çalışmada, karaciğer, beyin ve böbrek gibi dokularda kükürt içeren aminoasitlerin metabolizmasından sorumlu ana enzim olan SOX aktivitesinin olmadığını tespit etmişlerdir (135). 1967 yılından günümüze dek genetik SOX eksikliği tanısı ile hayatın erken dönemlerinde yaşamını yitiren pek çok hasta rapor edilmiştir (136).

SOX enzim eksikliğinin iki şekilde ortaya çıktığı gösterilmiştir.

- 1) SOX genindeki bir mutasyondan dolayı ortaya çıkan SOX enzim eksikliği.
- 2) Molibdopterin sentezinde görev alan birden çok enzimin genlerindeki mutasyondan dolayı ortaya çıkan SOX enzim eksikliği.

### *1) SOX genindeki bir mutasyondan dolayı ortaya çıkan SOX enzim eksikliği;*

Eksikliğin bu formunda SOX geninde bir mutasyon söz konusudur. Bu mutasyonlardan biri, enzimin protein dizilimindeki 160. pozisyonda bulunan arjinin amino asidinin, glisinle yer değiştirmesidir. Bu mutasyon diğer Mo içeren enzimler açısından bir problem yaratmadığı için sadece SOX eksikliğinden söz edilebilir ve “İzole SOX eksikliği” olarak isimlendirilir (134). Beyin magnetik rezonansla görüntüleme de ciddi kistik lökomalazi, beyin kabuğunda buruşma paternli kortikal atrofi, doğum sonrası ilerleyici serebellar hipoplazi saptanır (137).

SOX enziminin bu formunda, erken dönemdeki klinik bulgular arasında huzursuzluk, bilinç değişiklikleri, beslenme zorluğu, tonus artışı ve persistan nöbetler, geç dönemde ise kaba yüz görünümü, mental retardasyon, mikrosefali spastik tetrapleji, lens subluksasyonları sayılabilir. SOX enziminin izole eksikliği ağır klinik tablolara ve ölüme yol açabilmektedir (138). İzole SOX enzim eksikliğindeki, makroskobik en önemli bulgu yaygın beyin atrofisi iken mikroskopik olarak miyelin kaybı, kortekste ve santral nöronlarda kayıp, bazal ganglionlarda kistik değişiklikler ve gliosis olduğu bildirilmiştir (139).

**2) Molibdopterin sentezinde görev alan birden çok enzimin genlerindeki mutasyondan dolayı ortaya çıkan SOX enzim eksikliği;**

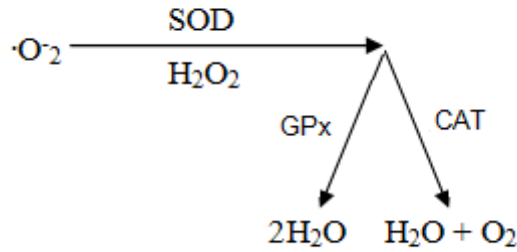
Molibdopterin, kofaktör olarak Mo içeren enzimlerin C terminalinde bulunan ve Mo iyonun bağlandığı integral bir yapıdır. Sentezi Molibdopterin sentaz (MPT sentaz), Mo şelataz gibi enzimlerin ve MogA, MoeA gibi Mo transportunda görevli çeşitli proteinlerin varlığında guanozinden başlayan kompleks bir biyokimyasal yolakla gerçekleşir. Bu sentez basamaklarındaki enzim ve proteinlerden birinin veya birden fazlasının sentezinden sorumlu gende oluşabilecek bir mutasyon, Mo'un molibdopterine olamamasına veya molibdopterin sentezinin gerçekleşmemesine sebep olur. Bu durumda SOX da dahil olmak üzere Mo içeren diğer enzimlerde de defekt söz konusu olacaktır. Bu yüzden SOX eksikliğinin bu tipine “*Mo kofaktör eksikliği*” denmektedir (134). Kofaktör molibden (MOCO) eksikliğindeki klinik bulguların aldehit oksidaz ya da ksantin dehidrojenaz enzimlerindeki eksikliğinden çok sülfür oksidaz enziminin eksikliğine bağlı olarak meydana gelmektedir (139). Hangi şekilde oluşursa oluşsun SOX enzim eksikliği, yukarıda belirtildiği gibi hayatın erken dönemlerinde ölümle sonuçlanan ciddi bir kalıtsal hastalıktır.

**SO<sub>3</sub>'in Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri**

SOX'in genetik yetmezliği nedeni ile ortaya çıkan nörolojik bozukluklara ilaveten, SO<sub>3</sub>'in direkt veya dolaylı olarak pek çok nörotoksik etkisi bulunmuştur (14,118,119,135). Örneğin, motor nöron hastalığı, Parkinson ve Alzheimer gibi çeşitli nörolojik hastalıklarda bozulmuş kükürt metabolizması rapor edilmiştir. Bu hastalarda, sistein amino asidinin plazma düzeyinin arttığı bulunmuştur. Bu amino asit, endojen SO<sub>3</sub><sup>-</sup> oluşumu bahsinde anlatıldığı gibi vücutta üretilen SO<sub>3</sub>'in ana kaynağıdır. Yine aynı hastalarda ksenobiyotiklerin SO<sub>4</sub>'la konjugasyonunda bir bozukluk ve artmış sistein/ SO<sub>4</sub> oranı saptanmıştır (14). Bunun anlamı, organizmanın hem SO<sub>3</sub>'in hem de SO<sub>4</sub>'la detoksifiye edilecek olan çeşitli ksenobiyotiklerin zararlı etkisine karşı savunmasız kalmasıdır. SO<sub>4</sub> oluşumunun önemli bir kaynağı, SO<sub>3</sub>'in SOX ile katabolizmasıdır (105). Bu hastalarda SOX aktivitesi ve SO<sub>3</sub> düzeyinin ne olduğu bilinmese de, hastalıklarının patogeneğinde SO<sub>3</sub> metabolizmasındaki bir defektin rol alabileceği bildirilmiştir (14).

Kükürt metabolizmasındaki bozukluğun bir sonucu da idrar ve kanda sistein-s-sülfat düzeyinin artmasıdır (135). Bu metabolit, merkezi sinir sisteminde glutamik asit, aspartik asit gibi hem nöroeksitatör hem de nörotoksik özelliklere sahip amino asitlere yapısal olarak benzemektedir. Yapısal olarak bu iki amino aside benzeyen birçok molekülün benzer etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (140). Nöronlar normal şartlarda bu amino asitlerin nörotoksik etkilerinden kurtulmayı başarırlar. Çünkü bunlar yaygın olarak hücre içinde bulunurlar ve her ikisi için de hücre dışından içine doğru çalışan yüksek afiniteli transport sistemlerinin varlığı gösterilmiştir (141). Böyle bir transport sisteminin sistein-s-sülfat için bulunmamasının, SOX eksikliğinde görülen nöron tahribatının bir sebebi olduğu ileri sürülmektedir (141).

$SO_3^-$ 'in nörotoksitesinde öne sürülen diğer bir mekanizma da GSH depleksiyonudur (142). GSH bilindiği gibi, serbest radikallere karşı antioksidan savunma sisteminin önemli bir ögesidir.  $O_2^-$ 'nin SOD ile enzimatik yıkımı sonucu oluşan Hidrojen peroksidin ( $H_2O_2$ ) suya çevrilerek detoksifiye edilmesi işlevini GPx ve Katalaz (CAT) enzimleri birlikte paylaşır (143).



GPx bu işlevini yaparken GSH GSSG'a döner. GSSG ise, Glutasyon redüktaz ile (GR) tekrar GSH'a dönüştürülür (143). Bu siklusun  $SO_3^-$  iyonları tarafından bozulabileceği gösterilmiştir.  $SO_3^-$  iyonu GSSG ile reaksiyona girerek S-sulfoglutasyon ( $GSSO_3$ ) oluşumuna neden olur. Bu molekül ise GR tarafından tekrar GSH'a dönüştürülemediğinden transpeptidazlar ile parçalanarak tiosülfat haline çevrilir (144). Bu molekül de bilindiği gibi idrarla atılmaktadır. GSH'un bu mekanizma ile tüketilmesi sülfitin sitotoksitesini artırır ve nöronları radikal hasarına karşı savunmasız bırakır. Sülfid sitotoksitesi aynı zamanda oksijen geri alım artışı, reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu ve lipid peroksidasyonuna eşlik

eder. Bu etkiye ek olarak  $GSSO_3$  molekülünün benzo( $\alpha$ )piren gibi Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) detoksifikasyonunda görev alan Glutasyon S-transferaz (GST) enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir (144). Bu bulgu Alzheimer hastalığında ksenobiyotik metabolizmasındaki bozuklukların gösterilmesi ile klinik olarak da desteklenmiştir (14). Bu iki etki beraber düşünüldüğünde hücrelerin toksinlerin etkilerine karşı oldukça dayanıksız olduğunu göstermektedir.

Nitekim GSH düzeyi düşürülmüş hayvanlarda çeşitli nörotoksinlere karşı hassasiyetin arttığı bilinmektedir. Parkinson ve Incidental Lewy Body hastalığında (ILBD) nöronların GSH düzeyinin kontrole göre yaklaşık % 50 oranında azaldığı göz önüne alınırsa (145), bu hastaların toksinlerin zararlı etkilerine daha açık olabilecekleri düşünülebilir. Bu düşünceden yola çıkılarak yapılan deneysel çalışmalarda GSH içeriği azaltılmış sıçan mezensefalik hücre dizilerinde  $SO_3^-$ 'in hücre canlılığını önemli oranda azalttığı gösterilmiştir (145). Yine aynı hücre dizisinde  $SO_3^-$  ve  $ONOO^-$ 'nin tek başlarına toksik etkilerinin gösterilmesine ilaveten, beraber oldukları zaman toksik etkiye sinerjizmaya neden oldukları bildirilmiştir (119). Zararlı etkileri belirtilen,  $SO_3^-$ 'in bilinen tek fizyolojik görevi nötrofil aktivasyonunu takiben bu hücrelerden salınarak biyolojik savunmada endojen kimyasal bir mediatör olarak fonksiyon göstermesidir (146).

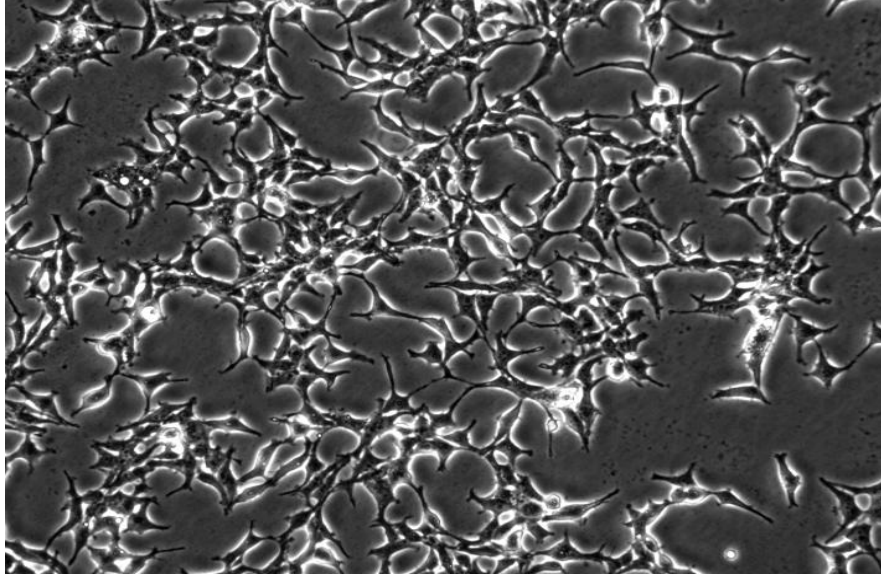
Hücre ve doku kültürü; aşı, monoklonal antikor, çeşitli enzimler ve hormonların üretimi için, hücre içi aktivite ölçümü, DNA ve RNA replikasyonu araştırması, protein sentezi, enerji metabolizmasının araştırılması, çeşitli ilaçların hücre döngüsünde etkisi, hormon-reseptör komplekslerinin davranışları, sinyal iletim mekanizması ve hücre haberleşmesi, hücrenin beslenme özellikleri, enfeksiyon, viral ve kimyasal transformasyon, özel ürünlerin sentezletilip salgılanması, embriyonik araştırmalar, hücre popülasyon kinetiği, adezyon, sitogenetik analiz, genetik manipülasyon ve immortalizasyon gibi çeşitli amaçlarla yapılmaktadır. Hücre kültürü için çeşitli doku kaynakları, doğum öncesi tanı için amniyotik hücreler, çeşitli araştırmalar için epitel ve fibroblast hücreleri, non-invaziv ve çoğalma kabiliyetlerinden dolayı kemik iliği, periferik kan, ayrıca tüm doku hücrelerinin yanı sıra "hücre hattı" oluşturmada kullanılan tümör hücreleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Bu çalışmadaki hipotezimiz, literatürdeki nörodejeneratif hastalıklarda izlenen artmış sistein azalmış sülfat düzeylerinden yola çıkarak sülfıt'in, detoksifikasyonundaki olası bir bozukluktan dolayı, homosisteine atfedilen nörodejenerasyona katkıda bulunan önemli bir bileşen olabileceğidir. Bu amaçla homosistein ve sülfıtın tek başlarına ve birlikte nöronlar üzerine olan etkisi metod kısmında anlatıldığı gibi sitotoksisite, genototoksisite ve oksidatif stres açısından SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanılarak değerlendirilecektir. Deneylein sonunda hipotezimize uygun verilerin elde edilmesi literatüre nörodejenerasyon sürecine katkıda bulunan yeni bir molekülün ortaya konması açısından katkıda bulunacak ve nörodejenerasyon nedenlerinin açıklanmasında yeni bir biokimyasal sürecin bozukluğuna işaret edilebilecektir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, hücre kültürü yöntemlerini kullanılarak *in vitro* koşullarda SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerinde (şekil 7), Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.B.D. hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 7. SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (X10)

## HÜCRE KÜLTÜRÜ AŞAMASINDA KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASALLAR

**Tablo 4.** Kullanılan cihazlar

CİHAZLAR	MARKA
CO <sub>2</sub> ' li inkübatör	Nuaire
Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl' lik)	Thermo
Laminar air Flow	Nuaire
Işık Mikroskobu	Olympus, Japan
Yatay Elektroferez	Thermo
Steril kültür kapları (flask 25-75'lik)	Corning
Çok kuyucuklu kültür plateler (6,96'lık)	Costar
ELISA Cihazı (Spektrofotometre)	Bio- Rad- Coda, Hercules, CA, USA

**Tablo 5.** Kullanılan kimyasal maddeler

<b>MADDE</b>	<b>MARKA</b>
DMEM F12	Sigma Chemical Co., St Louis Missouri
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma Chemical Co., St Louis Missouri
Tripan Mavisı Boyası (%0,5 (w/v) fizyolojik tuz içinde)	Sigma Chemical Co., St Louis Missouri
Etidyum Bromür	Sigma Chemical Co., St Louis Missouri
PBS	Thermo
Fetal Bovine Serum	Sigma
L-Glutamine	Biological Industries
Pen-strep solüsyonu	Biological Industries
Tripsin-EDTA	Biological Industries
Hücre kültür proliferasyon kiti	

Nöroblastoma hücre hattı üzerinde (SH-SY5Y), homosistein toksisitesine sülfıt molekülünün olası katkısı ve oksidatif stresin rolünü incelemek amacıyla oluşturduğumuz çalışmamızda, SH-SY5Y hücrelerinin rutin kültür basamakları;

- ✓ SH-SY5Y hücrelerinin hücre kültürü ortamında çoğaltılması ve pasajlanması
- ✓ SH-SY5Y hücrelerinin sayılması
- ✓ SH-SY5Y hücrelerinin dondurulması
- ✓ SH-SY5Y hücrelerinin çözülmesi şeklinde özetlenebilir.

### **SH-SY5Y HÜCRELERİNİN KÜLTÜRE EDİLMESİ**

Sülfıt ve homosisteinin nörotoksisite açısından kombine etkisini araştırmayı amaçladığımız çalışmamız *in vitro* koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak yapıldı. Çalışmamızda, model olarak SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanıldı. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besi ortamı, hücrelerin *in vitro* koşullar altında yaşayabilmeleri, büyüyebilmeleri ve proliferasyonu için uygun olmalı ve gerekli maddeleri içermelidir. İnaktif serum, hücrelerin gereksinimlerini karşılamak amacıyla besi yerine mutlaka eklenmelidir.

Çalışmamızda kullandığımız besi yeri %10 fetal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren DMEM F12 besi yeridir.

### **SH-SY5Y Hücrelerinin Çoğaltılması ve Pasajlanması**

1) DMEM F12 besi yeri ile üretilen SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri flasklara ekilmiştir. 37°C' de ve % 95 nem, % 5 CO<sub>2</sub>' li etüvde iki güne bir ortamları değiştirilerek çoğaltılmıştır.

2) SH-SY5Y hücreleri monolayer hücreler oldukları için hücrelerin pasajlanması için ilk olarak yapışıkları yüzeyden ayrılmaları gerekir. Bu nedenle, flasklarda bulunan ortam dökülmüş ve flasklar bir kez PBS kullanılarak yıkanmıştır.

3) Daha sonra hücrelerin üzerine 2,5 ml tripsin ilave edilmiştir. Flasklar 5 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir.

4) İnkübatörden çıkan flaskların hafif altlarından vurarak tüm hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir.

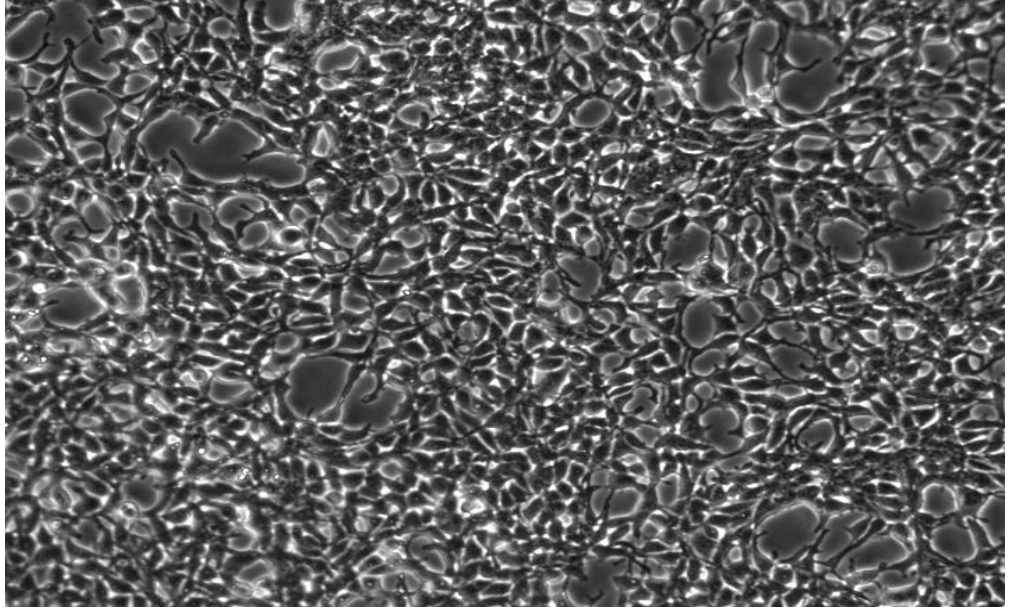
5) Flaskda bulunan tüm hücreler kalktıktan sonra, 5 ml serumlu ortam ilave edilmiştir.

6) Flask içerisinde bulunan hücre-ortam karışımı 15 ml' lik santrifüj tüpü içerisine alınmış ve 1500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

7) Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırılarak çöken hücrelerin üzerine 1 ml besi yeri eklenmiştir. Birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır.

8) 75 cm<sup>2</sup>' lik flasklara 10 ml ortam koyulmuş ve içine homojen dağılmış olan hücreden 100 µl konulmuştur.

9) Hücrelerin yüzeye yapışarak üremeye devam etmeleri için flasklar inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakılmış ve çoğalmaları sağlanmıştır.



**Şekil 8.** SH-SY5Y hücrelerinin yaklaşık 1 hafta sonraki pasajlanma öncesi mikroskobik görüntüsü (X10)

### **SH-SY5Y Canlı Hücrelerinin Sayılması**

Tripan Mavisi boyası sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilir. Ölü hücreler mavi (boya almış) ve canlı hücreler beyaz (boya almamış) olarak görülür. Işık mikroskobu ile canlı hücrelerin ölülerden ayırt edilerek sayım yapılır. Sayım işlemi aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1) İlk olarak pasajlanmalarında tarif edildiği gibi tripsinizasyon işlemi yapılmıştır.

2) Tripsinizasyon işleminden sonra hücrelere ortam eklenerek 15 ml' lik santrifüj tüp içerisine alınmış ve 1500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

3) Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırılarak çöken hücrelerin üzerine 1 ml besi yeri eklenmiş, birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır.

4) Bu şekilde hazırlanmış hücrelerden 100 µl alınıp ependorfa konulmuştur. Üzerine 400 µl PBS eklenip birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır.

5) Bu şekilde hazırlanmış hücrelerin üzerine 1 µl tripan mavisi konulmuş bu karışımdan da 10 µl alınıp thoma lamına konularak Işık mikroskopunda canlı hücreler sayılmıştır.

6) Tripan mavisi boyası testinden elde edilen sonuçlara göre hücreler, her kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir.

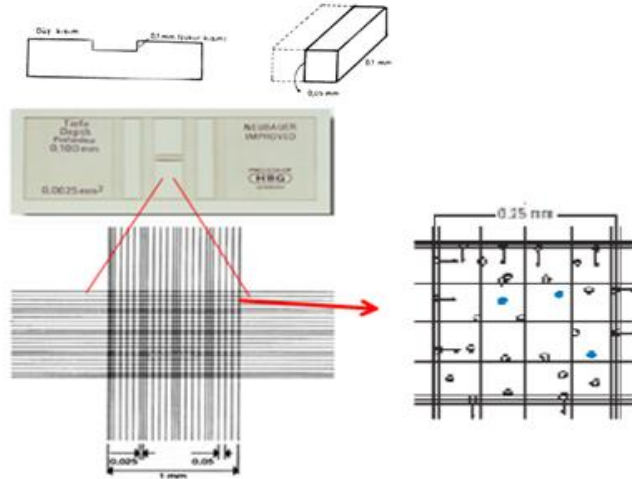
Sayım için en çok kullanılan iki eşdeğer bölmeye sahip olan thoma lamıdır (Şekil 15). Hücre süspansiyonu, sayma odacığına mikro pipetler yardımıyla aktarılır mevcut hücreler, karelerin üçlü çizgilerle çevrelenmiş olduğu merkezi bölmelerde sayılır. Köşe çizgilerinde bulunan hücreler sayıma dahil edilmez. Derinlik boyutu, şekilde verilen çukurun derinliğini göstermekte olup,  $1/10 = 0,1$  mm dir. 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi =  $0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,00025 \text{ mm}^3 = 1/4.000 \text{ mm}^3$ 'dür. Bir sayım alanında  $16 \times 25 = 400$  küçük kare olduğuna göre toplam sayım hacmi =  $0,00025 \text{ mm}^3 \times 400 = 0,1 \text{ mm}^3$ 'dür (231).

Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa (N):

1 ml yani  $1 \text{ mm}^3$ 'teki hücre sayısı =  $N \times DF \times 10^4$  olur.

DF= Dilüsyon Faktörü

$N=0.1 \text{ mm}^3$  te mevcut hücre sayısı



Şekil 9. Thoma lamı

### **SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması**

- 1) Flasklarda bulunan hücreler öncelikle tripsinizasyon işlemi ile yapışmış oldukları flask yüzeyinden kaldırılmıştır.
- 2) Hücreler 15 ml' lik santrifüj tüplerine alınarak 1500 g' de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
- 3) Santrifüj sonrası, her bir santrifüj tüpüne ait 1,5 ml' lik kriyotüpler hazırlanmıştır.
- 4) 9:1 oranında (%10' luk), serum: DMSO karışımından oluşan ortam hazırlanmıştır.
- 5) Süpernatant kısım uzaklaştırılarak santrifüj tüpleri buz üzerine alınmıştır. Hücrelerin üzerine 500 µl serum: DMSO karışımı eklenerek resüspanse edilmiştir.
- 6) Resüspanse edilen hücreler kriyotüpler içerisine konarak bu karışım -80°C' ye kaldırılmıştır.

### **Dondurulmuş SH-SY5Y Hücrelerinin Çözdürülmesi**

- 1) -80°C' de kriyotüpler içerisinde bulunan %10 DMSO ile dondurulmuş SH-SY5Y hücreleri çözünmesi için birkaç dakika 37°C' de etüve koyulmuştur.
- 2) DMSO' nun hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi bulunduğundan zarar görme sürecisini azaltmak amacıyla kriyotüp içerisine hızlı bir şekilde besi ortamı ilave edilmiş ve pipet yardımıyla karıştırılarak hücreler 15 ml' lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- 3) Falkon tüp içerisine yaklaşık 10ml daha besi yeri ilave edilerek 1500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 4) Santrifüj sonrası, süpernatant uzaklaştırılmış ve çöken hücrelerin üzerine 5 ml besi yeri eklenerek 25 cm<sup>2</sup> lik flasklara alınmıştır.
- 5) Flasklar, 37°C'deki %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve alınarak inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra, üremeye başlayan hücrelerin kullandıkları eski besi ortamı 5 ml taze besi yeri ile değiştirilmiştir. Yaklaşık 1 hafta sonra hücreler bütün flask yüzeyini kapladığı görülmüştür (Şekil 14). Hücrelerin canlılığını korumak ve devamlılığını sağlamak amacıyla pasaj yapılmıştır.

Araştırmamız;

- ✓ Deneyin kurulması ve sülfid ve homosistein uygulanması
- ✓ Sitotoksisite testlerinin çalışılması
- ✓ Total oksidan ve antioksidan düzeylerine bakılması, Oksidatif Stres indeksinin belirlenmesi
- ✓ DNA hasarının Comet Analizi ile incelenmesi
- ✓ Verilerin istatistiksel analizlerin yapılması basamaklarını içermektedir.

## **SÜLFİT VE HOMOSİSTEİN SİTOTOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ İÇİN DENEY DÜZENİĞİNİN KURULMASI**

Homosistein ve sülfidin SH-SY5Y hücre hatları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 3 gün sürecek bir deney düzeniği ve 4 farklı hücre grubu oluşturulmuştur:

**1. Grup:** Kontrol grubudur. Bu gruptaki SH-SY5Y hücrelerine herhangi bir muamele yapılmamıştır.

**2. Grup:** Homosistein grubu. Bu gruptaki hücrelere 10, 25, 50, 100 ve 250 µM homosistein verilmiştir.

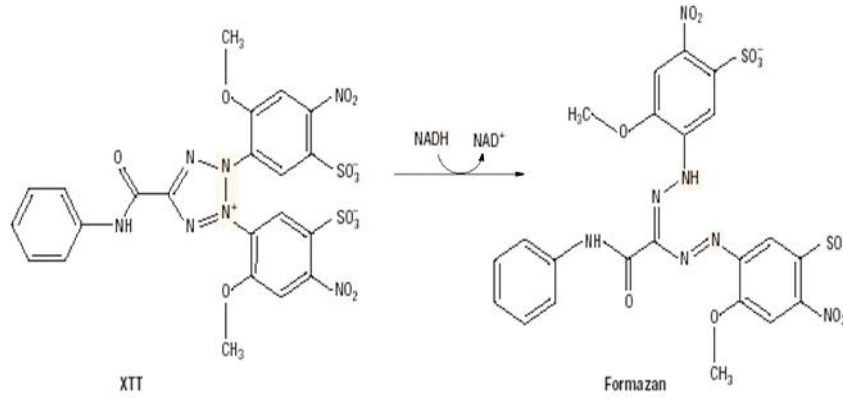
**3. Grup:** Sülfid grubu. Bu gruptaki hücrelere 0.1, 1, 5 mM sülfid verilmiştir.

**4. Grup:** Homosistein + sülfid grubu. Bu gruptaki hücreler 10, 25, 50, 100 ve 250 µM homosistein ve 0.1, 1, 5 mM sülfid dozları birbiri ile kombine edilmiştir.

## **XTT SİTOTOKSİSİTE TESTİ**

Bu test suda eriyebilir bir bileşik olan XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'yi canlı hücrelerce turuncu renkli formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır (Şekil 9).





**Şekil 10.** XTT' nin formazana dönüşümü

Suda çözünebilir özellikte olan boyanın yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla verilen dalga boylarında okutulabilmektedir. Formazan oluşumu, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır ve çok sayıda örneğin hızla çalışılıp sonuçların değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

Sülfid ve homosisteinin sitotoksitesi, “Cell Proliferation II Kit” i kullanılarak XTT testi ile belirlenmiştir. Toz halinde bulunan L-homosistein (Sigma Kat No: 64453 ) ve Na-sülfid (Merk Kat No: K42166052 114) sırası ile 10µM–250µM’ lık ve 0.1 mM-5mM’lık çalışma konsantrasyonları %10 serumlu tam besi ortamı (Sigma DMEM F12 Kat No: D6421) ile hazırlanmıştır.

Yukarıdaki gruplar aşağıda tarif edilen deney prosedürü kullanılarak çalışılmıştır.

1) 75 cm<sup>2</sup>’ lik flasklara ekilen ve flask yüzeyini kaplayan hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır.

2) İşlem sonrasında hücreler üzerine 5 ml besi ortamı ilave edilmiş ve 1500 g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

3) Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine 1 ml ortam eklenmiştir.

4) Hücre sayımı için bu karışımdan 100 µl alınmış ve thoma lamı kullanılarak hücrelerin canlılık oranı belirlenmiştir.

5) Hücrelerin canlılığına göre gerekli dilüsyonlar yapılmış ve her kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 100'er µl hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu plakalara dağıtılmıştır.

6) Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenmiştir. Kontrol kuyucukları dışında homosistein ve sülfid gruplarına sırasıyla 100 µl içindeki son konsantrasyonları 0.1, 1, 5 mM dozda sülfid ve 100 µl içindeki son konsantrasyonları 10, 25, 50, 100 ve 250 µM olacak dozda homosistein ilave edilmiştir. Homosistein+sülfid grubuna ise sülfid dozları sabit kalmak üzere homosisteinin artan dozları ilave edilmiştir. Bu ajanlarla inkübasyon süresi 24 saat olması belirlenmiştir. Bu şekilde hazırlanmış grupların her birinden 5' er adet çalışılmıştır.

7) 24 saat'in sonunda XTT testi için ayrılan ve sülfidin farklı dozlarını içeren kuyucukların sülfidin renk ağartıcı etkisinden dolayı dibindeki hücelere değmeden ortamları çekilmiştir. Her bir kuyucuğa 100 µL ortam koyulduktan sonra 50 µL XTT solüsyonu eklenmiştir. Madde eklenmesinden 4 saat sonra çalışılan grupların absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

## **OKSİDATİF STRES DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ**

### **Total Oksidan (TOS) ve Total Antioksidan (TAS) Seviye Ölçüm Yöntemleri**

Organizmada metabolik ve fizyolojik süreçlerde reaktif nitrojen ve oksijen türleri üretilir ve organizmada zararlı oksidatif reaksiyonlar ortaya çıkabilir. Bu oksidatif reaksiyonlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalar yoluyla ortamdan uzaklaştırılır.

Farklı oksidan türlerin serum (plazma) konsantrasyonları laboratuarda ayrı olarak ölçülebilir fakat ölçümler, zaman alan, yoğun iş gücü gerektiren, pahalı ve karmaşık teknikler gerektirir. Bu nedenle bir numunenin toplam oksidan ve antioksidan durumu ölçülmesi pratikte daha yararlı ve doğru sonuçların alınmasına sebep olur. Total oksidan seviye ölçümünün prensibi örneğin içindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyon dönüşünü sağlaması ve bunun da asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girerek absorban artışına sebep olmasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak izlenen absorban artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır. Total antioksidan seviye ölçümünün prensibi ise örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi-yeşil ABTS radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Total oksidan ve antioksidan seviye ölçümünün kısa sürmesi, kolay uygulanabilmesi, güvenilir ve duyarlı olması, yüksek doğrusalık göstermesi, serum ve plazma örnekleriyle, plevra sıvısı, beyin omurilik sıvısı, amnion sıvısı, semen plazması, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarında, doku örneklerinde çalışılabilme gibi avantajları vardır.

### **TAS, TOS, OSİ ve Comet Analizi İçin Deney Düzenine Kurulması**

Homosistein ve sülfidin SH-SY5Y hücre hatları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 3 gün sürecek bir deney düzeni ve 4 farklı hücre grubu oluşturulmuştur:

**1.Grup:** Kontrol grubu. Bu gruptaki SH-SY5Y hücrelerine herhangi bir muamele yapılmamıştır.

**2.Grup:** Homosistein grubu. Bu gruptaki hücreler deneyin başlangıcındaki homosisteinin en toksik dozuna maruz bırakılmıştır.

**3.Grup:** Sülfid grubu. Bu gruptaki hücreler deneyin başlangıcında sülfid en toksik dozuna maruz bırakılmıştır.

**4.Grup:** Homosistein+Sülfid grubu. Bu gruptaki hücreler deneyin başlangıcındaki homosistein ve sülfidin en toksik dozuna maruz bırakılmıştır.

### **TOS, TAS ve OSİ Değerinin Hesaplanması**

Çalışmamızda, homosistein ve sülfid deney gruplarında oluşturulan TOS düzeyi, TAS düzeyi ticari bir kit aracılığıyla ölçülmüştür. TOS sonuçları,  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$

Equiv./mg protein, TAS sonuçları ise mmolTrolox Equiv/mg protein başına ifade edilmiştir. OSI ise bulunan TOS ve TAS sonuçlarından hesap edilerek bulunmuştur. Örneklerin protein düzeyleri Lowry yöntemine göre belirlenmiştir. Yukarıdaki gruplar aşağıdaki gibi çalışılmıştır

1) Hücreler 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklenmiştir.

2) Gruplarda belirtilen dozlarda sülfid, homosistein eklenmiştir (her gruptan 10'ar tane bulunacak şekilde ) ve 24 saat inkübe edilmiştir.

3) Hücreler tripsinize edilmeden teflon bir hücre kaldırıncı ile plakalardan kaldırılmıştır. 15'lik santrifuj tüplerine konulan hücreler, 1500 g'de 5 dakika santrifuj edilmiştir.

4) Santrifuj işlemi sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 1 ml ortam eklenerek birkaç kez pipetajlanmış ve tekrar 1500 g'de 5 dakika santrifuj edilmiştir.

6) Yine süpernatant kısım uzaklaştırılarak hücrelerin parçalanması için üzerlerine 0.5 ml 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu eklenmiş ve bu şekilde birkaç kez insülin enjektörü ile pipetajlanarak homojenize olmaları sağlanmıştır.

7) Bu işlemden sonra homojenat +4 °C de 12000 rpm de 15 dk santrifuj edilmiş, süpernatantların bir kısmı alınarak TOS düzeyi bir eliza okuyucu yardımı ile 492 nm dalga boyunda ticari bir kit ile ölçülmüştür.

8) TOS değeri aşağıdaki formül uyarınca, her bir kuyucukta ölçülen örneklerin  $\Delta$  absorbans optik dansite değerinin standartın  $\Delta$  absorbans optik dansite değerine bölünerek 20 ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

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

$\Delta$  absorbans örnek = Örneğin 2. Absorbans değeri – örneğin 1. Absorbans değeri

$\Delta$  absorbans standart = Standart 2. Absorbans değeri – standart 1. Absorbans değeri

9) Süpernatantların bir kısmı alınarak TAS düzeyi bir eliza okuyucu yardımı ile 405 nm dalga boyunda ticari bir kit ile ölçülmüştür.

10) TAS değeri aşağıdaki formül uyarınca, standart 1  $\Delta$  absorbans optik dansidite değerinden her bir kuyucukta ölçülen örneklerin  $\Delta$  absorbans optik dansidite değerinin çıkarılması ve bu değerlerin standart1-standart2  $\Delta$  absorbans optik dansidite değerine bölünmesi ile hesaplanmıştır.

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

$\Delta$  absorbans örnek = Örneğin 2. Absorbans değeri – örneğin 1. Absorbans değeri

$\Delta$  absorbans standart 1 = Std1 2. Absorbans değeri – Std1 1. Absorbans değeri

$\Delta$  absorbans standart 2= Std2 2. Absorbans değeri – Std2 1. Absorbans değeri

Oksidatif stres indeksi, oksidatif stres derecesinin bir göstergesidir ve total oksidan seviyenin total antioksidan seviyeye bölünmesi ile elde edilen değerlerin 100 ile çarpılması ile hesap edilmiştir.

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

### **Lowry Yöntemi**

Protein tayininde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu reaktifi) alkali koşullarda proteinlerdeki fenolik amino asitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Bu yöntemde alkali koşullarda iki farklı reaksiyon gerçekleşmektedir. Birinci reaksiyonda peptit bağları ile  $\text{Cu}^{+2}$  arasında biüre reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır oluşur. İkinci reaksiyonda ise Folin-Ciocalteu ayırıcı, tirozin ve triptofan amino asitleri ile tepkimeye girerek indirgenir ve mavi renkli heteropolimolibden kompleksi meydana getirir. Oluşan kompleks 600-800 nm aralığında absorpsiyon piki verir.

TAS ve TOS ölçümü için hazırlanan süpernatantların bir kısmı alınmış ve lowry yöntemi kullanılarak örneklerin protein düzeyleri aşağıdaki gibi tespit edilmiştir.

1) Ayıraç A [%2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (%1 N NaOH' de çözülmüş)], Ayıraç B (%1 Na veya K-tartarat ), Ayıraç C (%0.5  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Ayıraç D ( 1 N folin ayıracağı) olmak üzere 4 solüsyon hazırlanmış ve sırası ile ayıraç A-B-C 'den 48-1-1 oranında karıştırılarak yeni bir ayıraç hazırlanmıştır.

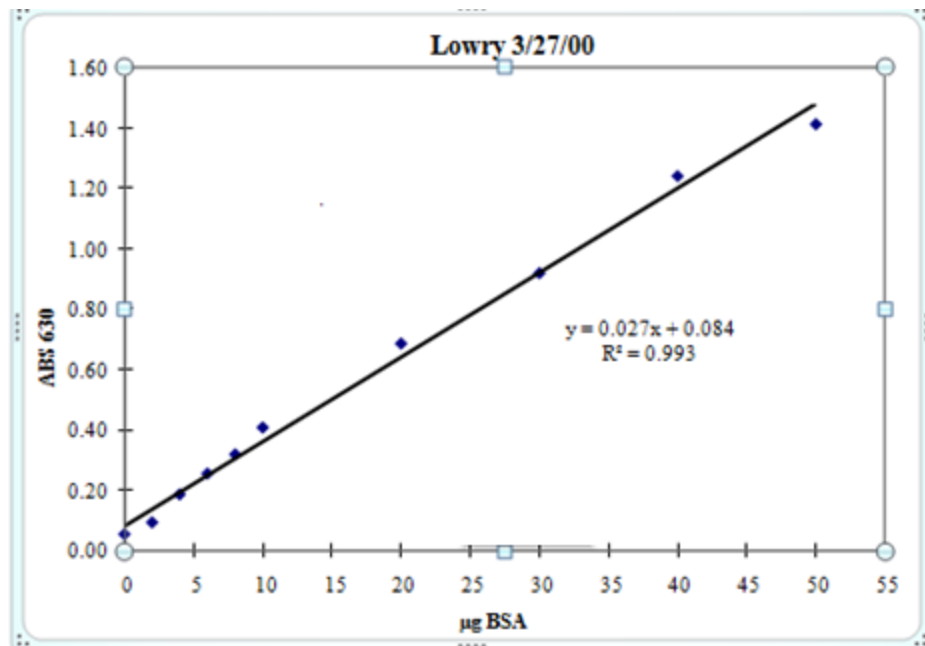
2) Ayrıca standart için BSA kullanılmış ve konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3) Yeni hazırlanan ayıraçtan 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 200  $\mu\text{L}$  olacak şekilde konulmuştur.

4) Üzerine ilk kısma her standart için 2 kuyucuk olacak şekilde hazırlanan standartlardan, diğer kuyucuklara 1/5 oranında sulandırılmış numunelerden her numune için 2 kuyucuk olacak şekilde 50  $\mu\text{L}$  koyulmuş ve karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

5) İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuğun üzerine 20  $\mu\text{L}$  folin ayıracağı koyularak 30 dk beklenmiş ve ELİSA okuyucu ile 630 dalga boyunda okunmuştur.

6) Örneklerin protein düzeyi, aşağıdaki şekilde verilen Standart grafik eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 11. Lowry Protein Standart Eğrisi

## **SÜLFİT VE HOMOSİSTEİN GENOTOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ**

DNA çeşitli reaktif moleküllerin hedefi olan, hasara duyarlılığı yüksek bir moleküldür. Genetik bilginin sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemli olduğundan çekirdekte DNA hasarını onaran çeşitli onarım sistemleri yer almaktadır. Ağır hasar oluştuğunda veya DNA onarım aktivitesi defektif ise replikasyon, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, uzun vadede ise mutasyona ve kromozom anomalilerine sebep olmaktadır. Kanser, diyabet, ateroskleroz gibi hastalıkların etiolojisinde yer alan DNA hasarı günümüzde kronik nörodejeneratif hastalıkların izlenmesinde, kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğinin takibinde, ksenobiyotik ve radyasyon aracılı genotoksitenin belirlenmesinde biyolojik belirteç olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle DNA hasarının hassas bir şekilde ölçülmesine olanak tanıyan teknikler günümüzde büyük önem kazanmıştır. Tek hücre jel elektroforezi veya sıklıkla tercih edilen diğer adıyla “Comet Assay” yöntemi son yıllarda genişleyen uygulama alanı, güvenilirliği ve uygulaması kolay olması bakımından kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan önemli bir metottur. Comet yönteminin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA’larını tek tek inceleyerek tespit etmektir. Elde edilen veriler hem hücrede meydana gelen DNA hasarının ne kadar olduğunu belirler hemde hücrenin hangi yapıya geçtiğini ifade eder.

Cometler rastgele seçilmeli ve tüm jeli temsil etmelidir. Jel sistematik bir şekilde taranmalıdır. Kenar bölgeler, hava kabarcıklarının kenarları ihmal edilmelidir. Bu bölgelerde genellikle anormal hasar görülür. Üst üste binen Cometlerin analizi bilgisayar analiz yöntemlerinin kullanımıyla mümkün değildir. Ancak, üst üste binen birçok cometlerin kuyrukları oldukça uzundur. Eğer çok fazla sayıda üst üste binen Comet göz ardı edilirse, hasar görmemiş az kuyruklu “Comet’lere” önemli derecede eğilim oluşabilir. Bu durumda, jel hazırlanırken hücre yoğunluğunun iyi ayarlanması gerekmektedir.

Araştırmacı tarafından seçilen Cometler için çeşitli flüoresan parametreleri hesaplayacak çok sayıda yazılım bulunmaktadır. Bu yazılımlar ile DNA parçaları baş ve kuyruk olarak iki ana bölüme ayrılabilmekte, çeşitli parametreler hesaplanabilmektedir. Bu parametreler;

- HL (Baş uzunluğu,  $\mu\text{m}$  )
- TL (Kuyruk uzunluğu,  $\mu\text{m}$ )
- Baş Yoğunluğu (Baş kısmındaki DNA yüzdesi, % H-DNA olarak ifade edilir.)
- Kuyruk Yoğunluğu (Kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi,% T-DNA olarak ifade edilir.)
- Kuyruk Momenti (TM,  $\mu\text{m}$  olarak ifade edilir, % T-DNA ile TL'nin çarpımının 100'e bölünmesi ile edilen bir değerdir)
- Kuyruk Migrasyon (Baş kısmının kenarından küçük saptanabilir fragmana DNA göçünün uzunluğudur.)

Araştırmamızda aşağıda tarif edildiği şekilde Comet Analizi yapılmıştır.

#### **Comet Assay (Tek Hücre Elektrofrezisi)**

1) Hücreler 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta  $10^4$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklenmiştir.

2) Gruplarda belirtilen dozlarda sülfid, homosistein eklenmiş (her gruptan 3'er tane bulunacak şekilde ) ve 24 saat inkübe edilmiştir.

3) Hücreler tripsinize edilmeden teflon bir hücre kaldırıcı ile plakalardan kaldırılmıştır. 1500 g'de 5 dakika santrifuj edilmiş ve 75  $\mu\text{l}$  % 0,5 'lik  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Mg}^{+}$  içermeyen PBS (fosfat tampon tuzu) ile 37°C' de hazırlanan "Low melting" agaroz (LMA) ile resüspanse edilmiştir.

4) Önceden % 1'lik "normal melting" agaroz (NMA) ile kaplanmış olan lam üzerine ince bir tabaka halinde dökülmüş ve 30 dk buz üzerinde beklendikten sonra 3. tabakayı oluşturan 70  $\mu\text{l}$  % 0,5 'lik LMA ile kaplanmış ve tekrar 10 dakika buz üzerinde beklenmiştir. Daha sonra lam hücresel proteinleri uzaklaştırmak amacıyla, pH'ı 10 olan soğuk lizis bağlama tamponu ile 60 dakika boyunca 4<sup>0</sup>C' de muamele edilmiştir.



5) Lizis işlemi sonrası lamalar yatay jel elektroforezine aktarılmış ve yeni hazırlanmış alkalın elektroforez tamponunda ( Distile su ,200 mM EDTA ve 10 N sodyum hidroksit, pH 13) 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir.

6) Elektroforez işlemi 4°C’ de, 300 mA’ de gerçekleştirilmiş ve işlem 30 dakika boyunca devam etmiştir.

7) Elektroforez işlemi takiben, lamalar nötralizasyon tamponu (0.4M Tris–HCl, pH 7.5) ile alkalın ve deterjanları uzaklaştırmak amacıyla 3 kez 5 dakika 4°C’ de yıkanmıştır. Bu işlemler dış kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir.

7) Nötralizasyon işlemi sonrası lamalar 60 µl etidyum bromid (2µl/ml) ile boyanarak flüoresan mikroskopunda incelenmiştir. DNA hasarı “Comet assay IV system (AutoComet)” programıyla DNA hasarı değerlendirilmiştir.

### ***Görüntü Analizi***

Hasarsız hücrelerin DNA’ları incelendiğinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun ve ortası parlak bir görünüm ile karşılaşılmaktadır. DNA’nın bu görünümü nonmigrasyon olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamış ise DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak normalde düzgün kenarlı olan DNA görüntüsü, kırıklarının çekirdek dışına göçünün nedeniyle düzensiz kenarlı bir görüntü halini alır. Bu görünüme stretch ya da low migration denir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (Comet, yüksek migrasyon ) şeklini alır. Bu uzama hasar ile doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruktaki flüoresan yoğunluğu da hasarın derecesine paraleldir.

### **İSTATİSTİK YÖNTEMLER**

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar SPSS 16,0 paket istatistik programı kullanılarak ortalamalar arasındaki fark “one way ANOVA” ve onu izleyen “Posthoc LCD ” testiyle değerlendirilmiştir. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

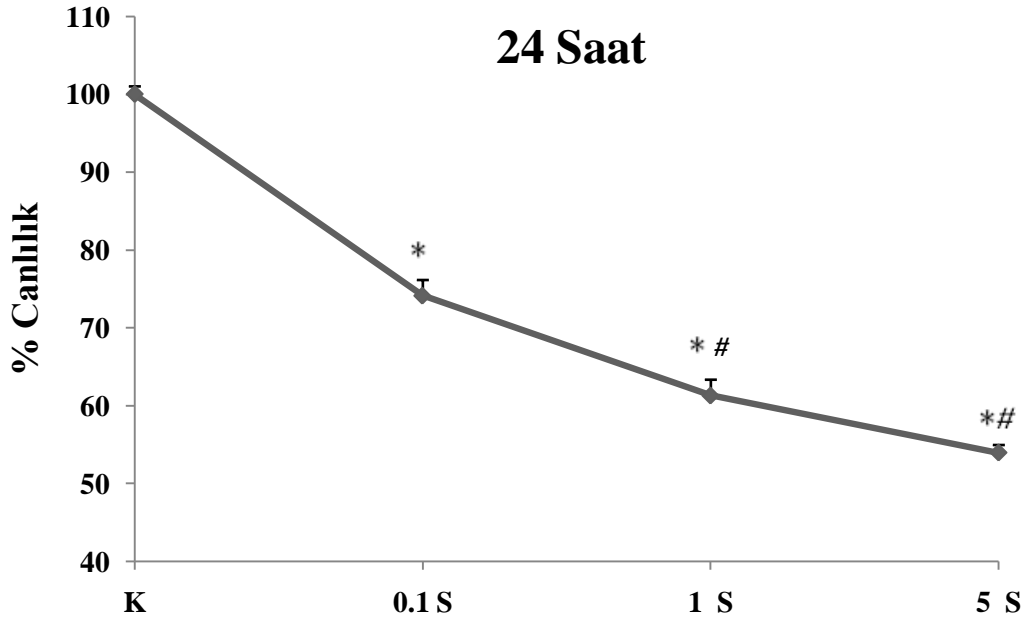
## BULGULAR

Homosistein toksisitesine sülfidit molekülünün olası katkısı ve oksidatif stresin rolü nöroblastoma hücre dizininde çalışılmıştır. Bu model için nöroblastoma hücreleri, SH-SY5Y hücre serisi kullanılmıştır.

### SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ

#### Sülfidit Sitotoksitesinin Belirlenmesi

SH-SY5Y nöroblastoma hücre serisinde sülfiditin 0.1, 1 ve 5 mM olarak kullanılan 3 farklı dozu ile 24 saatlik inkübasyonu takiben sitotoksite XTT testi ile değerlendirilmiş sitotoksitenin doza bağımlı olarak arttığı izlenmiştir. Sülfidit molekülünün 5 mM dozunda gösterdiği sitotoksitenin 0.1 ve 1 mM dozlarına göre istatistiksel olarak anlamlılığı daha yüksek olarak bulunmuştur (Şekil 12).

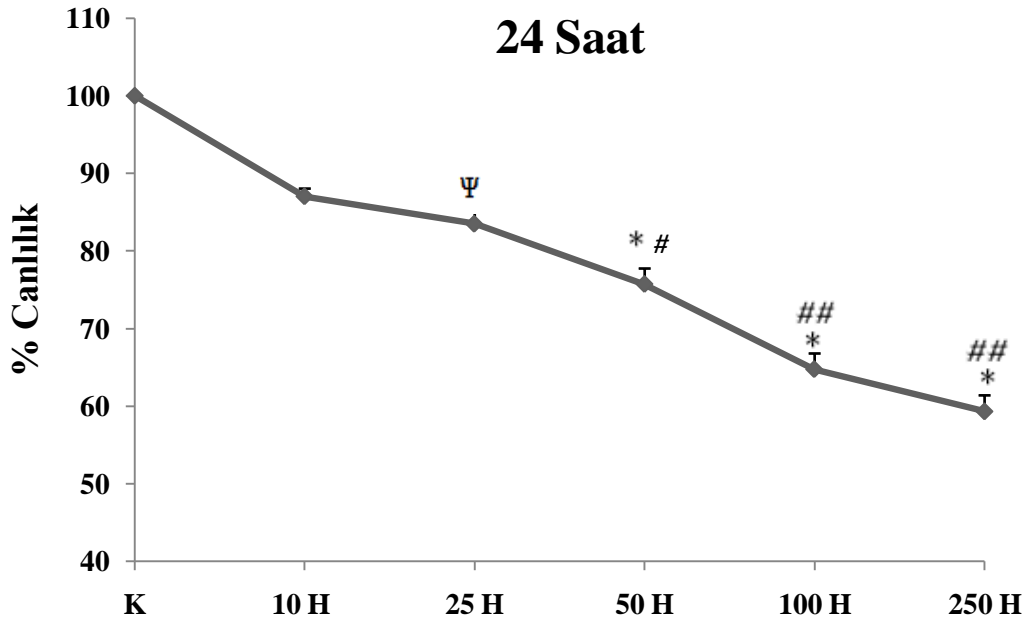


**Şekil 12.** Artan sülfidit dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi.

**K:** kontrol, **0.1S:** 0.1 mM dozda sülfidit uygulanan grup, **1S:** 1 mM dozda sülfidit uygulanan grup, **5S:** 5 mM dozda sülfidit uygulanan grup, (Ortalama  $\pm$  standart hata; n=5, \*: p<0.05 düzeyinde kontrolden fark, #: p<0.05 düzeyinde 0.1 S grubundan fark.)

### Homosisteinin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

SH-SY5Y nöroblastoma hücre serisinde Homosistein'in 10, 25, 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  olarak kullanılan 5 farklı dozu ile 24 saatlik inkübasyonu takiben sitotoksosite XTT testi ile değerlendirilmiş sitotoksitenin yine doza bağımlı olarak arttığı izlenmiştir (şekil 13). Homosisteinin 10  $\mu\text{M}$ 'lik dozunda sitotoksosite belirlenmezken sitotoksitenin 25  $\mu\text{M}$  dozda ortaya çıktığı ( $p<0.05$ ) bulunmuştur. Homosistein'in 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  dozlarında ortaya çıkan sitotoksitenin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu en fazla artışın ise 250  $\mu\text{M}$  homosistein dozda izlendiği bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Bu yüksek dozların düşük homosistein dozları ile karşılaştırıldığında 25  $\mu\text{M}$  homosisteine dozuna göre anlamlı bir şekilde sitotoksitede artışına sebep olduğu izlenmiştir ( $p<0.05$ ).

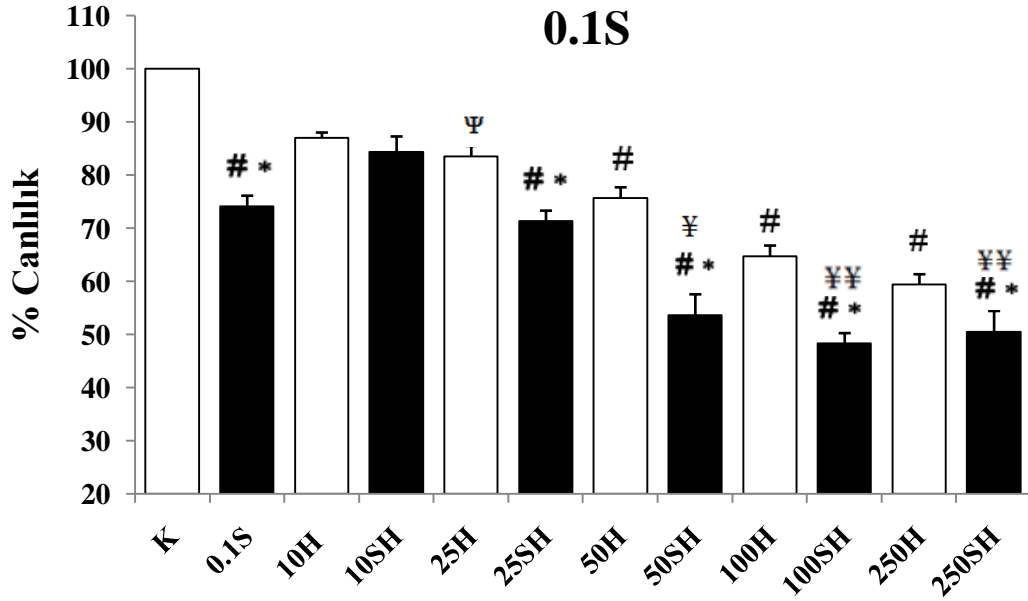


**Şekil 13.** Artan homosistein dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi.

**K:** kontrol, **10 H:** 10  $\mu\text{M}$  dozda homosistein uygulanan grup, **25 H:** 25  $\mu\text{M}$  dozda homosistein uygulanan grup, **50 H:** 50  $\mu\text{M}$  dozda homosistein uygulanan grup, **100 H:** 100  $\mu\text{M}$  dozda homosistein uygulanan grup, **250 H:** 250  $\mu\text{M}$  dozda homosistein uygulanan grup, (Ortalama  $\pm$  standart hata; n=5, **Ψ:**  $p<0.05$  düzeyinde kontrolden fark, **\***:  $p<0.001$  düzeyinde kontrolden fark, **#:**  $p<0.05$  düzeyinde 25 H grubundan fark.)

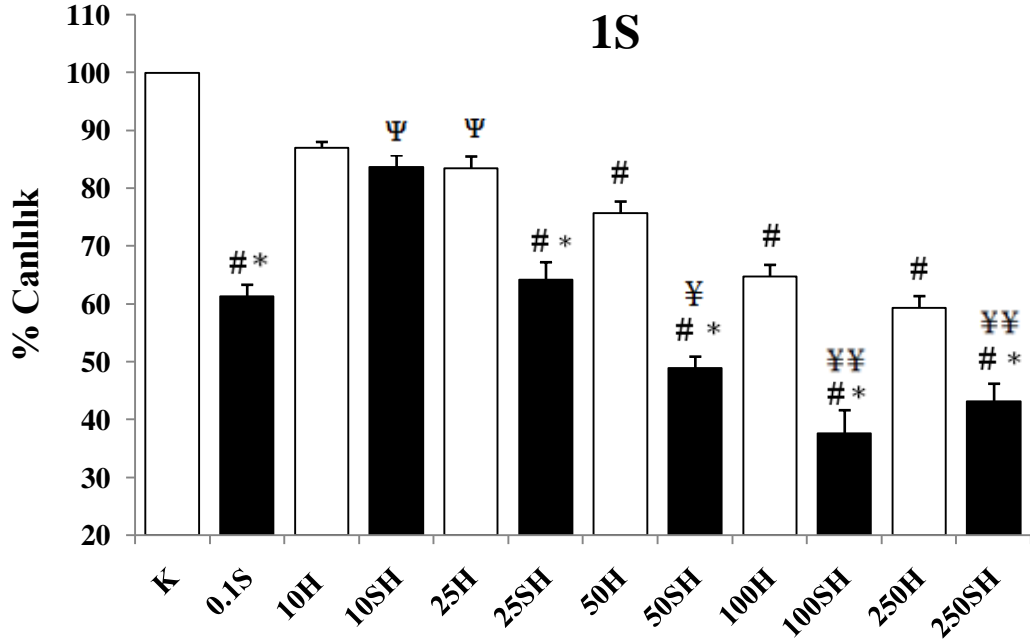
### Sülfıt + Homosistein kombinasyonunun Sitotoksitesini

Sülfıt toksitesinin homosistein varlığında potansiyelize olup olmadığını araştırmak için sülfıtın 0.1, 1, 5 mM dozları ile homosisteinin 10, 25, 50, 100, 250 µM dozları birbirleri ile kombine edilerek SH-SY5Y nöroblastoma hücre serisine uygulandı. Hem homosisteinin hemde sülfıtın sitotoksitesi etkilerini bariz olarak 24 saatte gösterdiğinden, bu iki ajanın kombinasyonu sonucu ortaya çıkacak etki 24 saatlik inkübasyonu takiben incelenmiştir. Homosistein varlığının SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerine sülfıtın neden olduğu sitotoksiteyi daha belirgin hale getirdiği izlenmiştir. Her üç sülfıt dozunda da bu etkinin homosisteinin 25 µM/L dozunda itibaren başladığı, 100 ve 250 µM/L dozlarında ise maksimuma eriştiği gözlenmiştir (Şekil 14,15,16).



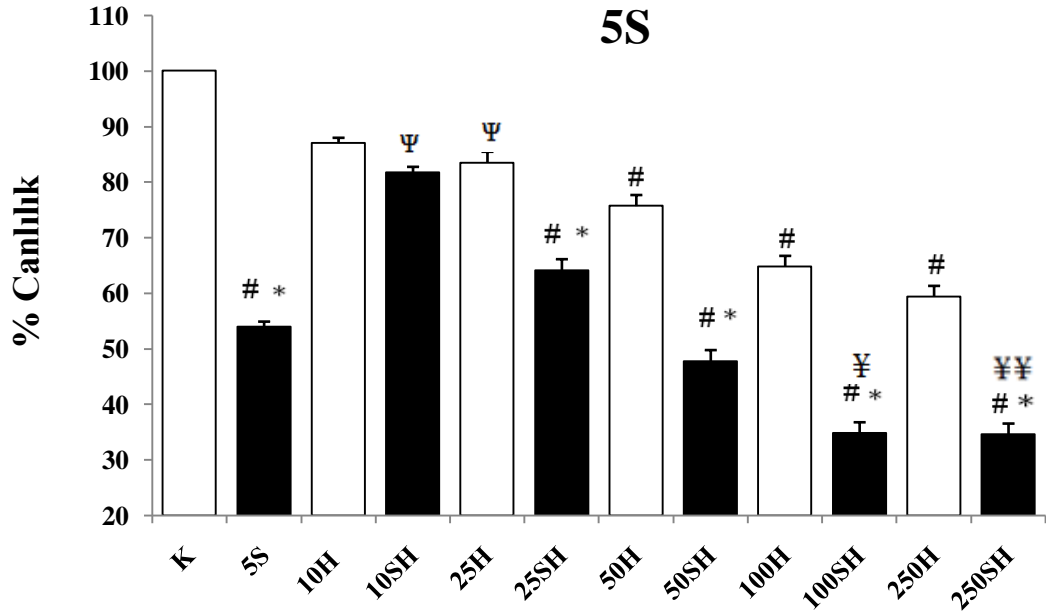
Şekil 14. Artan homosistein dozlarına 0.1 mM sülfıt ilavesiyle 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi.

**K:** kontrol, **0.1S:** 0.1 mM dozda sülfıt uygulanan grup, **10H:** 10 µM dozda homosistein uygulanan grup, **10SH:** 10 µM dozda homosisteine eklenen grup **25H:** 25 µM dozda homosistein uygulanan grup, **25SH:** 25 µM dozda homosisteine 0.1 mM doz sülfıt eklenen grup, **50H:** 50 µM dozda homosistein uygulanan grup, **50SH:** 50 µM dozda homosisteine 0.1 mM doz sülfıt eklenen grup, **100H:** 100 µM dozda homosistein uygulanan grup, **100SH:** 100 µM dozda homosisteine 0.1 mM doz sülfıt eklenen grup, **250H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **250SH:** 250 µM dozda homosisteine 0.1 mM doz sülfıt eklenen grup, (Ortalama ± standart hata; n=5, Ψ: p<0.05 düzeyinde kontrolden fark, #: p<0.001 düzeyinde kontrolden fark, ¥: p<0.001 düzeyinde 0.1S grubundan fark, \*: p<0.001 düzeyinde kendi konsantrasyonlarındaki H grubundan fark. )



**Şekil 15.** Artan homosistein dozlarına 1 mM sülfid ilavesiyle 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi.

**K:** kontrol, **1S:** 1 mM dozda sülfid uygulanan grup, **10H:** 10 µM dozda homosistein uygulanan grup, **10SH:** 10 µM dozda homosisteine 1 mM doz sülfid eklenen grup, **25H:** 25 µM dozda homosistein uygulanan grup, **25SH:** 25 µM dozda homosisteine 1 mM doz sülfid eklenen grup, **50H:** 50 µM dozda homosistein uygulanan grup, **50SH:** 50 µM dozda homosisteine 1 mM doz sülfid eklenen grup, **100H:** 100 µM dozda homosistein uygulanan grup, **100SH:** 100 µM dozda homosisteine 1 mM doz sülfid eklenen grup, **250H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **250SH:** 250 µM dozda homosisteine 1 mM doz sülfid eklenen grup, (Ortalama ± standart hata; n=5, Ψ: p<0.05 düzeyinde kontrolden fark, #: p<0.001 düzeyinde kontrolden fark, ¥: p<0.001 düzeyinde 1S grubundan fark, \*: p<0.001 düzeyinde kendi konsantrasyonlarındaki H grubundan fark. )



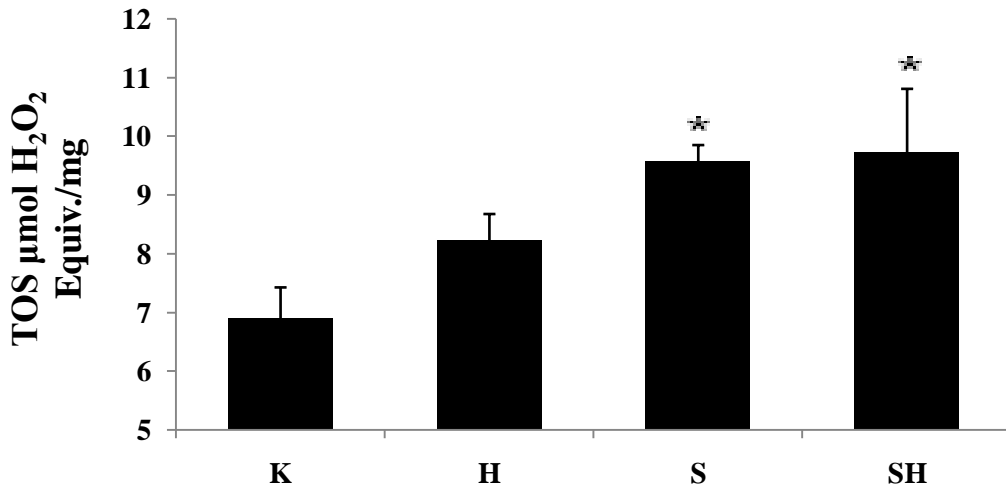
**Şekil 16.** Artan homosistein dozlarına 5 mM sülfid ilavesiyle 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi.

**K:** kontrol, **5S:** 5 mM dozda sülfid uygulanan grup, **10H:** 10 µM dozda homosistein uygulanan grup, **10SH:** 10 µM dozda homosisteine 5 mM doz sülfid eklenen grup **25H:** 25 µM dozda homosistein uygulanan grup, **25SH:** 25 µM dozda homosisteine 5 mM doz sülfid eklenen grup, **50H:** 50 µM dozda homosistein uygulanan grup, **50SH:** 50 µM dozda homosisteine 5 mM doz sülfid eklenen grup, **100H:** 100 µM dozda homosistein uygulanan grup, **100SH:** 100 µM dozda homosisteine 5 mM doz sülfid eklenen grup, **250H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **250SH:** 250 µM dozda homosisteine 5 mM doz sülfid eklenen grup, (Ortalama ± standart hata; n=5, Ψ: p<0.05 düzeyinde kontrolden fark, #: p<0.001 düzeyinde kontrolden fark, ¥: p<0.05 düzeyinde 5S grubundan fark, \*: p<0.001 düzeyinde kendi konsantrasyonlarındaki H grubundan fark).

## OKSİDATİF STRES İNDEKSİNİN BELİRLENMESİ

### Total Oksidan Seviyelerinin Belirlenmesi (TOS)

Sitotoksite deneylerinde izlenen etkide oksidan stresin rolünü araştırmak için yüksek sülfite (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarını seçtiğimiz deneyde total oksidan düzeyin sülfite verilen grupta arttığı, bu etkinin homosistein ile potansiyelize olmadığı izlenmiştir (Şekil 17).

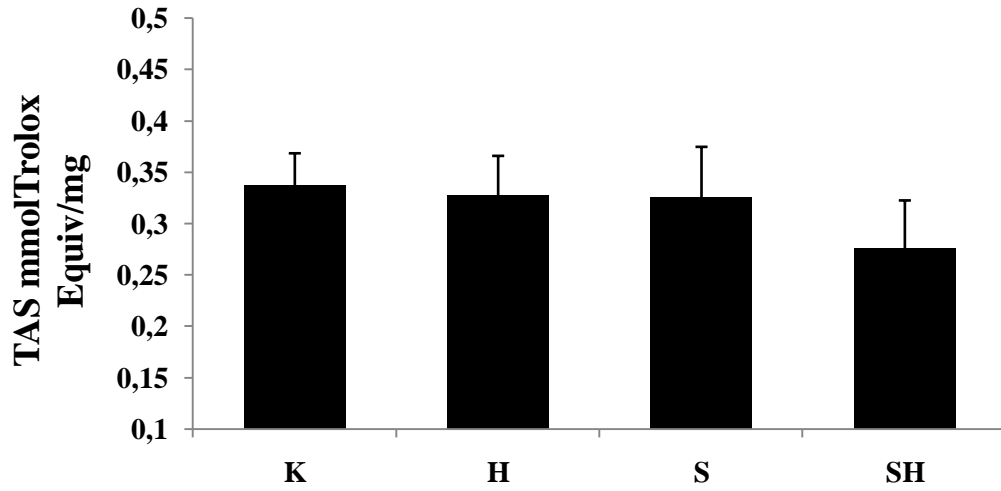


Şekil 17. Yüksek sülfite (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonu takiben belirlenen total oksidan düzeyi.

**K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfite uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfite 250 µM doz homosistein eklenen grup. (Ortalama ± standart hata; n=5, \*:p<0.05 düzeyinde kontrolden fark).

### Total Antioksidan seviyelerinin Belirlenmesi (TAS)

Total antioksidan düzey ortalamasına bakıldığında sülfite homosistein ile kombine edildiği grupta istatistiksel olarak önem taşımayan bir azalma bulunmuşsa da tüm deney gruplarının kontrol grubundan farklı olmadığı saptanmıştır (Şekil 18).

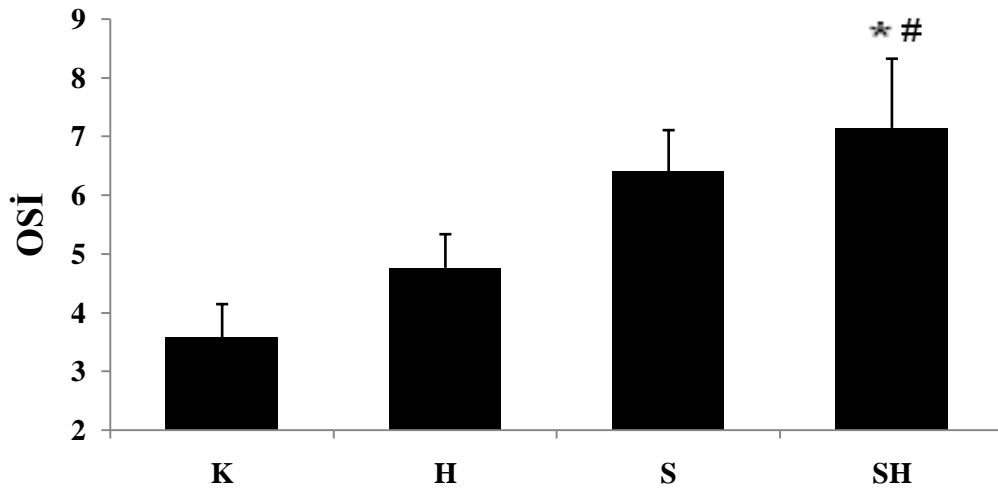


**Şekil 18.** Yüksek sülfite (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben belirlenen total antioksidan düzeyi.

**K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfite uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfite 250 µM doz homosistein eklenen grup. (Ortalama ± standart hata; n=5 )

### Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi (OSİ)

Total oksidan düzeyin total antioksidan seviyesine oranı olan OSİ değerinde ise sülfite homosistein ile kombine edildiği grupta kontrole ve tek başına sülfite grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda bir artış tespit edilmiştir (Şekil 19).



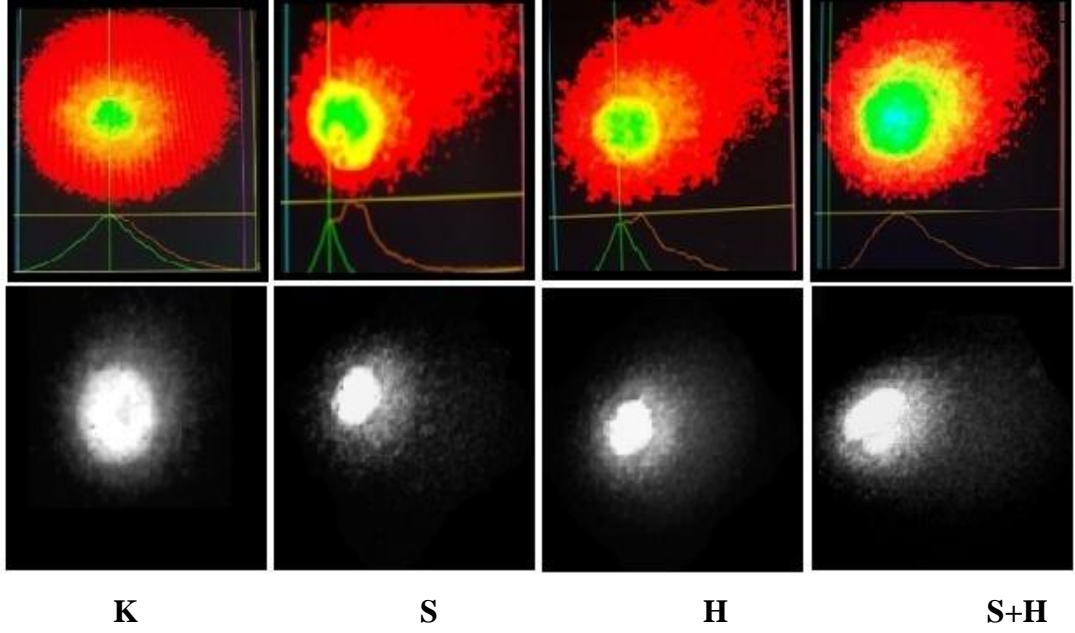
**Şekil 19.** Yüksek sülfite (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben belirlenen Oksidatif Stres İndeks Düzeyi.

**K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfite uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfite 250 µM doz homosistein eklenen grup. (Ortalama ± standart hata; n=5, \*:p<0.001 düzeyinde kontrolden fark, #: p<0.05 düzeyinde H ve S gruplarından fark).



## GENOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ

Comet analizi ile belirlenmiş genotoksisiteye ait demonstratif gösterimler şekil 20’de verilmiştir.

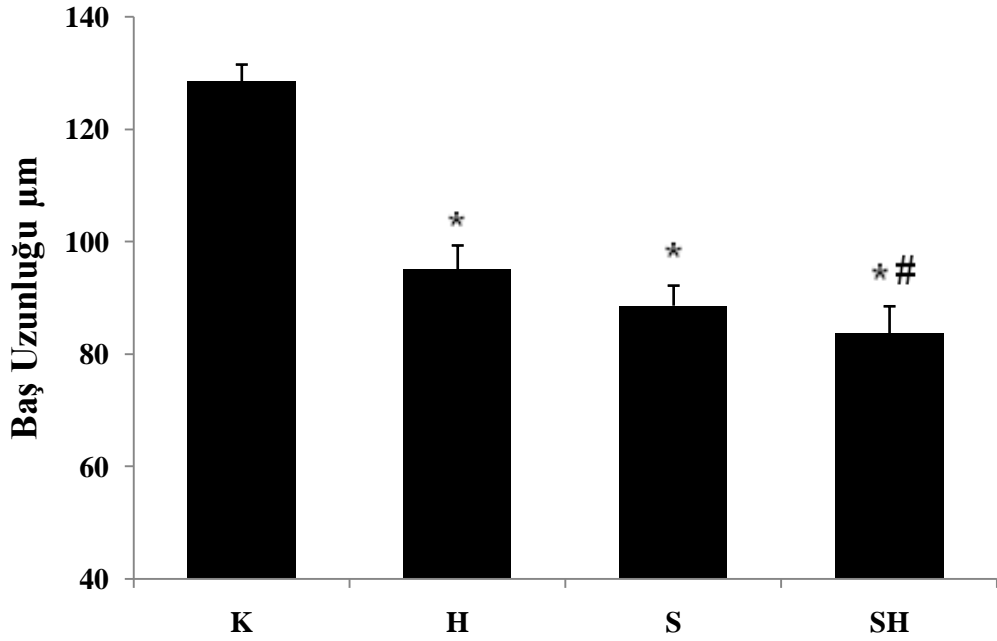


**Şekil 20.** Grupların 24 saat inkübasyonunu takiben Comet analizi ile demonstratif olarak görüntüsü. **K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfite uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfite 250 µM doz homosistein eklenen grup.

Toksisite sonucu oluşan fragmente DNA'nın varlığını saptamak için çalışma gruplarında comet yöntemi kullanılmıştır. Comet assay IV programı yardımı ile baş uzunluğu, baş yoğunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk migrasyonu ve kuyruk momenti parametreleri 150 hücrede ölçülerek ortalamaları alınmıştır.

## Baş Uzunluğunun Belirlenmesi

Baş uzunluğu homosistein ve sülfite gruplarında kontrole göre anlamlı olarak azaldı ( $p<0.001$ ). Sülfite +Homosistein grubunda izlenen baş uzunluğundaki azalma homosistein grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı iken ( $p<0.05$ ) sülfite grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olmadığı izlenmiştir. (Şekil 21).

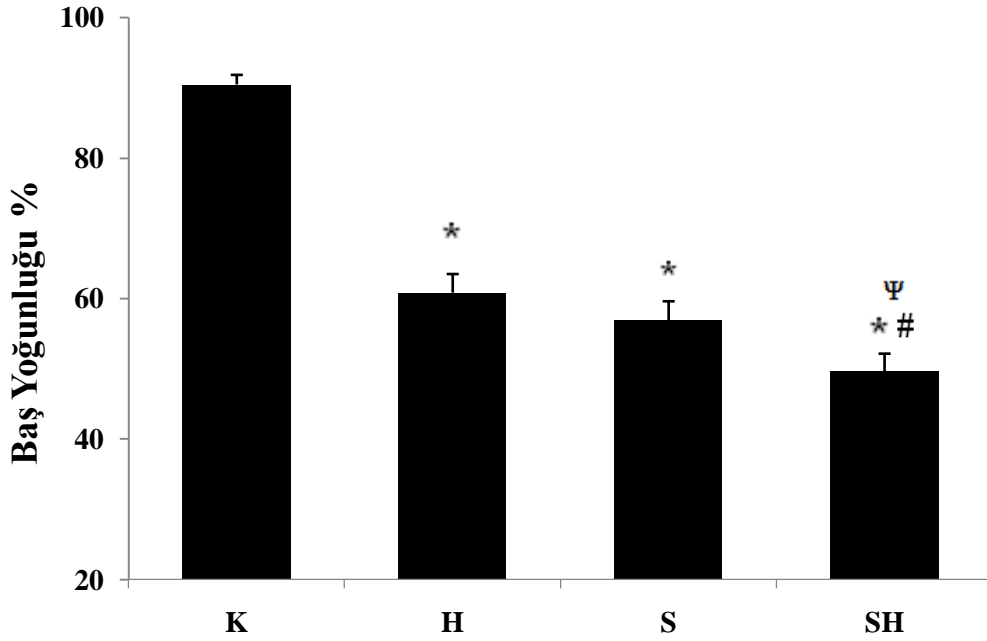


**Şekil 21.** Yüksek sülfite (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen baş uzunluğu değerleri.

**K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfite uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfite 250 µM doz homosistein eklenen grup. (Ortalama ± standart hata; n=150, \*: $p<0.001$  düzeyinde kontrolden fark, #:  $p<0.05$  düzeyinde H grubundan fark).

## Baş Yoğunluğunun Belirlenmesi

Benzer şekilde, baş yoğunluğunun da kontrole göre diğer gruplarda istatistiksel olarak önemli şekilde azaldığı izlenmiştir ( $p<0.001$ ). Homosistein + sülfid grubu, sülfid grubu ile karşılaştırıldığında baş yoğunluğundaki azalma  $p<0.05$  düzeyinde iken homosistein grubu ile karşılaştırıldığında ise bu azalışın  $p<0.001$  düzeyinde olduğu izlenmiştir (Şekil 22).

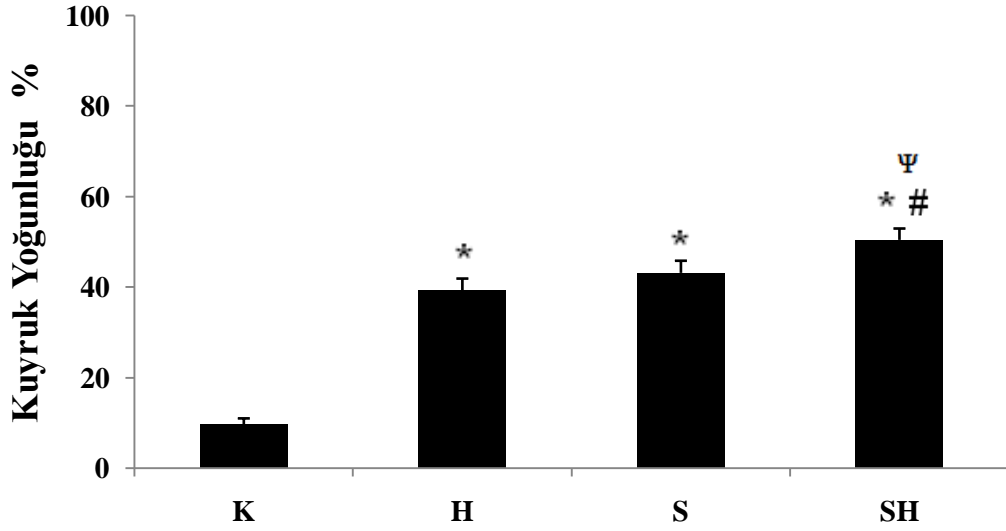


**Şekil 22.** Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen Baş yoğunluğu değerleri.

**K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfid uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfite 250 µM doz homosistein eklenen grup. ( Ortalama ± standart hata; n=150, \*: $p<0.001$  düzeyinde kontrolden fark, #:  $p<0.05$  düzeyinde S grubundan fark, Ψ:  $p<0.001$  düzeyinde H grubundan fark).

## Kuyruk Yoğunluğunun Belirlenmesi

Parçalanmış genetik materyalin kuyruğa ait parametrelerinden olan kuyruk yoğunluğu kontrole göre diğer gruplarda istatistiksel olarak önemli oranda ( $p < 0.001$ ) artmış olarak bulunmuştur. Bu parametredeki artış, Homosistein + sülfid grubu, sülfid grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$  düzeyinde iken, homosistein grubu ile karşılaştırıldığında ise  $p < 0.001$  düzeyinde olduğu izlenmiştir (Şekil 23).

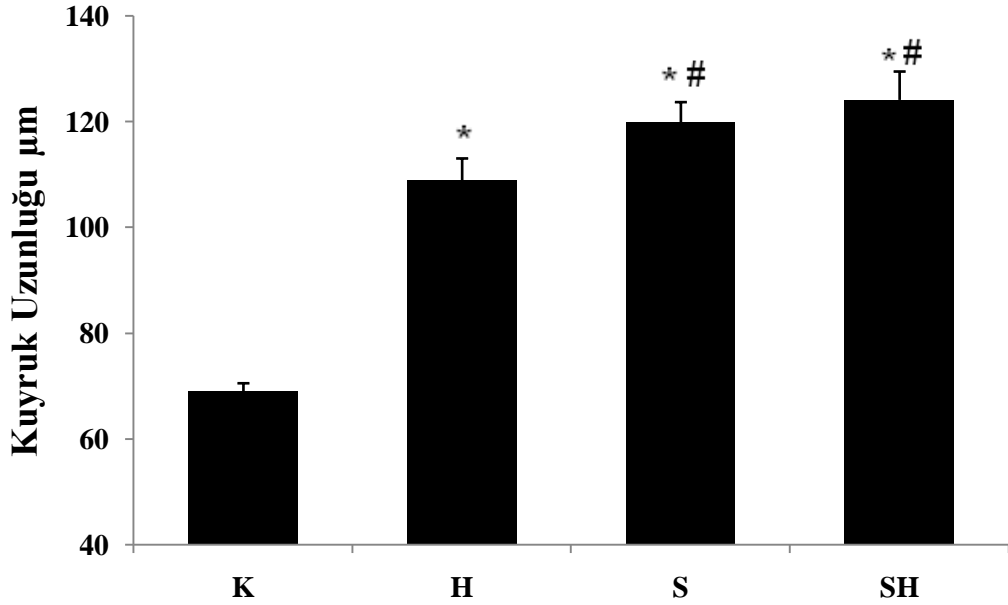


**Şekil 23.** Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk yoğunluğu değerleri.

**K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfid uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfide 250 µM doz homosistein eklenen grup. ( Ortalama ± standart hata; n=150, \*:  $p < 0.001$  düzeyinde kontrolden fark, #:  $p < 0.05$  düzeyinde S grubundan fark, Ψ:  $p < 0.001$  düzeyinde H grubundan fark).

## Kuyruk Uzunluğunun Belirlenmesi

Parçalanmış genetik materyalin kuyruğa ait diğer bir parametresi olan kuyruk uzunluğu kontrole göre diğer gruplarda istatistiksel olarak önemli oranda ( $p<0.001$ ) artmış olarak bulunmuştur. Bu parametredeki artış homosistein + sülfid grubu ile sülfid grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli oranda olmadığı bulunurken, homosistein grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak  $p<0.05$  düzeyinde olduğu saptanmıştır (Şekil 24).

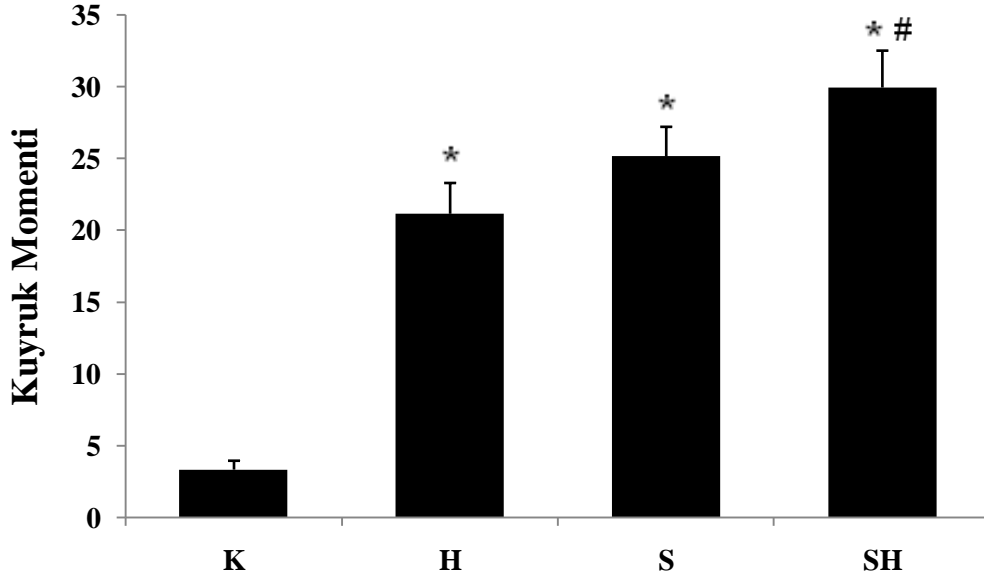


**Şekil 24.** Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk uzunluğu değerleri.

**K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfid uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfide 250 µM doz homosistein eklenen grup. ( Ortalama ± standart hata; n=150, \*:p<0.001 düzeyinde kontrolden fark, #: p<0.05 düzeyinde H grubundan fark ).

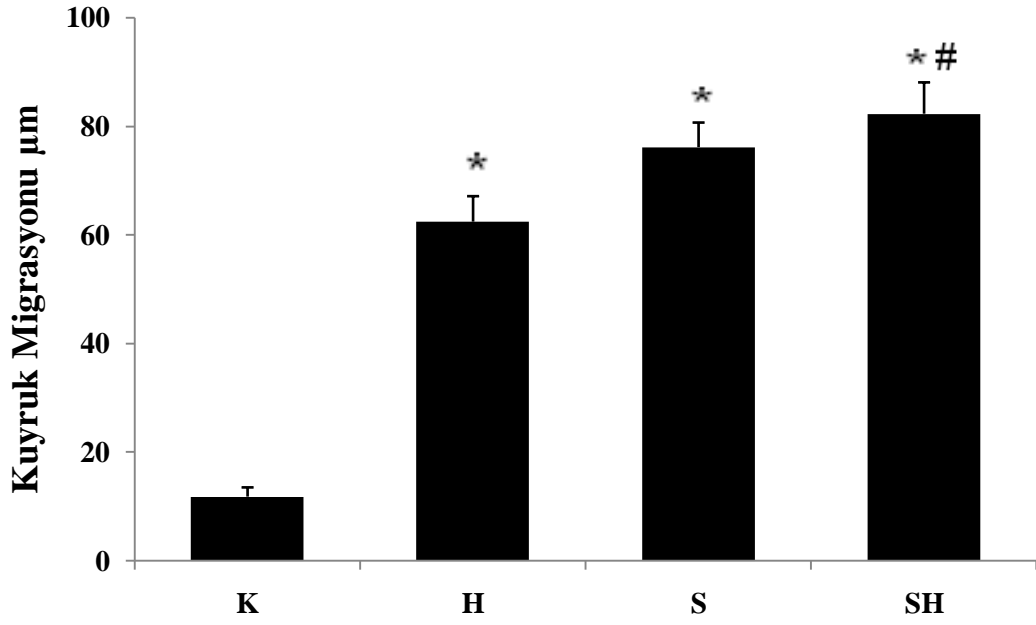
## Kuyruk Momenti ve Migrasyonunun Belirlenmesi

Benzer şekilde genotoksisite ölçümünün kuyruğa ait parametrelerinden kuyruk migrasyonu (Şekil 25) ve kuyruk momentinin (Şekil 26) kontrole göre diğer gruplarda istatistiksel olarak önemli oranda ( $p < 0.001$ ) artmış olduğu izlenmiştir. Bu iki parametre açısından homosistein+sülfid grubunun sülfid grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir artış olmadığı izlenirken, homosistein grubu ile karşılaştırılması durumunda artışın istatistiksel olarak önemli oranda olduğu bulunmuştur.



**Şekil 25:** Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk momentleri değerleri.

**K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfid uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfite 250 µM doz homosistein eklenen grup. ( Ortalama ± standart hata; n=150, \*:p<0.001 düzeyinde kontrolden fark, #: p<0.05 düzeyinde H grubundan fark ).



**Şekil 26.** Yüksek sülfite (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk migrasyon değerleri.

**K:** kontrol, **H:** 250 µM dozda homosistein uygulanan grup, **S:** 5 mM dozda sülfite uygulanan grup, **SH:** 5 mM dozda sülfite 250 µM doz homosistein eklenen grup. ( Ortalama ± standart hata; n=150, \*:p<0.001 düzeyinde kontrolden fark, #: p<0.05 düzeyinde H grubundan fark ).

## 5. TARTIŞMA

Son yüzyıl insan ömrünün artmasına bağlı olarak yaşlı nüfusun çok arttığı bir zaman dilimidir. Birçok epidemiyolojik araştırma yaş ile çeşitli Alzheimer, Parkinson demans, Motor Nöron Hatalığı gibi pek çok nörodejeneratif hastalık arasındaki güçlü ilişkiyi göstermektedir (147). Bu bozukluklar farklı klinik tablolara sahipse de birçok yönden ortak özelliklere sahiptir. Hepsiler ilerleyicidir, nedeni tam bilinmez, yaşla prevalansı artar ve hepsinde uzun bir prelinik period vardır. (148,149). Bu grup hastalıkların biyolojik belirteçler açısından da benzerlikleri vardır. Örneğin artmış plazma homosistein düzeyi tüm nörodejeneratif hastalıkların ortak biyokimyasal belirteçidir (150,151).

Homosistein ilk olarak bundan 75 yıl önce bulunmuş, metiyoninin katabolizması sırasında oluşan, herhangi bir protein yapısına katılmayan ve 135.2 dalton ağırlığında kükürt içeren bir aminoasittir (1). Bu aminoasidin oluşumundaki ilk basamak metiyoninin Metiyonin adenzil transferaz enzimi S-adenozilmetiyonin (SAM) oluşumudur (152). Bu molekül bilinen tüm biyolojik metilasyon işlemlerinin metil vericisi olarak görev yapmaktadır (95). Katabolizmanın bir sonraki reaksiyonu SAM molekülünün metil transferaz enzimi ile demetilasyonu sonucu S-adenozilhomosistein (SAH) oluşumudur. Homosistein oluşumundaki son basamak ise SAH'in SAH hidrolazlar ile Homosistein'e çevrilmesidir (18).

Homosistein'in NMDA reseptörlerinin agonisti olması, oksidatif stres'e neden olması, metilasyon kapasitesini azaltması, nörotoksik amiloid peptidin hücre içi ve dışında birikimine neden olması, endoplazmik retikulum stresine yol açması ve hücrede programlanmış hücre ölümünü aktive etmesi gibi çeşitli toksik özellikleri, metabolizmasının hücre içinde sıkı bir şekilde düzenlenmesini zorunlu kılmaktadır (20-24).

Bu nedenle aminoasit oluştuktan sonra temel olarak remetilasyona ve transsülfürasyon olmak üzere 2 yolla metabolize edilerek bahsedilen toksik etkilerinden korunulmaya çalışılır. Remetilasyonla metiyonin sentaz enzimi ile tekrar metiyonin amino asidi oluşturulurken, transsülfürasyonla sistatyonin beta sentaz enzimi ile daha sonra sisteine dönüştürülecek olan sistatyonini oluşturur (16). İlk



yolak bir geri dönüşüm reaksiyonunu, ikincisi ise fazla homosisteinin katabolize edilerek ortamdan uzaklaştırılmasını ifade eder.

Sağlıklı kişilerde remetilasyon ve transsülfürasyon yolları arasındaki denge nedeniyle plazma homosistein konsantrasyonları düşük düzeyde (5–15  $\mu\text{mol/L}$ ) izlenir (5,6). Artmış plazma homosistein düzeyleri ise bu yollarda görev yapan enzimlerin genetik defektlerine ve/veya çalışmaları için gerekli olan çeşitli vitaminlerin (B6, B12 ve folik asit) eksikliğine bağlı olarak bu aminoasidin hücre içi metabolizmasındaki enzimatik bir bozukluğu gösterir. Bu artışa yanıt olarak ta toksisiteden korunmak amacı ile homosistein hücre içinden dışına verildiği ileri sürülmüştür (7,8,150).

Sebebi ne olursa olsun artmış plazma homosistein düzeyi nörolojik, psikiyatrik, renal bozukluklar gibi oldukça geniş bir yelpazedeki klinik patoloji ile ilişkilidir (150,151). Bunlar arasında nörolojik patolojiler neredeyse ilk sırada yer almaktadır. Bu aminoasit ile nörolojik bozukluklar arasındaki ilişki ilk olarak altmışlı yılların ortalarında metiyonin metabolizmasındaki bir enzim olan sistasyonin beta sentaz enzim yetersizliği olan ve beyin atrofisi, mental retardasyon ve nöbetlerle karakterize klinik bulguları olan hastalarda gösterilmiştir (14,152). Sonraki yıllarda bu hastalara ilaveten Alzheimer, Parkinson, Demans, strok, orta düzeyde bilişsel bozulma gibi pek çok nörolojik bozukluğa sahip hastada artmış plazma homosistein düzeyi bulunmuştur (9,10,150).

Yapılan çalışmalarda yine bu grup bozukluklarda Homosistein'e ilaveten plazma sistein amino asidinin arttığı ve sülfat düzeyinin azaldığı bulunmuştur (11,86,153). Artmış sistein düzeyi homosistein metabolizmasında transsülfürasyon yolağının sağlam olduğunu yani metabolizmanın aksayan ayağının remetilasyon süreci olduğunu işaret etmektedir. Bununla uyumlu olarak homosistein metabolizmasındaki temel 2 enzim olan metiyonin sentaz ve sistasyonin beta sentaz aktivitelerinin hücrenin oksidatif çevresinden etkilendikleri bulunmuştur (11). Şöyle ki, metiyonin sentaz enziminin oksidasyona duyarlı olduğu ve artmış oksidatif strese aktivitesini azalttığı, sistasyonin beta sentaz enziminin ise zıt olarak oksidatif çevrede aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (13). Her iki durum beraber düşünüldüğünde

artmış oksidatif stres'in remetilasyon sürecini baskılayıp transsülfürasyon sürecini arttıracığı ve bu hastalarda saptanan artmış plazma sistein düzeylerine sebep olacağı oldukça makuldür. Bu büyük bir ihtimalle artmış oksidatif stres verilen fizyolojik bir yanıttır (12).

Organizma oksidatif strese cevaben önemli bir antioksidan olan glutasyonu oluşturan 3 aminoasitten biri (glutasyon glutamat, glisin ve sistein amino asitlerinden oluşmaktadır) ve hız kısıtlayıcı prekürsörü olan sistein amino asidinin sentezini arttırmaktadır. Bununla beraber transsülfürasyon yolağının da aksayan yönleri olabilir. Şöyle ki; yine bu çalışmalarda belirlenen azalmış sülfat düzeyi ise bu güne kadar nörotoksik etki açısından yeteri kadar irdelenmemiştir. Bu noktada dikkatimizi çeken konu artmış sisteine rağmen azalmış sülfat düzeyi idi (154). Bu açıdan sistein katabolizmasına daha yakından bakıldığında, dominant yol olan oksidasyonda sistein dioksijenaz enzimi etkisi ile sistein, sisteinsülfinat'a ve daha sonra başlıca piruvat ve sülfite veya hipotaurine çevrilir. Daha az etkin yol olan desülfürasyon da ise CBS ve CGL enzimleri Homosistein'i serin yerine sistein ile birleştirilir ve homosistein metabolizmasında olduğu gibi sistasyonin oluşturulur (155). Homosistein metabolizmasında CBS Homosistein'i serin ile birleştirirken sistasyoninin yanı sıra 1 molekül su açığa çıkarken, sistein katabolizmasında sistasyonin molekülünün yanında H<sub>2</sub>S gazı açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan bu gaz'ın hızlıca okside edilerek önce tiosülfat'a sonrada sülfid molekülüne çevrilerek metabolize edildiği gösterilmiştir (156). Sistein katabolizmasının yukarıda bahsedilen her iki formunda da oluşan metabolitler arasında sülfid'in üzerinde önemle durulması gerekir.

Sülfid molekülü nöronlar üzerine son derece toksik bir moleküldür ve detoksifikasyonunun yapılamaması hayatla bağdaşmaz. Yaklaşık elli yıl önce gösterilen sülfid oksidaz enzim yetersizliğine sahip bireyler mental retardasyon, gözlerde dislokasyon beyin atrofisi gibi pek çok nörolojik bozukluk semptomu ile hayatlarını en çok 2-3 yaşlarına kadar devam ettirebilmektedirler (135). Bu hastaların genetik olarak sülfid oksidaz enzim yetersizliğine sahip oldukları, kan ve idrarlarının sülfid ve metabolitleri açısından incelenmesinden ve postmortem fibroblast sülfid oksidaz enzim aktivitelerinin olmadığından saptanmasından sonra ortaya çıkmıştır. Bu kükürt içeren amino asit metabolizma bozukluğu en uç safhadaki bir örnek olmasına

rağmen, sülfid molekölün ne oranda toksik olduğunu çarpıcı bir biçimde ortaya koyması açısından önemlidir (119,122)

Bu endojen maruziyete ilaveten hava kirliliği, ilaçlar, yiyecek ve içecekler ile olmak üzere eksojen olarak da organizma sülfid molekölüne maruz kalmaktadır. Hava kirliliğinin önemli bir bileşeni olan SO<sub>2</sub>, soluma ile vücuda alınınca akciğerlerin bol sulu ortamında derhal sülfid molekölüne dönmekte ve solunum sisteminde başta bronkokonstrüksiyon olmak üzere alveol kalınlaşması, alveol hiperplazisi, akciğer ödemi ve akciğer kanserine yatkınlık gibi toksik etkilere (100,101) ayrıca beyin tümörlerinin görölme sıklığında artma, görsel ve somatosensorial uyarılma potansiyelerinde izlenen latenste uzama, eritrosit antioksidan defans sistemi ve lipid peroksidasyonunda değişikliklere neden olabilir (102,103).

SO<sub>3</sub><sup>-</sup> ilaç endüstrisinde oksidasyonu önlemek ve eriyebilirlik kazandırmak için de kullanılmaktadır (104). İlaç endüstrisinde inert madde olarak kullanılan jelatin, kola, dekstroz gibi maddeler de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> içermektedir (105).

SO<sub>3</sub><sup>-</sup> gıda endüstrisinde yiyecek ve içeceklerde antimikrobiyal, renk ve kıvam koruyucu ve renk ağartıcı, besinlerin kararmasına neden olan melanin oluşumunu engellemek ve dayanıklılığını arttırmak gibi pek çok değişik amaçla kullanılır (106,107).

SO<sub>3</sub><sup>-</sup> oksidatif ve oksidatif olmayan olmak üzere 2 şekilde metabolize edilir. Oksidatif olmayan SO<sub>3</sub><sup>-</sup> metabolizmasında, sülfitolizis reaksiyonu ile sistin, okside glutatyon (GSSG) gibi küçük veya daha büyük moleköl ağırlıklı proteinlerle disülfid bağları aracılığı ile birleşir ve s-sulfonat adı verilen bileşici oluşturur (130) veya SO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve 3-merkaptoprövatın reaksiyona girmesi ile tiosülfat oluşur ve bu yolla idrarla atılır (130). Oksidatif SO<sub>3</sub><sup>-</sup> metabolizması SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in temel detoksifikasyon mekanizmasıdır. Bu işlem vücutta dimerik bir yapıya sahip, mitokondrinin iç membranında lokalize ve molibdohemoprotein olan SOX enzimi aracılığı ile yapılmaktadır (131).

Görüldüğü üzere sülfat molekülünün sistein katabolizmasının son ürünü olan sülfat'tan bir önceki molekül olması ve nörojeneratif hastalıklarda artmış sistein düzeylerine rağmen sülfat molekülünün azalmış olması, bu hastalıklarda sistein katabolizmasında bir bozukluğun olabileceğini düşündürmüştür. Bu durumda iki seçenek akla gelmektedir; ya sistein katabolize edilememekte ya da sülfat sülfata çevrilememektedir (21,22)

Homosistein'in, yukarıda özetlenen ve bizzat kendisine atfedilen toksik etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. 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.

Tüm bu bilgilerin ışığında bizim hipotezimiz, nörodejeneratif hastalıklarda sistein amino asidinin artmış, sülfat molekülünün azalmış olması göz önüne alındığında Homosistein'in nörotoksik etkilerine katabolizmasının son ürünlerden biri olan sülfat molekülünün de aracılık edebileceği ve homosisteinin katabolizmasının transsülfürasyon yolağında özellikle de sülfat'ın sülfata detoksifikasyon basamağında bir bozukluk veya yetersizlik neticesinde homosistein artışına eşlik eden artmış plazma sülfat düzeyi izlenen nörotoksitenin önemli bir bileşeni olabileceğidir.

Bu amaçla çalışmamızda nöron hücre dizisine (SHSY-5Y nöroblastoma) homosistein tek başına ve sülfat ile kombine edilerek verilmiş ve olası nörotoksite, sitotoksite açısından kolorimetrik bir yöntem olan XTT analizi ile genotoksite açısından ise Comet analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca hücre kültürlerinden elde edilen süpernatantlardan Total Oksidan düzey (TOD) ve Total Antioksidan Düzey (TAD) belirlenmiştir.

Sitotoksite açısından incelendiğinde gerek sülfat gerekse de homosisteinin toksisitesi ve bu toksitenin doza bağlı olarak arttığı izlendi. Ayrıca hipotezimizle uyumlu olarak sülfat ve homosisteinin birlikteliği nöroblastoma hücreleri üzerine daha toksik bir etkinin ortaya çıkmasına sebep oldu. Bu etki özellikle homosisteinin

normal plazma konsantrasyonunun üzerindeki dozlarda belirgin ve istatistiksel olarak daha anlamlı olarak bulundu.

Plazma homosistein düzeyi normal kişilerde 5-15  $\mu\text{M/L}$  düzeyindedir. Bu düzeyin üzerinde bulunan plazma homosistein düzeyi 15-30  $\mu\text{M/L}$  aralığında hafif, 30-100  $\mu\text{M/L}$  aralığında orta ve 100  $\mu\text{M/L}$  den daha yüksek homosistein düzeyleri ise şiddetli hiperhomosisteinemi olarak kabul edilmektedir. Bu düzeyler göz önüne alındığında özellikle patolojik sınırlar içinde kabul edilen homosistein dozları ile beraber uygulanan 0.1, 1 ve 5 mm. üç sülfid dozunda da izlenen toksisitenin potansiyelize olduğu bulunmuştur.

Reist (1998) ve arkadaşları da nöronal hücre hattı ile yaptıkları çalışmada, çalışmamızla uyumlu bir şekilde 24 saatten sonra sülfidin toksik olduğunu ve toksisitede en fazla artışın 5 mM sülfid dozunda gösterdiğini bulmuşlardır (119).

Homosisteinin sitotoksik etkisinin 25  $\mu\text{M/L}$  dozunda başladığı ve 100 ve 250  $\mu\text{M/L}$  dozlarında maksimuma eriştiği gözlenmiştir.

Kruman ve arkadaşları (2000) çalışmamızla uyumlu olarak homosisteinin 250  $\mu\text{M}$  dozunda nörotoksik etkili olduğunu belirtmişler (22).

Ho ve ark. (2001) da benzer şekilde 250  $\mu\text{M}$  Hcy'nin nöronal hücrelerde değişik yolları kullanarak nörotoksik etki gösterdiği kanısına varmışlar (157), buna ilaveten White ve ark. (2001) bu çalışmayı destekleyen sonuçlar saptamışlardır (158).

Bu bulgu, çeşitli hiperhomosisteinemi durumlarında homosistein plazma düzeyinin milimolar değerlerine ulaştığı bilindiğinden, hiperhomosisteinemi durumunda nöronların toksik etkilere ne kadar açık olabileceğini iyi bir şekilde gösterir. Homosisteinin nörotoksik etkileri ve bunların mekanizmaları in vitro olarak laboratuvar ortamında gösterilmişse de, bazı çalışmalarda in vivo olarak homosisteinin direkt olarak nörotoksositeye sebep olmadığını bulan çalışmalar vardır (21,22). Örneğin, in vitro olarak toksik etkili bulunan homosisteinin normal plazma düzeyinin 3 katı dozda farelerin dorsal hipokampusüne infüze edilmesi, herhangi bir nörotoksik etki oluşturmamıştır (22).

Bir başka çalışmada, diyetlerinden folat çıkarılan farelerde, plazma homosistein düzeyi diyetten öncekinin 10 katına çıkmış, benzer şekilde bu hayvanlarda da herhangi bir nörotoksisite izlenmemiştir (23). Bu ve benzeri çalışmalarda homosisteinin direkt değil de kainat, 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropridin (MPTP) ve beta amiloid gibi çeşitli nörotoksinlerin etkisini potansiyelize ettiği gösterilmiştir (22-24).

Ho ve ark. (2001), Hcy'nin,  $\beta$ -amiloid (A $\beta$ ) peptid ile oluşturulan nörotoksisiteyi arttırma olasılığını incelediği çalışmada; Hcy'nin, SH-SY-5Y nöroblastoma hücrelerinde sitozolik kalsiyum ve apoptozis artışını indükleyen  $\beta$ -amiloid peptidi potansiyelize ettiğini belirtmişlerdir (157).

Bizim sitotoksisite sonuçlarımızda homosisteinin benzer şekilde diğer bir nörotoksik molekül olan sülfitin toksisitesini potansiyelize ettiğini teyit etmiştir. Bu bulgular homosisteinin hastalık patogenezeine katkısının nöronları herhangi bir nedenle oluşabilecek toksik etkilere karşı daha dayanıksız kılmak sureti ile olabileceğini hipotezini kuvvetlendirmektedir.

Reist ve ark. (1998), sülfid radikallerinin DNA ve protein hasarını uyararak hücre ölümüne neden olduğunu belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada da, sülfitin çeşitli koşullar altında nörotoksik ajan olarak rol alabileceğini bildirmişler fakat sülfitin nörotoksik mekanizmasının tam olarak aydınlatılabilmesi için daha çok *in vivo* çalışma yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (119).

Normal şartlar altında canlı organizmalar yüksek düzeyde SOX enzimine sahiptirler fakat enzimin konsantrasyonu veya aktivitesi çeşitli durumlarda azalabilmektedir (yaş, bazı hastalıklar vb...).

Schoneich ve ark. (1995), yüksek düzeyde sülfid oluşan radikalleri ile reaksiyona girerek oluşturduğu toksik etkinin hücresel bileşenlere ve proteinlere saldırması ile oluşan toksik etkiden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir .

Tappaz ve ark. (1996) yaptıkları çalışmada kükürt içeren amino asitlerin normal işlevi sırasında sülfitin beyindeki nörotoksisitesine bakmışlar ancak

çalışmamızın aksine SOX enzim eksikliği dışında direk sülfitin nörotoksik düzeye ulaşmadığı kanısına varmışlardır (159)

$SO_3^-$  toksisitesinde serbest radikaller önemli bir yer tutmaktadır (117,125). Bu radikaller temel olarak  $SO_3^-$ 'in enzim atık olmayan otooksidasyonu, "Horseradish" peroksidaz (HRP) ve Prostaglandin hidropereksohidaz (PGH sentaz) gibi çeşitli peroksidazlar tarafından enzim atık oksidasyonu esnasında oluşur (126,127). Peroksidazların enzimatik oksidasyonu esnasında  $SO_3^-$ 'in tek elektron kaybı sonucu oluşan ilk radikal kükürttrioksit radikalidir ( $SO_3^-$ ) (126).  $SO_3^-$  radikali aynı zamanda nonenzimatik olarak çeşitli iyon ve diğer radikallerin varlığında da oluşmaktadır. Bu radikal moleküler  $O_2$  ile reaksiyona girerek büyük oranda oldukça reaktif olan kükürt peroksil radikali ( $^{\cdot}O_3SOO^{\cdot}$ ) ve daha az miktarda süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) oluşturur (127).  $^{\cdot}O_3SOO^{\cdot}$ 'nin  $HSO_3^-$  ile reaksiyona girerek hidroksil (OH) radikali oluşturduğu bilinmektedir (126,127). Oluşan bu  $^{\cdot}O_3SOO^{\cdot}$ 'nin karsinojenik benzo ( $\alpha$ ) piren molekülü ile reaksiyona girerek kokarsinojenik etkisi olduğu ve  $SO_4^-$  radikali oluşumunu daha da hızlandırdığı bilinmektedir (128). Bu reaksiyon sonucu oluşan  $SO_4^-$  radikali bir yandan ortamdaki  $SO_3^-$  iyonları ile tepkimeye girerek yeni  $SO_3^-$  radikallerinin oluşumuna sebep olurken diğer yandan su ile birleşip OH oluşumuna neden olmaktadır (127).  $SO_3^-$ 'in yukarıdaki bahsedildiği gibi kükürt ve  $O_2$  radikalleri oluşturmasına ilaveten nötrofillerde NADPH oksidaz enzimini aktive ederek  $O_2$  radikali oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (129).

Kocabalkan ve ark. yüksek homosistein konsantrasyonlarının serbest oksijen radikallerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (160).

Mc Cully 1969, Homosistein düzeylerinin artması sonucu  $H_2O_2$  oluşumu ve lipid peroksidasyonun arttığını, antioksidan savunma sistemleri etkilediğini ve bunların sonucu olarak endotelial hücreler üzerine toksik etki yarattığını belirtmiştir (49).

Huang ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, Folat eksikliği bulunan ratların karaciğerinde peroksidatif hasar artma nedeni olarak, plazma homosistein düzeylerinin artması gibi güçlü bir oksidan etkinin varlığını veya hepatik antioksidan

mekanizmanın gücünün azalması ile oksidatif hasarın şiddetlenmesi olduğunu belirtmişlerdir (161).

Vanetura ve ark. (2000) homosistein tarafından indüklenen oksidatif stresin, membran lipid preroksidasyonu ölçümü sonucu, MDA düzeylerinde artış gözlemlenmiş ve metiyonin yükleme testi yapmışlardır. Sonrasında sağlıklı denekler ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, yüklemekten 8 saat sonra plazma antioksidan kapasitede bir azalma rapor etmişlerdir (162).

Ho ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışmada folat eksikliği ve nörolojik hastalıklar arasında ilişkiyi folatsız SH-SY-5Y nöroblastom hücrelerinde ve embriyonik kortikal nöron kültürlerinde invitro olarak incelemişler sitozolik kalsiyum, reaktif oksijen türleri (ROS), fosfor-tau ve apoptozun arttığını ve bunun sonucu olarakta folat eksikliğinin Hcy oluşumu üzerinden eksitotoksisite ve ROS artışı ile AD nöropatolojisini arttırabileceğini bildirilmiştir (21).

Serbest radikallerin hücre hasarındaki rolleri de çok iyi bilinen bir konudur.  $SO_3^-$ 'in toksik etkilerinin ortaya çıkmasındaki en önemli mekanizmanın kükürt ve  $O_2$  merkezli radikaller olduğu düşünüldüğünde sülfitin ve homosisteinin gerek tek başlarına gerekse de beraber kullanıldığında izlenen sitotoksik etkide oksidan stresin rolünü araştırmak için TOS, TAS ve OSI parametrelerini kullandık. Bu deneylerde izlenen sitotoksitedeki oksidan stresin rolünü açık bir şekilde ortaya koyabilmek için yüksek dozlardaki homosistein (250  $\mu$ M) ve sülfid (5 mM) dozlarını seçtik. TOS sonuçları ön gördüğümüz gibi sülfid grubunda artmış bir oksidatif stresi işaret etmekte fakat homosisteinin bu artışa ilave bir katkısının olmadığını göstermekteydi. Bilindiği gibi oksidan stres ile antioksidan sistem arasında bir denge vardır. Oksidatif stresin ortaya çıkması bu dengenin oksidanlar lehine bozulması ile ortaya çıkar. Bu yüzden tek başına oksidatif stres belirteçlerinin belirlenmesi oksidan stres açısından sağlıklı bir değerlendirme olmayabilir. Nitekim araştırmamızda antioksidan kapasiteyi de belirleyerek oksidatif stres indeksi hesaplaması yaptığımızda oksidan stresin en yüksek olarak sülfid+homosistein grubunda olduğunu gördük. Gerek sülfid gereksede homosisteinin tek başına oksidatif stres indeksini kontrole göre arttırdığı izlense de bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.



Çalışmamızda hipotezimizi genototoksisite açısından da test etmek için Comet analizini kullandık. Comet yönteminin temel prensibi hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik etkisi muhtemel ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini tespit etmektir. Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fiks edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. Bu moleküller DNA spesifik boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluştururlar (163,164).

Didenko (2006) ve Fidan, DNA hasarı oluşmaya başlamış ise fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırıklarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak normalde düzgün kenarlı görüntünün DNA kırıklarının çekirdek dışına göçü nedeniyle düzensiz bir hal aldığını ve merkezden kenara doğru uzama görüldüğünü ve bu uzamanın hasar ile doğru orantılı olduğunu belirtmişlerdir. Bizim sonuçlarımızda literatürdeki DNA hasarı arttıkça DNA kırıklarının kuyruğa doğru göçüne bağlı uzayıp kuyruklu görüntü alması ile uyumlu idi. Buda bize homosistein ve sülfitin kombine kullanımı ile çok daha fazla genototoksisiteye neden olduğunu göstermiştir (165,166).

Kruman ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada nöronal hücre ölümünü comet yöntemi ile değerlendirdiklerinde 250  $\mu$ M hcy dozunda 1. saatte DNA hasarında anlamlı bir artış saptamışlar ( $p < 0.01$ ), 2. ve 3. Saatte ise DNA hasarının daha fazla arttığını saptamışlardır ( $p < 0.001$ ) (22).

Sülfid, homosistein ve bunların birlikteliğinde gözlenebilecek olası genototoksisite Comet Assay IV yazılımı ile baş uzunluğu, baş yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerini kullanarak değerlendirdik. Bu parametrelerin hepsinde hipotezimize uygun olarak sülfid ve

homosisteinin tek başlarına oluşturdukları genotoksitenin beraber uygulandıklarında aditif bir etkiyle daha da arttırdığı gözlemlenmiştir.

Sonuçları özetlemek gerekirse baş uzunluğu homosistein ve sülfid gruplarında kontrole göre anlamlı olarak azalırken ikisinin birlikteliği bu genotoksik etkiyi daha da arttırıyordu. Bu bulgu ile uyumlu olarak baş yoğunluğunun da benzer bir kalıpla azaldığı izlendi. Parçalanan genetik materyalin kuyruğa ait parametreleri olan kuyruk uzunluğu, migrasyonu, yoğunluğu ve momenti ise benzer şekilde kontrole göre sülfid ve homosistein gruplarında anlamlı olarak arttığı, her iki ajanın birlikte uygulandığında bu artışın kuyruk migrasyonu hariç diğer parametrelerde istatistiksel olarak daha da önemli oranda olduğu bulunmuştur. Literatürle uyumlu olarak hem homosisteinin hem de sülfidin genotoksik etkileri olduğunu araştırmamız teyit etmiştir (38,161). Homosisteinin spesifik membran taşıyıcıları ile hızlıca hücre içine alındığı ve DNA metilasyon siklusunu bozarak DNA ipliklerinde kırılmalara yol açabileceği belirtilmiştir.

Sülfidin DNA üzerine olan genotoksik etkisi ise pek çok araştırmaya konu olmuştur. Örneğin CHO-AS52, CHL, hamster V79 gibi hücre dizilerinde ve fibroblastlarda DNA mutasyonlarına ve hasarlarına yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca ikisinin birlikteliği ile bu etkinin potansiyelize edildiği literatürde ilk defa araştırmamızın sonuçları göstermiştir.

Gerek homosisteinin, gerek sülfidin gerekse de ikisinin birlikteliği ile ortaya çıkan sinerjistik genotoksik etkiye oksidan stres aracılık etmiş olabilir. Oksidan stresin nükleik asit bazlarını hasarladığı tek ve çift iplik DNA kırıklarına sebebiyet verdiği iyi bilinmektedir.

Homosisteinin oksidatif stresi arttırarak amiloid peptidin neden olduğu nörotoksiteyi arttırdığı bilinir. Yine homosisteine bağlı toksitenin pek çok araştırmada antioksidanlarla azaltıldığı veya önlenildiğinin gösterilmesi, neden olduğu toksitede oksidatif stresin yerini önemli hale getirmektedir. Daha önce bahsedildiği gibi sülfid molekülünün ortaya çıkan toksitesindeki oksidan stresin dominant rolü ve göz önüne alındığında bu fenomen ikisinin birlikte ortaya çıkardığı genotoksitede önemli bir yer tutabilir. Nitekim bizde araştırmamızda oksidatif

stres indeksini her ikisinin beraber uygulandıkları durumda diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulduk Bu toksisitelerinde gözlenen sinerjistik etkide oksidatif stresin önemli yer tuttuğunu teyit etmektedir.

Sonuç olarak, araştırmamız homosisteinin kendine ait direkt toksisitesine ilaveten diğer toksik moleküllerin toksisitesini arttırabileceği ve bu etkinin direkt toksisitesinden daha önemli olduğu yönündeki bulguları kısmen teyit etmiştir. Sülfid molekölünün diğer çalışmalardaki gibi eksojen değil aksine homosistein metabolizması ile ilgili endojen bir nörotoksin olması ikisinin beraberliğinde ciddi bir nörotoksisite ortaya çıkarmalarına neden olabilir. Özellikle sitotoksisitede izlenen normalden yüksek homosistein dozlarında sülfid molekölünün toksisitesinde ki artışın sebeplerinin ve nörodejeneratif hastalıklarda artmış sülfid düzeyinin olup olmadığı konusunda daha ileri çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1) Araştırmamız sülfıt ve homosisteinin bilinen nörotoksik etkilerini ve bu etkinin doza bağımlı olarak artışını literatürle uyumlu olarak teyit etmiştir.
- 2) Çalışmamızda SH-SY5Y hücre serisinde homosisteinin en toksik dozu 250 µM, sülfıtın en toksik dozu ise 5 mM olarak belirlenmiştir
- 3) Sülfıtın her dozunun, özellikle patolojik düzeylerdeki homosistein ile birlikteliğinin gözlenen sitotoksistide anlamlı artışa sebep olduğu izlenmiştir.
- 4) Bu toksistide oksidan stresin önemli rol oynadığı bulunmuştur.
- 5) Ayrıca sülfıt ve homosisteinin tek başlarına ve beraber oluşturdukları toksiste comet yöntemiyle incelenmiş, sülfıt ve homosisteinin birlikte uygulandığında SH-SY5Y hücre serisi üzerine tek başlarına yaptıkları etkiden daha belirgin bir genototoksik etkisinin olduğu ortaya çıkmıştır.
- 6) Homosisteinin kendine ait direkt toksistisine ilaveten diğer toksik moleküllerin toksistisini arttırabileceği ve bu etkinin direkt toksistisinden daha önemli olduğu yönündeki bulguları kısmen teyit etmiştir
- 7) Sitotoksistide izlenen yüksek homosistein dozlarında sülfıt molekülünün toksistisinde ki artış sebeplerinin ve nörodejeneratif hastalıklarda artmış sülfıt düzeyinin olup olmadığı konusunda daha ileri çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir.

## KAYNAKLAR

1. De Vigneaud VE. Trial of research in sulfur chemistry and metabolism and related fields. Cornell university pres 1932;135-39.
2. Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32(4):385-89.
3. Nekrassova O, Lawrence SL, Compton RG. Analytic determination of homocysteine. *Talanta* 2003;60:1085-95.
4. Akgul EO. ADMA ve Homosistein İlişkisi, 1. Ulusal Homosistein ve ADMA Sempozyumu, Mersin, 2005.
5. Schulz RJ. Homocysteine as a biomarker for cognitive dysfunction in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:718-23.
6. 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.
7. Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:1140-51.
8. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification, *Public Health Rev* 2000;28:117-45.
9. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 2006;580:2994-3005.
10. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346(7):476-83.
11. Finkelstein JD. Regulation of homocysteine metabolism. In: Carmel R, Jacobsen DW (editors). *Homocysteine in health and disease*. Cambridge: Cambridge University Press 2001:92-99.
12. Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by

- the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000;39:13005-1.
13. Taoka S, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R. Evidence for hememediated redox regulation of human cystathionine $\beta$ -synthase activity. *J Biol Chem* 1998;273:25179-84.
  14. Grieco AJ. Homocystinuria: pathogenetic mechanisms. *Am J Med Sci* 1977;273:120-32.
  15. Champe PC, Harvey RA. *Lipinkott Biyokimya*. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E, Çev.Ed, 2. Baskı, İstanbul: Nobel kitabevi 1997:1-12, 241-56.
  16. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* 2006;136:1636-40.
  17. Cooper AJ. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem* 1983;52:187-222.
  18. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:219-25.
  19. Temel İ, Özerol E. Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002;9(2):149-57.
  20. 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.
  21. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, et al. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 2003;14(1):32-42.
  22. 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.
  23. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002;22:1752-62.

24. Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, et al. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 2002;277:12915-20.
25. Catoni GL. S-Adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 1953;204:403-16.
26. Fontecave M, Atta M, Mulliez E. S-Adenosyl methionine: nothing goes to waste *Trends. Biochem Sci* 2004;29:243-9.
27. Mineer SE, Evrovski J, Cole D. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism. An Update. *Clin Bioch* 1997;30:189-201.
28. Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH. Elevation of Serum Cystathionine Levels in Patients with Cobalamin and Folate Deficiency. *Blood* 1993;81:3403-13.
29. Şen S, Durat G, Atasoy I. Vitamin B 12 ve Folik Asit Eksikliğinin Psikiyatrik ve Nörolojik Bozukluklarla İlişkisi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2009;7(1):31-6.
30. McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM. Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin Sci (Lond)* 1991;81:551-6.
31. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B vitamins and coronary artery disease. *Med Clin North Am* 2000;84:215-37.
32. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 2006;580:2994-3005.
33. 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.
34. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003;26:137-46.
35. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine, pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157:40-4.
36. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-37.

37. James DH, Rene LJ, Lori MS, Margaret EB, John TB. Regulation of Homocysteine Metabolism. *Advan Enzyme Regul* 1999;39:69-91.
38. Corrales FJ, Pérez-Mato I, Sánchez Del Pino MM, Ruiz F, Castro C, García-Trevijano ER, et al. Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. *J Nutr* 2002;132:2377-81.
39. Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and Sadenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1694-9.
40. Vitvitsky V, Moshasov E, Tritt M, Ataullakhanov F, Banerjee R. Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep* 2003;8:57-63.
41. Banerjee R, Zou CG. Redox regulation and reaction mechanisms of human cystathionine beta-synthase: a PLP-dependent hemosensor protein. *Arch Biochem Biophys* 2005;433:144-56.
42. Nemeth I, Orvos H&Boda D. Blood glutathione redox status in gestational hypertension. *Free Radic Biol Med* 2001;30:715-21.
43. Ookhtens M& Kaplowitz N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis* 1998;18:313-29.
44. Cunha AA, Ferreira AGK, Cunha MJ, Pederzolli CD, Becker DL, Coelho JG, et al. Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung. *Mol Cell Biochem* 2011;358:153-60.
45. Cito A, Porcelli B, Coppola MG, Mangiavacchi P, Cortelazzo A, Terzuoli L. Analysis of serum levels of homocysteine and oxidative stress markers in patients with Alzheimer disease *Biomed Pharmacother* 2010; 10.1016/j.biopha.2010.09.018.
46. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry* 1998;44:1833-43.
47. Mansoor MA, Ueland PM, Aarsland A, Svardal A. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with homocystinuria. *Metabolism* 1993;42(11):1481-5.
48. Boztepe Derici Ü, Altok Reis K. Hiperhomosisteinemi ve kronik böbrek yetmezliği. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2002;3:129-34.



49. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-28.
50. Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA. The identification of homocystine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962;9:493-6.
51. Utku U, Çelik Y. Strokta etyoloji, sınıflandırma ve risk faktörleri. Sevin Balkan (ed) *Serebrovasküler Hastalıklar: Güneş Kitabevi Yayınları*, Ankara 2002:49-61.
52. Jousilahti P, Tuomilehto J, Vartiainen E, Pekkanen J, Puska P. Body Weight, Cardiovascular Risk Factors, and Coronary Mortality. 15-year Follow-up of Middle-aged Men and Women in Eastern Finland. *Circulation* 1996;93(7):1372-9.
53. Reis RP, Azinheira J, Reis HP, Bordalo A, Santos L, Adao M, et al. Homocysteinaemia after methionine overload as a coronary artery disease risk factor: Importance of age and homocysteine levels. *Coronary Artery Disease* 1995;6:851-6.
54. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factor for systemic atherosclerosis. *Jama* 2001;285:2481-5.
55. Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2005;29:1103-12.
56. 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.
57. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia an independent risk factor for vascular disease. *N Eng J Med* 1991;324:1149-53.
58. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and stroke. *Current opinion in Neurology* 2001;14:95-102.
59. Henry J, Barnett JP, Mohr, Bennett M. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Churchill Livingstone 1998;3:142-3.
60. 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.

61. Frosst P, Blomhøj M, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
62. Fattal-Valevski A, Bassan H, Korman SH, Lerman-Sagie T, Gutman A, Harel S. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: Importance of early diagnosis. *J Child Neuro* 2000;15(8):539-43.
63. Zang G, Dai C. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. *Thrombosis Research* 2001;104:187-95.
64. Sucu M, Karadere A, Toprak N. Homosistein ve kardiyovasküler hastalıkları. *Türk Kardiyol Dern Arş* 2001;29:181-90.
65. Hulthberg A, Anderson A, Sterner G. Plasma Homocysteine and Renal Failure. *Clin Nephrol* 1993;40:230-5.
66. Wouters MG, Moorrees MT, Van der Mooren MJ. Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1995;25:801-5.
67. Brattstrom L, Israelson B, Tengborn L. Homocysteine, factor VII, and antithrombin III in subjects with defective gene dosage for cystathionine synthase. *J. Inheret Metab. Dis* 1959;12:475-82.
68. Karaman Y. Plasma homosistein, folate and B12 vitamin levels in Alzheimer disease, vascular dementia and mild cognitive impairment. *Journal of Neurological Sciences* 2006;3:75-84.
69. Çiftçi H, Yıldız E, Mercanligil SM. Depresyon Ve Beslenme Tedavisi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008;28:369-77.
70. 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.
71. Andreotti F, Burzotta F, Manzoli A, Robinson K. Homocysteine and risk of cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2000;9:13-21.
72. Bhargava S, Ali A, Bhargava EK, Manocha A, Kankra M, Das S, et al. Lowering homocysteine and modifying nutritional status with folic acid and vitamin B(12) in Indian patients of vascular disease. *J Clin Biochem Nutr* 2012;50(3):222-6.

73. 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.
74. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
75. 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.
76. Aksoy ŞN, Geyikli İ, Saygılı Eİ. Sağlıklı Kişilerde Plazma Homosistein Düzeyinin Belirleyicileri. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006;31(4):175-81.
77. Nygard O, Vollset SE. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995;274:1526-33.
78. 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.
79. Giral P, Bruckent EE, Nelly J, Chapman M, Foglietti M, Turgin G. Homocysteine and lipid lowering Agents. A comparison between atorvastatin and fenofibrat in patients with mixed hiperlipidemia. *Atherosclerosis* 2001;154:421-7.
80. 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.
81. Garg R, Malinov M, Pettinger M, Upson B. Niasin treatment increases plasma homocysteine levels. *Am Healt J* 1999;138:1082-87.
82. Ermens AAM, Refsum H, Ruprecht J. Monitoring Cobalamin inactivation during nitrous oxide anaesthesia by determination of homocysteine and folate in plasma and urine. *Clin Pharmacol Ther* 1991;49:385-93.
83. Mcciiroy SP, Dynan KB, Lawson JT, Patterson CC, Passmore AP. Moderatly elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype and risk for stroke, vascular dementia and alzheimer disease in Northern Irland, *Stroke* 2002;33:2351-6.

84. Bhat RS, Chiu E, Jeste DV. Beslenme ve geriatric psikiyatri: ihmal edilmiş bir alan. *Current Opinion in Psychiatry* 2005;18:609-14.
85. Meeks TW, Ropacki SA, Jeste DV. Demansta nöropsikiyatrik sendromların nörobiyolojisi. *Current Opinion in Psychiatry* 2006;19:581-6.
86. McCaddon A, Hudson P, Hill D, Barber J, Lloyd A, Davies G, et al. Alzheimer's disease and total plasma aminothiols. *Biol Psychiatry* 2003;53(3):254-60.
87. Dietrich-Muszalska A, Malinowska J, Olas B, Głowacki R, Bald E, Wachowicz B, et al. The oxidative stress may be induced by the elevated homocysteine in schizophrenic patients. *Neurochem Res* 2012;37:1057-62.
88. Rees MM, Rodgers GM. Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. *Thrombosis Research* 1993;71(5):337-59.
89. Zinellu A, Loriga G, Scanu B, Pisanu E, Sanna M, Deiana L, et al. Increased low-density lipoprotein S-homocysteinylolation in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2010;32:242-8.
90. Rocha MS, Teerlink T, Janssen MC, Kluijtmans LA, Smulders Y, Jakobs C, et al. Asymmetric dimethylarginine in adults with cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. *Atherosclerosis* 2012;222:509-11.
91. Omrani HQ, Shandiz EE, Qabai M, Chaman R, Fard HA, Qaffarpoor M. Hyperhomocysteinemia, folateo and B12 vitamin in Iranian patients with acute ischemic stroke. *ARYA Atheroscler* 2011;7(3):97-101.
92. Wang L, Li J, Xie Y, Zhang XG. Association between serum homocysteine and oxidative stress in elderly patients with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *biomedical and environmental sciences* 2010;23:42-7.
93. Lester MR. Sulfite sensitivity: significance in human health. *J Am Coll Nutr* 1995;14:229-32.
94. Gunnision AF, palmes ED. Persistence of plasma S-sulfonates following expasure of rabbits to sulfite and sulfur dioxide. *Toxicon Appl Pharmacol* 1973;24:266-78.
95. Cohen HJ, Fridovich I. Hepatic sulfite oksidase. The nature and function of the heme prosthetic groups. *J Biol Chem* 1971;246:367-73.

96. Gunnison AF. Sulphite toxicity: a critical review of in vitro and in vivo data. *Food Cosmet Toxicol* 1981;19(5):667-82.
97. Wu L, Yang W, Jia X, Yang G, Duridanova D, Cao K, et al. Pancreatic islet overproduction of H<sub>2</sub>S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Laboratory Investigation* 2009;89:59–67.
98. Benevenga NJ. Evidence for alternative pathways of methionine catabolism. *Adv Nutr Res* 1984;6:1-18.
99. Amdur MO. Toxicologic appraisal of particulate matter, oxides of sulfur and sulfuric acid. *J Air Pollut Control Assoc* 1969;19(9):638-44.
100. 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.
101. 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(10):991-5.
102. Agar A, Kucukatay V, Yargicoglu P, Aktekin B, Kipmen-Korgun D, Gumuslu S, et al. 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;39:257-64.
103. Meng Z. Oxidative damage of sulfur dioxide on various organs of mice: sulfur dioxide is a systemic oxidative damage agent. *Inhal Toxicol* 2003;15(2):181-95.
104. Golembiewski JA. Allergic reactions to drugs: implications for perioperative care. *J Perianesth Nurs* 2002;17(6):393-8.
105. Halaby SF, Mattocks AM. Absorption Of Sodium Bisulfite From Peritoneal Dialysis Solutions. *J Pharm Sci* 1965;54:52-5.
106. McEvily AJ, Iyengar R, Otwell WS. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992;32(3):253-73.
107. Fazio T, Warner CR. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Addit Contam* 1990;7(4):433-54.

108. Gibson WB, Strong FB. Metabolism and elimination of sulphite by rats, mice and monkeys. *Fd Cosmet Toxicol* 1973;11:185-98.
109. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Toxicological Evaluation of Certain Food Additives with a Review of General Principle and of Specifications. 17<sup>th</sup> Report. Food and Agriculture Organization. Rome (1974).
110. Kochen J. Sulfur dioxide, a respiratory tract irritant, even if ingested. *Pediatrics* 1973;52(1):145-6.
111. Simon RA. Sulfite sensitivity *Ann Allergy* 1986;56(4):281-8.
112. Fine JM, Gordon T, Sheppard D. The roles of pH and ionic species in sulfur dioxide- and sulfite-induced bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1987;136(5):1122-6.
113. Widdicombe JG. Reflex control of airways smooth muscle. *Postgrad Med J* 1975;51(7):36-44.
114. Sprenger JD, Altman LC, Marshall SG, Pierson WE, Koenig JQ. Studies of neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis in metabisulfite sensitivity. *Ann Allergy* 1989;62(2):117-21.
115. Tan WC, Cripps E, Douglas N, Sudlow MF. Protective effect of drugs on bronchoconstriction induced by sulphur dioxide. *Thorax* 1982;37(9):671-6.
116. Rencuzogullari E, Ila HB, Kayraldiz A, Topaktas M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutat Res* 2001;490(2):107-12.
117. 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.
118. Abedinzadeh Z. Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:166-70.
119. Reist M, Jenner P, Halliwell B. Sulphite enhances peroxynitrite-dependent alpha1-antiproteinase inactivation. A mechanism of lung injury by sulphur dioxide? *FEBS Lett* 1998;423(2):231-4.

120. Hoffer LJ, Hamadeh MJ, Robitaille L, Norwich KH. Human sulfate kinetics, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:1372-80.
121. Reist M, Marshall KA, Jenner P, Halliwell B. Toxic Effects of Sulphite in Combination with Peroxynitrite on Neuronal Cells. *J Neurochem* 1998;71:2431-8.
122. Küçükatay V, Savcioğlu F, Hacıoğlu G, Yargıçoğlu P, Ağar A. Effect of sulfite on cognitive function in normal and sulfite oxidase deficient rats, *Neurotoxicol Teratol* 2005;27:47-54.
123. Carson NA, Cusworth DC, Dent CE, Field CM, Neill DW, Westall RG. Homocystinuria: A New Inborn Error Of Metabolism Associated With Mental Deficiency, *Arch Dis Child* 1963;38:425-36.
124. Alarie Y, Ulrich CE, Busey WM, Swann HE Jr, MacFarland HN. Long-term continuous exposure of guinea pigs to sulfur dioxide. *Arch Environ Health* 1970;21(6):769-77.
125. 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.
126. Mottley C, Mason RP, Chignell CF, Sivarajah K, Eling TE. The Formation of Sulfur Trioxide Radical Anion during the Prostaglandin Hydroperoxidase-catalyzed Oxidation of Bisulfite (Hydrated Sulfur Dioxide). *J Biol Chem* 1982;257:5050-5.
127. Mottley C, Mason RP. Sulfate anion free radical formation by the peroxidation of (Bi)sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1988;267(2):681-9.
128. 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.
129. 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.

130. Gunnison A.F, Sellakumar A, Currie D, Synder E.A. Distribution, Metabolism And Toxicity of Inhaled Sulfur Dioxide And Endogenously Generated Sulfite in the Respiratory Tract of Normal and Sulfite Oxidase-Deficient Rats. *J Toxicol Environl Health* 1987;21:141-62.
131. Cohen HJ, Fridovich I, Rajagopalan KV. Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J Biol Chem* 1971;246(2):374-82.
132. 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(3):859-66.
133. Kisker C, Schindelin H, Pacheco A, Wehbi WA, Garrett RM, Rajagopalan KV, et al. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 1997;91(7):973-83.
134. Garrett RM, Johnson JL, Graf TN, Feigenbaum A, Rajagopalan KV. 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(11):6394-8.
135. Mudd SH, Irreverre F, Laster L. Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. *Science* 1967;156:1599-602.
136. Johnson JL, Coyne KE, Garrett RM, Zobot MT, Dorche C, Kisker C, et al. Isolated sulfite oxidase deficiency: identification of 12 novel SUOX mutations in 10 patients. *Hum Mutat* 2002;20(1):74.
137. Bindu PS, Christopher R, Mahadevan A, Bharath RD. Clinical and imaging observations in isolated sulfite oxidase deficiency. *J Child Neurol* 2011;26(8):1036-40.
138. Sass JO, Nakanishi T, Sato T, Shimizu A. New approaches towards laboratory diagnosis of isolated sulphite oxidase deficiency. *Ann Clin Biochem* 2004;41:157-9.
139. Salman MS, Ackerley C, Senger C, Becker L. New insights into the neuropathogenesis of molybdenum cofactor deficiency. *Can J Neurol Sci* 2002;29:91-6.



140. 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.
141. Griffiths R, Grieve A, Dunlop J, Damgaard I, Fosmark H, Schousboe A. Inhibition by excitatory sulphur amino acids of the high-affinity L-glutamate transporter in synaptosomes and in primary cultures of cortical astrocytes and cerebellar neurons. *Neurochem Res* 1989;14(4):333-43.
142. Langley-Evans SC, Phillips GJ, Jackson AA. Sulphur dioxide: a potent glutathione depleting agent. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1996;114(2):89-98.
143. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999;37(9-10):949-62.
144. Leung KH, Post GB, Menzel DB. Glutathione S-sulfonate, a sulfur dioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;77(3):388-94.
145. 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.
146. Mitsuhashi H, Nojima Y, Tanaka T, Ueki K, Maezawa A, Yano S, Naruse T. Sulfite is released by human neutrophils in response to stimulation with lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 1998;64(5):595-9.
147. Billion S, Tribout B, Cadet E, Queinnec C, Rochette J, Wheatley P, et al. Hyperhomocysteinaemia, folate and vitamin B12 in unsupplemented hemodialysis patients: effects of oral therapy with folic acid and vitamin B12. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:455-61.
148. Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, et al. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000;54:10-5.

149. Halperin I, Morelli M, Korczyn AD, Youdim MB, Mandel SA. Biomarkers for evaluation of clinical efficacy of multipotential neuroprotective drugs for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurotherapeutics* 2009;6:128-40.
150. 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.
151. Muller UJ, Frick B, Winkler C, Fuchs D, Wenning GK, Poewe W, et al. Homocysteine and serum markers of immune activation in primary dystonia. *Mov Disord* 2005;20:1663-7.
152. Clarke S, Banfield K. S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases. In *Homocysteine in health and disease*. Eds: Carmel R, Jacobsen DW. Cambridge University Press, Cambridge, New York 2001:63-78.
153. 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;110:216-20.
154. Hoffer LJ. Methods for measuring sulfur amino acid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:511-7.
155. Hoffer LJ. Homocysteine remethylation and trans-sulfuration. *Metabolism* 2004;53:1480-3.
156. Łowicka E, Bełtowski J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep* 2007;59:4-24.
157. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, et al. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem* 2001;78(2):249-53.
158. White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, et al. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary cultures, possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem* 2001;76:1509-20.
159. Do KQ, Tappaz ML. Specificity of cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) for sulfur-containing amino-acids. *Neurochem int* 1996;28:363-71.
160. Kocabalkan F, Baykal Y, Bozoğlu E. Yaşlılarda kardiyovasküler risk faktörü olarak homosistein. *Geriatrici* 2000;3(2):69-73.

161. Huang RF, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 2001;131(1):33-8.
162. Ventura P, Panini R, Verlato C, Scarpetta G, Salvioli G. Ventura P, et al. Peroxidation indices and total antioxidant capacity in plasma during hyperhomocysteinemia induced by methionine oral loading. *Metabolism* 2000;49(2):255-8.
163. Dikilitaş M, Koçyiğit A. Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *HR.Ü.Z.F. Dergisi* 2010;14(2):77- 89.
164. Dinçer Y, Kankaya S. DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(4):1365-73.
165. Fidan AF, DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi AKÜ-Fen Bilimleri Dergisi 8(1);53-64.
166. Didenko VV. *Methods in Molecular Biology*, vol. 203: *In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols*. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 2006.