



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3- NİTROPROPIYONİK ASİT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
HUNTINGTON HASTALIĞI MODELİNDE ALFA LİPOİK ASİT'İN
HASAR OLUŞTURUCU MEKANİZMALAR ÜZERİNDE TEDAVİ
EDİCİ ETKİNLİĞİ**

ŞEYDA ŞAYİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Goncagül Haklar

İSTANBUL 2008

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ()

Anabilim Dalı : Biyokimya (Tıp)

Tez Sahibi : Şeyda ŞAYİR

Tez Başlığı : 3- Nitropropionik asit ile oluşturulan deneysel Huntington hastalığı modelinde alfa lipoik asitin hasar oluşturucu mekanizmalar üzerinde tedavi edici etkinliği

Sınav Yeri : Biyokimya (Tıp)

Sınav Tarihi: 22.09.2008

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Goncagül HAKLAR

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı,
Soyadı)

Prof. Dr. Yavuz TAGA

Yrd. Doç. Dr. Meral YÜKSEL

Kurumu

Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D

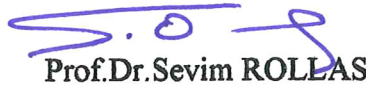
Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D

S.H.M.Y.O. Tıbbi Lab.Biyokimya

İmza



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 16./10./2008. tarih ve 11. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Sevim ROLLAS

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

15. 10. 2008

ŞEYDA ŞAYİR



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince gösterdiği sabır, yakın ilgi, değerli katkı ve yönlendirmelerinden dolayı sevgili Danışmanım, kıymetli Hocam

Prof. Dr. Goncagül Haklar'a

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yavuz Taga'ya

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ;

Prof. Dr. Kaya Emerk'e

Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer'e

Prof. Dr. Serpil Bilsel'e

Prof. Dr. A. Süha Yalçın'a

Prof. Dr. Önder Şirikçi'ye

Tez çalışmalarımda desteğini benden esirgemeyen, bilgilerinden çokça faydalandığım sevgili

Yard. Doç. Dr. Meral Yüksel'e

Tez çalışmalarımın tüm aşamalarında yanımda olan, sevgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili arkadaşım

Dr. Göksenin Ünlügüzel'e

Tez çalışmalarımın ölçümlerinin yapılmasında katkıda bulunan M.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvarı Bölümü öğretim üyeleri,

Yard. Doç. Dr. Ayliz Velioglu Ögünç, Yrd. Doç. Dr. Dumrul Gülen ve

Öğr. Gör. Hülya Şahin'e

Tez çalışmamda kullandığım deney hayvanlarının temin edilmesinde yardımcı olan

Vet. Dilek Özbeyli'ye

M.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan çok sevgili

Arkadaşlarıma

Yüksek lisans çalışmalarım süresince her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm sevgili

Aileme

Yüksek lisans yaptığım sürece bana maddi destek sağlayan **TÜBİTAK'a**

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
Teşekkür	I
İçindekiler	II
Simgeler ve Kısaltmalar	IV
Şekillerin Listesi	V
Tabloların Listesi	V
Özet	1
İngilizce Özet (Summary)	2
1. Giriş ve Amaç	4
2. Genel Bilgiler	6
2.1. Huntington Hastalığı	6
2.1.1. Huntington Hastalığı'nın Genetik Özellikleri	7
2.1.2. Huntington Hastalığı'nın Nöropatolojik Gelişimi	7
2.1.3. Huntington Hastalığı'nda Enerji Metabolizması Bozuklukları	8
2.1.4. Huntington Hastalığı'nda Oksidatif Stresin Rolü	8
2.1.5. 3- Nitropropiyonik Asit ile Oluşturulan Deneysel Huntington Hastalığı Modeli	10
2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	10
2.3. Solunumsal Patlama	16
2.4. Antioksidanlar	17
2.4.1. Antioksidanlar'ın Genel Özellikleri	17
2.4.2. Enzimatik Antioksidanlar	19
2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz	19
2.4.2.2. Katalaz	20

2.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz	20
2.4.2.4. Glutasyon S –Transferaz	21
2.4.2.5. Glutamat Redüktaz	21
2.4.2.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	22
2.4.3. Nonenzimatik Antioksidanlar	22
2.4.4. Alfa Lipoik Asit	25
2.3.4.1. Alfa Lipoik Asit’in Biyosentezi	26
2.4.4.2. Alfa Lipoik Asit’in Biyolojik Aktivitesi	27
3. Gereç ve Yöntemler	29
3.1. Gereçler	29
3.1.1. Deney Hayvanları	29
3.1.2. Reaktifler	29
3.1.3. Cihazlar	30
3.2. Yöntemler	30
3.2.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması ve Enjeksiyonlarının Düzenlenmesi	31
3.2.2. Striatal Kesitlerin Eldesi	31
3.2.3. Kemilüminesans Ölçümleri	32
3.2.4. Kan Numunelerinin Eldesi	33
3.2.5. İstatistiksel Analizler	34
4. Bulgular	35
4.1. Deney Hayvanlarının Takibi	35
4.2. Kemilüminesans Ölçümleri	36
4.2.1. Doku Ölçümleri	36
4.2.2. Mononükleer Hücre Solunumsal Aktivitesi Ölçümleri	40
5. Tartışma	42
6. Kaynaklar	47
7. Özgeçmiş	58

SİMGELELER ve KISALTMALAR

3-NPA	3-Nitropropionik asit
AUC	Eğri altı alanı
DHLA	Dihidro lipoik asit
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG-R	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon S transferaz
HH	Huntington hastalığı
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HO ₂ ·	Hidroperoksil radikali
KAT	Katalaz
KL	Kemilüminesans
LA	Alfa lipoik asit
MDA	Malonaldehit
NMDA	N- metil D- aspartat
NO·	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
O ₂ · ⁻	Süperoksit radikali
·OH	Hidroksil radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
PMA	Phorbol myristate acetate

ROT	Reaktif oksijen türleri
RLU	Relative light unit
RNT	Reaktif nitrojen türleri
SF	Serum fizyolojik
SOD	Süperoksit dismutaz
YBOS	Yapay beyin omurilik sıvısı

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

- Şekil 1. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri
- Şekil 2. LA ve DHLA'nın moleküler yapısı
- Şekil 3. Deneklerdeki kilo değişimleri (g)
- Şekil 4. Luminol aracılı kemiluminesans ölçümleri açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması
- Şekil 5. Lusigenin aracılı kemiluminesans ölçümleri açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması
- Şekil 6. RNT salınımı açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması
- Şekil 7. Mononükleer hücre solunumsal patlama aktiviteleri açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması

TABLULARIN LİSTESİ

- Tablo 1. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri
- Tablo 2. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi

ÖZET

Huntington hastalığı (HH) 1/100.000 oranında görülen kalıtsal nörodejeneratif bir hastalıktır. HH'de nöronal hücre ölümünün etiyolojisi henüz tamamen aydınlatılamamıştır. Nörodejenerasyona neden olan mekanizmalar arasında eksitotoksisite, mitokondriyal enerji metabolizması bozuklukları, artan hücre içi kalsiyum düzeyleri ve serbest radikaller yer almaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada bulunan koruyucu mekanizmalara antioksidanlar denir. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler.

Çalışmamızda 3-NPA ile deneysel HH modeli oluşturularak, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin düzeyleri kemilüminesans yöntemi ile ölçüldü. HH modeline alternatif bir tedavi seçeneği olan antioksidan terapi uygulanarak serbest radikal düzeylerindeki değişimler kemilüminesans yöntemi ile saptandı. Çalışmamızın alternatif tedavi grubunda ise 3- NPA ve buna ek olarak alfa lipoik asit (LA) sıçanlara sistemik olarak uygulandı ve beyin kesitlerinden salınan reaktif türler ve tam kan örneklerinden elde edilen mononükleer hücre aktivasyonu kemilüminesans yöntemi ile ölçüldü.

Çalışmamızın sonucunda deneysel olarak oluşturulan HH modelinde reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin arttığını ve mononükleer hücrelerin aktivasyonunun azaldığını saptadık. Buna ilaveten 3-NPA ile oluşturulan deneysel HH modeline tedavi olarak LA'in kullanılması ile birlikte serbest radikallerin miktarının azaldığını ve mononükleer hücre aktivasyonunun arttığını saptadık.

Sonuç olarak çalışmamızda HH'nin patogeneğinde artmış reaktif türlerin olduğunu, bu artışta eksitotoksisitenin yanı sıra mitokondriyal enerji metabolizmasındaki bozuklukların ve artan hücre içi kalsiyumun da katkıda bulunduğunu dolaylı olarak gösterdik. Bununla birlikte deneysel HH modelinde artan reaktif türlerin uygun antioksidan kullanımı ile azaltılabildiği sonucunu elde ettik.

Anahtar kelimeler: Huntington hastalığı, reaktif oksijen ve nitrojen türleri, 3-NPA, lipoik asit, oksidatif stres

SUMMARY

Therapeutic effects of alpha lipoic acid on injury mechanism of experimental Huntington's disease model that is produced by 3-Nitropropionic acid

Huntington's disease (HH) is a genetic neurodegenerative disease that is seen 1/100.000. Etiology of dying neuronal cells in HH has not yet been clarified. The mechanisms that cause neurodegeneration include excitotoxicity, mitochondrial energy metabolism disorders, increased calcium levels within cells and free radicals. The protective mechanisms in the organism against the harmful effects of the free radicals are called antioxidants. Some of these antioxidants hinder free radical formation, and some prevent the harmful effects of already formed free radicals.

By forming an experimental HH model with 3-NPA in our study, the levels of reactive species are measured using the chemiluminescence method. The changes in reactive species levels are also measured using the chemiluminescence method after the application of antioxidant therapy which is a treatment option alternative in HH model. In the alternative treatment group of our study on the other hand, 3-NPA and additionally alpha lipoic acid (LA) are applied to rats systematically, and the reactive species that are released from their brain slices and the mononuclear cell activation obtained from blood samples are measured using the chemiluminescence method.

At the end of our study, we have found that the reactive species increase and mononuclear cell activations decrease in the experimental HH model. Additionally, we have found that the concentration of reactive species decreases and mononuclear cell activation increases after LA treatment in our experimental HH model.

As a result, we have indirectly shown that the reactive species increase in the pathogenesis of the HH, and besides excitotoxicity, the calcium ion concentration within in the cells and disorders in the mitochondrial energy metabolism contribute in this increase. In addition to this, we have shown that the reactive

species that increase in the experimental HH model can be reduced with the use of proper antioxidants.

Key words: Huntington's disease, reactive oxygen and nitrogen species, 3-NPA, Lipoic acid, oxidative stress

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Huntington hastalığı (HH), orta yaşlarda başlayan otozomal dominant kalıtmı nörödejeneratif bir hastalıktır. HH istemsiz kore formundaki hareketler, psikolojik değişiklikler ve demans ile birlikte seyrederek. HH ilk kez George Huntington tarafından 1872 yılında tanımlanmıştır (1).

HH nöropatolojisi incelendiğinde farklı beyin bölgelerinin farklı seviyelerde hastalıktan etkilendiği görülmektedir. En önemli kayıp striatumda görülmekle birlikte substantia nigra, globus pallidus, nucleus subtalamicus, amigdala, talamus ve hipotalamus bölgelerinde de lokal nöronların ölümü görülmektedir (2).

Pozitron emisyon tomografisi ile yapılan görüntülemelerde Huntington'lu hastalarda özellikle striatumda glukoz metabolizmasının bozulduğu tespit edilmiştir (3). Bu durum HH'de ortaya çıkan en erken patolojik değişikliklerdir. Hücre metabolizmasında meydana gelen bu defekt striatumda hücre ölümüne ve beyinde enerji üretimine yönelik metabolik enzimlerde azalmaya neden olmaktadır. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri primer olarak etkilenmekte ve enerji üretimi azalmaktadır (3).

Deneyisel HH modeli oluşturmak üzere kullandığımız 3-nitropropionik asit (3-NPA) maddesi mikotik kökenli striatal bir nörotoksindir. Krebs siklusunda ve elektron taşıma zincirinde görev alan süksinat dehidrogenaz enziminin geri dönüşümsüz inhibitörüdür (4). 3-NPA, sıçan, fare ve primatlara akut veya kronik olarak uygulandığında HH benzeri semptomlar ortaya çıkarmakta ve ATP oluşumunu azaltmaktadır (4).

Çalışmamızda deneyisel olarak oluşturulan HH modellerinden elde edilen striatal kesitlerde reaktif oksijen ve nitrojen türleri kemilüminesans yöntemi ile ölçülerek hasar oluşturucu mekanizmadaki rollerinin bölgesel olarak incelenmesi amaçlandı. Ayrıca deneklerden alınan kan örneklerinden elde edilen mononükleer

hücrelerde solunumsal patlama düzeyleri belirlenerek dolaşımdaki genel etkinin incelenmesi düşünüldü.

Alfa lipoik asit (LA) antioksidan ve anti-enflamatuvar etkileri olan bir kofaktördür (5). Diabetes mellitus, ateroskleroz ve iskemi-reperfüzyon hasarında etkinliği gösterilmiş olmasına rağmen nörodejeneratif hastalıklardaki etkinliği ile ilgili az sayıda yayın mevcuttur. Çalışmamızda deneysel HH modelimizde LA tedavi gruplarında 3-NPA alımına eş zamanlı olarak LA uygulaması yapılması ve bu uygulama sonucu LA'nın striatal beyin kesitlerinde hasar oluşturuvcu mekanizmada etkin olduğu düşünülen reaktif oksijen ve nitrojen türleri üzerine azaltıcı ve/veya anti-enflamatuvar etkilerinin araştırılması planlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Huntington Hastalığı

Huntington hastalığı (HH) fetal, otozomal dominant geçişli prevelansı 1:100.000 olan fiziksel, bilişsel ve psikiyatrik semptomları kapsayan nörodejeneratif bir hastalıktır (1, 6, 7, 9). HH'nin en karakteristik belirtisi kore adını alan düzensiz ve istemsiz hareketlerdir (8). Kontrol dışı olan bu hareketler sürekli ve vücudun büyük bir bölümünün katılımıyla sıçramalar şeklinde olur (2). HH gelişiminde fiziksel stabilite bozulması ve kas kontrolünün zayıflaması sonucunda anormal yüz ifadeleri, ifade bozukluğu, çiğneme ve yutmada zorluk görülür. Disfaji ve buna bağlı olarak kilo kaybı mevcuttur (10, 11). Bunların yanı sıra uyku sikluslarında bozulma, uykusuzluk ve hızlı göz uyku hareketlerinde bozulmalar görülür (12, 13).

Bilişsel semptomlar seçici bilişsel yeteneklerdeki zayıflama ile ortaya çıkar. Buna bağlı olarak yönetici fonksiyonlar (planlama, bilişsel esneklik, soyut düşünme, kural edinme, uygun davranışların sergilenmesi, uygunsuz davranışların engellenmesi), fizikomotor fonksiyonlar (kas kontrolü ile ilgili düşünsel işlemlerde yavaşlama), algısal ve çevresel yetenekler, bilgileri hatırlamada doğru metodu seçme ve yeni beceriler öğrenmedeki bozukluklar bireydeki patoloji ile paralellik gösterir (14).

Hastalık çeşitli fiziksel ve bilişsel semptomların yanı sıra depresyon, anksiyete, duygu dışavurumunda azalma (duygusal kısıtlılık), öfke gibi negatif dışavurumları kontrol yeteneğinde azalma, korku, üzüntü, başkalarından nefret etme, bencillik, saldırganlık ve zorlayıcı davranışlar gibi psikiyatrik semptomları da içerir (15). HH olan bireyin çalışma hayatında veya gündelik yaşamında performansı düşmekte ve ilaç takviyesi ile yaşamını sürdürmektedir (1, 7).

Hastalık genellikle 35-45 yaşları arasında başlar ve ilerleyici bir şekilde seyreder. İlk semptom görüldüğünden itibaren ortalama yaşam süresi 15-20 yıldır (16). Çok küçük bir popülasyonda 15 yaşın altında görülmekte; bradikinezi, epilepsi, demans ve ataksi gibi semptomlar hızla gelişmektedir. 60 yaşın üzerinde hastalık daha yavaş gelişmekte fakat daha fazla semptom görülmektedir (2).

2.1.1.Huntington Hastalığı'nın Genetik Özellikleri

HH, otozomal dominant kalımlı nörodejeneratif bir hastalıktır. HH geni huntingtin adı verilen 350 kDa ağırlığında ve işlevi henüz bilinmeyen, sitoplazmada bulunan bir protein kodlar (17). HH geni 4. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur. Bu genin exon 1 bölgesinde meydana gelen mutasyon sonucu CAG trinükleotidlerinin tekrarlarının artmasına neden olur (9).

Sağlıklı bireylerde 35'ten az CAG tekrarı varken HH olan bireylerde bu sayı 37 ve üzerine çıkar (16). Artan CAG trinükleotid tekrarları mutant huntingtin proteinine anormal uzunluktaki poliglutamin sekanslarının eklenmesine neden olur (16, 17). Huntingtin proteini ile interaksiyona giren 4 farklı protein tarif edilmiştir. Bunlardan birincisi HIP 2 *huntingtin-interacting protein 2*'dir ve görevi protein degradasyonunu gerçekleştirmektir. İkincisi HAP 1 *huntingtin-associated protein 1*, üçüncüsü HIP 1 proteindir ve huntingtinin hücrel fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gereklidir. Sonuncusu da HEAT *protein motif found in huntington elongation factor 3 regulatory A subunit of protein phosphatase 2A and TOR*'dir. Bu proteinin aminoasit dizisinin bir kısmı huntingtin ile homoloji gösterir. Aynı zamanda yapısındaki aminoasitlerin, transport işlevinden sorumlu sitoplazmik regülatör proteinlerle aynı olduğu gösterilmiştir. (3, 18)

HH'de heterozigot kalımlı bireyler ile homozigot bireyler arasında klinik olarak fark saptanamamıştır. Homozigot bireylerin letal olması gerekirken heterozigotlar ile aynı eksiklikler görülmektedir. Bu durum oluşan gen defektinin esansiyel bir geni elemine etmediğinin bir göstergesidir ve bu gen defekti ile birlikte bir enzim aktivitesinin azaldığı ya da tamamen ortadan kalktığı düşünülmektedir. (2, 3)

2.1.2. Huntington Hastalığı'nın Nöropatolojik Gelişimi

HH globus pallidus, amigdala, nucleus subthalamicus, substantia nigra, talamus ve hipotalamus ile subkortikal bölgelerdeki lokal nöronların kaybı ile karakterize bir hastalıktır ve bu bölgeler hastalıktan farklı derecede etkilenmektedirler (16, 19). Huntington'lu hastaların post-mortem beyin dokuları

incelendiğinde %20 oranında küçülme görüldüğü kaydedilmiştir (2). HH'de striatumda çeşitli hücre tiplerinin azalmasıyla %95 kayıp meydana gelmektedir ve bu atrofik görüntü postmortem beyin kesitlerinde net olarak gözlenmektedir (1, 3).

İmmünohistokimyasal boyama yöntemleriyle yapılan çalışmalarda Huntington'lu hastaların serebral korteks ve striatumlarında dejenerasyon ve proliferasyonun sitoskeletal farklılaşmalar ile birlikte geliştiği gösterilmiştir. Nöral hücre adezyon moleküllerinde 'fosfataz dirençli epitoplara' yapılan boyamada özellikle striatumda dejeneratif değişikliklerin olduğu tespit edilmiş ve anormal sitoskeletal protein fosforilasyonunun N-methyl D-aspartate (NMDA) reseptörünün aktivasyonu ile ilişkilendirilebileceği ileri sürülmüştür (20).

2.1.3. Huntington Hastalığı'nda Enerji Metabolizması Bozuklukları

HH'de ortaya çıkan en erken patolojik değişiklik glukoz metabolizmasında meydana gelen azalmadır. Huntington hastalarında pozitron emisyon tomografisi ile yapılan görüntülemelerde, striatumda, özellikle nucleus caudatus'ta glukoz metabolizmasındaki azalma tespit edilmiştir (2, 3). Hücre metabolizmasında meydana gelen bu defekt nucleus caudatus ve putamen'de hücre ölümüne neden olmakta ve buna ilaveten beyinde enerji üretiminde rol alan metabolik enzimlerde azalma görülmektedir. Bu durumdan mitokondriyal elektron taşıma zinciri primer olarak etkilenmekte dolayısıyla enerji üretimi azalmaktadır. Bunun yanı sıra HH'de enerji metabolizmasında görülen genetik defektler, eksitotoksik nöron ölümüne neden olmaktadır (3).

Bir hipoteze göre huntingtin proteinindeki poliglutamin segmenti primer veya sekonder enerji metabolizması defektine bağlı olarak, nöronal dejenerasyona neden olmaktadır.(21)

2.1.4. Huntington Hastalığı'nda Oksidatif Stresin Rolü

Bütün aerobik canlılar normal solunumun bir sonucu olarak bir miktar istenmeyen serbest radikal oluşturmaktadır. Kullanılan oksijenin yaklaşık % 1.5'i suya indirgenmemekte ve serbest radikal oluşturarak ortama salınmaktadır (22).

Sağlıklı bir konakçıda antioksidanlar, bu üretilen radikallerin çevre dokuya hasar vermesini engellemektedir. Ne zamanki serbest radikal oluşum hızı konakçının antioksidan defans mekanizmalarını aşarsa o zaman oksidatif stres oluşur.

Oksidatif stres DNA, lipitler, proteinler, karbonhidratlar gibi birçok makro molekülde hasar meydana getirir, hücrel homeostazı bozar ve birçok hastalığın patogeneğinde rol oynayan hasar verici diğer reaktif oksijen türleri (ROT)'nin üretimini arttırır (23).

Nörodejeneratif proseslerde ROT'nin artmasıyla normal mitokondriyal işleyiş ve buna bağlı olarak üretilen ATP miktarı azalır, mitokondriyal membran potansiyeli ve permeabilitesi değişir, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar. Tüm bu değişiklikler nöronal ölümlere, eksitotoksisteye, makro moleküllerin oluşumuna ve apoptoza neden olur (24).

Oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon üzerinde direkt olarak etkilidir. ROT'nin oluşumu süresince nöronlarda hidrojen peroksit oluşumu görülür, bu da mitokondriyal disfonksiyona ve mitokondriden sitokrom c sakınımına neden olur. Reaktif nitrojen türleri (RNT) ise nöronlarda anoksiye neden olur ve bu da mitokondriyal membranlarda depolarizasyona ve sonrasında da sitokrom c salınımına neden olur (25). HH hastalığı patogeneğinde diğer nörodejeneratif hastalıklarda da olduğu gibi oksidatif stres ve mitokondriyal hasarın olduğu öngörülür. Huntington'lu hastaların beyin otopsilerinde birçok mitokondriyal enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. HH'de elektron taşıma zincirinde kompleks II ve III' te %55, kompleks IV'te %25 kayıp olduğu gözlemlenmiştir (26, 26). Serbest radikallerin elektron taşıma zincirinde yapmış olduğu zarar enerji metabolizmasındaki bozulmanın asıl nedenidir.

Bunların yanı sıra yapılan çalışmalarda Huntington'lu hastalarda bazal gangliada 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (OHdG) seviyelerinin yüksek bulunması oksidatif DNA hasarının düşündürmektedir (3). HH'da transgenik modeller üzerinde yapılan çalışmalarda OHdG seviyesi idrar, plazma ve striatal mikrodializatlarda yüksek bulunmuştur (3). Yapılan diğer transgenik model çalışmalarında ROT'nin indeksi olan dichlofloruscein (DCF) in arttığı, 11,19 ve 35 haftalık hayvanlarda katalaz enziminin baskılandığı görülmüş ve oksidatif stresin HH gidişatında etkili olduğu düşünülmüştür (3).

2.1.5. 3- Nitropropiyonik Asit (3-NPA) ile Huntington Hastalığı Modeli

3-NPA moleküler ağırlığı 119.08 g/mol olan striatal bir toksindir. Mitokondriyal sitrik asit döngüsünde ve elektron transport zincirinde yer alan süksinat dehidrogenaz enziminin geriye dönüşümsüz inhibitörüdür (27, 28). 3-NPA sıçan, fare ve primatlara akut veya kronik uygulandığında, HH benzeri semptomlar ortaya çıkarmakta ve ATP oluşumunu azaltmaktadır (27).

Düşük doz 3-NPA sistemik uygulandığında striatal atrofiye neden olur ve oluşan lezyonlar striatuma spesifiktir, yüksek dozda uygulandığında ise hipokampus ve talamus etkilenir (29).

3-NPA'nın yüksek metabolik aktiviteye sahip olan ve çok sayıda NMDA reseptörü içeren beyin bölgelerine etki ettiği ortaya çıkarılmıştır. 3-NPA uygulamasıyla oluşan 3 farklı tip lezyon tanımlanmıştır. Tip 1 lezyonlar, dorsal striatumdaki adacıklarda nöron kaybı, NADPH diaforaz nöronlarında azalma ve aksonlarda küçülme ile tip 2 lezyonlar daha fazla sayıda nöron kaybı, diaforaz nöronlarında eksiklik ve HH striatal patolojisine benzer hücre içinde fibril demetleri şeklinde kapsülcükler ile, tip 3 lezyonlar dorsal striatumun tamamında nöronal kayıp ve ventral striatumda nöron kaybı başlangıcı ile karakterizedir (3).

Altı haftadan küçük deney hayvanlarına sistemik enjeksiyon sonrası toksik etkinin olmadığı, 7-14 haftalık deney hayvanlarında %25 oranında striatal hasar olduğu ve 16 haftadan büyüklerde ise %80 striatal lezyon olduğu ve ölüm görüldüğü bildirilmiştir (22). İntrastriatal enjeksiyon sonucunda sistemik enjeksiyona göre daha fazla nöronal kayıp olduğu gösterilmiştir (29, 30). HH'de kore tarzında hareket varken 3-NPA uygulaması sonucu distonik hareket görülür. İkisinde de striatal hasarlanma ve striatal afferentlerde azalma, spiny nöronlarında dendiritik anormallik, NADPH diaforaz nöronlarında azalma ve spiny projeksiyon nöronlarında kayıp görülür (27).

3-NPA ile görülen davranış bozuklukları ilk aşamada uyku hali, daha sonrasında yürüyüş bozukluğu, sendeleme ve dönme hareketi son aşamada ise yana uzanma hareketi ve aktivite düşüklüğüdür (29, 30).

3-NPA'nın sistemik enjeksiyonu ile birlikte vücudun tüm dokularında yüksek enerjili fosfat bileşiklerini yıkan fosfatazlar hızla azalır. Kronik düşük doz 3-NPA uygulaması ile NMDA reseptör agonistlerinin İntrastriatal uygulanmasının histolojik açıdan benzer lezyonlara neden olduğu gösterilmiştir (56). Mitokondriyal toksinlerle elektron taşıma zincirinin inhibisyonu *in vivo* sekonder eksitotoksik nöronal dejenerasyona neden olmaktadır (32, 33). Başka bir yandan süksinat dehidrogenaz aktivitesinin inhibisyonu hücre ATP düzeyinin azalmasına ve hücre anoksiye neden olmaktadır ve anoksinin de eksitotoksik hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (34). Toksisitenin mekanizmasında dopaminerjik toksisite, striatal arterin yaralanması veya glutamat taşıyıcı aktivitesinin yüksek olmasının da etkili olabileceği düşünülmektedir (32).

2.2 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri:

Serbest radikaller, en dış orbitalinde tek sayıda paylaşılmamış elektron bulunan moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikaller canlı hücrenin biyomembranlarındaki doymamış lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi organik bileşiklerle reaksiyona giren oldukça reaktif nitelikli moleküllerdir. Çok kısa yaşam süreleri olmasına karşın, hücrede oksidatif hasara yol açabilirler (35).

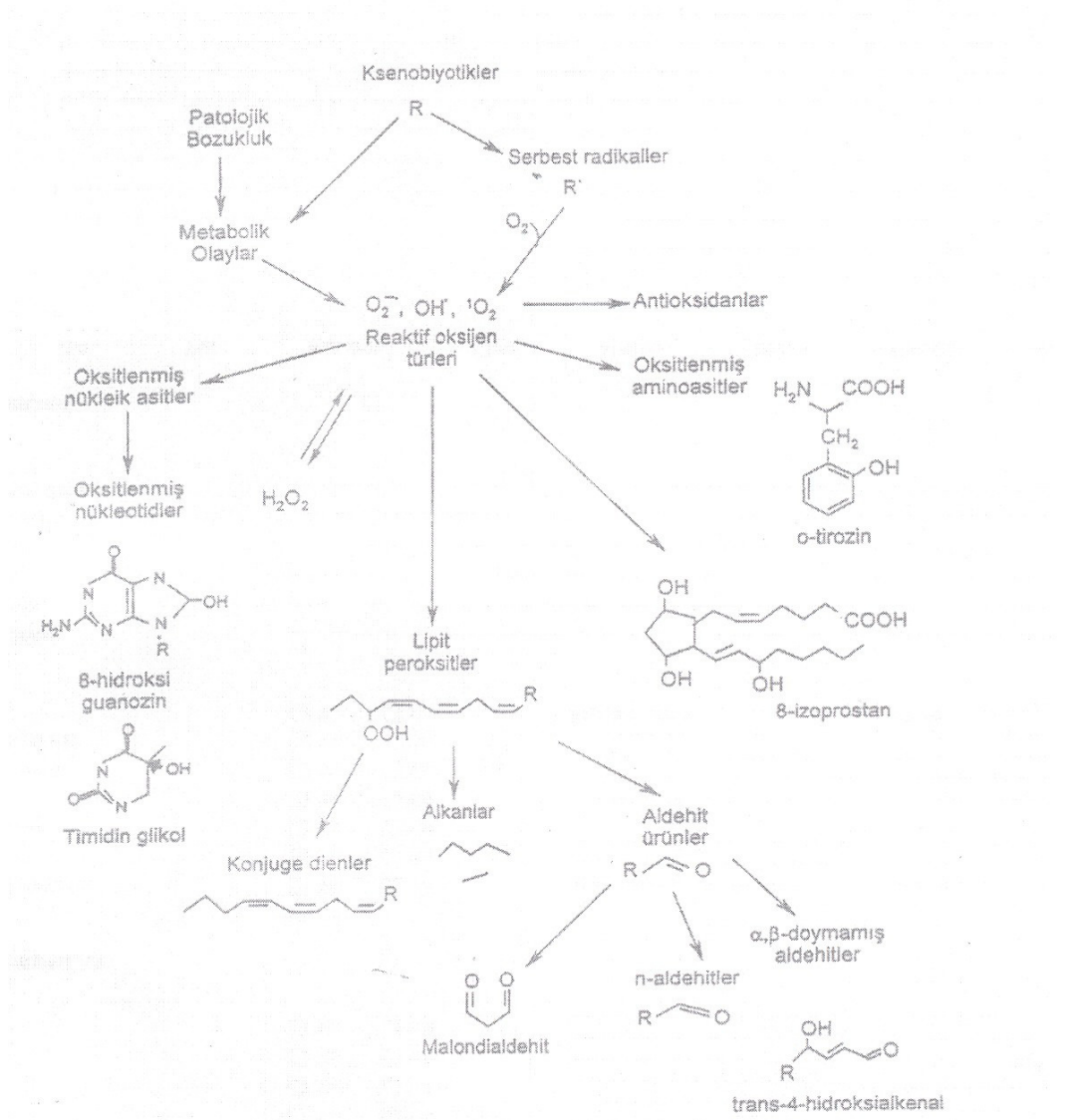
Serbest radikaller elektron konfigürasyonlarını pozitif yükü dengelemeleri gerektiğinden oldukça reaktiftirler. Elektronunu başka bir moleküle verebilen serbest radikaller, başka bir molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilmektedirler. Bu reaksiyonlar yoluyla radikal olmayan yapılar da radikal şekline dönüşebilir (36).

Serbest radikaller normal hücresel metabolik reaksiyonların bir ürünüdür. Bu nedenle biyolojik bir bozukluk olarak nitelendirilmemelidir. Farklı metabolik olaylar farklı radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Hücre zarında, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde, sitozol ve endoplazmik retikulumda gelişen metabolik reaksiyonlar serbest radikal oluşumuna neden olurlar. Aynı zamanda organizmada hastalığa sebep olan eksojen madde etkisi ile de oluşabilirler (37, 38).

Aerobik metabolizmaya sahip canlılarda serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir. Bunun yanı sıra organizmada karbon ve kükürt merkezli radikaller

de oluşmaktadır. Serbest radikal gibi davranan, ancak serbest radikal tanımına uymayan oksijen kaynaklı hidrojen peroksit gibi hareketli moleküller de mevcuttur. Bu moleküller de serbest radikaller ile beraber reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılırlar (35 - 38) (Şekil 1).

Reaktif oksijen türleri enzimatik reaksiyonlar ve metabolik fonksiyonlar için gereklidir. Buna karşın hücresel yapıları olumsuz etkileyebilirler. Serbest radikallerin en önemli hedef yapıları DNA, lipit ve proteinlerdir. Hücre zarındaki lipitlerde lipit peroksidasyonuna, protein metabolizmasında agregasyon, parçalanma ile kırılmaya ve DNA yapısında mutasyona neden olarak hücre ölümüne yol açabilirler (39).



Şekil 1. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri

Serbest radikaller kaynaklarının endojen veya ekzojen oluşuna göre iki gruba ayrılırlar. Ekzojen kaynaklar; sigara dumanı, radyasyon, hava kirliliği ve farmakolojik bazı elementlerdir. Endojen kaynaklar; fagositler, makrofajlar, nötrofiller, elektron transport sistemi, ksantin oksidaz ve araşidonik asit metabolizmasıdır (40, 41).

Endojen kaynak bölgelerinden biri olan fagositlerde zar bağımlı NADPH oksidaz enzimi bulunur. Bu enzim hücre zarına bağlı bir flavoproteindir ve fizyolojik koşullarda indirgeyici substrat olarak NADPH'ı kullanır. Monosit aktivasyonu sırasında membran fosfolipidlerinden, fosfolipaz C, D ve A₂ ile oluşan araşidonik asit ve diğer yağ asitleri NADPH oksidazı uyarır. Solunumsal patlama, moleküler oksijenin indirgenmesi ile reaktif oksijen türevlerini oluşturur. Tablo 1'de reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri görülmektedir (35, 40).

Tablo 1. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit anyon radikali (O ₂ ⁻)	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Hidroksil radikali (OH•)	Lipit peroksit (LOOH)
Peroksit radikali (ROO•)	Singlet oksijen (O ₂)
Alkoksil radikali (RO•)	Ozon (O ₃)
Semikinon radikali (HQ•)	Hipoklorit asit (HOCl)
Organik radikaller (R•)	Peroksinitrit (ONOO ⁻)
Nitrik oksit (NO•)	
Azot dioksit (NO ₂ •)	

Reaktif oksijen türlerinden en fazla etkilenen moleküller lipitlerdir. Lipit peroksidasyonu doymamış lipitlerin bulunduğu yerlerde görülen, moleküler oksijen ile yürüyen reaksiyonlarla gerçekleşen ve lipit hidroperoksitlerin oluştuğu kompleks bir işlemdir. Çoğu biyolojik örnek içindeki lipit hidroperoksitleri degradasyona uğrayarak, alkan, alken, hidroksialkenal, keton cisimlerin ortaya

çıkıldığı ürünlere dönüşürler. Lipit peroksidasyonu otokatalitik ve geri dönüşümsüz bir reaksiyon olduğundan oldukça zararlıdır (42, 43)

Canlı hücrelerinde hidroksil radikali öncelikli olarak membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerine (polyunsaturated fatty acids, PUFA) saldırarak, PUFA'nın bir karbon atomuna bağlı yan zincirinden hidrojen atomunu ayırarak, su molekülü oluşturacak biçimde bu atomla birleşir (36, 39). PUFA'nın peroksidasyonu, hücresel hasarın en önemli nedenlerinden biridir. Yağ asitleri peroksidasyonu zincir tepkimeler biçiminde gelişir. İlk olarak yağ asidi ve radikal molekül birleşmesi ile yağ asidi radikali oluşur ve bu molekülün oksijenle birleşmesi sonucu, lipit peroksit radikali oluşur. Lipit peroksit radikali, başka bir yağ asidinin yan zinciri ile reaksiyona girerek, hidroperoksit radikallerini oluşturur. Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile son bulur. Peroksitler otokatalitik zincir reaksiyonunu başlatır ve böylece şiddetli hücre zarı hasarı gelişir (35).

Lipit peroksitlerin yıkımıyla aktif aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler, ya da başlangıç etki bölgesinden difüzyonla hücrenin diğer bölümlerinde hasarın yayılmasına neden olurlar. Bu aldehitlerin en önemlisi malondialdehittir (MDA). MDA nonenzimatik olarak çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu ortaya çıkabileceği gibi, araşidonik asidin enzimatik oksijenasyonu sonucu yan ürün olarak da ortaya çıkabilir. Yarılanma ömrü uzundur ve zarları geçebilir (35, 36, 39).

Lipit peroksidasyonu birçok hastalığa ve doku hasarına neden olarak zar geçirgenliğini ve mikroviskoziteyi olumsuz yönde etkiler. MDA ise zar bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece iyon taşınması, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu bozulur. Hücre zarında zedelenmeye yol açarak akışkanlığın bozulmasına, sekreter fonksiyon kaybına ve transmembran iyon dengesizliğine yol açar (35, 39).

Peroksidasyonun son ürünü olan aldehitler, hidrokarbon gazlar ve MDA içeren diğer kimyasal bileşikler hücre ödemine neden olur, damar permeabilitesini etkiler, enflamasyon ve kemotaksisi başlatırlar. Fosfolipaz aktivitesini değiştirip, araşidonik asit salınımını uyararak prostaglandin ve endoperoksidazların yapımını

arttırırlar. Artmış enflamatuvar olayın başlamasıyla salınan sitokinlerin serbest yağ asidi miktarını arttırması, karaciğere giren yağ asidi artışı ile glukoz ve VLDL çıkışı artar (35, 44).

Reaktif oksijen türlerinin aşırı hareketliliği nedeni ile yarı ömürleri kısadır ve düşük konsantrasyonlarda bulunurlar (45). Varlıklarının gösterilmesinde “Spin trapping” teknikleri, kolorimetrik ölçümler, kemiluminesans (KL) ve elektron spin rezonans spektroskopisi kullanılmaktadır. KL; kimyasal reaksiyonlarda oluşan ışığın üretimi olup ışık yayılmasını ifade eder. Noninvazif direkt bir yöntemdir. KL ekzotermik oksidatif reaksiyona girebilen ve ışımaya oluşturabilen kimyasal maddelerin evrensel özelliğidir. Ortaya çıkan ışık 400-600 nm dalga boyu arasında görülebilir. Fakat daha kısa dalga boyundaki UV alanda veya daha uzun dalga boyundaki kızıl ötesi alanda oluşup görünmeyebilir. Doğal KL düşük şiddette olduğundan ve ışık dalga boylarında potansiyel değişiklikler oluşabildiğinden luminol ve lusigenin gibi güçlendirici bileşikler kullanılmaya başlanmıştır (46).

Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-fitalazinedon) ve lusigenin (bis-N-metilakridon) *in vitro* ortamda biyolojik sistemlere eklendiğinde oksijenizasyon için seyreltici madde olarak görev alır ve yüksek seviyede uyarılmış ürünler ile KL oluştururlar. Doğal KL ile karşılaştırıldığında bu yöntemin hassasiyetinin 1000 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Nötrofillerin luminol KL’si miyeloperoksidaza bağımlıdır. Lusigenin KL’ı da aktif polimorfonükleer lökositlerin oksidatif metabolizmasını belirlemek için kullanılmıştır (46, 47).

Hidrojen peroksit ve hipoklorik asit luminolü doğrudan okside edebilirler. Luminol ile hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipoklorit, peroksinitrit ve lipid peroksit radikalleri saptanır. Lusigenin ise süperoksit ile doğrudan reaksiyona girer ve ortamdaki süperoksit radikalinin ölçümünde kullanılır (47, 48).

Luminol ve lusigenin oksidan ajanlarla reaksiyona girdiğinde aminofitatlar ve N-metilakridon oluşur. Bu bileşiklerdeki uyarılmış elektronlar, eski konumlarına dönerken KL formunda ışık enerjisi yayarlar. Bu ışık enerjisi luminometre ile saptanır. Belirli zaman aralıkları ile yapılan ölçümlerden grafik elde edilir ve grafikteki eğrinin altında kalan alan (area under curve, AUC)

hesaplanarak serbest radikal miktarı belirlenir. Sonuçlar AUC rlu/mg doku cinsinden ifade edilir (46, 48).

2.3. Solunumsal Patlama

Fagositik lökositler opsonize mikroorganizmalar, C5a kompleman fragmanı, lökotrien B₄, bakteriyel orijinli N-formil oligopeptitler gibi partiküler ya da çözünebilir bir uyarıcıyla uyarıldıklarında lizozomal komponentleri dışarıya vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler (49).

Fagosit edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücrelere zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar.

Fagositlerin uyarılması, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukozun oksidasyonunda artışa yol açar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve moleküler oksijenin (O₂) süperoksit radikaline (O₂⁻) indirgenmesi sonucu NADP⁺ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur (50).

Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-hem içeren miyeloperoksidaz enzimi bulunur. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler miyeloperoksidaz içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. Miyeloperoksidaz, hidrojen peroksit (H₂O₂) varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur (51).

Nötrofillerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu, yakın hücrelere ve solubl sistemlere zarar verir. Fagosit kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünoşpresif ve mutajenik etkiler gösterirler.(52)

2.4.Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (53-55, 57).

2.4.1.Antioksidanlar'ın Genel Özellikleri

Antioksidanlar etkilerini lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipit peroksidasyonunun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak gösterirler. Antioksidanlar; intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki grupta incelenirler. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (56).

Antioksidanlar, hücrel lokalizasyonları yanında fonksiyonlarına göre de sınıflandırılmaktadır. Genelde, radikal oluşumunu önleyen (metal şelatörler, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, ubikinon, retinoik asit, betakaroten, glutatyon, urat) antioksidanlar olarak iki kategoride incelenirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar (Tablo 2). Hücrelerin hem sıvı, hem de membran kısımlarında bulunabilirler (71).

Tablo 2. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi (71)

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albümin
Katalaz (KAT)	α -Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbat (vit C)	Transferrin
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon	β -Karoten	Ferritin
Peroksidaz (PLGSH-Px)	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Ürat	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Bilirubin	Sistein

Antioksidanlar etkilerini, şimdiye kadar tespit edilebilen altı değişik mekanizma ile gösterirler. Bu mekanizmalar, birbirinden bağımsız veya bir arada işleyebilmektedirler (53, 56, 58).

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.
2. Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.
3. Membran lipitlerine direkt etkiyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni ($^1\text{O}_2$) baskılayabilir, ya da temizleyebilirler .
4. Metal iyonlarını bağlamak yoluyla reaktif grupların ($\cdot\text{OH}$, ferril ya da $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}/\text{O}_2$ kompleksleri gibi) ve /veya lipit peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler. Membranlarda lipit peroksidasyonun başlamasına hangi reaktif ürünlerin neden olduğu tartışılmaktadır, ancak hem başlangıç için ve hem de oluşan lipit peroksitlerinin dekompozisyonu için transisyonel metal iyonlarına ihtiyaç olduğu konusunda genel bir kanı vardır.
5. Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GSH-Px, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.
6. Zinciri kırabilirler yani; zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar için de fenoller, aromatik aminler ve en

yaygın olanı α - tokoferol yer almakla birlikte başka lipid solubl zincir kırıcı antioksidanlar da vardır (64).

Bir oksidatif zincirde antioksidanlar, farklı basamaklarda etki gösterirler. Lipit peroksidasyonu yukarıdaki mekanizmalardan ilk dört tanesi ile önleyenler “koruyucu antioksidanlar” olarak kabul edilmektedir. Dördüncü mekanizma ile etki edenler reaksiyon sırasında tüketilemezler (64). Beşinci mekanizma ile etki eden antioksidanlar ise koruyucu olmakla birlikte reaksiyon sırasında kimyasal karakterlerine göre, tüketilebilir ya da tüketilemezler. Altıncı mekanizma ile etki eden zincir kırıcı antioksidanlar ise zincir uzama reaksiyonlarına neden olan radikallerle kompleks yaptıklarından kırma reaksiyonu sürecinde tüketilirler. Burada, özellikle vurgulanması gereken nokta antioksidanların pek çoğunun tek bir mekanizma üzerinden etki etmediği, birden fazla mekanizma ile asıl etkisini oluşturduğudur (64). Ek olarak oksidatif hasarın hızlı tamiri ki bu, peroksidize yağ asitlerinin membran lipitleri arasından temizlenmesi şeklinde olur ve lipit peroksidasyonu yavaşlatabilir (64).

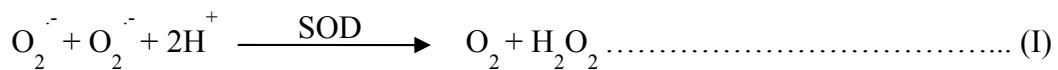
Membrandaki yapısal değişiklikler de peroksidabiliteye etki edebilir. Antioksidanlar sadece lipitlerin değil, belki okside olmaları çok daha zararlı olabilen DNA ve proteinlerin de korunmasında etkindirler (53, 56, 59-61).

Antioksidanların oksidatif hasarlara karşı dokuları veya hücreleri koruyucu özellikleri göz önüne alındığında, yaşlanmaya, doku hasarlarına ve toksik ajanlar ile zehirlenmeye karşı koruyucu ajanlar olarak gösterilmektedir (71).

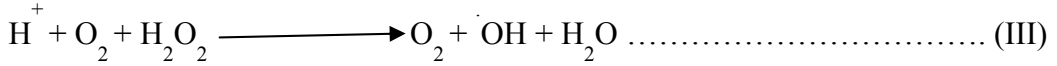
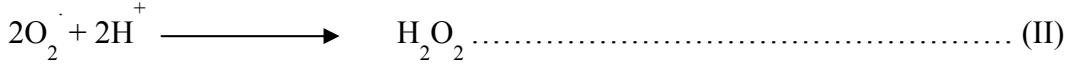
2.4.2. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz

Antioksidan savunmanın ilk basamağı süperoksitin H_2O_2 ’e dismutasyonunu katalizleyen süperoksit dismutaz enzimidir (55, 63, 71).



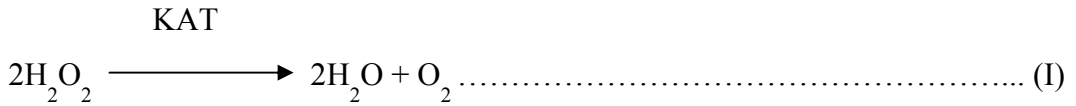
Süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen bu enzim ilk olarak inek eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Bu enzimin ksantin-ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe ettiğini bulmuşlardır (71).



SOD, II'nin hızını önemli ölçüde artırır. III'ün ise oluşumunu engeller (71).

2.4.2.2. Katalaz

Katalaz (KAT), tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Molekül ağırlığı 248,000 dalton'dur. Hidrojen peroksidi moleküler oksijen ve suya katalizler (71).

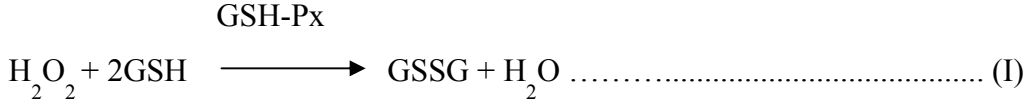


Daha çok peroksizomlarda lokalizedir. KAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (53, 55, 65).

2.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 85000 dalton'dur. Birbirinin aynı dört alt gruptan oluşan tetramerik bir enzimdir. Her alt grup bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür (53, 66, 67).

GSH-Px, intrasellüler mesafede lipitleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartımanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur (53, 69, 71). GSH-Px, aşağıdaki reaksiyonları katalizler:



2.4.2.4. Glutatyon S-Transferaz

Glutatyon S-transferaz (GST) “selenyuma bağlı olmayan GSH-Px” olarak adlandırılır. Membran lipit peroksidasyonunu yalnızca fosfolipaz A2'nin varlığında inhibe eder. Öncelikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlerine karşı Se bağımsız GSH peroksidaz gibi aktivite göstererek antioksidan etki gösterir (53, 66).



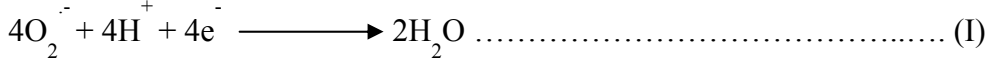
2.4.2.5. Glutatyon Redüktaz

Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutatyon (GSSG), GSSG-R'ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır (53, 65).



2.4.2.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksiti detoksifiye eden enzimdir.



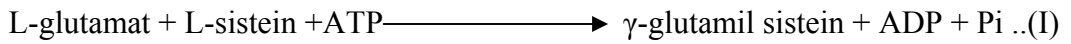
Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır (53, 57, 59, 70).

2.4.3. Nonenzimatik Antioksidanlar

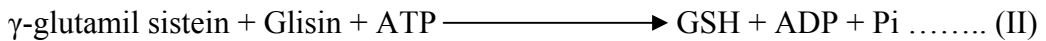
2.4.3.1. Glutatyon

Redükte glutatyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. Vücuttaki GSH'nun büyük bölümü karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan iki aşamada sentezlenebilen bir tripeptittir (53, 72, 73).

γ -glutamil sistein sentetaz



Glutatyon sentetaz



Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (53, 73).

2.4.3.2. E Vitamini

1925 yılında Evans ve Bishop isimli araştırmacılar bazı lipidlerin eksikliğine bağlı olarak üreme yetersizliği olduğunu keşfetmişler ve bu eksik olan maddeye de D vitamininden sonra alfabetik sıraya göre E vitamini adını vermişlerdir (74)

E vitamini “Tokoferoller” ve “Tokotrienoller” olarak iki ana grupta toplanabilen, 6 kromonal türevleri olan 8 doğal bileşimi içerir. Bu bileşikler molekülün kromonal halkasındaki metil gruplarının sayı ve pozisyonuna göre α , β , γ ve δ tokoferoller olarak adlandırılır (75).

Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (64).

E vitamini dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger (53, 65, 76).

E vitamini dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki korunma mekanizmasıdır (53, 54, 77, 78).

2.4.3.3. Vitamin C

C vitamini (askorbik asit) bir ketolaktondur. L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit gibi iki aktif formu olan askorbik asit iyi bir redüktan maddedir. Redükleyici bir ajan ve radikal süpürücü olarak askorbik asit, reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu etki sağlar. Bununla birlikte, askorbik asit; serbest radikal kaynağı gibi hareket edebilen çeşitli işlevli bir bileşimdir (64).

2.4.3.4. Karotenler

Doğada yaygın olarak bulunan ve hücreleri korumada önemli görevleri olan pigmentlerdir (55). A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direkt olarak etkileşerek antioksidan vazife gördüğü tesbit edilmiştir (53, 57).

2.4.3.5. Flavonoidler

Lipidlerde çözünen antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Başlıca besinsel kaynakları elma, portakal, limon gibi meyveler ile patates, karnabahar gibi sebzelerdir. Şarap, üzüm suyu ve çay gibi bitkisel kaynaklı içeceklerde de bulunurlar (64).

Flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Fenolik antioksidan, lipid radikallere hızla H[•] vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi ROO[•] ve RO[•] radikalini parçalamak ve böylece LPO zincir reaksiyonunu sonlandırmaktadır. Ayrıca bakır iyonlarıyla kompleks oluşturabilirler; bu durum antioksidan etkilerine bağlanabilir (79).

2.4.3.6. Ürat

Süperoksit, hidroksil, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. C vitamini oksidasyonunu da engeller (53, 64).

2.4.3.7. Bilirubin

Hem proteinlerinin yıkım ürünü olan bilirubin aynı zamanda çok efektif bir lipid antioksidandır. Bilirubin mikromolar konsantrasyonlarda dahi peroksil radikalini yakaladığı ve zincir kıran antioksidan olarak davrandığı gösterilmiştir (64, 80).

2.4.3.8. Albümin

Plazmanın zincir kırıcı antioksidan aktivitesine yol açan plazma sülfidril gruplarının major komponentidir. Plazmada hipokloröz asitin güçlü bir temizleyicisidir (56).

2.4.3.9. Seruloplazmin

Hem doku homojenatları, hem de basit lipid emilsiyonlarında güçlü bir serbest radikal inhibitörüdür (81). Demirin transferrine bağlanmasını kolaylaştırır ve ekstrasellüler SOD gibi davranır. Ayrıca ferrik demiri ferro demire yükseltgeyerek fenton reaksiyonunu önler (53, 64).

2.4.3.10. Transferrin

Dolaşımdaki serbest demiri bağlar (53, 65).

2.4.3.11 Melatonin

En zararlı radikal olan hidroksil radikalini ortadan kaldıran, günümüze kadar bilinen en güçlü antioksidandır. Lipofilik özelliğe sahiptir. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyerini de kolayca geçer. DNA hasarını da çok etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Yaş artımı ile birlikte melatonin üretimi de azalmaktadır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde önemli olabileceği düşünülmüştür (53, 64).

2.4.3.12. Sistein

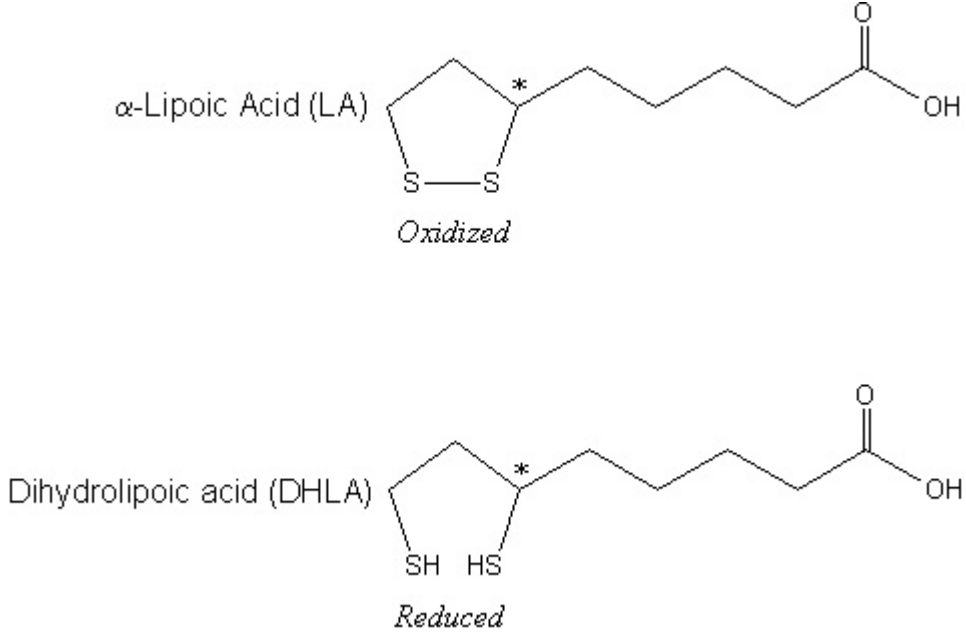
Süperoksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısıdır (53, 64).

2.4.4. Alfa Lipoik Asit

Alfa lipoik asit (LA) 'thioctic' asit olarak bilinen bitkiler, hayvanlar ve insanlarda çok küçük miktarlarda doğal olarak sentezlenen bir moleküldür (82). Molekül ağırlığı 206.328 g/mol' dür. Endojen olarak bulunan LA önemli mitokondriyal enzim komplekslerindeki spesifik proteinlere kovalen bağlı olarak bulunur (83).

LA, 2 tiyol (sülfür) grubu içerir , bu gruplar okside veya redükte olabilir. Redükte formu dihidrolipoik asit (DHLA), okside formu LA olarak bilinir (84).

LA asimetrik karbon atomu içerir ve birbirinin ayna görüntüsünde olan 2 optik izomeri vardır (Şekil 2).



Şekil 2. LA ve DHHLA'nın moleküler yapısı

Endojen olarak sentezlenen LA proteinlere bağlanarak birçok önemli mitokondriyal enzime kofaktör olarak fonksiyon gösterir.

2.4.4.1. Alfa Lipoik Asit'in Biyosentezi

LA *de novo* olarak mitokondride proteinlere bağlı olarak bulunduğu ve kofaktör olarak görev yaptığı yerde 8- karbonlu yağ asitlerinden (oktanoik asit) sentezlenir (85, 86). LA sentezindeki son safhada 2 sülfür atomu oktanoik aside eklenir. Bu reaksiyon içerisinde demir-sülfür kümeleri bulunan lipoil sentaz enzimi tarafından katalizlenir (87, 88)

Eksojen olarak alınan LA *lipate activating enzyme* tarafından enerji kullanılarak aktive edilir ve LA bağlayıcı enzim olan lipoil transferaz ile taşınır (88).

2.4.4.2. Alfa Lipoik Asit'in Biyolojik Aktivitesi

Proteinlere bağlı olarak bulunan LA enerji üretimi ve alfa – keto asitlerin ve aminoasitlerin katabolizmasında kritik rol oynayan birçok mitokondriyal enzim kompleksinin önemli bir kofaktörüdür (89). LA enzim komplekslerinin protein kısımlarındaki spesifik lizin kalıntılarına kovalen olarak bağlanır (piruvat dehidrojenaz kompleksi, alfa-ketoglutarat dehidrojenaz kompleksi) (90).

Serbest olarak bulunan LA antioksidan aktiviteye sahiptir. *In vitro* ortamda LA ve DHLA direkt olarak ortamda bulunan ROT ve RNT'lerin nötralize ederler (83). Her ikisinin de radikal süpürücü (scavenger) özellikleri vardır. LA'nın $\cdot\text{OH}$, O_2^- , HOCl , $\text{NO}\cdot$, ONOO^- , H_2O_2 gibi radikallerin süpürücüsü olduğu bilinmektedir (91, 92, 93).

LA'nın dört farklı sistemde O_2^- süpürme aktivitesi gösterilmiştir. İlk zamanlarda yapılan çalışmalarda sadece organik çözücülerde çalışılan bu etki, daha sonra fizyolojik koşullar altında da gösterilmiştir. O_2^- ile oluşan DNA tek iplik kırıklarını önlemede de LA'nın etkili olduğu bildirilmiştir (92, 94).

Doku hasarının mediyatörü olarak RNT'ler de oldukça önemlidir. $\text{NO}\cdot$ önemli fizyolojik rollere sahip olmakla birlikte aşırı miktarlarda oluşumu nörodejeneratif hastalıklar, atherosklerozis, kronik inflamasyon, septik şok gibi bazı durumların etiyopatolojileri ile ilişkili görülmüştür. $\text{NO}\cdot$ toksisitesinin bir kısmında O_2^- ile girdiği reaksiyonda oluşan ONOO^- ile ilişkilidir. Oldukça reaktif olan bu radikal hücrede protein, lipid ve DNA oksidasyonuna neden olduğu gibi aynı zamanda alfa 1 antiproteazı da inaktive ederek proteolitik hasarı artırır. LA ve DHLA güçlü bir ONOO^- süpürücüsüdür (95).

Eritrositlerin hemolizi bir oksidatif stres modelidir. Bu modelin kullanıldığı çalışmalarda peroksi radikali ile oluşturulan eritrosit hemolizine karşı LA'nın koruyucu olduğu görülmüştür ve bu etki peroksi radikal süpürücü aktivitesine bağlanmıştır (96).

LA potent bir antioksidandır, diğer antioksidanların rejenerasyonunda, redoks potansiyeli olan serbest metal iyonlarının oksidan molekülleri oluşturmasının engellenmesinde, detoksifikasyonda rol oynayan önemli bir antioksidan olan glutatyon sentezinin arttırmada, insülin sinyallerinin arttırılmasında, diğer

hücresel sinyal moleküllerinin ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynar. LA'in diabetes mellitus, atherosklerozis, iskemi-reperfüzyon hastalıkları, multiple sklerozis, bilişsel kayıplar ve yaşa bağlı demansta etkinliği gösterilmiştir (97-102).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1.Deney Hayvanları

09. 04. 2007 tarihinde Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Etik Kurulu tarafından onaylanan (55. 2006. Mar) çalışmamızda Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarından temin edilen Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı.(n=38) Sıçanlar M. Barbaros Denizeri (İstanbul) yem fabrikasından temin edilen ve içeriğinde %23,9 protein , %4,5 sellüloz , %2,9 yağ ile birlikte kalsiyum, lizin, metiyonin ve sodyum bulunan pellet yem ile beslendi, sürekli su verildi. Deney hayvanları, %40 nem ve 20±2°C sıcaklık olacak şekilde düzenlenen ortamlarda ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünde muhafaza edildi.

3.1.2.Reaktifler

Çalışmamızda kullanılan çözeltiler için gerekli kimyasallar MERCK (Almanya) firmasından temin edildi. Ayrıca luminol, lusigenin, DMSO, 3-NPA Sigma (A.B.D)'dan, LA Fluka (A.B.D)'dan, karboksi-PTIO Calbiochem (İsviçre)'den, desferal CIBA-Geigy (İsviçre)'den temin edildi.

Yapay Beyin Omurilik Sıvısı

125 mM NaCl, 37.5 mM KCl, 12 mM NaH₂PO₄, 13mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, 100mM D-glukoz içerecek şekilde stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon +4°C'de 1 hafta süre stabildir. Bu solüsyondan 100 mL alınarak 100 mL 260 mM NaHCO₃ çözeltisi ile karıştırıldı ve 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. Çözeltiye 1-3 mg fenol kırmızısı eklendi ve bu solüsyon günlük olarak hazırlandı. Hazırlanan solüsyon çalışmaya başlamadan önce 1 saat süre ile %95 O₂ ve % 5 CO₂ ile aere edildi.

Hank's Hepes Çözeltisi

200 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 10 mM D-glukoz, 15 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES içerecek şekilde hazırlandı ve 1 N HCl ile pH 7.2'ye ayarlandı.

PBS Hazırlanması

0,136 g KH₂PO₄ 2 mL ye distile su ile tamamlandı İçinden 1,76 mL'si alındı (0,5 M). 0,696 g K₂HPO₄ 8 mL ye distile su ile tamamlandı.

İçinden 6,08 mL' si alındı (0,5 M). 1,76 mL KH₂PO₄ (0,5 M) +6,08 mL K₂HPO₄ (0,5 M) 100 mL ye distile su ile tamamlandı. Hazırladığımız tampon % 9'luk 1000 mL lik NaCl üzerine pH 7,4 olana dek eklendi. PBS (pH 7,4) karanlık ortamda, oda sıcaklığında saklandı.

PMA (Phorbol Myristate Acetate) Hazırlanması

Ana stok: Liyofilize PMA, 1 mL dimetil sülfoksit içinde çözüldü.

Ara stok: Ana stoktan 100 µL alınıp distile su ile 10 mL' ye tamamlandı. 400 µL' lik parsellere ayrılarak -20°C 'de saklandı.

3- NPA (3- Nitropropiyonik Asit) Hazırlanması

LA (Alfa Lipoik Asit) Hazırlanması

3.1.3.Cihazlar

Terazi: Sartorius , Ohaus Adventurer, Çin

PH metre: Inolab, Almanya

Manyetik karıştırıcı: İkomag-Rh, Janke & Kunkel, Almanya

Vortex: VF2, Janke & Kunkel, Almanya

Etüv: Termal Lab.

Doku kesitleyici: Campden Instruments, İngiltere

Luminometre: Berthold Mini Lumat LB, Almanya

Mikroskop: Nikon, Japonya

Soğutmalı santrifüj: Hettich Zentrifugen, Almanya

Eppendorf santrifüjü: Eppendorf Centrifuge 5415 C, Almanya

Aerasyon sistemi ve karbojen tüpleri: Habaş, Türkiye

Su banyosu, sonik su banyosu: Sanorex Bandelin, Almanya

Buzdolapları : Arçelik (+4), Uğur Soğutma (-20), Türkiye

Mikropipetler: Isotherm

Thoma lamı

Çeşitli cam malzeme, plastik malzeme

3.2.Yöntemler

3.2.1.Deney Hayvanlarını Gruplandırılması ve Enjeksiyonlarını Düzenlenmesi

Çalışmamızda 12-15 haftalık 170–240 g ağırlığında dişi sıçanlar kullanıldı. Denekler 4 gruba ayrılarak enjeksiyon maddeleri ve dozları belirlendi.

1 - SF (kontrol) grubu n=9

2 – 3NP (hasta) grubu n=12

3 – LA kontrol grubu n=12

4 – 3-NPA + LA grubu n=8

SF grubuna alınan sıçanlara 10 gün süre ile 20 mg/kg/günlük dozlarda serum fizyolojik i.p. olarak verildi. 3-NPA grubuna alınan sıçanlara 10 gün süre ile 20mg/kg/günlük dozlarda 3-NPA i.p. olarak verildi. LA kontrol grubuna 10 gün süre ile 35 mg/kg/gün'lük LA i.p. olarak verildi. 3NPA+LA tedavi grubuna dahil edilen sıçanlara 10 gün süre ile 20 mg/kg/ gün'lük doz 3-NPA ve 1 saat sonrasında 35 mg/kg/gün'lük doz LA i.p. olarak verildi. Deneklerin kilo takipleri yapıldı, beslenmeleri takip edildi.

3.2.2.Striatal Kesitleri Elde Edilmesi

Yapılan son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar giyotin ile dekapite edildikten sonra beyinleri hızlı bir şekilde çıkarıldı. Sağ ve sol hemisfer birbirinden ayrıldıktan sonra ön ve arka beyin bölgelerinden 4-5 mm beyin dokusu elde edildi, özel yapıştırıcılar ile doku kesitleyicisine yapıştırıldı. Daha sonra üzerine YBOS eklendi, doku kesitleyicisi ile 400µm kalınlığında striatal kesitler alındı ve YBOS içerisinde karbojen ile aere edildi. Kesitleme işleminin ardından striatal bölgeler korteksinden ayrıldı ve dinlenme durumuna geçmeleri amacı ile 45 dakika aere edildi (3).

3.2.3.Kemilüminesans Ölçümleri

İnkübasyon süresini tamamlayan kesitler 2mL Hank's + HEPES tamponu içeren sayım tüplerine alındı. Üzerlerine luminol (0.2 mM) ve lusigenin (0.2 mM) eklendi, daha sonra kemilüminesans ölçümleri luminometrede 60 saniyelik aralıklar ile 5 dk. süre ile yapıldı.

Reaktif nitrojen türleri salınımı için saflaştırılmış luminol–hidrojen peroksit sistemi kullanıldı. Bu amaçla 2mL Hank's + HEPES tamponu içeren tüplere alınan kesitler önce K₂CO₃ (400 µM) ile muamele edildi. Ortama desferal (60µM), H₂O₂ (2mM) ve saflaştırılmış luminol (3.6 µM) eklenerek luminometrede sayım gerçekleştirildi (3).

Elde edilen sonuçların yorumlanmasında kesitte önceden var olan peroksinitritin ayırt edilmesi amacı ile bir nitrik oksit tutucusu olan 2-(4-Carboxyphenil)-4,4,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (karboksi PTIO) ortama eklendi 15–20 dakika karanlık ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra sayım tekrarlandı. Böylece karboksi PTIO eklenmeden yapılan kemilüminesans sayımları total peroksinitriti gösterirken örneklere karboksi PTIO eklendikten sonra elde edilen ölçümler dokuda oluşan peroksinitrit olarak değerlendirildi. Ölçüm sonunda kesitler sayım tüplerinden alınarak sıvıları filtre kağıdına emdirildi ve bu işlem sonrasında tartılarak kuru ağırlıkları tespit edildi. Sonuçlar AUC (area under curve) rlu/mg doku cinsinden ifade edildi

3.2.4.Kan örneklerinin Elde Edilmesi

Dekapitasyon işlemi sonrasında heparinli tüplere alınan tam kan örnekleri (4mL) mononükleer hücreleri izole etmek üzere içerisine 3 mL fikol konulan steril cam tüplere pipet yardımı ile konuldu. Sonrasında 1200xg'de 20 dk. santrifüj edildi ve santrifüj fren mekanizması devre dışı bırakılarak kendi kendine durması sağlandı. Tüpte santrifüj sonrası orta tabakada görülen bulutsu tabaka pipet yardımı ile toplanarak içinde 2 mL PBS bulunan falkon tüplerine aktarıldı. PBS ile 12 mL'ye tamamlanan falkon tüpler 1050xg'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve dipte kalan tabaka vortex yardımı ile homojen hale getirildi. 20 µL örnek thoma lamına yayılarak mikroskop yardımı ile mononükleer hücre sayımı yapıldı ve mL örnekteki total hücre sayısı hesaplandı (37).

Mononükleer hücre sayısı 2 milyon/mL olacak şekilde hücre solüsyonlarından almamız gereken miktar hesaplandı, hasta ve kontrol için yapılan her ölçümdeki hücre sayısı böylece sabitlendi. Her bir denek için 2 preparat hazırlandı. Birinci preparat (uyarım öncesi) içerisine hücre süspansiyonu ve hepes konuldu. Üzerine 4 µL luminol eklenip luminometrede 10 dk 60 sn'lik aralıklar ile ölçüm yapıldı. İkinci preparat (uyarım sonrası) içerisine hücre süspansiyonu, hepes solüsyonuna ek olarak 200 µL PMA (phorbol myristate acetate) konuldu ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 4 µl

luminol kullanılarak luminometrede 10 dk. süresince 60 sn.'lik aralıklar ile ölçüm gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçlarının eğri altında kalan alanları (AUC) her iki preparat içinde hücre sayısına göre standardize edilerek hesaplandı. Elde edilen uyarım sonrası grubun AUC değerlerinden uyarım öncesi grubun AUC değerleri çıkarıldı ve sonucun logaritması alındı (37).

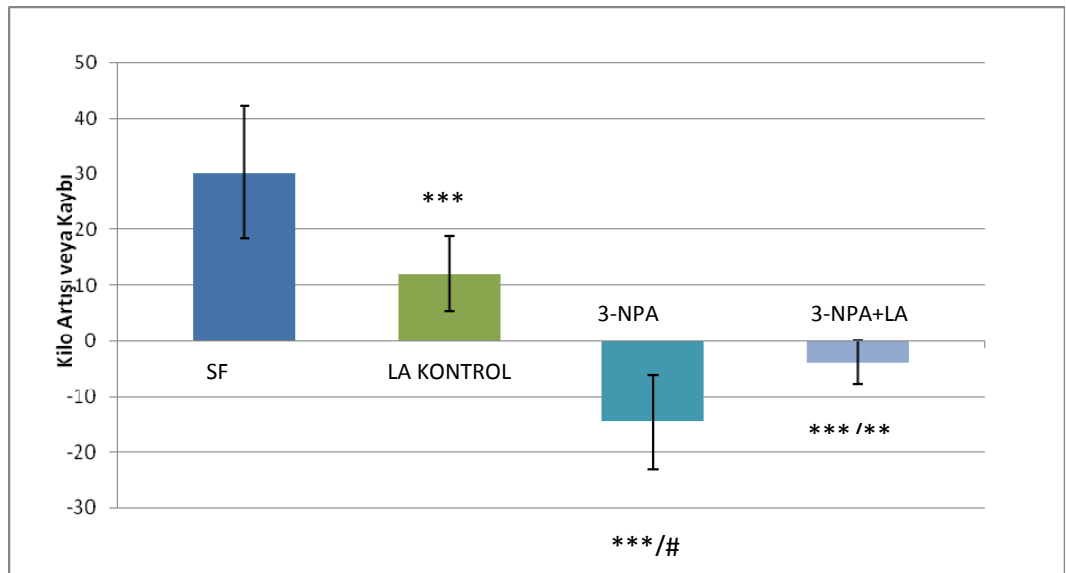
3.2.5.İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirme GraphPad InStat programında V2.02 versiyonunda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Sonuçların tümü Tukey – Kramer çoklu testi ile karşılaştırıldı, $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1.Deney Hayvanlarının Takibi

Enjeksiyon süresince deneklerin davranışları, su ve yem tüketim miktarları, kilo kontrolleri yapıldı. Kilo değişimleri değerlendirildiğinde 3-NPA grubundaki sıçanlarda ortalama olarak 14.5 g kilo kaybı olduğu tespit edildi. 3-NPA + LA grubundaki sıçanlarda ise ortalama 3.8 g kilo kaybı gözlemlendi. SF grubunda ortalama 30.3 g kilo alımı gözlenirken , bu değer LA kontrol grubunda 12 g olarak tespit edildi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Buna ilaveten deneklerin su ve yem tüketimleri incelendiğinde ise 3-NPA alan sıçanlarda su tüketiminin arttığı yem tüketiminin azaldığı görüldü.



Şekil 3 : Deneklerdeki kilo değişimleri (g)

SF (n= 9) : 30.3 ± 11.9 g

LA KONTROL(n = 12) : 12.0 ± 6.8 g ***

3-NPA (n = 12) : -14.5 ± 8,4 g ***/#

3-NPA + LA (n = 8) : -3.8 ± 3.9 g ***/**

SF ve LA kontrol grubu karşılaştırıldığında p<0.001 ***

SF ve 3-NPA + LA grubu karşılaştırıldığında p<0.001***

SF ve 3-NPA grubu karşılaştırıldığında p<0.001***

LA kontrol ve 3- NPA + LA grubu karşılaştırıldığında $p < 0.01^{**}$

LA kontrol ve 3- NPA grubu karşılaştırıldığında $p < 0.001\#$

3- NPA ve 3-NPA + LA grubu karşılaştırıldığında $p > 0.05$

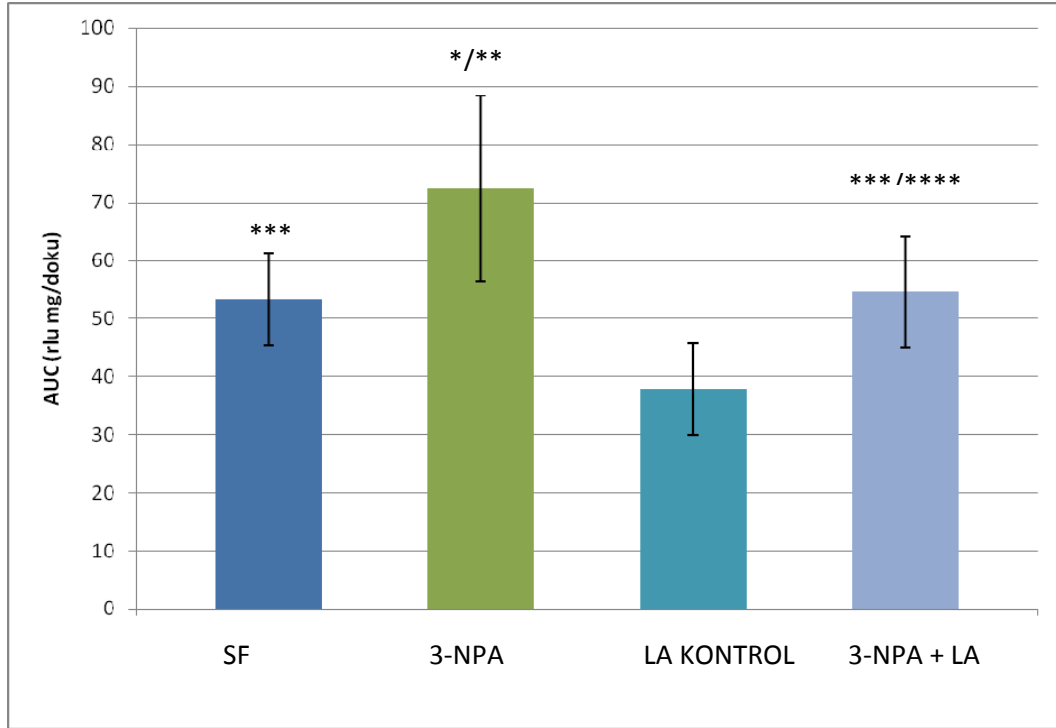
Çalışmanın sonucunda elde edilen istatistiki bilgiler ışığında kontrol gruplarının her ikisinde de kilo alımı olduğu ve SF kontrol grubunda LA kontrol grubuna göre daha fazla kilo alımı olduğu tespit edildi. 3- NPA grubu ile 3-NPA + LA gruplarında kilo kaybı olduğu ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı fark olmadığı tespit edildi.

Deneklerin davranış değişiklikleri incelendiğinde 20 mg/kg/günlük 3-NPA dozu alan deneklerde HH modelinde görülen davranış bozuklukları olan uyaranlara yanıt vermeme, yana yatma, rotasyon, yürüyüş bozuklukları ve uyku hali gözlemlendi. Diğer gruplarda herhangi bir davranış bozukluğuna rastlanmadı. Kontrol grupları ve tedavi grubunda yer alan denekler normal davranışlar sergilediler ve uyaranlara yanıt verdiler.

4.2.Kemilüminesans Ölçümleri

4.2.1.Doku Ölçümleri

Luminol aracılı kemilüminesans açısından 20 mg/kg/günlük doz 3-NPA uygulanan denekler, aynı doz SF uygulanan denekler, 20 mg/kg/gün'lük doz 3-NPA ilaveten 35 mg/kg/günlük doz LA uygulanan ve 35 mg/kg/günlük doz LA uygulanan denekler birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklar olduğu tespit edildi.



Şekil 4. Luminol aracılı kemilüminesans ölçümleri açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması

SF (n=9) 53.3 ± 8.0 rlu/mg doku***

3-NPA (n=11) 72.4 ± 15.9 rlu/mg doku*/**

LA KONTROL (n= 12) 37.8 ± 7.9 rlu/mg doku

3-NPA+LA (n=7) 54.5 ± 9.6 rlu/mg doku***/**

*p<0.01 SF ve LA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

**p<0.05 3-NPA+LA grubu ile karşılaştırıldığında

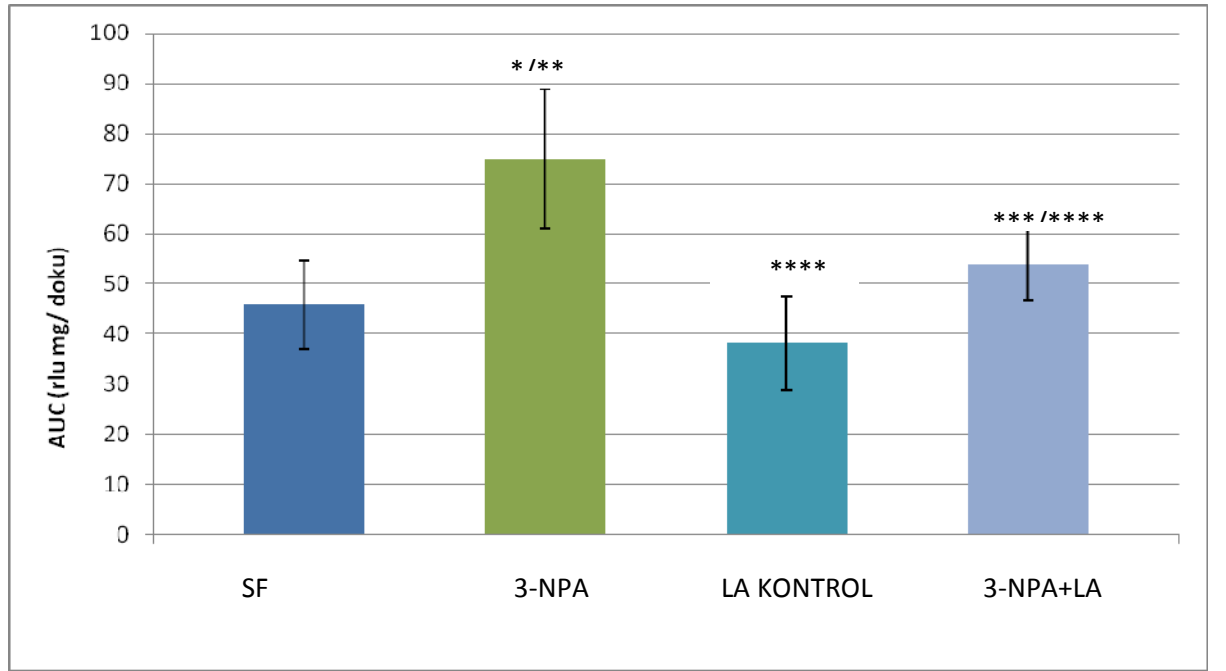
***p<0.05 LA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

****p>0.05 SF grubu ile karşılaştırıldığında

Çalışmanın sonucunda elde ettiğimiz veriler ışığında 3-NPA uygulaması alan denekler ile SF ve LA kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunduğu tespit edildi. 3-NPA grubu ve 3-NPA + LA grubu arasında da luminol aracılı KL ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi. 3-NPA + LA grubundaki denekler SF ve LA kontrol grupları ile karşılaştırıldığında LA kontrol grubu ile arasında anlamlı fark olduğu görüldü. SF kontrol grubu ile 3-NPA + LA grubu arasında ise anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Kontrol grupları

birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi.

HH ve tedavi modelinde yer alan gruplar lusigenin kemilüminesansı açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi.



Şekil 5. Lusigenin aracılı kemilüminesans ölçümleri açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması

SF (n=9) 45.9 ± 8.8 rlu/mg doku

3-NPA (n=12) 74.9 ± 13.9 rlu/mg doku*/ **

LA KONTROL (n=12) 38.2 ± 9.4 rlu/mg doku****

3-NPA+LA (n=8) 54.0 ± 7.1 rlu/mg doku***/**

*p<0.001 SF ve LA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

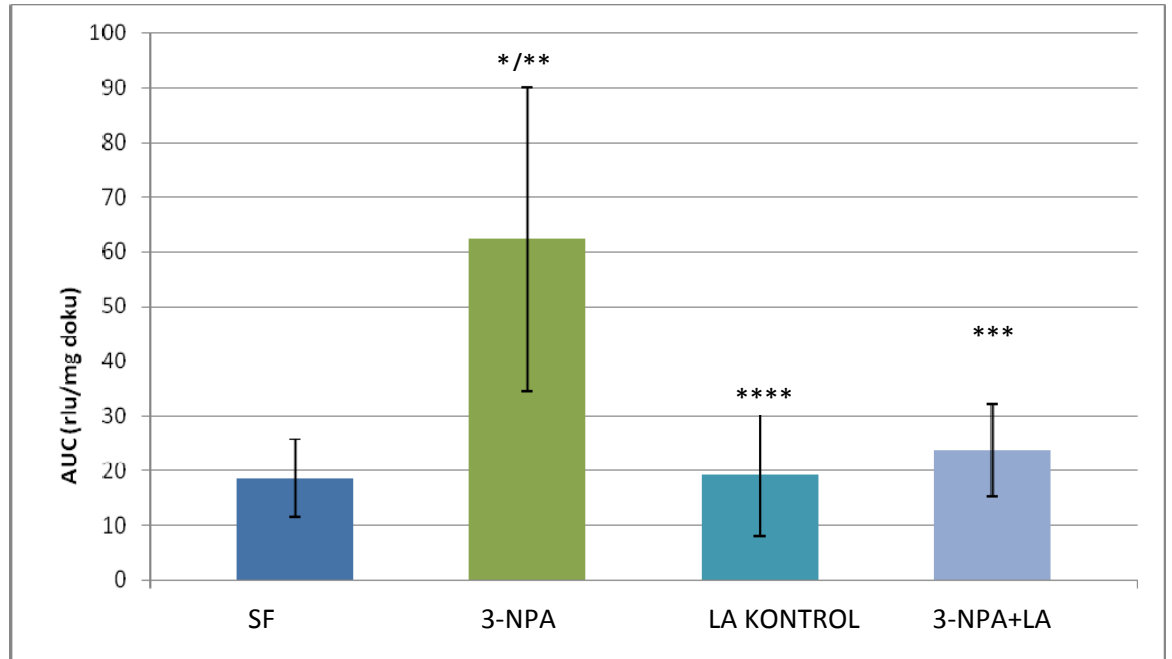
**p<0.001 3-NPA+LA grubu ile karşılaştırıldığında

***p<0.05 LA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

****p>0.05 SF grubu ile karşılaştırıldığında

3-NPA grubu lusigenin kemiluminesansı açısından SF ve LA kontrol grupları ve 3-NPA + LA grubu ile karşılaştırıldığında aralarında ileri düzeyde anlamlı fark olduğu tespit edildi. 3-NPA + LA grubu lusigenin kemiluminesansı açısından LA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülürken SF kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi. LA kontrol grubu ile SF kontrol grubu lusigenin kemiluminesansı açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Çalışma grupları RNT salınımı açısından karşılaştırıldığında hasar ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Kontrol grupları arasında fark bulunamadı.



Şekil 6. RNT salınımı açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması

SF (n=8) 18.5 ± 7.1 rlu/mg doku

3-NPA (n=10) 62.2 ± 27.7 rlu/mg doku**

LA KONTROL (n=12) 19.2 ± 11.1 rlu/mg doku****

3-NPA+LA (n=8) 23.7 ± 8.5 rlu/mg doku***

*p<0.001 SF ve LA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

**p<0.001 3-NPA+LA grubu ile karşılaştırıldığında

***p>0.05 SF ve LA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

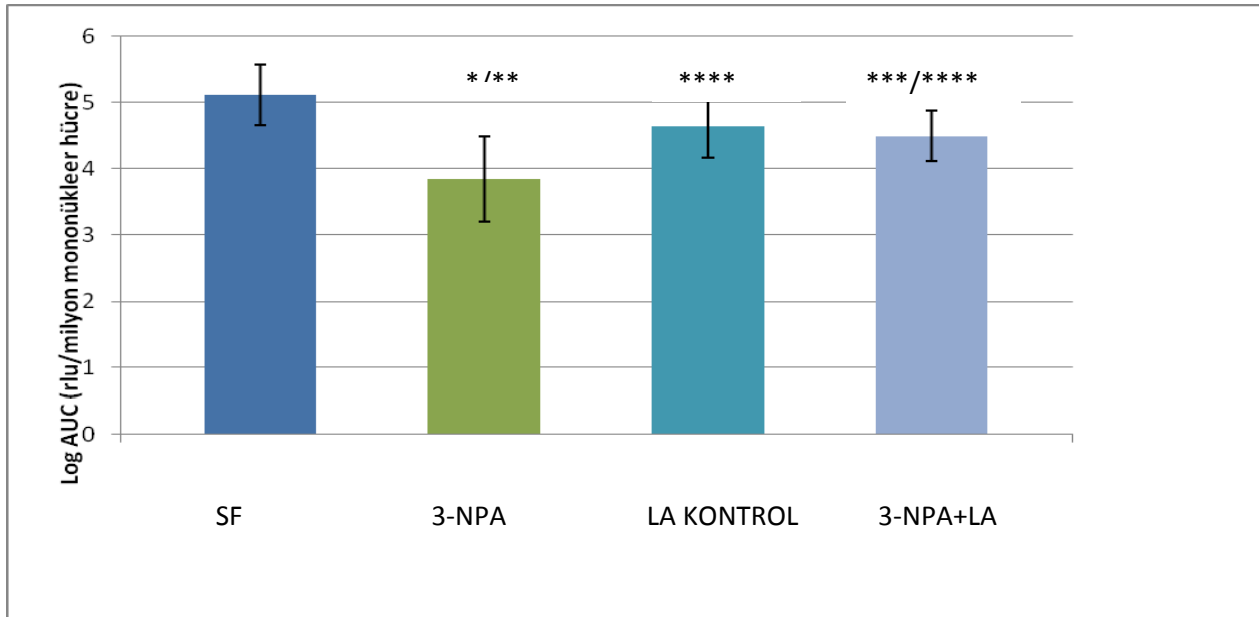
****p>0.05 SF grubu ile karşılaştırıldığında

RNT salınımı açısından 3-NPA grubu SF ve LA kontrol grupları ve 3-NPA + LA grubu ile karşılaştırıldığında aralarında ileri derecede anlamlı fark olduğu saptandı. 3-NPA + LA grubu SF ve LA kontrol grupları ile karşılaştırıldığında aralarında NO salınımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. LA ve SF kontrol grupları arasında NO salınımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi.

NO ölçümünü yaparken dokuda bulunan peroksinitrit düzeyini tespit etmek amacı ile karboksi PTIO kullanıldı. Karboksi PTIO ortama eklendiğinde serbest bulunan NO'yu bağlayarak dokuda oluşmuş peroksinitritin miktarının tespit edilmesine olanak sağlar(15).

4.2.2. Mononükleer Hücre Solunumsal Aktivitesi Ölçümleri

HH ve tedavi modellerinde yer alan gruplar mononükleer hücre solunumsal patlama sürecinin göstergesi olan logAUC sonuçları açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilirken kontrol grupları arasında fark saptanmadı.



Şekil 7. Mononükleer hücre solunumsal patlama aktiviteleri açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması

SF (n=9) 5.11 ± 0.46

3-NPA (n=12) 3.85 ± 0.65 */**

LA KONTROL (n=12) 4.64 ± 0.46 ****

3-NPA + LA (n=8) 4.5 ± 0.38 ***

* $p < 0.01$ SF ve LA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

** $p < 0.05$ 3-NPA + LA grubu ile karşılaştırıldığında

*** $p > 0.05$ SF ve LA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

**** $p > 0.05$ SF grubu ile karşılaştırıldığında

Mononükleer hücrelerdeki solunumsal patlama süreci göstergesi olan logAUC açısından değerlendirildiğinde 3-NPA ve SF kontrol grubu arasında ileri derecede fark görülürken, 3-NPA ile 3-NPA + LA ve LA kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. 3-NPA + LA grubu ile SF ve LA kontrol grupları arasında logAUC açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. SF ve LA kontrol grupları logAUC açısından karşılaştırıldıklarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi.

5.TARTIŞMA

Huntington hastalığı (HH) orta yaşlarda başlayan otozomal dominant kalıtmı nörödejeneratif bir hastalıktır. HH istemsiz kore formundaki hareketler, psikolojik değişiklikler ve demans ile birlikte seyreder (9).

Nörödejeneratif süreçlerde ROT'ların artmasıyla normal mitokondriyal işleyiş ve buna bağlı olarak üretilen ATP miktarı azalır, mitokondriyal membran potansiyeli ve permeabilitesi değişir, kalsiyum alınımı artar. Tüm bu değişiklikler nöronal ölümlere, eksitotoksisite oluşumuna, makromoleküllerin oluşumuna ve apoptoza neden olur (24).

HH'de özellikle striatumda büyük oranda nöron kaybı görölmektedir. 3-NPA striatal bir nörotoksindir. Mitokondride Krebs siklusunda ve elektron taşıma zincirinde yer alan süksinat dehidrogenaz enziminin geri dönüşümsüz inhibitörüdür (27). Düşük doz 3-NPA sistemik uygulandığında striatal atrofiye ve HH benzeri semptomların ortaya çıkmasına neden olur (27).

Yapmış olduğumuz çalışmada 3-NPA ile oluşturulan deneysel HH modelini kullandık. Referans aldığımız çalışmalarda deneklerin yaşı ve cinsiyetinin 3-NPA toksisitesi açısından önemli olduğunu gözlemledik. Çalışmamızda 3-NPA toksisitesinin görülebilir, fakat letal olmaması için gerekli olan 12 – 15 hafta ideal yaş grubunu seçtik (29). 3-NPA toksisitesinin cinsiyete bağlı farklılık göstermesi yapılan çalışmalarda dişi sıçanlarda erkek sıçanlara göre ölümün daha az görölmesi nedeni ile çalışmamızda dişi sıçanlar kullanıldı (3, 32).

3-NPA doz ayarlanmasında da birçok çalışmayı inceleyerek deneklerin hayatta kalabildiği ve hastalık semptomlarının ortaya çıktığı doz olan 20 mg/kg/gün'lük dozu 10 gün süresince deneklere i.p. olarak uyguladık. Kontrol gruplarına da aynı süre ve dozda SF i.p. olarak uygulandı. Enjeksiyon süresi boyunca deneklerin davranış ve kilo takipleri yapıldı. 3-NPA grubunda davranışsal değişimler kaydedildi. İlk aşamada hareket kısıtlılığı, yürüyüş koordinasyonunda bozulma sonrasında rotasyon ve yana yatma hareketleri deneklerde gözlemlendi. Bunun yanı sıra yem tüketimlerinde ve buna bağlı olarak kilolarında azalma, su tüketimlerinde artma gözlemlendi.

Striatal kesitlerde ve mononükleer hücrelerde yapılan ölçümlerde ise 3-NPA uygulaması alan sıçanlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ROT ve RNT'lerin arttığı, mononükleer hücrelerin aktivasyonunun azaldığı saptandı.

3-NPA'nın i.p. enjeksiyonları kısa sürede plazma düzeyini yükselterek kan beyin bariyerini bozmakta ve akut lezyonlarla striatal hasara neden olmaktadır (30).

3-NPA uygulanan sıçanların striatal kesitlerinde yapılan luminol aracılı KL ölçümleri kendi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi. 3-NPA grubunda kontrol grubuna göre ROT'nin miktarının 1.4 kat arttığı saptandı.

Hidrojen peroksit ve hipoklorik asit luminolü doğrudan okside edebilirler. Luminol ile hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipoklorit, peroksinitrit ve lipid peroksit radikalleri saptanır(37, 47). Yapılan bir çalışmada 3-NPA verilen sıçanlarda $\cdot\text{OH}$ belirteci olan ve $\cdot\text{OH}$ 'in DNA üzerinde oluşturduğu hasar sonucunda ortaya çıkan, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin'in immünohistokimyasal olarak arttığı saptanmıştır (103).

Yapılan bir başka çalışmada da spin trap tekniği kullanılmış ve $\cdot\text{OH}$ ürünleri olan 2,3-dihidroksibenzoik asit ile 2,5-dihidroksibenzoik asitin arttığı saptanmıştır (104).

Yapılan diğer bir ölçüm olan ve daha çok süperoksit radikalinin tayininde kullanılan lusigenin aracılı KL ölçümlerine bakıldığında 3-NPA grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. 3-NPA grubunda süperoksit radikalinin miktarının kontrol grubuna göre 1.6 kat arttığı görüldü.

3-NPA toksisitesinin hücre içi Ca^{+2} düzeyini Na^{+} - Ca^{2+} değiş-tokuş mekanizmasını ters yönde çalıştırarak arttırdığı ve buna bağlı olarak glikotoksik etkinin olduğu ileri sürülmüştür (34). Aynı zamanda 3-NPA toksisitesi ile hücre içi ATP seviyesinin düşüşü, hücre membranının kısmi depolarizasyonuna neden olmaktadır. Bu etki ile NMDA reseptörlerinin Mg^{+2} bloğu kalkmakta ve daha fazla Ca^{+2} hücre içine girmesini sağlayarak 'sekonder eksitotoksitate' olarak

adlandırılan ROT ile RNT'nin artışına neden olan bir dizi reaksiyon başlatmaktadır (27).

Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun artışı özellikle NOS'un aktivasyonunu indüklemektedir. Elektron taşıma zinciri toksisitesi sonucu ortaya çıkan O_2^- , NO ile birleşerek daha toksik bir bileşik olan ONOO'nin oluşumunu sağlar. 3-NPA'nın sistemik uygulandığı grup kontrol grupları ile karşılaştırıldığında RNT'nin anlamlı olarak arttığı tespit edildi.

3-NPA uygulaması sonucunda deneklerde oksidan / antioksidan dengesinin oksidanlar yönüne bozulduğu görüldü.

Çalışmamızdaki diğer bir parametre olan mononükleer hücre aktivasyonu ve PMA ile uyarılma sonucu oluşan solunumsal patlama KL ile ölçüldü. 3-NPA ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. 3-NPA grubunda kontrol grubuna göre mononükleer hücre aktivasyonu ve PMA ile uyarılmada belirgin şekilde azalmalar olduğu saptandı.

Çalışmamıza alınan diğer bir grup 3-NPA + LA grubuydu. LA güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olan bir moleküldür. LA potent bir antioksidandır, diğer antioksidanların rejenerasyonunda, redoks potansiyeli olan serbest metal iyonlarının oksidan molekülleri oluşturmasının engellenmesinde, detoksifikasyon olayında rol oynayan önemli bir antioksidan olan glutatyon sentezinin arttırmada, insülin sinyallerinin arttırılmasında, diğer hücre sel sinyal moleküllerinin ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynar. LA'nın diabetes mellitus, ateroskleroz, iskemi reperfüzyon hastalıkları, multipl skleroz, bilişsel kayıplar ve yaşa bağlı demans'ta etkinliği gösterilmiştir (97-102). Bununla birlikte nörodejeneratif olgular ile yapılan az sayıda çalışma mevcuttur.

3-NPA ile oluşturduğumuz deneysel HH modeline alternatif olarak oluşturduğumuz 3-NPA + LA grubuna 10 gün süre ile 20 mg/kg/gün 3-NPA dozu eş zamanlı olarak 35 mg/kg/gün LA dozu i.p olarak uygulandı. Bu gruba kontrol grubu olarak sadece 35 mg/kg/gün LA dozu i.p olarak uygulandı. Deneklerin davranış modelleri incelendiğinde 3-NPA grubuna göre daha aktif oldukları

kısmen koordinasyon bozuklukları olmasına karşın rotasyon gibi ileri düzey semptomlarının gelişmediği gözlemlendi.

Striatal kesitlerde ROT ve RNT KL yöntemleri ile tespit edildi. Luminol aracılı KL ölçümleri açısından gruplar değerlendirildiğinde 3-NPA grubu ile 3-NPA + LA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Bu sonucun 3-NPA uygulaması sonucu bozulan oksidan / antioksidan dengesinin LA uygulaması ile birlikte tekrar denge noktasına yaklaşması sonucu ortaya çıktığı düşünülebilir. LA tedavi grubu kendi kontrolü ile karşılaştırıldığında da istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edilirken SF kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark olmadığı tespit edildi. LA uygulaması sonucu, 3-NPA ile artan ROT de kontrol grubuna yakın belirgin bir azalma olduğu tespit edildi.

Lusigenin KL açısından değerlendirildiğinde 3- NPA uygulaması ile artan O_2^- miktarının LA uygulaması sonucu düştüğü tespit edildi. 3-NPA grubu ile 3-NPA + LA grubu arasında anlamlı fark tespit edildi. 3-NPA + LA grubu ile LA kontrol grubu arasında anlamlı fark tespit edilirken SF grubunda fark saptanamadı. Bu durum LA'nın sağlıklı bireylerde normal işleyişin bir ürünü olarak meydana gelen ROT oluşumunu da nötralize ettiğini düşündürmektedir.

LA, ROT'ların miktarını belirgin bir şekilde azaltarak RNT miktarını arttıran bir dizi reaksiyonunda belli bir oranda önüne geçmiş olmaktadır. Ölçülen RNT miktarları açısından gruplar değerlendirildiğinde 3-NPA ve LA tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. LA uygulaması ile birlikte RNT miktarlarında belirgin azalma olduğu saptandı. LA kendi kontrol grubuyla ve SF kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aralarında fark olmadığı saptandı. Bu durum LA kullanılması ile birlikte deneysel HH modelindeki deneklerde RNT düzeylerinde kontrol grubuna yakın düzeyde azalma sağlandığını gösterirken, sağlıklı bireylerde LA kullanımı ile RNT düzeylerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığını düşündürebilir.

Yapılan bir çalışma ile eksitotoksik mekanizmaların yer aldığı düşünülen yaşlanma ile ilişkili hafıza kayıplarında ve davranış bozukluklarında LA'nın bazı etkileri gösterilmiştir. Yaşlı sıçanlarda NMDA Reseptörleri üzerinden hafızada düzelme sağlanmıştır. Ancak başka reseptör tiplerine etkisi yoktur (105).

Çalışmamızda kullandığımız 3-NPA maddesinin kronik düşük doz uygulanması ile NMDA reseptör agonistlerinin intrastriatal uygulamaları histolojik açıdan benzer karakterde lezyonlara sebep olduğu gösterilmiştir (31). Bu açıdan değerlendirildiğinde literatür bilgisi ile çalışma sonuçlarımız örtüşmektedir.

Yapılan bir diğer çalışmada serebral iskemi reperfüzyonu takiben oluşan hasarı önlemede LA'nın önemli etkileri gözlenmiştir. Hem genel radikal süpürücü etkisi hem de sellüler GSH düzeylerini arttırıcı ve hücre redoks durumunu stabilize edici etkisi önemlidir (106).

LA diabetik nöropatilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Diğer nöropati tiplerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Örneğin, N-hekzan inhalasyonunun yol açtığı şiddetli nöropatinin gelişimini geciktirdiği görülmüştür (107).

Mononükleer hücre aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde 3-NPA ve 3-NPA + LA tedavi grupları arasında anlamlı fark tespit edildi. LA uygulanan deneklerde mononükleer hücre aktivasyonunun normale yakın olduğu 3-NPA kullanımı ile azalan PMA ile uyarıma yanıtta artma olduğu saptandı. LA kontrol ve SF kontrol grupları arasında fark tespit edilmedi.

Sonuç olarak çalışmamızda HH'nda KL yöntemiyle ROT ve RNT miktarlarının arttığının ve mononükleer hücre aktivasyonunda PMA ile uyarımda azalma olduğunu gösterdik. Çalışmamız HH modelinde eksitotoksik mekanizmaların etkili olduğunu ve hastalığın patogeneğinde ROT ve RNT'lerin etkili olduğunu düşündürmektedir. Artan ROT ve RNT ile oksidatif stres durumu ortaya çıkmaktadır. Bu aşamada çalışmamızda kullandığımız potent bir antioksidan olan LA'nın hasar oluşturan ROT ve RNT miktarlarının düşürülmesinde etkili olduğunu belirledik. Daha önce de başka patolojiler üzerinde yapılan çalışmalarda LA'nın etkisi zaten gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarında HH patolojisinde antioksidan olarak LA'nın etkili olduğunu göstermektedir.

6.KAYNAKLAR

1. Martin J. B. , Gusella J. F. : Huntington's disease. N. Engl. J. Med. 315:1267-1276, 1996.
2. Strange P. G. : Brain Biochemistry and Brain Disorders. Oxford University Press, London, 1996.
3. Yüksel M : Nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde serbest radikallerin rolünün incelenmesi. M. Ü Tıp Fakültesi, Doktora Tezi, 2001 İstanbul.
4. Koutouzis T. K. , Borlongan C. V. , Scordia T. , Creese I. , Cahill D. W. , Freeman T. B. , Sanberg P. R. : Systemic 3- nitropropionic acid: long term effects on locomotor behavior. Brain Res. 646: 242-246, 1994.
5. Reed L. J. : A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. J Biol Chem. 276(42):38329-38336, 2001
6. Francisca Pe' rez-Severiano, Camilo R' ios, Jose' Segovia: Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. Brain Research 862: 234–237, 2000.
7. Jia Yi Li, Natalija P. , and Patrik B. : The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's Disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. NeuroRx_, Vol. 2, No. 3, 2005.
8. Gillian B. , Peter H. , and Lesley J. : *Huntington's Disease - Third Edition*. Oxford: Oxford University Press, 2002.
9. Group HsDCR. : A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72:971–983, 1993.
10. Gaba A. M. , Zhang K. , Marder K. , Moskowitz C. B. , Werner P. , Boozer C. N. : "Energy balance in early-stage Huntington disease". Am. J. Clin. Nutr. 81 (6): 1335–41, 2005.

11. Booklet by the Huntington Society of Canada. : *Caregiver's Handbook for Advanced-Stage Huntington Disease*.. HD Society of Canada (2007-04-11). Retrieved on 2008-08-10
12. Morton A. J. , Wood N. I. , Hastings M. H. , *et al.* : "Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease". *J. Neurosci.* 25 (1): 157–63, 2005.
13. Arnulf I. , Nielsen J. , Lohmann E. , *et al.* : "Rapid eye movement sleep disturbances in Huntington disease". *Arch Neurol* 65 (4): 482–488, 2008.
14. Cognitive Impairment: Symptoms to Diagnosis Toward Optimized Practice" (PDF). Alberta Medical Association (2007). Retrieved on 2008-08-10.
15. Johnson S. A. , Stout J. C. , Solomon A. C. , *et al.* : "Beyond disgust: Impaired recognition of negative emotions prior to diagnosis in Huntington's disease". *Brain* 130 (Pt 7): 1732–44, 2007.
16. Vonsattel J. P. : DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369–384, 1998.
17. Shi-Hua Li, Anna L. C. , Hui Z. , Suzanne L. , Manjula R. , He Li and Xiao-Jiang Li. : Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Molecular and Cellular Biology*, p. 1277–1287, 2002.
18. Wellington C. L. , Hayden M. R. : Of molecular interactions mice and mechanism: new insights into Huntington's disease. *Current Opin. Neurol.* 10: 291-298, 1997.
19. Lawrence A. D. , Sahakian B. J. , Robbins T. W. : Cognitive functions and corticostriatal circuits : insights from Huntington's disease. *Trends Cognitive Sci.* 2: 379-387, 1998.
20. Nihei K. , Kowall N. W. : Neurofilament and neural cell adhesion molecule immunocytochemistry of Huntington's disease striatum. *Ann. Neurol.* 31: 59-63, 1992.
21. Matthews M. T. , Ferrante R. J. , Jenkins B. G. , Browne S. E. , Goetz K. , Berger S. , Chen I. Y. C. , Beal M. F. : Iodoacetate produces striatal excitotoxic lesions. *J. Neurochem.* 69: 285-289, 1997.

22. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995;61 :1-31.
23. R. G. Cutler, "Oxidative stress profiling—part I. Its potential importance in the optimization of human health," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1055: 93–135, 2005.
24. Ilias G. Kirkinezosa, Carlos T. , Moraesa B. : Reactive oxygen species and mitochondrial diseases *Cell and Development Biology*, Vol. 12: 449–457, 2001
25. V.M. Mann, J.M. Cooper, F. Javoy-Agid, Y. Agid, P. Jenner, A.H.V. Schapira, *Lancet* 336: 749, 1990.
26. S.E. Browne, A.C. Bowling, U. MacGarvey, J. Baik, S.C. Berger, M.K. Muqit, E.D. Bird, M.F. Beal, *Ann. Neurol.* 41: 646-653, 1997
27. Beal M. F. , Brouillet E. , Jenkins B. G. , Ferrante R. J. , Kowall N. W. , Miller J. M. , Storey E. , Srivastava R. , Rosen B. R. , Hyman B. T. : Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3- nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13: 4181-4192, 1993
28. Binienda Z. , Simmons C. , Husseain S. , Slikker W. , Ali S. F. : Effect of acute exposure to 3- nitropropionic acid on activities of endogenous antioxidants in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 251: 173-176, 1998.
29. Borlongan C. V. , Koutouzis T. K. , Sanberg P. R. : 3- Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21: 289-293, 1997
30. Brouillet E. , Guyot M. C. , Mittoux V. , Altairac S. , Conde F. , Palfi S. , Hantraye P. : Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3- nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70: 794-805, 1998.
31. Guyot M. C. , Hantraye P. , Dolan R. , Palfi S. , Maziere M. , Brouillet E. : Quantifiable chronically treated with 3- nitropropionic acid. *Neurosci.* 79: 45-56, 1997.
32. Nishino H. , Kumazaki M. , Fukada A. , Fujimoto I. , Shimano Y. , Hida H. Sakurai T. , Deshpande S. B. , Shimizu H. , Morikawa S. , Inubushi T. : Acute 3- nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell

- death and dysfunction of the blood-brain barrier : involvement of dopamine toxicity. *Neurosci. Res.* 27: 343-355, 1997.
33. Schulz J. B. , Matthews R. T. , Henshaw D. R. , Beal M. F. : Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins : implications for neurodegenerative diseases. *Neurosci.* 71: 1043-1048, 1996.
34. Deshpande S. B. , Fukuda A. , Nishino H. : 3- Nitropropionic acid increases the intracellular Ca^{2+} in cultured astrocytes by reverse operation of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger. *Exp. Neurol.* 145: 38-45, 1997.
35. Lankin V. Z. : The Enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation. *Free radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, biochemical, and clinical aspects. NATO Science Series.* 344:8-23, 2003.
36. Szmen Y. E. :Yaşlanma Biyokimyası. Ed: Onat T. , Emerk K. , Szmen Y. E. , İnsan Biyokimyası., s: 665-674, Palme Yayıncılık, Ankara, 2002.
37. nlgzel G. : Kistik fibrozlu olgularda hastalık şiddeti parametreleri ile ilişkilendirilen biyokimyasal belirteçler ve oksidatif etkiler. M. . Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2008 İstanbul.
38. Dormandy T. L. : An approach to free radicals. *Lancet* 29:1010-1014, 1983
39. Uysal M. : Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan –antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim.* 11: 336-341, 1998
40. Pryor W. A. : Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann Rev Physiol* 48:657-667, 1986.
41. Duke J. B. : The biology of oxygen radicals. *Science* 201:875-880, 1978.
42. Haklar G. : Kronik böbrek hastalarında oksidan etkinin değişik yöntemlerle ölçülmesi. M.. Tıp Fakültesi, Tıpta uzmanlık tezi, İstanbul, 1994 (Danışman: Prof.Dr.A.Süha Yalçın).
43. Slater F. T. : Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 105: 283-293, 1984.

44. Ward P. A. , Warren J. S. , Johnson K. J. : Oxygen radicals, inflammation and tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 5:403-408, 1988.
45. Halliwell B. , Gutteridge J. M. : *Free radicals in Biology and Medicine.*, Third edition, Oxford University Press, New York, 36-104, 191-225, 1999.
46. Van Dyke K. , Castronova V. , et all : *Cellular Chemiluminescence.* London: CRC pres, 1-67, 1987
47. Allen R. C. , Loose L. D. : Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Commun*, 69:245-253, 1976.
48. Wilson M. E. , Trush M. A. , Van Dayke K. , Kyle J. M. , Mullet M. D. , Neal W. A. : Luminol-dependent chemiluminescence analysis of opsonophagocytic dysfunctions. *J Immunol Methods*, 23:315-323, 1978.
49. Roos d. , Weening R. S. , Voetman A. A. , Schaik J. V. , Bot A. A. M. , Meerhoff L. J. , Loos J. A. : Protection of phagocytic leukocytes by endogenous glutathione: Studies in family with glutathione reductase deficiency. *Blood*, 1979 ; 53(5):851-866
50. Abdalla D. S. P. , Campa A. , Monterio H. P. : Low density lipoprotein oxidation by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis* 1992; 47: 149-159
51. Weiss S. J. , Klein R. , Slivika A. , Wei M. : Chlorination of taurine by human neutrophils. *J Clin Invest* 1982; 70: 598-607
52. Slivka A. , Lo Buglio A. F. , Weiss S. J. : A potential role for hypochlorous acid in granulocyte mediated tumor cell cytotoxicity. *Blood* 1980 ; 55: 347-350
53. AKKUŞ, İ. 1995. : Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, Kuzucular ofset, Konya.
54. Ames B. , N. Shigenega, Hagen T. M. : Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Sep 1;90(17):7915-22, 1993.
55. Bast A. , Haenen G. R. M. M. , Cees J. A. D. :1997. Oxidants and antioxidants:State of the art. *The American Journal of Medicine*, 91,(Supll 3C),30,3C-2S_3C-13S.

56. Hallivell B. , Gutteridge J. M. : The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* Jul; 280(1):1-8, 1990.
57. Frei B. : Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action.,*The American Journal of Medicine*, 97(Suppl 3A),26,3A-5S-3A-12S, 1994.
58. Guemouri L. , Artur Y. , Herbeth B. , Jeandel C. , Cuny G. , Siest G. : Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem.* Nov; 37(11):1932-7, 1991.
59. Hallivell B. : Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* Sep 10; 344(8924):721-4, 1994
60. Jialal I. , Fuller C. J. : Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol.* Apr; 16(4 Suppl 1):I6-9, 1993.
61. Maxwell S. R. : Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs.* Mar; 49(3):345-61, 1995.
62. Gonzales R. , Auclair C. , Voisin E. , Gautera H. , Dhermy D. , Boivin P. : Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res.* Sep; 44(9):4137-9, 1984.
63. Cerutti A. P. , Mc Cord J. M. , Fridovich I. (EDS). : Oxy-radicals in molecular biology and pathology. Alan R. Liss. Inc. Pages 183-193. New York, 1988.
64. Tekkes Y. : Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde Aspirin ve E vitamininin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Ü. Yüksek Lisans Tezi, 2006 , Kahramanmaraş.
65. Rice-Evans C. A. , Diploct A. T. , Symons M. C. R. : Techniques in free radicals research. Elsevier, Amsterdam, vol 22. 1991.
66. Mannervik B. : Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 113:490-5, 1985.
67. Mc Millan T. J. , Steel G. G. : Molecular aspects of radiation biology: Basic Clinical Radiobiology. Birinci baskı. Steel GG (ed) Edward Arnold Publishers, London, S: 211-223, 1993.

68. Mc Cray P. B. , Gibson D. D. , Fong K. L. , Hornbrook K. R. : Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*. Jun 22; 431(3):459-68, 1976
69. Michiels C. , Raes M. , Toussaint O. , Remacle J. : Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. Sep; 17(3):235-48, 1994.
70. Smirnoff N. , Pallanca J. E. :Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 24,16, 1995.
71. Carreau JP. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods Enzymol*. 62:152-158, 1979.
72. Beutler E. , Duron O. , Kelly B. M. : Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963. May;61:882-8.
73. Champe P. C. , Harvey R. A. Glikozaminoglikanlar. A. Tokullugil, M. Dirican, E. Ulukaya. : Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1997 s. 147-156.
74. Evans H. M. , Bishop K. S. : On the existance of a hiterto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56, 650. 1922.
75. Fristma G. A. , George A. , Fristma M. S. : Vitamin E and autoxidation. *American Journal of Medical Technology*, 49,6,453-456. 1983.
76. Tanakol R. : Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. *Klinik Gelişim*, 11:347-357. 1998.
77. Horwitt M. K. : Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin-tryptophan, and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B-6. *Am J Clin Nutr*. Dec; 44(6):973-85. 1986.
78. Schmindtmann S. , Baehr R. V. , Precht K. : Free radicals induce increased lysis of red blood cells after hemodialysis nephrol dial. *Transplant* 5, 600-603. 1990.

79. Feredioon S. , Janitha P. K. , Wanasundara P. D. : Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 32(1):67-103. 1992.
80. Krinsky N. I. : Membrane antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*, 551:17-32; discussion 32-3. 1980.
81. Winyard P. , Lunec J. , Brailsford S. , Blanke D. : Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of Caeruloplasmin. *Int.J.Biochem.*, 46,1273-1278. 1984.
82. Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem.* 11(9):1135-1146, 2004
83. Kramer K, Packer L. : R-alpha-lipoic acid. In: Kramer K, Hoppe P, Packer L, eds. *Nutraceuticals in Health and Disease Prevention*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 129-164, 2001
84. Cicchillo R. M. , Iwig D. F. , Jones A. D., et al. : Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry.* 43(21):6378-6386, 2004
85. Zhao X. , Miller J. R. , Jiang Y. , Marletta M. A. , Cronan J. E. : Assembly of the covalent linkage between lipoic acid and its cognate enzymes. *Chem Biol.* 10(12):1293-1302, 2003
86. Cicchillo R. M. , Booker S. J. : Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. *J Am Chem Soc.* 127(9):2860-2861, 2005
87. Miller J. R. , Busby R. W. , Jordan S. W. , et al. : *Escherichia coli* LipA is a lipoyl synthase: in vitro biosynthesis of lipoylated pyruvate dehydrogenase complex from octanoyl-acyl carrier protein. *Biochemistry.* 239(49):15166-15178, 2000

88. Bustamante J. , Lodge J. K. , Marcocci L. , Tritschler H. J. , Packer L. , Rihn B. H. : Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med.* 24(6):1023-1039, 1998
89. Harris R. A. , Joshi M. , Jeoung N. H. , Obayashi M. : Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J Nutr.* 135(6 Suppl):1527S-1530S, 2005.
90. Jones W. , Li X. , Qu Z. C. , Perriott L. , Whitesell R. R. , May J. M. : Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 33(1):83-93, 2002 .
91. Horramaki N. , Han D. , Handelman G. J. , Tritschler H. J. , Packer L. : Cytosolic and mitochondrial systems for NADH- and NADPH- dependent reduction of LA. *Free Rad Biol Med.* 1997; 22: 535-542.
92. Pecker L. , Witt E. H. , Tristchler H. S. : Antioxidant properties and clinical applications of LA and DHLA. *Handbook of Antioxidant*, Marcel Dekker Inc New York 1996; 535-592.
93. Havgaard N. , Havgaard E. : Stimulation glucose utilization by thioctic acid in rat diaphragm incubated in vitro. *Biochem Biophys Acta* 1970; 222: 583-586.
94. Devasagayam T. P. A. , Mascia P. D. , Kaiser S. , Sies H. : Singlet oxygen induced single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA: The enhancing effect of thiols. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1088: 409-412.
95. Pryor W. A. , Squadrito G. L. : The chemistry of peroxynitrite: Product from reaction of Nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol* 1995 ; 267 : 699-722.
96. Constantinescu A. , Tritschiler H. , Packer L. : LA protects against hemolysis of human erythrocyte induced by peroxy radicals. *Biochem Mol Biol Int.* 1994; 33: 669-676.

97. May J. M. , Qu Z. C. , Mendiratta S. : Protection and recycling of alpha-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys.* 349(2):281-28, 1998.
98. Kozlov A. V. , Gille L. , Staniek K. , Nohl H. : Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form by two-electron reduction of ubiquinone and one-electron reduction of ubisemiquinone. *Arch Biochem Biophys.* 363(1):148-154, 1996.
99. Valko M. , Morris H. , Cronin M. T. : Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12(10):1161-1208, 2005.
100. Hagen T. M. , Vinarsky V. , Wehr C. M. , Ames B. N. : (R)-alpha-lipoic acid reverses the age-associated increase in susceptibility of hepatocytes to tert-butylhydroperoxide both in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal.* 2(3):473-483, 2000
101. Suh J. H. , Shenvi S. V. , Dixon B. M. , et al. : Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(10):3381-3386, 2004.
102. Renu A. Kowluru and Pooi-See Chan : Oxidative Stress and Diabetic Retinopathy. *Experimental Diabetes Research Volume 2007*, Article ID 4360.
103. Schulz J. B. , Matthews R. T. , Jenkins B. G. , Ferrante R. J. , Siwek D. , Henshaw D. R. , Cipolinni P. B. , Mecocci P. , Kowall N. W. , Rosen B. R. , Beal M. F. : Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J. Neurosci.* 15: 8419-8429, 1995.
104. LaFontaine M. A. , Geddes J. W. , Banks A. , Butterfield D. A. : Effect of exogenous and endogenous antioxidants on 3-nitropropionic acid-induced in vivo oxidative stress and striatal lesions: insights into Huntington's disease. *J. Neurochem.* 75: 1709-1715, 2000.

105. Stoll S. , Hatmann H. , Cohen S. A. , Müller W. E. : The potent free radical scavenger LA improves memory in aged mice : Putative relationship to NMDA receptor deficits. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 46: 799-805.
106. Nickander K. K. , Mc Phee B. R. , Low P. A. , Tritschler H. : LA : Antioxidant potency against lipid peroxidation of neural tissues in vitro and implications for diabetic neuropathy. *Free Rad. Biol Med* 1996; 21: 631-639.
107. Packer L. , Tritschler H. Jj , Wessel K. : neuroprotection by the metabolic antioxidant LA. *Free Rad. Biol Med.* 1997; 22 : 359-378.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	ŞEYDA ŞAYİR
Doğum yeri / Tarihi	ÜSKÜDAR / 29.11.1984
Medeni Hali	BEKAR
Bildiği Yabancı Dil	İNGİLİZCE
Mezun Olduğu	
İlkokul ve Yılı	Zübeyde Hanım İlköğretim Okulu 1998
Lise ve Yılı	Kadıköy Anadolu İmam Hatip Lisesi 2002
Üniversite	Dumlupınar Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölüm	Biyoloji
Mezuniyet Yılı ve Ortalama	2005 3,74 (96,10) (Fen Edebiyat Fakültesi İkincisi)
Çalıştığı Yerler	Göztepe Devlet Eğitim ve Araştırma Hastanesi (Stajyer) ENE Tıbbi Cihaz Pazarlama Şirketi / ürün sorumlusu
Katıldığı Kurslar	P. Ü. Deney Hayvanlarının Biyolojik Araştırmalarda Kullanılması Kursu-IV 15,16 Mayıs 2006 Denizli
Aldığı Burslar	TUBİTAK Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ARAŞTIRMA ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

PROJENİN ADI : 3- Nitropropiyonik asit ile oluşturulan Huntington hastalığı modelinde alfa- lipoik asit'in hasar oluşturucu mekanizmalardaki tedavi edici etkinliği
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof .Dr. Goncagül HAKLAR
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR : Şeyda ŞAYİR- Yrd.Doç.Dr. Meral YÜKSEL-
Dr. Göksekin ÜNLÜGÜZEL
PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR : M.Ü Tıp Fakültesi Biyokimya ABD
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI : 09.04.2007- 55.2006.mar

Sayın : Prof. Dr. Goncagül HAKLAR

Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na " 3- Nitropropiyonik asit ile oluşturulan Huntington hastalığı modelinde alfa- lipoik asit'in hasar oluşturucu mekanizmalardaki tedavi edici etkinliği" isimli proje ile yapmış olduğunuz başvurunuz, "Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu" tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Doç.Dr. Zafer GÖREN
Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu
Yürütücü Sekreteri

Fikir Belirtenler

Prof. Dr. Özdemir AKTAN
Prof. Dr. Berrak YEĞEN
Doç. Dr .Zafer GÖREN
Öğr. Gör.Gürkan SERT
Vet.Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Not: Deneylerin yapılması sırasında ortaya çıkan zorluklar, deney protokolünde yapılması gereken değişiklikler, "Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na" bildirilmelidir. Bütün yazışmalarda, proje onay tarihi ve onay sayısı belirtilmelidir. Araştırmacıların proje ile yapılan bütün yayınlarda proje onay tarih ve numarası belirtmesi zorunludur.