

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELEKTROMANYETİK ALANA MARUZ KALAN  
SIÇAN BEYİN DOKUSUNDA OKSİDATİF STRES  
ÜZERİNE KARNİTİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL  
VE YAPISAL ETKİLERİ**

**MÜGE KIRAY**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ**

**DOKTORA TEZİ**

**İZMİR-2010**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELEKTROMANYETİK ALANA MARUZ KALAN  
SIÇAN BEYİN DOKUSUNDA OKSİDATİF STRES  
ÜZERİNE KARNİTİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL  
VE YAPISAL ETKİLERİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
DOKTORA TEZİ**

**MÜGE KIRAY**

Danışman Öğretim Üyeleri:

Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR

Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2006.KB.SAG.003 sayı ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa no

<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	vii
<b>KISALTMALAR</b> .....	viii
<b>ÖZET</b> .....	1
<b>YABANCI DİLDE ÖZET</b> .....	2
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	3
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	6
2.1. Elektromanyetik Alan.....	6
2.1.1. Elektriksel Alan .....	6
2.1.2. Manyetik Alan .....	7
2.1.3. Elektromanyetik Alan .....	7
2. 1. 3.1.Elektromanyetik Alan Oluşumundaki Temel Teoriler.....	8
2.1.3.1.1. Helmholtz Teorisi.....	8
2.1.3.1.2. Selenoid Boru Teorisi.....	8
2.1.3.2. Elektromanyetik Alanların Ölçü Birimleri.....	8
2.1.3.3. Manyetik Alanın İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi.....	9
2.1.3.3.1. Elektromanyetik alanın santral sinir sistemi üzerine etkileri.....	9
2.1.3.4. EMA'nın olası etki mekanizmaları.....	10
2.2. Serbest radikal; tanımı ve yapısı .....	11
2.2.1. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri .....	12
2.2.3. Serbest radikallerin kaynakları .....	13
2.2.2.1. Endojen kaynaklar.....	13
2.2.2.1.1. Mitokondrial ve endoplazmik retikulum elektron transport zinciri .....	13
2.2.2.1.2. Nötrofil fagositoz sistemi .....	14
2.2.2.1.3. Ksantin oksidaz sistemi .....	14
2.2.2.1.4. Araşidonik asit metabolizması .....	14
2.2.2.1.5. Enzimatik olmayan reaksiyonlar .....	15

2.2.2.2. Eksojen kaynaklar .....	15
2.2.3. Serbest radikaller ile oluşan hücresel hasarlar .....	15
2.2.3.1. Lipid Peroksidasyonu .....	15
2.2.3.2. DNA ve serbest radikal hasarı .....	16
2.2.3.3. Proteinler ve serbest radikal hasarı .....	16
2.2.3.4. Karbonhidratlar ve serbest radikal hasarı .....	17
2.3. Antioksidan savunma mekanizmaları .....	17
2.3.1. Antioksidan savunma enzimleri .....	18
2.3.1.1. Süperoksid dismutaz (SOD) .....	18
2.3.1.2. Katalaz (CAT) .....	19
2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) .....	19
2.3.2. Diğer antioksidan moleküller .....	20
2.3.2.1. Glutasyon .....	20
2.3.2.3. Nutrisyonel antioksidanlar .....	20
2.4. Beyin ve serbest radikaller.....	21
2.5. Apoptoz .....	22
2.5.1. Apoptoz ve hücre morfolojisi.....	24
2.5.2. Apoptozun moleküler mekanizması.....	26
2.5.3. Apoptoz saptama yöntemleri.....	28
2.6. Merkezi sinir sistemi.....	29
2.7. Hippokampal formasyon.....	31
2.8. Karnitin .....	31
2.8.1. Karnitin biyosentezi.....	32
2.8.2. Karnitin ve metabolik işlevleri.....	32
2.8.3. Karnitin ve nöron koruyucu etkisi.....	34
2.8.4. Karnitin ve oksidatif stres.....	36
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>38</b>
3.1. Çalışma grupları .....	38
3.2. EMA oluşturulması .....	38
3.3. Doku örneklerinin hazırlanması .....	39
3.3.1. Işık mikroskopik doku takibi.....	39
3.3.2. Krezil violet ile boyama yöntemi.....	40

3.3.3. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Tekniği ile Boyama .....	40
3.3.4. İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi.....	41
3.3.5. Elektron mikroskopik inceleme.....	41
3.4. Homojenizasyon.....	42
3.5. Enzim aktiviteleri ve TBARS düzeylerinin saptanması .....	42
3.6. İstatistik değerendirme .....	43
<b>4.BULGULAR</b> .....	<b>44</b>
4.1. MDA sonuçları .....	44
4.2. SOD ve GPx enzim aktivitesi sonuçları .....	46
4.3. Işığ mikroskopik bulgular.....	49
4.3.1. Krezil violet boyama.....	49
4.3.2. TUNEL boyama.....	52
4.3.3. Aktive kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama.....	55
4.3.4. Elektron mikroskopik inceleme.....	58
<b>5.TARTIŞMA</b> .....	<b>61</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>66</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>67</b>

## TABLO LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 1. Tüm grupların MDA değerleri ( $\mu\text{M} \pm \text{SH}$ ).....	45
Tablo 2. Tüm grupların SOD aktivitesi değerleri ( $\text{U/mL} \pm \text{SH}$ ).....	46
Tablo 3. Tüm grupların ortalama GPx aktivitesi değerleri ( $\text{U} \pm \text{SH}$ ).....	48
Tablo 4: Prefrontal korteks ve hipokampus bölgelerindeki hücre sayıları.....	51

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Şekil 1. Ortalama MDA değerleri .....	44
Şekil 2. SOD enzim aktiviteleri .....	46
Şekil 3. GPx enzim aktiviteleri .....	48
Şekil 4. Krezil Violet boyama (prefrontal korteks).....	49
Şekil 5 Krezil Violet boyama (hipokampus).....	50
Şekil 6. TUNEL boyama (prefrontal korteks).....	52
Şekil 7. TUNEL boyama (hipokampus).....	53
Şekil 8: TUNEL (+) hücre oranı.....	54
Şekil 9. Aktive antikaspaz-3 immunohistokimyasal boyama (prefrontal korteks).....	55
Şekil 10: Aktive antikaspaz-3 immunohistokimyasal boyama (hipokampus).....	56
Şekil 11: Antikaspaz-3 (+) hücre oranı.....	57
Şekil 12. Sham grubu elektron mikroskopik görüntüleri.....	58
Şekil 13. EMA grubu elektron mikroskopik görüntüleri.....	59
Şekil 12. EMA+KAR grubu elektron mikroskopik görüntüleri.....	60

## KISALTMALAR

<b>EMA</b> .....	Elektromanyetik Alan
<b>GPx</b> .....	Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH</b> .....	İndirgenmiş Glutasyon
<b>GSSG</b> .....	Yükseltgenmiş Glutasyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> .....	Hidrojen Peroksid
<b>MDA</b> .....	Malondialdehit
<b>MSS</b> .....	Merkezi Sinir Sistemi
<b>NO</b> .....	Nitrik Oksid
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> .....	Süperoksid radikali
<b>·OH</b> .....	Hidroksil Radikali
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> .....	Singlet Oksijen
<b>ROS</b> .....	Reaktif Oksijen Türleri
<b>SOD</b> .....	Süperoksid Dismutaz



## ÖZET

# ELEKTROMANYETİK ALANA MARUZ KALAN SIÇAN BEYİN DOKUSUNDA OKSİDATİF STRES ÜZERİNE KARNİTİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE YAPISAL ETKİLERİ

**Müge KIRAY**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji&Embriyoloji ABD Balçova, İzmir

Bu çalışmada Elektromanyetik Alana (EMA) maruz bırakılan sıçanlarda, beyin dokusunda karnitinin yapısal, antiapoptotik ve oksidatif stres üzerine etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

Çalışmada Wistar cinsi yetişkin erkek sıçanlar (250-300 g) kullanıldı. Çalışma grupları şu şekilde oluşturuldu: I. grup: Sham grubu. EMA'na maruz kalma ve enjeksiyon uygulaması yok (n=10). II. grup: EMA+S grubu. EMA'na maruz kalan ve serum fizyolojik uygulanan sıçanlar (n=10, 1 ml/kg, po, 30 gün). III. grup: EMA+KAR grubu. EMA'na maruz kalma+L-karnitin uygulanan sıçanlar (n=10, 300 mg/kg, po, 30 gün). EMA+S ve EMA+KAR gruplarına 30 gün süreyle 50 Hz, 3 mT, 4 saat/gün EMA uygulandı Sham grubuna EMA veya ilaç uygulanmadı. Deney sonunda oksidatif stres parametrelerinden lipid peroksidasyon ürünleri (malondialdehit; MDA), antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), apoptozu göstermek için TUNEL ve aktive antikapaz-3 immunohistokimyasal incelemeler yapıldı. Gruplar arasındaki farklar one-way ANOVA posthoc Bonferroni testi ile değerlendirildi. P< 0.05 anlamlılık düzeyi esas alındı.

EMA+S grubunda MDA değerleri, prefrontal korteks, striatum ve hipokampus bölgelerinde sham ve EMA+KAR gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. SOD ve GPx enzim aktiviteleri her üç beyin bölgesinde, sham ve EMA+KAR gruplarında EMA+S grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. EMA+S grubunda apoptotik hücre yoğunluğu sham ve EMA+KAR gruplarına göre yüksek olarak bulundu. Sham ve EMA+KAR gruplarının sonuçları benzerlik göstermekteydi.

Sonuç olarak bu çalışmada beynin farklı bölgelerinde EMA'nın neden olduğu hasarlara karşı karnitinin koruyucu etkisi ilk kez gösterilmiştir. Karnitin antioksidatif etkisi aracılığıyla antiapoptotik etki gösterebilmektedir.

Anahtar kelimeler: Elektromanyetik alan, beyin, oksidatif stres, apoptozis, karnitin

## SUMMARY

# **THE IMMUNOHISTOCHEMICAL AND STRUCTURAL EFFECTS OF CARNITINE ON OXIDATIVE STRESS IN ELECTROMAGNETIC FIELD EXPOSED RAT BRAINS**

**Muge KIRAY**

Dokuz Eylul University Medical School Departments of Histology&Embryology  
Balçova, İzmir

The aim of this study was to investigate the effects of carnitine on apoptosis and oxidative stress in electromagnetic field (EMF) exposed rat brains.

In this study, male Wistar rats (250-300 g) were used. Rats were divided in three groups; group I: Sham group (n=10) was not exposed to EMF. Group II was exposed to EMF and received physiological saline solution for 30 days (EMF+S, n=10, 1 ml/kg, po). Group III was exposed to EMF and received L-carnitine for 30 days (EMF+CAR, n=10, 300 mg/kg, po). Rats in EMF+S and EMF+CAR groups were exposed to 50 Hz, 3 mT EMF for 30 days (4 h/day). Subsequently, oxidative stress markers (malondialdehyde; MDA), antioxidative enzymes (superoxide dismutase; SOD and glutathione peroxidase; GPx), TUNEL and active-anticaspase-3 immunohistochemistry for apoptosis were examined in each group. All data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) post hoc Bonferroni test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

MDA levels in prefrontal cortex, striatum and hippocampus regions were significantly higher in EMF+S rats than those in sham and EMF+CAR rats. SOD and GPx enzyme activities in all brain regions were significantly higher in sham and EMF+CAR rats than those in EMF+S rats. Apoptotic cell death was increased in EMF+S group. The results of sham and EMF+CAR rats were similar.

In conclusion, the protective effect of carnitine on EMF-induced damage in brain tissue was demonstrated firstly in the present study. Carnitine exhibits antiapoptotic effect via its antioxidative properties.

Key words: Electromagnetic field, brain, oxidative stress, apoptosis, carnitine

## **1. GİRİŞ VE AMAÇ**

Manyetik alanlar günümüzde yaygın olarak çevresel dağılım göstermekte ve elektrikli aletlerin gelişmesiyle birlikte etkileri de artmaktadır (1). Gelişmiş ülkelerde elektrik dağıtımı ve kullanımının artması da Elektro Manyetik Alanlara (EMA) maruziyeti arttırmaktadır. EMA maruziyeti ve kanser riski arasında korelasyon bulunması konuyu toplumsal sorun haline getirmektedir (2,3). Bu nedenle EMA'nın biyolojik sistemlerdeki olası yan etkileri son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bazı epidemiyolojik çalışmalar EMA maruziyeti ile beyin, meme ve hematolojik maligniteler arasında korelasyon bulunduğunu göstermektedir. Özellikle zayıf EMA birçok hücresel fonksiyonu etkileyebilmektedir ve önemli bir etkisi de sinyal ileti yolları üzerinedir. Yapılan in vitro çalışmalar EMA'nın hücre proliferasyonu, apoptozis, farklılaşma vs üzerine etkilerini ortaya koymaktadır. EMA'nın hücresel davranışları nasıl etkilediği tam olarak açıklanamamıştır, bununla birlikte membran yapısı ve küçük moleküllerin geçirgenliği, özellikle  $Ca^{+2}$  transport sistemi, üzerine etkilerine ait hipotezler mevcuttur (1,3). Diğer hipotezler ise EMA'nın serbest radikal üretimiyle sonuçlanan kimyasal reaksiyonlarla etkileşmesidir (2, 4).

EMA, atom ve moleküllerin eşleşmemiş elektronlarla elektron-spin (dönme) hareketini direkt etkileyerek sinyal ileti yollarına etkimektedir. Bu etki spinle korele serbest radikal eşleşmesi ardından redox iletisine etkimektedir. Bu olaylar growth faktörler, iyon transportu, transkripsiyon ve apoptozla ilişkilidir. Redox uyarısı transkripsiyon genlerini, Reaktif Oksijen Türlerini (ROS) ve hücre ölümüyle sonuçlanan mitokondrial komponentlerin oksidasyon/degradasyonunu aktive edebilir. Apoptozun bu üç basamaklı süreç yoluyla aktive olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple EMA, ROS üzerine etkiyerek apoptoza yol açabilmektedir (5).

Serbest radikaller hücre veya dokunun tipine ve etki süresi ile şiddetine bağlı olarak değişen sitotoksik veya mitojenik etkiler oluşturabilmektedir (2). Demir ve bakır gibi geçiş metalleri Fenton reaksiyonu yoluyla ROS üretimini artırarak DNA ve diğer makromolekülleri hasara uğratabilen en önemli ajanlardır. ROS, non-radikallerle reaksiyona girdiği zaman yeni serbest radikaller oluşarak lipid peroksidasyonu gibi zincir reaksiyonlarını başlatabilir. Hücresel seviyede lipidler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler ROS ile reaksiyona girerek hasarlanabilir. ROS artışı hücreyi oksidatif strese sokarak reversibl veya irreversibl doku hasarını başlatan fonksiyonel ve morfolojik bozukluklara yol açabilir. ROS, direkt veya indirekt yollarla apoptotik veya

nekrotik hücre ölümünü başlatabilir. Hücre ölümü ROS üretimiyle ilişkisi olan fizyolojik veya non-fizyolojik ajanlarla indüklenebilir. Yapılan in vitro çalışmalar EMA'nin apoptozu indüklediğini göstermiştir (4).

Karnitin insan dokularında yaygın olarak bulunan doğal bir maddedir. Yağ asitlerinin oksitlenerek enerji üretmek üzere mitokondriye taşınmasında esansiyel rol oynamaktadır. Karnitinin esas depo bölgeleri olan kalp ve iskelet kasındaki seviyeleri yaşla birlikte azalmaktadır. Dışardan verilen karnitin desteği lipid metabolizmasındaki yaşa bağlı değişimler üzerine olumlu etkiler yapmaktadır (6). Karnitin ökaryot hücrelerde metabolik olarak yıkılmadığı için regülasyonu şu yollarla olmaktadır; endojen olarak sentezi, dışardan diyetle alımı ve renal reabsorpsiyonu. Karnitin etkin şekilde böbrekten reabsorbe olmakla birlikte üriner atılımı büyük oranda diyetle bağlıdır. Diyetin artması halinde böbrekler reabsorpsiyonunu azaltarak adapte olmaktadır (7, 8).

Karnitin eksojen olarak verildiği zaman özgün taşıyıcısı ile hızlı bir şekilde kan-beyin bariyerini geçmektedir. Bu yönüyle karnitin nöroprotektif ajan özelliği göstermekte, nekrotik ve apoptotik nöron ölümünü engelleyebilmektedir. Yapılan çalışmalarda karnitinin iskemiye bağlı nöron ölümünü engellediği gösterilmiştir (9).

Beyin dokusu diğer organlara göre daha fazla toksik radikaller üretmesi nedeniyle serbest radikal hasarına yatkınlık göstermektedir. Beyin dokusunda antioksidan sistem aktivitelerinin bölgesel farklılık göstermesi ve metabolik hızların değişken olması oksidatif hasarın bölgesel birikimine neden olabilir (10,11). EMA maruziyeti beyinde birçok biyolojik süreci etkilemenin yanısıra tek veya çift zincir kırıklarına yol açabilmekte, bu durum karsinogenez gelişimi için potansiyel risk oluşturmaktadır (12,13).

Bu bilgiler ışığında çalışmanın amacı; EMA'na maruz bırakılan beyin dokusunda karnitinin farklı beyin bölgelerinde (korteks, striatum, hippokampus) oksidatif stres üzerine immunohistokimyasal ve yapısal etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla üç farklı beyin bölgesinde karnitin lipit peroksidasyonu (MDA) ve antioksidan enzim (süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx)) aktiviteleri üzerine potansiyel etkileri belirlenecektir. Ayrıca karnitin dokudaki apoptozis ve ultrastrüktürel yapı üzerine etkileri ışık ve elektron mikroskopik olarak değerlendirilecektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

Son yıllarda EMA'nın insan sağlığı, özellikle de beyin üzerine önemli etkileri olası risk faktörleri olarak açıklanmaktadır. EMA beynin elektriksel aktivitesi yanı sıra kognitif süreçler, enerji metabolizması ve nörotransmitter sistemleri de etkilemektedir. Manyetik alanların etki oluşturmada serbest radikaller rol oynamaktadırlar. Serbest radikal aracılığıyla oluşabilen DNA zincir kırıkları, maruz kalma süresi ve şiddetine bağlı olarak beraberinde karsinogenezis riskini de getirmesi nedeniyle önem taşımaktadır. DNA hasarının yanı sıra protein ve lipidlerin de serbest radikal aracılığıyla hasarlanması insan sağlığı üzerinde önemli etkiler oluşturabilmektedir. EMA'nın beyinde apoptozu da artırması serbest radikal oluşumu aracılığıyla gerçekleşebilmektedir. Bu nedenlerle antioksidan destek sağlanması EMA'nın olası zararlı etkilerini minimuma indirmek açısından yararlı olacaktır. Bu çalışmada, doğal bir antioksidan olan karnitin'in, EMA'na maruz kalan beyin dokusunda koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılacak ve konuyla ilgili literatüre yeni bir kaynak sağlanmış olacaktır.

### **2.1. Elektromanyetik Alan**

#### **2.1.1. Elektriksel Alan**

Elektrik alanı E vektörü simgesi ile gösterilir. Eksi yük için elektrik alan vektörü E, radyal (yükten olan doğrusal uzaklık) olarak eksi yüke doğru yönelmiştir. Artı yük için ise durum, radyal olarak yükten dışarı doğrudur. Bu vektörün anlamı R kadar bir uzaklıkta bulunan artı birim yük üzerine etki eden kuvvetin büyüklüğü ve yönüyle aynı olmasıdır. Yani R kadar uzaklığa konan bir artı birim yükün, ne kadar kuvvet, ivme ile nereye doğru hareket edeceğini göstermektedir. Elektrik alan vektörünün şiddeti  $1/R^2$  ile orantılı olarak azalır.

Elektrik alan vektörü, elektrik alan çizgilerini oluşturur ve çizgilerin nereden nereye doğru gittiğini gösterir. İki zıt kutuplu yük için elektrik alan çizgileri, artıdan çıkıp eksiye son bulur. İki farklı çizgi hiçbir zaman bir diğer çizgiyi kesmez. Aynı kutuplu iki artı veya eksi yük içinse, yüklerden çıkan çizgiler birbirlerini kesmeyecek bir biçimde birbirini bükerek ve sonsuzda son bulur (14,15)

#### **2. 1. 2. Manyetik Alan**

Elektrik alanı, bir gözlemciye göre duran yüklerin oluşturduğu bir alan çeşidi iken, manyetik alan ise bir gözlemciye göre düzgün doğrusal (ivmesiz) hareket eden yüklerin

oluşturduğu bir alandır. Manyetik alan da elektrik alan gibi vektörel (yönü ve büyüklüğü olan) bir niceliktir. Manyetik alan vektörü, B simgesiyle gösterilir. Vektörün yönü, yüklerin hareket yönüne diktir. Manyetik alan çizgileri, elektrik alan çizgilerinin aksine bir yükte başlayıp bir yükte son bulmazlar. Tersine, alan çizgileri kendi üzerine kapanan eğriler oluştururlar. Bunun yanında, elektrik alan çizgileri gibi birbirlerini kesmezler.

Elektrikte hareket eden yükler, artı yükler olarak kabul edilir ve eksi yüklerin (aslında hareket eden yükler eksi yüklü parçacıklar olan elektronlardır) tersi yönünde aktığı kabul edilir. Teoriler ve hesaplar artı yüklerin hareketine göre çözülür. Manyetik alan çizgilerinin sıklığı, akım geçen telden radyal uzaklığın karesiyle ters orantılı olarak azalır. Bilimsel otoritelerce kabullenilmiş olan sağ el kuralı geçerlidir. Sağ el kuralı, sağ el başparmağınızı akım yönünde tutup diğer parmaklarınızı tel etrafına doladığınızda manyetik alan vektörünün yönünü bulmanızı sağlar.

Manyetik alan, günlük yaşantımızda her yerde karşımıza çıkmaktadır. Akım geçiren her şey, manyetik alan oluşturur, mıknatıslar manyetik alan oluşturur, hatta dünyanın akışkan olan iç kesimleri dahi dünyanın manyetik alanını oluşturur (15,16).

### **2.1.3. Elektromanyetik Alan**

Manyetik alan ve elektrik alanın kökenleri, her zaman yüklere bağlıdır. Eğer bir gözlemciye göre yüklü parçacıklar hareket etmiyorsa, orada sadece elektrik alan vardır. Eğer yükler hareket halinde ise, gözlemciye göre yüklü parçacıkların hareketinden ötürü gözlemci elektrik alanın yanı sıra bir de manyetik alanın etkilerini hissedecektir. Faraday ve Maxwell, bu olguların yüklerin gözlemcilere göre hareketlerinden kaynaklandığını ve zamana bağlı olarak değişen manyetik alanın bir elektrik alan oluşturacağını ve aynı zamanda, zamana bağlı olarak değişen elektrik alanın bir manyetik alan oluşturacağını buldular ve formülleştirdiler. Elektromanyetik alan aslında manyetik alanla elektrik alanın birleştirilmiş halidir.

Bir elektron ya da hareketsiz yük veya yüklü cisim kendi çevresinde bir elektrik alan oluşturur. Oysa ki bu yük hareketli olsa o zaman bir mıknatıs alan da oluşturur. İşte bu iki alana birlikte elektromanyetik alan denir. Hareket halindeki elektronlar bir kabloda ilerlerken oluşturdukları manyetik alan elektrik akımının yönü ile ilişkilidir. Manyetik alanın yönünü tespit etmek için sağ el Fleming kuralı kullanılır. Bu kanuna göre başparmak elektrik akımının yönünü gösterirken diğer parmaklar manyetik alanın yönünü gösterir. Elektrik akımı etrafında şiddeti ile orantılı olarak belli bir yoğunlukta manyetik alan oluşturur. Elektrik akımının şiddeti arttıkça etrafında oluşan manyetik

alanın şiddeti de artar. Manyetik alanın yoğunluğu kabloya yakın kısımda fazla iken kablodan uzaklaştıkça manyetik alan yoğunluğu azalmaktadır (15,16).

### **2. 1. 3. 1. Elektromanyetik Alan Oluşumundaki Temel Teoriler**

#### **2.1.3. 1. 1. Helmholtz Teorisi**

Temeli sağ el Fleming kanununa dayanmaktadır. Bir bobinden elektrik geçirdiğimizde başparmak elektrik akımının yönünü gösterirken diğer parmaklar manyetik alanı göstermektedirler.

Akım dairesel olarak sağdan sola doğru gitmekteyken manyetik alan yukarıya doğrudur. Eğer akım tam zıt yönde soldan sağa doğru giderse manyetik alan aşağıya doğru olacaktır. Manyetik alanın yoğunluğu halkanın merkezinde en üst düzeydedir. Manyetik alan yoğunluğu akım ile doğru orantılı iken, bobinin uzunluğu ile ters orantılıdır (14,16).

#### **2.1.3.1.2. Selenoid Boru Teorisi**

Bu yöntemde bir borunu etrafına teller sarılarak bir bobin oluşturulmuştur. Bu borunun içinde ve merkez ekseninde manyetik alan yaklaşık olarak eşittir fakat borunun iki ucundaki manyetik alan eşit değildir (15,16).

#### **2.1.3.2. Elektromanyetik Alanların Ölçü Birimleri**

Elektrik ve manyetik alanlar, elektrik akımlarının olduğu güç hatları ve kabloları, elektrik tesisatının döşeli olduğu alanlarda görülür. Elektrik şarjlarında ortaya çıkan elektriksel alanlar volt/metre ile (v/m) ölçülür. Tahta ve metal gibi bazı yaygın maddeler bu alanlardan korunmada etkilidir. Elektrik şarjlarından kaynaklanan manyetik alanlar tesla (T), militesla (mT) veya mikrottesla ( $\mu$ T) ile değerlendirilirler. Bazı ülkelerde kullanılan diğer birim de gauss (G) tur.  $1T=10000G$ ,  $1T=1.000.000 \mu T$ ,  $1\mu T=10 mG$ .

#### **2.1.3.3. Manyetik Alanın İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi**

Son elli yıldır elektromanyetik tayfın birçok bölümündeki enerji türleri günlük yaşamda kullanılmaya başlanmıştır. Bunların yanında evlerdeki elektrikli aletlerin ve kablolarının, iş ve büro makinelerinin, elektrik iletim ve dağıtım hatlarının, bilgisayar ekranlarının da yaydığı elektromanyetik alanlar vardır. Bu nedenle her geçen gün biraz daha fazla elektromanyetik alan ve dalgaların etkisinde kalınmaktadır. Elektrik hatlarından ev aletlerine kadar insan yapısı elektrik sistemlerinin tüm öğeleri doğal

değerlerin çok üzerinde manyetik alanlar oluştururlar. Evrimin herhangi bir aşamasında insan ya da öteki canlı türleri, bu denli yoğun bir biçimde elektromanyetik alanların etkisi altında kalmamıştır.

Tıp alanında ve elektrik teknolojisindeki hızlı ilerlemelere karşın, elektromanyetik alanların biyolojik dokulara ve insan sağlığına etkileri, üzerinde az çalışılan konular olmuştur. Bu nedenle de hâlâ tartışmalı bir konudur. Son 30 yılda başta ABD ve Avrupa olmak üzere tüm dünyada yüzlerce araştırma yapıldı ve yapılmaktadır. Kimi araştırmalarda dikkat çekici sonuçlara ulaşılmıştır. Örneğin 1994'te ABD'de ve Finlandiya'da yapılan araştırmalar, elektromanyetik alanların çok sık etkisinde kalan işçilerde Alzheimer hastalığının normal insanlara göre erkeklerde 4.9 kat, kadınlarda da 3.4 kat daha çok görüldüğünü ortaya koydu. 1998'de gerçekleştirilen bir başka araştırmada radyo operatörleri, endüstriyel donanım işçileri, veri işleme aygıtı tamircileri, telefon hattı işçileri, elektrik santralleri ve trafo merkezinde çalışan işçilerle film makinistlerinde Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve başka bir takım nörolojik bozuklukların daha çok görüldüğü ortaya çıkmıştır (17,18).

#### ***2.1.3.3.1. Elektromanyetik alanın santral sinir sistemi üzerine etkileri:***

1950–1986 yılları arasında 5 elektrik şirketinde çalışan toplam 13900 işçiden 6000 tanesi seçilmiş ve bu kişiler üzerinde araştırma yapılmıştır. Bu kişiler ortalama 16 yıldır bu işte çalışmaktadırlar. Bu araştırmaya göre bu işçilerde normal topluma göre intihar riski 2 kat daha fazla bulunmuştur ve intihara teşebbüs edenlerin yaşları 50'den küçüktür. Bu araştırmaya göre elektromanyetik alan muhtemelen melatonin hormonu üretimini azaltmaktadır. Melatonin uyku uyanıklılık düzeni ve biyolojik ritmi düzenleyen bir hormondur, melatonin düzeyinin azalması depresyon ile birliktelik göstermektedir (19).

1997'de Lai ve ark. radyofrekans dalgalarına maruz kalmanın rat beyin hücrelerinde DNA kırıkları oluşturduğunu bildirirken, buna paralel olarak Robinson ve ark. da HL-60 ve HL60R soylarında elektromanyetik alanın etkisi ile DNA tamir oranında azalmanın olduğunu belirtmektedirler (20,21).

Röösli ve ark. 2007 de yayımladıkları çalışmanın sonucuna göre 1972-2002 yılları arasında demiryolunda çalışan iki işçi grubu incelenmiş ve sonuç olarak düşük frekanslı manyetik alana maruz kalmak ile Alzheimer hastalığına yakalanmak arasında anlamlı bir ilişki olduğu ve hastalığın sonraki süreçlerinin bu ilişkidenden etkilendiği bildirilmiştir (22).



1999 yılında memeli hayvanlar üzerinde araştırmaya göre düşük frekanslı elektromanyetik alan melatonin salgılanmasını azaltmaktadır (19).

2002 yılında 900 MHz 45 dakika süreyle elektromanyetik alan ratların öğrenme becerilerini olumsuz yönde etkilemiştir (23).

Epidemiyolojik araştırmalara göre ev aletlerinin yaydığı elektromanyetik alan nöroendokrin ürünlerin salgılanmasına etki ederek uyku fazlarının bozulmasına neden olmaktadır (24).

#### **2.1.3.4. EMA'nın olası etki mekanizmaları:**

Elektromanyetik alan serbest radikal yoğunluğunu artırıp biyokimyasal reaksiyonlar aracılığı ile hücre hasarına neden olmaktadır. Bir kimyasal reaksiyona giren serbest radikaller tepkimeye girdikleri organik maddeden bir bağ koparıp elektron kazanırlar. Bunun sonucunda serbest radikal tepkimeye girdiği maddeyi de serbest radikal haline çevirir. Elektronlar atomların çevresinde bir yörüngede dönmektedir. Elektronlar kimyasal bağ oluşumuna katıldıkları zaman anti-paralel yörüngelerde dönerler. Bir kimyasal bağ oluşumu için elektronların yörüngelerde anti-paralel dönmesi gerekmektedir. Şu anda bilinen elektronların kimyasal reaksiyonda yörüngelerini değiştirmedikleridir. Kimyasal bağa katılmış olan elektronlar bağ kırıldıktan sonra serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikallerdeki yörüngeler anti-paraleldir (serbest radikaller oluştuğu anda yörüngeler anti-paraleldir, daha sonra yörüngeler değişebilmektedir). Birbirine yakın serbest radikaller oluştukları anda tekrar kararlı duruma dönmek için birbirleri ile bağ oluşturmaları beklenir. Fakat serbest radikaller hızla paralel yörüngelere dönüp reaksiyona girmezler. Anti-paralel yörüngeye sahip serbest radikallerin hızla paralel yörüngeye dönüşüp birbirleri ile tekrar bağ oluşturmalarını engelleyen bir mekanizma olması gereklidir. Elektromanyetik alan elektronların yörüngelerine 2 şekilde etki etmektedir:

1) Çekirdek ve elektron arasında çok hassas olan etkileşime 'hyper-fine interaction' denir ve buna elektromanyetik alan etki etmektedir. Anti-paralel yörüngedeki elektronu paralel yörüngeye çevirmektedir. Bu yüzden bağ kırılır ve serbest radikal oluşur.

2) Paralel yörüngedeki elektronların enerjileri başlangıçta eşittir fakat elektromanyetik alana maruz kaldıkları zaman bu eşitlik bozulmaktadır. 3 tür paralel yörüngede elektronlar oluşur (25).

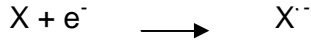
## 2.2. Serbest radikal; tanımı ve yapısı:

Son yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren molekül, iyon veya bileşikler başka moleküller ile etkileşime girerek bu molekülden elektron alır veya verirler. Başka moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişine girebilen bu moleküllere serbest radikaller denir. Serbest radikaller reaktif bir yapıya sahip olup eşlenmemiş elektronlarını paylaşmak için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerler (26,27). Serbest radikaller üç şekilde oluşabilir (28):

1. Non-radikal bir molekülden tek bir elektron kaybı.



2. Non-radikal bir molekülün tek bir elektron kazanması.



3. Homolitik yarıma. Normal bir molekülün kovalan bağının homolitik yarılması sonucu eşleşmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması.



### 2.2.1. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri:

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri aşağıda özetlenmiştir (28,29):

Oksijen merkezli serbest radikaller:

- Süperoksid radikali ( $O_2^-$ )
- Hidroksil radikali ( $\cdot OH$ )
- Alkoksil radikali ( $RO\cdot$ )
- Peroksil radikali ( $RO_2^-$ )
- Hidroperoksil radikali ( $HO_2\cdot$ )

Oksijen merkezli olmayan serbest radikaller:

- Karbon merkezli (Lipid radikalleri)
- Alkoksil radikalleri

- Sülfür merkezli (Sülfür radikali)
- Hidrojen merkezli (Hidrojen radikali)
- Demir merkezli (Perferil radikali )
- Azot merkezli ( Nitrik oksid ,Nitrojen dioksid)

Radikal olmayan reaktif oksijen türleri:

- Ozon (O<sub>3</sub>)
- Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Hipoklorik asid (HOCl)
- Singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)
- Peroksinitrit (ONOO)

## **2.2.2. Serbest radikallerin kaynakları:**

Organizmada serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına yol açan endojen ve eksojen kaynaklar bulunmaktadır.

### **2.2.2.1. Endojen kaynaklar**

#### **2.2.2.1.1. Mitokondrial ve endoplazmik retikulum elektron transport zinciri**

İnsan vücudu tarafından alınan oksijenin yaklaşık %85'i mitokondrial elektron transport zincirinde kullanılmaktadır. Mitokondriler adenosin trifosfat (ATP) üretimi için esas kaynağı oluşturan organellerdir. Metabolik enerji üretimi için öncelikle yağ asidi veya glukoz oksidize olur ve elektron taşıyıcıları (örneğin, nikotin adenin dinucleotid (NAD), flavin mononucleotid (FMN), flavin adenin dinucleotid (FAD) yoluyla elektron kaybederler. Sonuç olarak indirgenmiş NAD (NADH) ve flavinler (FMNH<sub>2</sub> ve FADH<sub>2</sub>) oluşur. NADH ve indirgenmiş flavinler iç mitokondrial membranda tekrar oksidize olurken organizmanın temel yakıtı olan ATP kazanılmaktadır (28). Oksidasyon basamaklı bir şekilde gerçekleştiği için enerji salınımı da yavaş yavaş olmaktadır. NADH'dan ayrılan elektronlar zincirdeki enzimlerin yapısında bulunan demir iyonlarının

indirgenmesinde kullanılmaktadır. Elektron transport zincirinde en son oksijeni kullanan oksidaz enzimi, sitokrom oksidazdır. Sitokrom oksidaz demir ve bakır iyonları içerir. Bu metaller oksijenin indirgenmesinde rol oynarlar (29,30). Elektron transport zincirinin erken basamaklarında birkaç elektron oksijene doğru sızmakta ve bu sızma superoksit radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Normal şartlarda mitokondride indirgenen oksijenin %1-3'ü superoksit radikali oluşturabilmektedir. Mitokondri hasar gördüğü zaman sızma artmakta ve dolayısıyla superoksit radikalleri de artmaktadır (31,32).

Endopazmik retikulumda da NADPH-P450 redüktaz enzimidaki flavinlerden oksijene elektron kaçağı olmakta ve superoksit radikalleri oluşmaktadır (28).

#### **2.2.2.1.2. Nötrofil fagositoz sistemi**

Nötrofil ve makrofajların plazma membranında bulunan NADPH oksidaz enzim sistemi aktive olunca (bakteriel enfeksiyon gibi durumlarda) superoksit radikali oluşur, superoksit radikali de hidrojen perokside indirgenir. Mikroorganizmalara karşı savaşmada temel mekanizma olan bu olay solunumsal patlama olarak adlandırılır (28,29).

#### **2.2.2.1.3. Ksantin oksidaz sistemi**

Organizmaya alınan oksijenin %10-15'i mitokondride kullanılmaz, değişik oksidaz ve oksijenaz sistemleri tarafından doğrudan veya kimyasal (enzimik olmayan) tepkimeler yolu ile kullanılır. Ksantin ve hipoksantin ürik asite oksidasyonu ksantin dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenmektedir ve elektronlar oksijene değil  $NAD^+$  üzerine aktarılmaktadır, böylece normal koşullarda ROS üretimi olmamaktadır (28,29). İskemi sırasında sitozolik kalsiyum artması sonucu hücre içi proteazlar aktive olarak ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. İskeminin başlamasıyla ATP katabolizması sonucu oluşan adenozin, inozine dönüştürülür. İnozin de hipoksantine dönüşür. Böylece dokularda biriken hipoksantin ve ksantin reperfüzyonla gelen  $O_2$  ile ksantin oksidaz enzimi aracılığıyla birleşerek  $O_2^{\cdot}$  oluşur (33).

#### **2.2.2.1.4. Araşidonik asit metabolizması**

Prostaglandin sentezindeki ilk basamak olan yağ asiti substratının elde edilmesi için fosfolipaz A<sub>2</sub> enzimi aktive olarak membran lipidlerinden araşidonik asiti ayırmaktadır. Araşidonik asitin eikozonoidlere (prostaglandin, lökotrien ve tromboksan) enzimatik oksidasyonu sırasında ROS oluşumu görülmektedir (28).

#### **2.2.2.1.5. Enzimatik olmayan reaksiyonlar**

Biyolojik olarak öneme sahip birçok molekül demir ve bakır gibi geçiş metallerinin katalizörlüğünde moleküler oksijen tarafından otooksidasyona uğramakta ve superoksit radikali oluşturmaktadır. Bu moleküller gliseraldehit, adrenalin, noradrenalin gibi hormonlar ve dopamin gibi nörotransmitterleri kapsamaktadır (32,34).

#### **2.2.2.2. Eksojen kaynaklar**

Organizmada serbest radikal oluşturan eksojen kaynaklar şunlardır (28,35):

- iyonizan radyasyon,
- hepatotoksinler (Karbon tetraklorür ),
- ksenobiyotikler,
- redoks siklusu yapan maddeler( paraquat, nitrofurantoin),
- kemoterapötikler (Adriamisin ),
- hava kirliliği,
- sigara.

#### **2.2.3. Serbest radikaller ile oluşan hücresel hasarlar:**

Serbest radikaller lipidler, proteinler ve DNA gibi hücresel bileşenlerde oksidan hasar oluşturmaktadır. Serbest radikallerin organizmada oluşturduğu ana etkiler şunlardır:

### **2.2.3.1. Lipid Peroksidasyonu:**

Serbest radikal hasarının esas süreci lipid peroksidasyonu olarak kabul edilmektedir. Yaşlanmayla birlikte dokularda oksidize lipid rezidüleri olan lipofussin pigmenti birikmektedir. Biyolojik membranlar, yüksek oranda doymamış yağ asiti içerirler (PUFA) ve serbest radikal hasarına karşı çok hassastırlar (36,29).

Membrana yapışık poliansatüre yağ asitleri özellikle hidroksil radikali tarafından saldırıya uğrar ve yağ asiti zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile lipid peroksidasyonu başlar. Böylece bir yağ asiti zinciri radikal özellik kazanır. Lipid radikallerinin moleküler oksijenle reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksid radikali meydana gelir. Bu radikal diğer yağ asitlerini etkileyerek serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu lipid peroksidlerinin malondialdehit (MDA) ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona erer (28). Membran lipidlerinin yaşlanmaya bağlı peroksidasyonu membran bütünlüğünün bozulmasına ve sonuç olarak sinyal iletimi veya iyon geçirgenliği gibi yaşamsal fonksiyonlarda bozulmaya yol açar. Lipid peroksidasyonun göstergesi olarak Tiobarbiturik asitle reaksiyona giren maddeler (TBARS) içeriği doku, idrar veya plazma örneklerinde ölçülmektedir (37,38).

### **2.2.3.2. DNA ve serbest radikal hasarı:**

ROS herhangi bir hücresel yapı veya moleküle saldırabilir, bununla birlikte yaşlanma süreci düşünüldüğü zaman esas hedeflerinden biri DNA'dır. ROS pürin ve pirimidin bazlarında kimyasal modifikasyonlara neden olabilir ve oksidatif baz modifikasyonları mutasyonla sonuçlanabilir (39). Hidroksil radikali DNA'nın bütün bazlarında modifikasyon oluştururken, singlet oksijen öncelikle 8-hidroksilasyon yoluyla guanin bazını modifiye etmektedir. DNA hasarı deoksinukleotidleri ve bazıları serbestleştirilen endonukleaz ve glikozilaz enzimleriyle onarılmaktadır. Bazlar direk olarak idrara atılır, deoksinukleotidler ise idrara atılmadan önce mononukleotidlere metabolize edilir. Oksidasyona uğrayan nukleotidlerin idrarda bulunmaları bu sürecin patolojik olmayan koşullarda da oluştuğunu göstermektedir. Oksidatif DNA hasarını belirlemek için çoğunlukla idrarda 8-hidroksiguanin ve 8-hidroksi-2-deoksiguanosin ölçümü kullanılmaktadır (40,41).

### **2.2.3.3. Proteinler ve serbest radikal hasarı:**

Proteinler ve proteinlerin yapıtaşı olan aminoasitler de serbest radikallerin hedeflerindedir. Serbest radikaller kovalan olarak proteinlere bağlanırlar. Membran lipidlerinin oksidasyonu sonucu oluşan lipid radikalleri proteinlere hasar verebilmekte ve proteinlerin parçalanmasına neden olmaktadır, ayrıca lipoproteinlerin oksidasyonu ateroskleroz gibi vasküler hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır (32). Proteinlerin amino asit yan zincirlerinin oksidatif hasarı sonucu protein oksidasyon ürünleri ve karbonil türevleri oluşabilmektedir. Serbest radikaller, proteinlerde parçalanmaya ve polimerizasyona yol açarlar. Proteinlerdeki karbonil grupları oksidatif hasarın göstergesi olarak kabul edilmektedir. Serbest radikal hasarının bir göstergesi olarak protein oksidasyon ürünleri, spektrofotometrik yöntemle doku veya plazma örneklerinde ölçülebilmektedir (32,37).

#### **2.2.3.4. Karbonhidratlar ve serbest radikal hasarı:**

Hidroksil radikallerinin karbonhidratlara, özellikle glikoza etki etmesi sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır. Ayrıca glikoz, aldehit grubu içermesi nedeniyle toksik etki yapabilmektedir. Aldehitler reaktif maddelerdir ve proteinler ile DNA'ya bağlanarak enzimatik olmayan glikasyonlarına yol açarlar. Glikasyon reaksiyonu glikoz seviyeleri yükseldiğinde daha kolay oluşur ve diabetli hastaların bazı proteinlerinde saptanabilir (28,32). Glikasyon ürünlerinin serbest radikallerle oksidasyonu sonucu ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşur. AGE birikimi doku hasarına neden olur, kollajen dokuda birikmesi elastikiyet kaybına ve böbrekte bazal membran hasarına neden olabilir (28).

#### **2.3. Antioksidan savunma mekanizmaları**

Okside olabilen bir maddenin oksidasyonunu geciktiren ya da önleyebilen maddeler antioksidan olarak tanımlanmaktadır (36). Belirli bir düzeye kadar olan oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir seviyede bulunan doğal endojen antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli bir düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz kalırsa, oksidan moleküller organizmanın yapı taşları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asid ve yararlı enzimleri hasara uğratırlar (29,42).

Antioksidan savunma sistemi aşağıdaki komponentlerden oluşur (28,36,39):

- Serbest radikaller ve diğer reaktif türleri ortadan kaldıran enzimler: Superoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutatyon Peroksidaz (GPx).

- Demir ve bakır iyonları gibi pro-oksidanların etkilerini en aza indiren proteinler. Örneğin; transferrin, haptoglobulin.

- Düşük moleküler ağırlıklı ajanlar. Örneğin; glutatyon,  $\alpha$ -tokoferol. Askorbik asit ve  $\alpha$ -tokoferol gibi bazı düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar diyetle alınırlar. Beslenme ve antioksidan defans arasında özel bir ilişki bulunmaktadır.

- Biyomolekülleri hasarlanmaya karşı koruyan diğer moleküller. Örneğin; ısı şok proteinleri.

- İlaçlar. Örneğin; sitokinler (TNF ve interlökin), demir şelatörleri (desferroksamin, dimetil tioüre, seruloplasmin), ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipurinol), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin lokal anestezipler, Ca kanal blokerleri, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar), mannitol, barbitüratlar, flavonoidler, trimetazidin, indepamid, H<sub>2</sub> reseptör blokerleri.

### **2.3.1. Antioksidan savunma enzimleri**

#### **2.3.1.1. Süperoksid dismutaz (SOD)**

SOD oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. Bu enzim sadece süperoksid radikali için spesifiktir. Enzimatik olmayan koşullarda çok yavaş olan süperoksidin dismutasyonunu hızlandırarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturmaktadır. Karaciğerde SOD aktivitesi kalbe göre dört kat daha fazladır. Memeli dokularında SOD enzimi temelde hücre içi yerleşimlidir, %10 kadarı hücre dışında bulunmaktadır (28). SOD'un üç farklı formu bulunmaktadır (28,43,44):

1. Bakır ve çinko içeren (Cu-Zn SOD) dismutazlar (Sitozolik SOD) : Aktif bölgesinde bakır ve çinko içerir. Bu enzim protein yapısındadır ve hücrelerin sitoplazmasında yerleşmiştir. Çinkonun stabiliteyi sağladığı, bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çinkonun ayrılması irreversibl iken bakır reversible olarak ayrılıp tekrar bağlanabilir. Isıtmaya, proteazlara ve üre gibi ajanlarla denaturasyona karşı dirençlidir. Cu-Zn SOD karaciğer, beyin ve testiste en yüksek, akciğer ve pankreasta ise en düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır.

2. Manganez içeren (Mn-SOD) dismutazlar (Mitokondrial SOD) : Mitokondri matriksinde bulunan Mn-SOD birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşur ve her alt birim



başına birer atom mangan bağlıdır. Aktif bölgeden manganın uzaklaştırılması katalitik aktiviteyi ortadan kaldırır. Isı veya kimyasallarla denaturasyona karşı CuZnSOD'a göre daha dayanıksızdır.

3. Demir içeren dismutazlar (FeSOD) : Aktif bölgesinde demir iyonu taşımaktadır. Hücre matriksinde yerleşmiştir ve iki protein alt ünitesi vardır Yapısal olarak Mn-SOD 'a büyük benzerlik göstermesine rağmen her iki enzim de aktif bölgelerinde kendi metal iyonları olduğu zaman çalışabilmektedir. Mn-SOD enziminin endojen süperoksid radikallerine karşı, Fe-SOD enziminin ise eksojen radikallere karşı koruyucu etki gösterdiği kabul edilmektedir. Azid ile inhibisyona karşı çok duyarlıdır. FeSOD bitkilerde ve bazı bakteri türlerinde bulunmaktadır.

### **2.3.1.2. Katalaz (CAT)**

Katalaz enzimi peroksidazlar grubunun bir üyesidir. Aktif bölgesinde hem grubu içermektedir. Hidrojen peroksidin ortadan kaldırılmasını katalizlemektedir. Katalaz, düşük hızlarda  $H_2O_2$ 'nin olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle,  $H_2O_2$  oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle  $H_2O_2$ 'i suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır. Beyindeki aktivitesi karaciğere göre daha düşüktür. CAT enzimi özellikle karaciğerde yoğun olarak bulunmaktadır, beyin, kalp ve iskelet kasındaki seviyeleri daha düşüktür (28,45).

### **2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx):**

GPx, hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin temizlenmesinde görevlidir. Dört adet protein alt ünitesinden oluşmuştur ve her biri aktif bölgesinde selenyum atomu taşımaktadır (37).GPx, hidrojen peroksiti indirgenmiş glutatyonla bağlayarak suya indirgenmesini sağlamaktadır. Bu reaksiyon sırasında indirgenmiş glutatyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatyonla çevirir (GSSG). GSH düşük moleküler ağırlıklı ve tiyol (-SH) içeren bir tripeptiddir. Reaksiyona giren glutatyonlar disülfid bağları ile bağlanarak indirgeyici özelliklerini yitirirler, bu sebeple GSSG'nin tekrar GSH'a döndürülmesi gerekmektedir. Bu reaksiyon NADPH bağımlı bir enzim olan glutatyon redüktaz tarafından katalizlenir. Reaksiyonda kullanılan NADPH ise pentoz fosfat yolundan sağlanır (46,47,48).

GPx iki tip enzim içermektedir. Birincisi, klasik tip GPx'dir. Plazmada düşük seviyelerde bulunmaktadır, plazmada GSH seviyesi de çok düşük olduğu için GPX enzimi olarak fonksiyon görüp görmediği tam olarak bilinmemektedir. İkincisi, fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidazdır. Bu enzim yağ asidi ve kolesterol hidroperoksidleri azaltmakla görevlidir (28).

### **2.3.2. Diğer antioksidan moleküller**

#### **2.3.2.1. Glutatyon**

Glutatyon organizmada birçok metabolik süreçte rol oynamaktadır. Bunlardan başlıcası, glutatyon peroksidaz enzimi için kofaktör oluşturmasıdır. Ayrıca, askorbik asit metabolizmasında, hücreler arası haberleşmede, proteinlerin sülfidril gruplarının oksidasyonunu engellemede ve hücre içi bakır transportunda görev almaktadır. Glutatyon, hidroksil radikali, peroksil radikali ve peroksinitrit gibi serbest radikallerle reaksiyona girerek temizlemeye çalışmaktadır (46,48).

#### **2.3.2.2. Transferrin**

Ekstrasellüler sıvılarda antioksidan savunma enzimlerinin çok düşük seviyelerde bulunmaktadır. Bu sebeple plazmada, E vitamini, C vitamini veya ürat gibi moleküller antioksidan savunmaya katkıda bulunmaktadır. Plazmada transferrin oranının yüksek olması antioksidan savunmada esas rolü üstlendiğini göstermektedir. Transferrin, geçiş metallerini bağlayarak serbest radikallerle reaksiyona giremeyecekleri bir forma getirmektedir (28,49).

#### **2.3.2.3. Nutrisyonel antioksidanlar**

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki sebze ve meyve tüketimi ile iskemik kalp hast ve ölüm arasında anlamlı bir ilişki vardır, fakat MSS ile ilgisi bakımından veriler çok azdır. Yaşlı hayvan ve insanlarda antioksidan korumanın artırılması ile bilişsel performansın ve konsantrasyon güçlüklerinin düzeltilmesi mümkündür (50). Yüksek miktarda antioksidan verilen hayvanların ortalama yaşam süresinin uzadığı görülmüştür (39).

Yaşlılarda serum E vitamini seviyesinin düşmesiyle hafızanın zayıfladığı ve askorbik asit ile betakaroten seviyelerinin yükselmesi ile de güçlendiği gösterilmiştir. E vitamininin Alzheimer gelişimini de önleyebileceği ileri sürülmüştür (45,50). A ve E vitaminleri ayrıca prematürlerde, parenteral beslenmede ve kanser hastalarında da

önemli rol oynamaktadır. E vitamini eksikliğinde eritrosit yaşam ömrü düşmekte, nörolojik fonksiyonlarda bozulma, bazı kanser türlerinin oluşumu ve immun yanıtlarda bozulma görülmektedir. Yüksek seviyede E vitamini ise yaşlı kişilerde enfeksiyon insidansını azaltmaktadır (39,45,51).

A vitamini büyüme, üreme, görme ve immun sistem için gereklidir, ayrıca karsinogenesis üzerine inhibitör etkisi vardır (39). Organizmada sentezlenemediği için diyetle alınması gereken bir vitamin olan C vitamini (askorbik asit), özellikle kollajen sentezinde görevli olan enzimler tarafından kofaktör olarak kullanılmaktadır ve beyindeki konsantrasyonu oldukça yüksektir (45). C vitamininin antioksidan özelliklere sahip olduğu ve biyomolekülleri ROS hasarına karşı koruduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Diyetle C vitamini kısıtlaması yapılan hayvanların dokularında E vitamini seviyesinin de düşmesi C ve E vitaminleri arasında ilişki olduğunu düşündürmektedir ve E vitamininin döngüsünde rol aldığı ileri sürülmektedir. Ayrıca C vitamini, özellikle sigara içenlerde hücre zarlarını lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu bilinmektedir (28,45). Bu sebeplerle diyetle alınan antioksidanlar kanser ve KVH ile birlikte MSS üzerine de koruyucu etki yapabilir.

#### **2.4. Beyin ve serbest radikaller:**

Beyin dokusu oksidatif strese yatkınlık göstermektedir. Bu yatkınlığın başlıca sebepleri şunlardır :

- Nöronal membranlar arasında kalsiyum (Ca) trafiğinin hızlı olması. Normalde hücre içinde serbest kalsiyum seviyesi çok azdır, Ca mitokondri içinde, endoplazmik retikulumda veya kalmoduline bağlı olarak bulunmaktadır. Organizmada ROS oranı artarsa mitokondri hasar görebilir ve Ca açığa çıkarak serbest hale geçer. Serbest Ca oranının artması hücrede iki yönde etki yapar; birincisi, membran yapısını bozabilir, ikincisi kendisine bağımlı enzimler olan nitrik oksit sentaz ve fosfolipaz A<sub>2</sub> enzimlerinin aktiviteleri artar. Sonuç olarak NO radikali oluşumu artar ve hücre hasar görür (28).

- Oksijen tüketiminin yüksek olması. Diğer dokularda olduğu gibi beyinde de mitokondri O<sub>2</sub> ·<sup>-</sup> oluşturabilir ve mitokondrial DNA'da yaşla beraber mutasyon ve delesyonlar artabilir (52,53).

- Eksitotoksik aminoasitlerin varlığı (örn. Glutamat ve aspartat). Oksidan stres nöronlardan eksitatör aminoasitlerin salınımını arttırabilir ve bir kısır döngüye yol

açabilir. Diğer bir olasılık da ROS'ların glial hücreler tarafından glutamat uptake'ini azaltabilmesidir (28).

- Nörotransmitterlerin otooksidize olabilmesi. Dopamin, L-DOPA ve noradrenalin  $O_2$  ile reaksiyona girerek  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  ve reaktif kinonlar oluşturabilir (28).

- Beyin omurilik sıvısının (BOS) plazmadan farklı olarak demir bağlama kapasitesine sahip olmaması. BOS'ta total demir ve ferritin değerleri birbirine çok yakındır, dolayısıyla BOS'taki ferritin yaklaşık olarak demir saturasyonuna eşittir. Beyin dokusunun hasarı serbest radikal reaksiyonlarını katalizleyecek şekilde demir iyonları salınmasına neden olur. Örneğin,  $H_2O_2$ 'den  $O_2^{\cdot-}$  oluşumu, lipid peroksidasyonu ve nörotransmitterlerin otooksidasyonu gibi (28,52).

- Nöron zarlarında lipidlerin, yüksek oranda kolayca okside olabilen çoklu doymamış yağ asiti içermesi (52,53).

- Beyin metabolizmasının  $H_2O_2$  oluşturması. Örneğin, dopaminin MAO ile oksidasyonu sırasındaki oluşumu gibi (28).

- Antioksidan enzimlerin düşük seviyede olması. Özellikle CAT çoğu beyin bölgesinde düşük seviyededir (52,53).

- Glial hücrelerin bir kısmının mikroglialardan oluşması. Mikroglialar sinir sisteminin makrofajlarıdır ve diğer makrofajlar gibi aktive olduklarında  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  oluşturabilir, sitokin sekrete edebilir (IL1, IL6,  $TNF\alpha$  gibi).  $TNF\alpha$  aktivasyonu ile de ROS oluşumu artabilir ve hücre hasarıyla sonuçlanabilir (28).

## **2.5. Apoptoz:**

Apoptoz, Yunanca'da apo (ayrı) ve pitozis (düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir. 1980'lerin ortasına kadar hücre ölümünün tek türü, infarktüste görülen masif hücre ölümü olarak klasik kitaplarda tanımlanmıştır. 1971'de Avustralya'lı bir patolog olan Kerr, rat karaciğerinde çalışırken gördüğü değişiklikleri büzülme nekrozu olarak tanımlamıştır. İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından "fizyolojik hücre ölümü" ifadesi tanımladıktan sonra yine ilk olarak Wyllie ve Kerr tarafından glukokortikoidlere maruz kalan timus hücreleri üzerinde yapılan deneysel bir çalışma ile gösterilmiştir (54, 55). 1983 yılında Duke ve ark, jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk

biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir. Bu tarihten sonra apopitoz ile ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde artmıştır (56).

Apopitoz; normal embriyonik gelişimde, timusta reaktif hale gelen T hücrelerinin delesyonu gibi çeşitli organ sistemlerinin olgunlaşmasında, lökosit gibi olgunlaşmış hücrelerin yenilenmesinde ve geç prostatik gerileme gibi olgularda kritik rol oynayan programlanmış hücre ölümüdür (54). Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen ATP miktarının azalması, hücre homeostazının hızla bozulduğu, inflamasyon yanıtının geliştiği bir olaydır. Apoptoz ise nekroza tamamen farklı olarak inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır (56). Apoptozis rejenerasyon ve tamir olaylarında, hücre homeostazının sağlanmasında ve organ büyüklüklerinin korunmasında önemlidir. Hastalıklar gereğinden fazla apopitoz sonucunda veya apopitozun yetersizliği gibi durumlarda ortaya çıkabilmektedir. Apopitozun artması nörodejeneratif hastalıklara, AIDS'de görülen lenfosit yetersizliğine; azalması ise malignite ve otoimmün hastalıklara yol açabilir. Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler. Bu mekanizmalar apopitoz ve nekrozdur. Apopitoz fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilirken nekroz patolojik bir olaydır (57,58).

Apopitoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Programlı hücre ölümünün moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olmasıyla başlamaktadır. Ayrıca apopitoz mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyarılar genel olarak; büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir. Bunlardan özellikle protoonkojenlerin (c-myc gibi) çoğunun apopitozun regülasyonunda yer aldığı kanıtlanmıştır. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler. Apoptozda, hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de, bazen apopitoz dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apopitoz gelişmesine yol açabilir (57).

Nekrozda apoptozdan farklı olarak hücre sel büzüşme yerine şişme olur, bu nekrozun erken belirtisidir. Patolojik hücre ölümü yani nekrozun klasik nedenleri içinde ise hipertermi, oksidatif fosforilasyon-Krebs siklusu ya da glikolizisin inhibisyonu, otolizis, hipoksi ve çeşitli toksinler yer alır. Hücre tarafından genlerle programlanmayan ve çeşitli dış etkenlerle gerçekleşen nekrotik hücre ölümünde; enerji depolarında ani azalma ile birlikte hücre zarının geçirgenliği bozulur ve sodyum ile suyun hücre içerisine girmesine neden olur, böylece hücre şişer. Ayrıca hücreyle birlikte mitokondrilerde de şişme gözlenir, diğer organeller ise plazma içinde dağılır. Şişme sonucunda hücre zarı patlar ve bütünlüğünü kaybeder, proteolitik enzimler içeren plazma, hücreler arası boşluğa sızar, doku çevresinde inflamasyon ile birlikte zedelenme oluşturur (54,59).

### **2.5.1. Apoptoz ve hücre morfolojisi:**

Canlı hücrelerde hücre ölümü iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan biri fiziksel veya kimyasal reaksiyonlar sonucunda patolojik olarak gerçekleşen nekroz, diğeri ise programlı hücre ölümü olarak bilinen fizyolojik veya patolojik bir uyararla meydana gelebilen hücre ölüm mekanizması olarak bilinen apoptozdur (60). Apoptotik hücre ölümü, nekrotik hücre ölümünden farklı bir süreç izlemektedir. Apoptotik ölümün ilk başlangıcında, ölmek üzere komut almış hücreyi normal hücreden morfolojik olarak ayırt etmek mümkün değildir. Yaklaşık iki saat sonra, apoptoza gidecek hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar ve belirli bölgelerde sıkıştıkları izlenir. Sitoplazma yoğunlaşmaya ve hücrenin boyutları küçülmeye başlamıştır. İkinci saatin sonunda apoptoza uğrayan hücrelerde yeni değişiklikler ortaya çıkar ve hücre apoptotik cisimcik denilen daha küçük parçalara bölünür. Bu parçacıkların en büyük özelliği, fragmente olmuş nükleusların ve parçalanmış hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplanarak immün sistemi enflamasyon yönünde uyarmamasıdır. Apoptotik cisimcikler, yüzeylerinde yeni sinyal yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yandaki hücre tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Tüm bu süreç yaklaşık 5 saatte tamamlanır (61, 62).

Nekrotik ölüm ise çoğunlukla hücre hasarı ile ortaya çıkar. Hasarlanan hücre önce şişer ve sonra parçalanır. Hücrelerin parçalanması sonucu ortaya çıkan prostaglandinler, lökotrienler, serotonin, histamin gibi vazoaktif aminler, hasara en yakın damar endotelini uyarır. Damar endoteli ise selektin yapımını uyarır. Selektin plazma membranının dış yüzeyine yapışır ve lökositlerin burada yavaşlaması ve yapışmasını sağlar. Daha sonra integrin ligandları aynı hücre parçalanma ürünleri ile uyarılır ve

lökositler hücre hasarının olduğu bölgeye doğru çekilmeye başlarlar. Bu sürecin ardından iltihaplanma dediğimiz kızarıklık, ödem ve ağrı ile tanımlanan inflamatuvar reaksiyonlar başlar. Apoptotik hücre ölümlerinde inflamasyona ait klinik septomların olmaması, immün sistemi uyarmadığı için otoimmün cevapların ortaya çıkmaması ve apoptotik hücre ölümlerinin enerji bağımlı olması temel farkları oluşturmaktadır (61, 63).

Apoptozisin görüldüğü örnekler aşağıda özetlenmiştir (59, 64,65):

- Embriogenez esnasında hücrelerin destrüksiyonu,
- Omurgalıların nöron gelişimi sırasında nöron hücrelerinin azalması sırasında ve aksonları hedeflerine ulaşmayan nöronların ortadan kaldırılarak nöronlarla hedef organlar arasındaki bağlantı hatalarının kaldırılmasında
  - Derideki keratinositlerin yüzeye göç edip epidermisin en üst tabakası olan stratum korneumu oluşturmalarında,
  - Prolifere olan hücre popülasyonlarında hücre delesyonu, örnek intestinal kript epiteli,
  - Tümörlerde regresyon fazında hücre ölümü,
  - Akut inflamatuvar cevapta nötrofillerin ölümü,
  - İmmün hücrelerin ölümü, sitokin deplesyonu sonrası B ve T lenfositler ile gelişmekte olan timusta otoreaktif T hücrelerin ölümü,
  - Sitotoksik T hücrelerce indüklenen hücre ölümü
  - Parenkimal organlarda duktus obstrüksiyonu sonrası patolojik atrofi
  - Viral hastalıklarda hücre hasarı,
  - Toksik uyanlardaki hücre ölümü, ancak nekroz oluşturacak dozdan daha az verildiğinde, ısı, radyasyon, sitotoksik kanser ilaçları ve hipoksi.
  - Apoptozis birçok hastalıkla da yakından ilişkilidir. Örneğin apoptozisin artması AIDS hastalığının karakteristik özelliğidir. İskemik beyin hasarında apoptozis gözlenir. Alzhemier, Parkinson, amyotrofik lateral skleroz gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta, miyokardial enfarktüsten sonra iskemik hasarda, reperfüzyon hasarında, hepatit ve otoimmün hastalıklarda gözlenir.

### **2.5.2. Apoptozun moleküler mekanizması:**

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

- I) Apoptozun başlatılması,

- II) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,
- III) Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,
- IV) Fagositoz, olarak özetlenebilir (56).

Apoitozun başlangıç aşaması kaspaz aktivasyonunda başlangıç, hücre redoks potansiyelinde değişiklik, hücre küçülmesi, membran lipid asimetrisinde kayıp ve kromatin kondansasyonu ile karakterizedir. Sonraki aşamalar kaspazlar ve endonükleazların aktive olması, apoptotik cisimlerin oluşumu ve hücre fragmantasyonu ile karakterizedir. Bir hücrede apoptozun aktivasyonu ekstensek ve intrinsek mekanizmalarla düzenlenir (66):

1- Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (Tümör nekrozis faktör süperailisi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen apoptoz: Hücre membranındaki reseptör moleküller farklı efektörleri aktive ederek hücre davranışlarını değiştirebilirler. Hücre membran reseptörleri hücre ölümünü de tetikleyebilir. Hücre yüzeyi ölüm reseptörleri Tümör necrosis faktör reseptör (TNFR) süperailisine ait transmembran proteinleridir. Bu reseptörler hücre dışındaki bölgelerde sisteinden zengin bölgelerde yer alırlar. Ölüm reseptörleri sitoplazmanın iç kısmında ölüm bölgesi (death domain) denen protein zincirleri taşırlar. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyarırlar ve hücre dışından gelen uyarıyı hücre içine iletirler. Bu yolağın prototipi Fas proteinidir. Fas yalnızca Fas ligandı (FasL) olarak isimlendirilen bir ekstrasellüler sinyal tarafından tetiklenir. FasL, Fas'a bağlandığı zaman kaspaz 8'i aktive eder ve tüm kaspaz zinciri olaya katılır (55, 58, 67).

2- Hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenen apoptozis: Mitokondri apoptotik hücre ölümünü indükleyicilerin kontrol noktası olarak görülmektedir. Mitokondriyal yolla hücrenin apoptozise uğraması öncelikle kaspazları aktive eden proteinleri içermesi nedeniyle çok önemlidir. Apoptozise ilişkin birçok mitokondriyal protein, mitokondrilerin iç membranında bulunur. Apoptotik tetiklenme sonucu mitokondriyal proteinler sitoplazma veya çekirdeğe salınarak mitokondriyal ve sitoplazmik apoptozisi kontrol eden proteinlerin etkileşimi sonucunda hücrenin yaşam ve ölüm dengesi sağlanır. Mitokondriyal Permeability transition pore (PTP) veya bu proteinin bir bileşeni sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasında yer almaktadır. Bu proteinin Bax ile açılması veya Bcl-2 ile kapanması apoptozdaki rollerini ortaya koymaktadır. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir. Bu grubu oluşturan proteinlerin bir kısmı antiapoptotik, bir kısmı ise proapoptotiktir. Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri mitokondri dış zarı ile bağlantılıdır ve mitokondri bütünlüğünü korurlar. BH1, BH2,



BH3, BH4 bölgelerininin hepsini içerirler. BH4 bölgesinin apoptozisin diğer hücresele yollarla ilişkisini kurduğu düşünülür. Anti-apoptotik üyeler, sitokrom c'nin salınmasını baskırlar. Sitokrom c'nin salınımı hücrede apoptozisin başladığının göstergesidir (58, 59).

Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyeleri mitokondri dışı ile bağlantılıdır ve bu zararın bütünlüğünü bozarlar. Pro-apoptotik üyeler sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımını tetikler. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki gruba ayrılır; yapılarında her üç bölgeyi içeren (BH1, BH2, BH3) üyeler (örneğin Bak, Bax) ve sadece BH3 bölgesi (BH3-only) içeren üyeler (örneğin Bid, Bad, Bim) (59).

Apoptozis gelişiminde bir diğer yol, viral enfeksiyonlara karşı esas savunma mekanizmaları olarak tanımlanan sitotoksik T-hücrelerinin (CTL) viral yolla enfekte olmuş hücrelerde apoptozise neden olmasıdır. CTL hücreleri yüzeylerinde Fas/CD95 taşırlar ve Fas ligand eksprese ederler, böylece Fas taşıyan hedef hücreleri öldürebilirler. Sitoplazmalarında granzim B deneni serin proteaz ve perforin proteini içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler. CTL hücreleri hedef hücre membranında perforin aracılığı ile por oluşturur ve hedef hücre sitoplazmasına granzim B salgılar. Granzim B hedef hücrelerde kaspazları aktive ederek hücreyi apoptozise götürür (59).

p53, % 50-55 insan kanserleri ile ilişkili bir tümör supressor genidir. p53, hücre siklusunun kontrol noktalarında yer alıp, hücre siklusunun G1 fazında durması ya da hücrede DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse programlı hücre ölümünü indüklenmesi sırasında aktive olur. Aktive olmuş p53, hücre siklusunun durması, hücresele yaşlanma ve birçok tümör oluşumunun engellenmesinde rol oynamaktadır. p53 geni, mitozu engelleyip hücre diferansiasyonunu ve DNA onarımını p21 üzerinden yaparken, hücreyi apoptozise Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak, Bax salınımını ise arttırarak yani Bcl-2/Bax oranını değiştirerek yaptığı düşünölmektedir (58, 59).

### **2.5.3. Apoptoz saptama yöntemleri:**

Apoptozis hücre morfolojisi esas alınarak ya da histokimyasal ve biyokimyasal teknikler kullanılarak hücrede DNA kırıklarının belirlenmesi yoluyla saptanabilir.

- Apoptotik hücre morfolojisinin değerlendirilmesi: Işık mikroskopu ile incelendiğinde apoptotik hücrelerin önemli özellikleri yoğunlaşmış ve büzüşmüş bir sitoplazma ile çekirdeksel değişikliklerdir. Kromatin kondenzasyonu ve kromatinin çekirdek zararının periferinde toplanması, çekirdeğin küçülmesi ve parçalara ayrılması en önemli morfolojik özellikleridir (65). Floresan maddelerin (Hoechst boyası, DAPI,

propidium iyodur) kullanılması ile yapılan boyalarla floresan mikroskopu ile inceleme yapılabilir. Apoptotik hücre karakterindeki çekirdek ve hücrel organeller düzeyindeki değişiklikler elektron mikroskopu ile gözlemlenebilir. Kültür ortamlarında üretilen hücreleri incelemek amacıyla faz kontrast mikroskopu kullanılabilir. Faz kontrast mikroskopu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepçikler izlenebilir. Hücreler henüz ortama yayılmış halde iseler hücrelerin sitoplazmalarında ortaya çıkan vakuoller gözlenebilir. Bu vakuoller hücreden ayrılıp besiyeri içinde yüzebilirler. İçleri boş küresel yapılar olarak olarak gözlenen bu hücreler hayalet hücre (ghost cell) olarak adlandırılır (68).

- DNA fragmentasyonunun belirlenmesi: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) yöntemi tek ya da çift iplikli DNA kırıklarına işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızla parçalanmakta olduklarından, birdenbire hücre içerisindeki kromatin ağ, bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir. Hücrede terminal deoxynucleotidyl transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin dUTP'yi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları, ortama FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin eklendiğinde görünür hale gelirler (59).

- İn situ hibridizasyon tekniği: Apoptotik DNA'nın denaturasyona duyarlılığı, formalin ile tespit edilip parafine gömülmüş dokularda apoptozisin belirlenmesi için işaretlenmiş poly (A) problemleri kullanılması esas alınarak belirlenir (69).

- Anneksin-V yöntemi: Normalde hücrenin iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserinler apoptozis süresince hücrenin dış yüzüne çıkarlar. Bu fosfatidilserinler bir floresan madde (örn: FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilebilir ve apoptotik hücreler saptanmış olur. Bu belirleme flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılır ve floresan mikroskopu ile incelenir (59).

- Apoptozise özgü proteinlerin saptanması: Western blotting ya da immunohistokimya yöntemleri kullanılarak sadece apoptotik hücrelerde aktif hale gelen (örneğin kaspazlar) ya da eksprese olan (örneğin Bcl-2 vb) bazı proteinlerin dokuda tespit edilmesi esasına dayanır.

## 2.6. Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sistemi beyin ve medulla spinalisten oluşmaktadır. Makroskopik olarak gri cevher ve beyaz cevher bölümlerine ayrılmaktadır. Genel olarak gri cevherde çoğunlukla nöron gövdeleri, beyaz cevherde aksonlar yer almaktadır. Aksonların miyelin kılıfı nedeniyle beyaz cevher açık renkli olarak görülmektedir. Serebral hemisferlerdeki gri cevher, girus ve sulkuslar olarak adlandırılan birçok katlantı oluşturmaktadır. Beynin bu bölgesi öğrenme, bellek, bilginin analizi, motor yanıtların başlatılması ve duysal uyarıların entegrasyonu ile ilgilidir. Beyinde, nöronların yoğun ve diffüz yerleşim gösterdiği yüzeyel bölgesi serebral korteks olarak isimlendirilmektedir. Histolojik olarak serebral korteks, farklı tabakalara yerleşmiş beş morfolojik tipte nöron içermektedir. Neo-korteks olarak isimlendirilen bölgeler altı tabakadan oluşmaktadır. Neo-korteks duysal ve motor alanları içermektedir ve insanlarda serebral korteksin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Üç tabakadan oluşan eski korteks yalnızca olfaktör korteks ve temporal lobdaki limbik sistem bölümlerinde bulunmaktadır. Serebral korteksteki nöron tipleri şunlardır:

1-Piramidal nöronlar; hücre gövdeleri piramidal şekillidir, apeksleri korteks yüzeyine doğrudur. Hücrenin tabanından çıkan akson alttaki beyaz cevhere doğru ilerler ve derin tabakalarında sinaps yapar. Apekten ayrılan dendrit yüzeye doğru ilerler ve orada ince dallara ayrılır. Ayrıca hücre tabanının köşelerinden çıkan ve lateral olarak uzanan kısa dendritleri de bulunmaktadır. Piramidal nöronların büyüklükleri değişkendir. Motor korteksteki Betz hücreleri olarak isimlendirilen nöronlar korteksteki en büyük çaplı piramidal hücrelerdir.

2- Stellat (granüler) nöronlar; Kısa bir aksonu ve kısa, dallanan dendritleri nedeniyle yıldız şeklinde görünen küçük nöronlardır. Rutin histolojik metotlarla küçük granüller şeklinde görülebilmesi nedeniyle granüler nöron olarak da isimlendirilmektedir.

3- Martinotti nöronları; birkaç kısa dendriti bulunan küçük poligonal şekilli nöronlardır. Aksonu yüzeye doğru uzanır ve korteksin en üst tabakasında horizontal olarak ikiye ayrılır.

4- Fuziform nöronlar; iğ şeklindeki nöronlardır. Aksonu yüzeye doğru ilerler, dendritleri derin tabakalara doğru dallanarak ilerler.

5- Cajal'ın horizontal nöronları; küçük ve iğ şekilli hücrelerdir, yüzeye paralel olarak uzanırlar. Kortekste en az görülen hücrelerdir ve sadece en yüzeyel tabakada bulunurlar. Aksonu piramidal nöronların dendritleri ile sinaps yapar.

Neo-korteks içerdığı nöronların tipine, büyüklüğüne ve yoğunluğuna göre altı tabakaya ayrılır. En yüzeysel tabaka piamaterin hemen altında uzanır, en içteki altıncı tabaka beyaz cevher sınırında bulunur:

1- Pleksiform (moleküler) tabaka; en yüzeysel tabakadır. Sinaps yapan dendrit ve aksonları ve Cajal hücrelerini içermektedir.

2- Dış granüler tabaka; küçük piramidal hücreler ve stellat hücrelerin oluşturduğu ince bir tabakadır.

3- Piramidal tabaka; orta büyüklükteki piramidal hücreler bulunur, ayrıca Martinotti nöronları da bulunabilir.

4- İç granüler tabaka; stellat nöronlardan meydana gelmiştir.

5- Ganglionik tabaka; büyük çaplı piramidal hücreler, az sayıda stellat ve Martinotti hücreleri bulunmaktadır. Tabakanın adı içerdığı dev Betz hücrelerinden gelmektedir.

6- Multiform tabaka; tüm hücre tiplerini içermesi nedeniyle bu ismi almıştır (70,71).

## **2.7. Prefrontal korteks**

Beyin korteksinin ön kutbu prefrontal korteks olarak tanımlanmaktadır. Prefrontal korteksin hipotalamus, subtalamus, mezensefalon, limbik sistem ve serebellumla nöral bağlantıları bulunmaktadır. Bu bağlantılar aracılığıyla prefrontal korteks dikkat, öğrenme, bellek ve sosyal davranışların oluşumunda rol oynamaktadır. Histolojik olarak korteksin tipik altı tabakalı yapılanmasını göstermektedir. Özellikle 4. tabaka olan içgranüler tabakası belirgin olarak görülmektedir ve bu nedenle frontal granüler korteks olarak da isimlendirilmektedir.

## **2.8. Korpus striatum**

Korpus striatum bazal ganglion çekirdeklerinden biridir. Kaudat nukleus ve putamen birlikte korpus striatum olarak isimlendirilmektedir. Prefrontal korteks gibi altı tabakalı yapılanma göstermektedir. Özellikle II, V ve VI. tabakalardaki nöronlar korteksten uzanan piramidal nöron uzantıları ile sinaps yapmaktadır. Yapısında %96 oranda spiny nöronlar olarak isimlendirilen nöronlar bulunmaktadır. Yapının kalanını Deiters nöronları ve ara nöronlar oluşturmaktadır. Korpus striatum hareketin planlanması ve düzenlenmesi ile bilişsel süreçlerde rol oynamaktadır.

## **2.7. Hipokampal formasyon**

Hipokampal formasyon; subikulum, Ammon boynuzu (hipokampus proper) ve girus dentatustan oluşmuştur. Ammon boynuzu CA (cornu ammonis) olarak kısaltılır ve dört bölgeye ayrılır. CA1, CA2 ile birleşerek lateral ventrikülün temporal boynuzunun medial tabanını oluşturur. CA2 kompakt bir piramidal hücre tabakasından oluşmuş olması nedeniyle rahatlıkla tanınabilir. CA3 girus dentatusun hilusunda sonlanan bir medial dal oluşturur. CA4, hilusun içinde uzanır ve son plak olarak da isimlendirilir. CA1, hasarlanmaya karşı en duyarlı olan bölgedir. CA2 ise diğer bölgelere göre daha dirençlidir. Histolojik olarak şu tabakalardan oluşmuştur: Stratum molekulare (ara nöronlar içerir), stratum radiatum (CA1-CA3 bağlantıları ve ara nöronlar oluşturur), stratum lusidum (sadece CA3'te bulunur, asellülerdir), piramidal hücre tabakası (en belirgin tabakadır) ve stratum oriens (az hücreli) (72).

## **2.8. Karnitin**

Karnitin (3-hydroxy-4-N-trimethylammonio-butanoate) insan dokularında yaygın olarak bulunan doğal bir maddedir. İlk olarak 1905'de kas dokusunda kuaterner amonyum bileşiği olarak izole edilmiştir. 1950'lere kadar metabolizmadaki primer rolü anlaşılamamıştır. Dokularda değişen oranlarda bulunmakla birlikte en yüksek konsantrasyonları kalp ve iskelet kasındadır. Karnitin'in esas depo bölgeleri olan kalp ve iskelet kasındaki seviyeleri yaşla birlikte azalmaktadır (73,74).

### **2.8.1. Karnitin biyosentezi**

Karnitin et ve süt ürünleri yoluyla günlük diyetle alınmaktadır. Sıkı vejetaryen diyetlerde bile yeterli karnitin konsantrasyonları sağlanmaktadır. Bunun nedeni, karnitinin primer olarak diyetle sağlanmasının yanı sıra lizin ve metioninden karaciğer, böbrek, kas ve az miktarda da nöronlarda endojen olarak da sentezlenebilmesidir. Karnitin biyosentezi endojen karnitin sentezi yapabilen bireylerde önem taşımaktadır. Endojen sentezi demir, C vitamini, B6 vitamini ve niasin kofaktörlerinin yeterli miktarda bulunmasını gerektiren bir seri biyokimyasal reaksiyonu içermektedir. Biyosentezin başlangıç basamağını peptid-bağlı trimetillizinin sentezi oluşturmaktadır. Son basamak ise  $\gamma$ -butyrobetaine hydroxylase enzimi katalizörlüğünde  $\gamma$ -butyrobetaine'nin L-karnitine hidrosilasyonunu içermektedir. Yenidoğan ve bebeklerde  $\gamma$ -butyrobetaine hydroxylase

enzim aktivitesi yetişkinlerden %12 daha düşük olduğu için karnitin eksikliği gelişimi açısından risk altındadır. Bu nedenle, bu enzimin aktivitesinde düşme karnitin biyosentezi için hız sınırlayıcı basamağı oluşturmaktadır. Renal veya hapatik yetmezlikli hastalar biyosentez basamaklarında gerekli olan kofaktörlerin eksikliği nedeniyle karnitin sentezleyemezler. Yapılan çalışmalar lizin ve metioninden protein sentezi için gereken trimetillizin üretiminin karnitin biyosentezini kısıtladığını göstermiştir. Bu nedenle, azalmış metionin veya lizin depoları, azalmış total protein depoları ve protein sentezi olan bireyler de karnitin eksikliği gelişimi açısından risk altındadır. (75).

## **2.8.2. Karnitin ve metabolik işlevleri**

Karnitin suda çözünen bir moleküldür ve L-izofomunda biyolojik olarak aktiftir. Ara metabolizmada karnitin bulunması biyoenerjetik süreçler için gereklidir. Yağ asitlerinin oksitlenerek enerji üretmek üzere mitokondriye taşınmasında rol oynamaktadır. Karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin asetil-karnitin esterlerinin oluşumunda major rol oynamaktadır. Bu basamak mitokondri iç membranında gerçekleşen beta-oksidasyonda açıl gruplarının transferi için gereklidir. Bu reaksiyon karnitin palmitoyltransferase enzimi tarafından katalize edilir. Karnitin, karnitin acyltransferase enzim ailesi diğer üyeleri için de substrat görevi görür. Karnitin acyltransferase enzimleri acyl-CoA/CoA oranını değişik intrasellüler bölümlerde düzenleme özelliğine sahiptir. Acylcarnitine ester taşıyıcılarının membranları boydan boya geçme özelliği hücrel organeller arasında metabolik ihtiyaçlarına göre farklı açıl gruplarının kolaylıkla taşınmasını sağlamaktadır. Ayrıca karnitine bağımlı açıltransferazlar değişik substratlara hassas olduğu için, karnitin konsantrasyonunu arttırmaya yönelik farmakolojik yaklaşımlar olumlu metabolik sonuçların elde edilmesi için kullanılabilir. Dışarıdan verilen karnitin desteği lipid metabolizmasındaki yaşa bağlı değişimler üzerine olumlu etkiler yapmaktadır (73,74,76,75, 77).

Karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin transportuna aracılık etmesi nedeniyle üç farklı fonksiyona sahiptir. Sitozol ve mitokondriyal membrandaki serbest koenzim A sitrik asit döngüsü, ketogenesis ve gluconeogenesis gibi birçok metabolik süreçte görev yapmaktadır. Açıl CoA'daki açıl grubu karnitinle birleştiği zaman, açilkarnitin esterleri mitokondriyal membran ve hücreden uzaklaştırılır ve böylece karaciğer ve böbrek yoluyla atılır. Karnitin dış mitokondriyal membranın iç yüzünde lokalize olan carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1) etkisiyle uzun zincirli karboksilik asitlerle yüksek enerjili ester bağı

oluşturur. Açıkarnitin iç mitokondrial membrana açıkarnitin translokaz aracılığıyla transloke olur. İç mitokondrial membrandan CPT-2 ile ayrılır. Açıkarnitin esterlerinin mitokondri dışına çıkarılmasının iki avantajı vardır. Bu yolla hem mitokondri membranında serbest CoA kalır, hem de hücre toksik açıkCoA bileşiklerinden korunmuş olur. Bu mekanizma nedeniyle karnitin, bazı yağ asiti metabolizma hastalıkları ve organik asiduride rol oynamaktadır. Son fonksiyonu ise, karnitinin hücrel kompartmanlarda metabolik enerjiyi depolama ve transportudur (75, 78).

Sitozolda oluşturulan açıkCoA'lar mitokondri, peroksizom ve endoplazmik retikulumdaki metabolik yollarda substrat olarak kullanılır. Açık CoA esterleri endoplazmik retikulum lümeninde diacylglycerol acyltransferase ve acyl-CoAcholesterol acyltransferase aracılığıyla kullanılır. Uzun zincirli açıkCoA direkt olarak taşınmadığı için, bu organeller arasında açıkarnitin olarak taşınmaktadır.

Karnitin taşıyıcısı sıçan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılarak lipozomlar halinde yapılandırılmıştır. Karnitinin tek yönlü taşınmasını sağlayan bu taşıyıcı, karnitin/uzun zincirli açıkarnitin antiporter'ı olarak da çalışabilir. Bu taşıyıcının diğer bir fonksiyonu ise amino asit (ornitin, arginin, glutamin ve lizin) taşıyıcısı olarak çalışmasıdır (79).

Beyin oksidatif metabolizmada yağ asitlerini direkt olarak kullanamamaktadır, fakat karaciğerde yağ asitlerinin beta oksidasyonu sonucu oluşan asetilCoA ve asetoasetilCoA'dan türeyen keton cisimlerini oksitleyebilir. Yağ asiti oksidasyonu bozulunca yağ dokusundan salınan yağlar karaciğer, iskelet kası ve kalbe giderek birikir, sonuçta steatoz oluşur. Karnitin kalp, iskelet kası ve böbrek dokularına OCTN2 karnitin taşıyıcısı aracılığıyla giderek birikir. Ketonlar kalp, iskelet kası ve beyinde glukozu alternatif bir enerji kaynağı olarak kullanılır. Yağ asiti oksidasyonunun bozulması sonucu yağların kullanılamaması nedeniyle, glukoz glukoneogenezle yerine konmadan tüketilir ve hipoglisemi oluşur. Kullanılabilir enerji kaynaklarının tükenmesi beyin fonksiyonlarını bozar ve bilinç kaybı oluşur (80).

Karnitinin farmakolojik etkileri; metabolik ve biyofiziksel fonksiyonları olarak tanımlanmaktadır. Karnitinin lipid ve glukoz metabolizmasındaki fizyolojik rolü metabolik fonksiyonuna örnek olarak verilebilir. Karnitin ve plazma membranının lipid içeriği arasındaki fiziko-kimyasal etkileşimler de biyofiziksel fonksiyonlarına örnek gösterilebilir (74).

Karnitin ökaryot hücrelerde metabolik olarak yıkılmadığı için regülasyonu şu yollarla olmaktadır; endojen olarak sentezi, dışardan diyetle alımı ve renal

reabsorbsiyonu. Karnitin etkin şekilde böbrekten reabsorbe olmakla birlikte üriner atılımı büyük oranda diyete bağlıdır. Diyetel alımının artması halinde böbrekler reabsorbsiyonunu azaltarak adapte olmaktadır (78).

### **2.8.3. Karnitin ve nöron koruyucu etkisi**

Karnitin en yüksek oranda kalp ve iskelet kasında bulunmakla birlikte, karnitin ve asetil türevi (ALKAR) kan-beyin bariyerini aktif transportla geçebilmektedir. Karnitin eksojen olarak verildiği zaman özgün taşıyıcısı ile hızlı bir şekilde kan-beyin bariyerini geçmekte ve beyin-omurilik sıvısındaki konsantrasyonu artmaktadır. Karnitin serebral korteks nöronlarında primer olarak serbest formunda ve %10-15 kadar da ALKAR formunda birikmektedir. Bu yönüyle karnitin nöroprotektif ajan özelliği göstermekte, nekrotik ve apopitotik nöron ölümünü engelleyebilmektedir. Yapılan çalışmalarda karnitin'in iskemiye bağlı nöron ölümünü engellediği gösterilmiştir (76, 81).

Karnitin, glutamat maruziyeti sonucu oluşan nöronal hücre ölümünü inhibe etmektedir. Ekzisitotoksisite oluşturulan deneylerin çoğunda glutamati maksimize eden koşullar kullanılmıştır. Bu koşullar kültür ortamına magnezyum ve glisin eklenmesini içermektedir. Yapılan hücre kültürü deneylerinde karnitin hücre ölümünü anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar ayrıca karnitin, hücre ölümüne hipokampal nöronlar kadar hassas olan kortikal nöronları da koruduğunu göstermektedir. Karnitin ayrıca ekzisitotoksisitenin hem akut hemde gecikmiş fazında nöron koruyucu etki göstermektedir (82).

Karnitin toksik hücre ölümüne karşı koruyucu etkisi glutamat reseptörlerinin direkt antagonizması ve gamma-aminobutyric acid (GABA) reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla olabilmektedir. Diğer mekanizmalar in vitro ve in vivo iskemik nöron ölümü modellerinde araştırılmıştır. Nöron kültüründe karnitin uygulanması nörotrofik faktör eksikliğinin sebep olduğu apopitozu inhibe etmektedir. Bu olay karnitin nörotrofik etkisi de olabileceğini göstermektedir. Akut beyin hasarını takiben oluşan apopitoz intrasellüler değişimler (örn. kalsiyum artışı veya oksidatif stres) veya ekstrasellüler faktörlere yanıt olarak (örn. İnflamatuar sitokinler ve Fas gibi hücre ölüm ligandları) oluşabilir. Karnitin ve karnitin esterleri ile tedavi dolaşımdaki TNFalfa ve interlökin seviyelerini anlamlı olarak düşürmektedir. Karnitin akut hasarlanmayı takiben beyinde oluşan inflamatuvar reaksiyonları da azaltmaktadır. Serebral iskemi ve travma sırasında kalsiyuma bağımlı fosfolipaz 2 gibi enzimler aracılığıyla salınan toksik intrasellüler



serbest yağ asitlerini karnitin tamponlayabilmektedir. Açıl karnitin esterlerinin oluşumu sebebiyle serbest yağ asitlerinin azalması mitokondrial geçirgenliği azaltma özelliklerini inhibe etmektedir. Bu yolla hepatositlerin anoksik ölümüne karşı korunma sağlanmaktadır. Karnitinin nöron koruyucu olarak birçok mekanizmaya sahip olması en önemli etkisinin kullanılarak yöntem oluşturulmasını sınırlamaktadır. Diğer taraftan değişik beyin hasarı yolaklarında kullanılabilmesini sağlamaktadır (82).

Karnitin akut valproik asit toksisitesinde kullanılabilir. Valproik asit toksisitesinde özellikle hastalar komada ise, amonyak seviyesi yüksekse veya valproik asit düzeyi 450 mg/l 'yi aşmış ise karnitin kullanımı uygun olmaktadır. Yapılan olgu sunumları karnitinin yan etki profilinin uygun olduğunu ve akut valproik asit toksisitesinde kullanılmasının yararlı olduğunu göstermektedir (83).

#### **2.8.4. Karnitin ve oksidatif stres**

Kardiak arrest modeli kullanılan çalışmalarda karnitin tedavisinin reperfüzyondan 2 ve 24 saat sonra protein karbonil gruplarını anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Protein karbonil grupları oksidatif doku hasarının bir göstergesidir ve iskemi/reperfüzyon esnasında anlamlı olarak artmaktadır. Karnitin, ROS oluşumunu başlatan doku laktik asidozunu azaltarak dolaylı yoldan oksidatif strese karşı koruma sağlamaktadır. Karnitin, mitokondrial ve sitozolik redoks dengesindeki kaymayı azaltarak da ROS detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (84).

Kardiak arrestten 30 dk ve 24 saat sonra beyin pirüvat dehidrogenaz enzim aktivitesi karnitin tedavisi ile düzelmektedir. Oksidatif stres nedeniyle reperfüzyon sırasında pirüvat dehidrogenaz aktivitesinde azalma oluşmaktadır. Bu bulgu karnitinin beyindeki protein oksidasyonu üzerine dolaylı etkisini yansıtmaktadır. Pirüvat dehidrogenazın oksidatif inaktivasyonu reperfüzyon sırasında hızla gelişmektedir, fakat inhibisyon karnitin gibi antioksidan maddelerin uygulanması ile geri dönüşümlü olarak oluşmaktadır (85).

Karnitin antioksidan genlerin indüksiyonu yoluyla da dolaylı antioksidan etki gösterebilmektedir. Primer sıçan kortikal astrosit kültürü karnitin ile tedavi edilince antioksidan enzim hemoksijenaz-1 ekspresyonu artmaktadır ve inflamatuvar sitokinlerin neden olduğu hücre ölümü ve mitokondrial değişimlere karşı koruma sağlamaktadır. Karnitinin hemoksijenaz ekspresyonu üzerine etkisi Nrf2 ekspresyonundaki artışla oluşmaktadır. Nrf2, mitokondrial genom üzerindeki transkripsiyon genlerin dolaylı

stimülasyonu ve antioksidan genlerin ekspresyonunu stimüle eden bir transkripsiyonel aktivatör faktördür (86).

Beta-amiloid Alzheimer'lı hastaların beyinlerinde biriken ve nörodejenerasyonda rol oynayan nörotoksik bir peptiddir. Karnitin, nöronal hücrelerin beta-amiloide maruz kalması sonucu oluşan hücre ölümü ve oksidatif stresi inhibe edici etki göstermektedir. Multipl sklerozlu hastaların oral karnitin ile 6 ay tedavisi, bu hastaların beyin omurilik sıvısında yüksek olarak tesbit edilen oksidatif stres markırlarını azaltıcı yönde etki yapmıştır (82).

Mitokondriyal beta oksidasyon reaktif oksijen türlerinin oluşumu için major kaynağı oluşturmaktadır. Oksidatif stres, hücrel biyoenerjetik süreçlerin etkinliğindeki azalma nedeniyle metabolik bozuklukların gelişmesine yol açmaktadır. Oksidasyon /redüksiyon durumu oksidatif strese eşlik eden inflamatuvar bir sinyali tetiklemekte ve böylece proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açmaktadır. Mitokondrial fonksiyonu düzenlemek için karnitin kullanımı oksidatif stresi ve inflamatuvar durumu azaltabilmektedir. Sonuç olarak hastaların klinik bulgularında düzelme sağlanmaktadır. İskelet kasında en yüksek oranda bulunması nedeniyle, karnitin eksikliği kas gücünde azalma, hipotoni, lipid depolayan miyopati ve miyolizle birlikte Tip II lif atrofisine yol açmaktadır (87).

Karnitinin antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri hayvan modellerinde yoğun olarak çalışılmıştır. Karnitin desteği yaşlı inflamatuvar hücrelerin kemotaktik ve fagositik aktivitelerini düzeltmekte, astrositleri oksidatif strese karşı korumakta ve E vitamini ve folat kombinasyonu ile birlikte Alzheimer hastalığını önlemede yarar sağlamaktadır. İnsanlarda araştırmalar son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda yoğunlaşmıştır. Hemodiyaliz hastalarında karnitin desteği halen tartışmalı bir konudur, fakat karnitin kullanımının hastalarda olumlu sonuçlar verdiği bilinmektedir (87,88,89).

Böbrek yetmezlikli hastaların dışında kas yorgunluğu gibi oksidatif stresin artış gösterdiği diğer klinik durumlarda da karnitin desteğinin yararlı etkileri test edilmiştir. Ülseratif kolitli hastalarda karnitin kullanımı hastalardaki histolojik bulguları düzeltmekte ve hastalığın aktivite indeksinde anlamlı düzelme yapmaktadır (87).

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Çalışma grupları**

Bu çalışmada Wistar cinsi yetişkin erkek sıçanlar (250-300 g) kullanılmıştır. Çalışmalar için Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurul Başkanlığı'ndan 29.11.2005 tarihli oturumunda 107 protokol no ile onay alınmıştır. DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında Wistar suşunun bulunması ve literatürle uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçilmiştir. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında standart koşullarda bakılmıştır. Herhangi bir sebeple deneyi devam ettiremeyecek olan (enfeksiyon, ilaç reaksiyonu vs) ya da deneyler bitmeden yaşamı sonlanan hayvanlar deney ve istatistik kapsamından çıkarılmıştır. Tüm sıçanlar sham, EMA+Serum fizyolojik (S) ve EMA+Karnitin (KAR) olarak rastgele üç gruba ayrıldı. EMA+S ve EMA+KAR gruplarına 30 gün süreyle 4 saat/gün EMA uygulandı. Bu süre içinde EMA+S ve EMA+KAR gruplarına EMA uygulaması ile birlikte serum fizyolojik (S) veya L-karnitin (KAR) uygulandı. Çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

I. grup: Sham grubu. EMA'na maruz kalma ve enjeksiyon uygulaması yok (n=10)

II. grup: EMA+S grubu. EMA'na maruz kalan ve serum fizyolojik uygulanan sıçanlar (n=12, 1 ml/kg, po, 30 gün)

III. grup: EMA+KAR grubu. EMA'na maruz kalma+L-karnitin uygulanan sıçanlar (n=10, 300 mg/kg, po, 30 gün)

#### **3.2. EMA oluşturulması**

EMA oluşturmak için 50 Hz frekanslı alternatif akım ile 3 mT EMA meydana getiren helmholtz bobin sistemi kullanıldı. EMA'nın şiddeti bir transformatör ve teslametre (FW Bell, 5170) aracılığıyla kontrol edildi. EMA sistemi birbirinden 33 cm aralıklı yerleştirilen 95 cm çaplı iki bakır bobinden oluşturuldu. Bobinler ahşap bir çerçeveye monte edilen 320 sarımlı, 2.5 mm çaplı bakır tellerden oluşturuldu. Sıçan kafesleri bobinlerin arasına yerleştirildi. Bu sistemle aynı anda 2 kafese EMA uygulanabilmektedir.

EMA+S ve EMA+KAR gruplarındaki sıçanlar günde 4 saat boyunca 3 mT EMA'na maruz bırakıldı. Maruz kalma süresince tüm sıçanlar plastik kafeslere yerleştirildi. Sham grubundaki sıçanlar aynı ortamda tutuldu fakat EMA uygulanmadı.

### **3.3. Doku örneklerinin hazırlanması**

30 günlük deneyin tamamlanmasının ardından 24 saat sonra tüm sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edildi. Sıçanların yarısına önce izotonik NaCl, ardından %10 formaldehit ile intrakardiyak perfüzyon yapıldı. Sağ atriuma kesi yapılarak kanın dışarı akışı sağlandı, serum gelmeye başlayınca izotonik infüzyonu kesilerek formaldehit infüzyonuna başlandı. Perfüzyonun ardından beyin dokusu çıkarıldı ve %10 formaldehitte 2 gün bekletildi, ardından bir gece suda bekletildi. Rutin histolojik takip işlemlerinin ardından dokular parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla (Leica RM2255) beyin dokusundan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak örnekler lizimli lamlara yerleştirildi. Her hayvandan Paxinos ve Watson'un rat beyin atlasına göre tanımlanmış 21-23 ve 25. seviyelere denk gelen 3'er kesit alınarak sırasıyla cresyl violet, TUNEL ve aktive antikaspa-3 antikoru ile boyandı.

#### **3.3.1. Işık mikroskopik doku takibi**

- 1- Fiksasyon: 48 saat % 10 formalin
- 2- 24 saat akarsuda yıkama
- 3- % 70 etil alkol 20 dk
- 4- % 80 etil alkol 20 dk
- 5- % 96 etil alkol 20 dk
- 6- Aseton I 20 dk
- 7- Aseton II 20 dk
- 8- Aseton III 20 dk
- 9- Aseton IV 20 dk
- 10- Ksilol I 30 dk
- 11- Ksilol II 30 dk
- 12- 60°C'lik etüvde erimiş parafin I 1 saat
- 13- Parafin II 1 saat
- 14- Parafin içinde bloklama

### **3.3.2. Cresyl violet ile boyama yöntemi**

Cresyl violet ile nöronların Nissl granüllerinin boyanması amaçlanmıştır.

1-Ksilol I (etüvde)	20dk
2-Ksilol II	10dk
3- Ksilol II	10 dk
4- Absolu alkol	1 dk
5-%96 alkol	1 dk
6-%80 alkol	1 dk
7-%70 alkol	1 dk
8-Distile su	5 dk
9- Boya solusyonu	20 dk
10-%96 alkol	çalkalama
11- Ksilol (üç değişim)	30-60 dk
12- Entellan ile kapama	

### **3.3.3. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Tekniği ile Boyama**

Her hayvandan birer kesit dokudaki apoptotik hücreleri göstermek amacı ile TUNEL tekniği ile boyandı. Bu teknik için In situ cell death detection TUNEL system, POD kiti (Roche) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 3 değişim ksilol ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Kesitler 15 dakika 20 µg/ml proteinase K ile enkübe edildikten sonra, distile su ile 5 dakika yıkandı. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Germany) uygulandıktan sonra 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Phosphate Buffered Saline Solution, DBS, Pleasanton, CA) ile yıkanan kesitler TdT-enzimi 37°C de 1 saat enkübe edildi. Ardından tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkanan kesitler anti-streptavidin-peroksidaz ile 30 dakika enkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, Roche Diagnostics, Germany) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Harris hematoksilen ile zemin

boyaması yapılan kesitler %80 ve %96'lık alkollerde dehidratasyon ve 30'ar dk 3 değişim ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

### **3.3.4. İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi**

Kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra immunohistokimyasal yöntemle boyandı. Antikaspaz-3 immunreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla rat spesifik aktive antikaspaz-3 (1:100; Neomarkers, Fremont, CA) antikoru kullanıldı. Lizinli kesitler üç değişim ksilol ile deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Proteinaz K solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler antikaspaz-3 antikoru ile bir gece +4°C'de enkübe edildi. Ertesi gün fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dk enkübe edildi. Sekonder antikor Vector Elite ABC kit (Vector Labs, Burlingame, CA) ile bağlandıktan sonra antikor-biyotin-avidin-peroksidaz kompleksi 0.02% Diaminobenzidin (DAB) kullanılarak görünür hale getirildi. Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

### **3.3.5. Elektron mikroskopik inceleme**

Dokulardaki ince yapının değerlendirilmesi amacıyla her gruptaki 3'er denekten 1x1 mm büyüklüğünde doku örnekleri alındı. Örnekler %2.5'lük gluteraldehid içinde fikse edildi. %1'lik osmiumtetraoksit içinde postfiksasyon yapıldıktan sonra dereceli alkollerde dehidratasyon işlemleri yapıldı. Doku örnekleri propilen oksitten geçirildikten sonra araldit içine gömülerek 60°C etüvde polimerizasyon için 48 saat bekletildi. Ultrince kesitler uranil asetat-kurşun sitrat ile boyanarak Zeiss Libra 120 TEM ile incelendi.

## **3.4. Homojenizasyon**

Tüm sıçanların kalan yarısının servikal dislokasyon ile yaşamları sonlandırıldı. 1-2 dakika içinde soğuk zemin üzerinde önce beyin ardında da hipokampus, striatum ve prefrontal korteks dokuları disseke edildi. Her dokudan 1x1 mm büyüklüğünde örnekler elektron mikroskopik inceleme için ayrıldı. Kalan dokular soğuk serum fizyolojik ile

hemen yıkandı ve lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), antioksidan enzimler Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) ölçümü için homojenize edildi. Doku örnekleri ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonopuls, Germany) 2 ml soğuk PBS içinde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri buzla soğutulmuş ortamda yapıldı. Homojenatlar +4°C'de 600 g'de 10 dk santrifüj edilerek MDA ölçümü için ependorf tüpüne ayrıldı, geri kalan homojenat +4°C'de 10000 g'de 20 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant enzim ve protein ölçümleri için ayrılarak -70 °C'de saklandı. 30 gün içinde ölçümler yapıldı.

### **3.5. Enzim aktiviteleri ve MDA düzeylerinin saptanması**

MDA değerleri The Bioxytech MDA-586 (Oxis International, USA) ticari kiti ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar µM olarak ifade edildi.

SOD ve GPx enzim aktiviteleri Oxis Research kitleri kullanılarak spektrofotometre (HachLange, DR5000) ile ölçüldü. Enzim aktiviteleri hazırlanan süpernatantlardan ölçüldü ve sonuçlar ünite/mg protein (U/mg pr) ± Standart Hata (SH) olarak gösterildi.

SOD aktivitesi Bioxytech SOD-525 (Oxis International, USA) kiti ile ölçüldü. SOD'un rolü, oksidatif enerji süreçleri sırasında oluşan toksik süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu sağlamaktır. Kitin çalışma yöntemi süperoksit radikalleri oluşturmak üzere ksantin ve ksantin oksidazı kullanır. Oluşan süperoksit radikalleri 2-(4-iodophenil)-3-(4-nitrophenol) -5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) ile tepkimeye girerek kırmızı renk oluşturur. Yöntemin temeli, bu tepkimenin SOD tarafından inhibisyon derecesine dayanır.

GPx aktivitesi Bioxytech GPx-340 (Oxis International, USA) kiti ile saptanmıştır. Bu kit Paglia ve Valentine'in tanımladığı yöntemle göre hazırlanmıştır. GPx, kümen hidroperoksit ile glutasyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında, okside glutasyon (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) çevrilir, bu sırada NADPH okside olarak NADP' ye dönüşür. Spektrofotometrede 340 nm'de absorbansdaki azalma ölçülür.

Doku protein ölçümleri RANDOX'un U/CSF protein kitiyle yapıldı. Kitin çalışma prensibinde önce örnek magnezyum iyonlarını uzaklaştırmak ve proteini çöktürmek amacıyla EDTA içeren alkalın solüsyonla karıştırılır, sonra benzethonyum klorid eklenir, turbidite oluşturarak spektrofotometrede 600 nm' de absorbans okunur.

### **3.6. İstatistik değerlendirme**

Tüm veriler ortalama±SH olarak gösterildi. Grupların ortalamaları arasındaki farklar SPSS programında one-way ANOVA post hoc Bonferroni testi kullanılarak değerlendirildi.  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyi esas alındı.

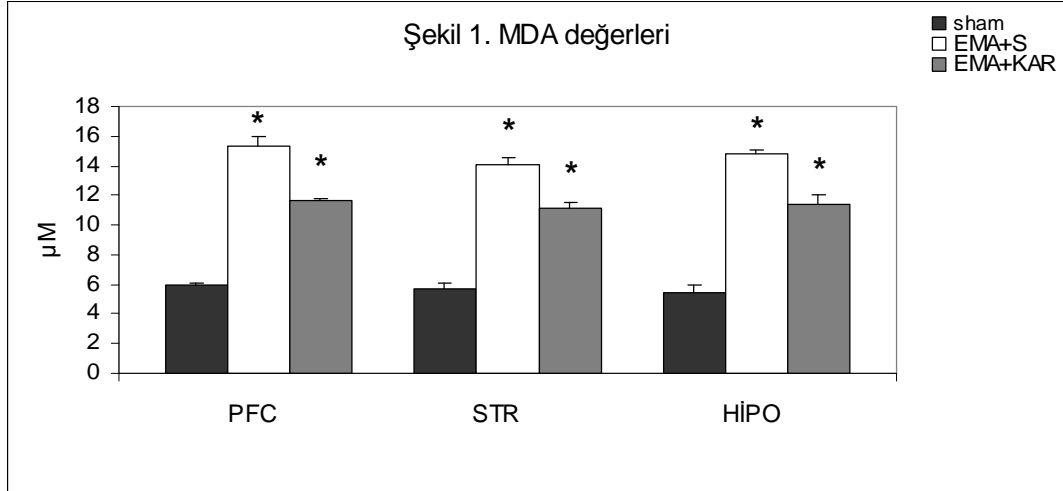


## 4.BULGULAR

### **4.1. MDA değerleri**

Tüm grupların MDA değerleri Tablo 1'de, ortalama MDA sonuçları Şekil 1'de gösterilmektedir. Prefrontal korteks, striatum ve hipokampus bölgelerinde sham ve EMA+KAR gruplarının MDA değerleri EMA+S grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuŐtur ( $p < 0.05$ ). Sham ve EMA+KAR grupları arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).

**Şekil 1: Ortalama MDA değerleri**



**Tablo 1: Tüm grupların MDA değerleri ( $\mu\text{M} \pm \text{SH}$ )**

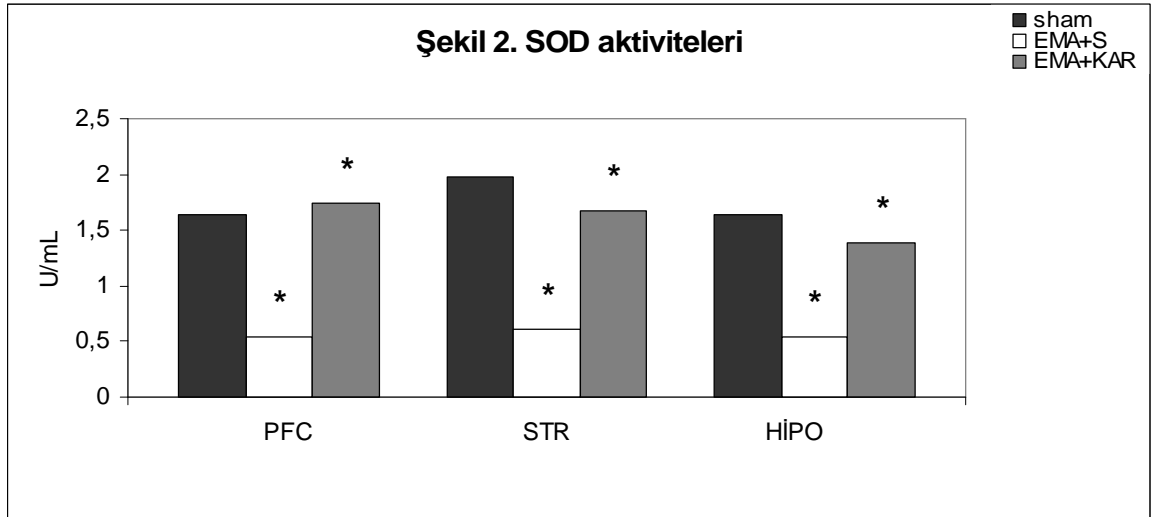
Grup	Hayvan no	Prefrontal korteks	Striatum	Hipokampus
sham	1	6,7	6,3	4,3
sham	2	6,2	7,1	5,6
sham	3	5,4	4,4	4,4
sham	4	5,3	5,4	6,4
sham	5	5,9	5,7	6,7
grup ort $\pm$ SH		5,9 $\pm$ 0,2	5,78 $\pm$ 0,4	5,48 $\pm$ 0,4
EMA+S	1	15,9	15,9	15,3
EMA+S	2	12,7	15,3	15,5
EMA+S	3	14,1	12,2	14
EMA+S	4	13,6	13,5	15,6
EMA+S	5	15,1	13,1	13,9
EMA+S	6	17,1	15,1	15,6
EMA+S	7	18,4	13,3	13,9
grup ort $\pm$ SH		15,3 $\pm$ 0,7*	14,1 $\pm$ 0,5*	14,8 $\pm$ 0,3*
EMA+KAR	1	12,2	12,5	11,3
EMA+KAR	2	11,8	10,7	9,5
EMA+KAR	3	11,4	11,1	12,4
EMA+KAR	4	11,7	10,1	11,1
EMA+KAR	5	11,6	11,3	13,1
grup ort $\pm$ SH		11,7 $\pm$ 0,1*	11,1 $\pm$ 0,3*	11,4 $\pm$ 0,6*

#### 4.2. SOD ve GPx enzim aktiviteleri

Tüm grupların SOD enzim aktivitesi değerleri Tablo 2'de, ortalama SOD enzim aktivitesi sonuçları Şekil 2'de gösterilmektedir. Prefrontal korteks, striatum ve hipokampusta sham ve EMA+KAR gruplarında SOD enzim aktivitesi, EMA+S grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Sham ve EMA+KAR grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Tüm grupların GPx enzim aktivitesi değerleri Tablo 3'de, ortalama GPx enzim aktivitesi sonuçları Şekil 3'de gösterilmektedir. Her üç beyin bölgesinde de sham ve EMA+KAR gruplarının ortalama GPx aktivitesi değerleri, EMA+S grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Sham ve EMA+KAR grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

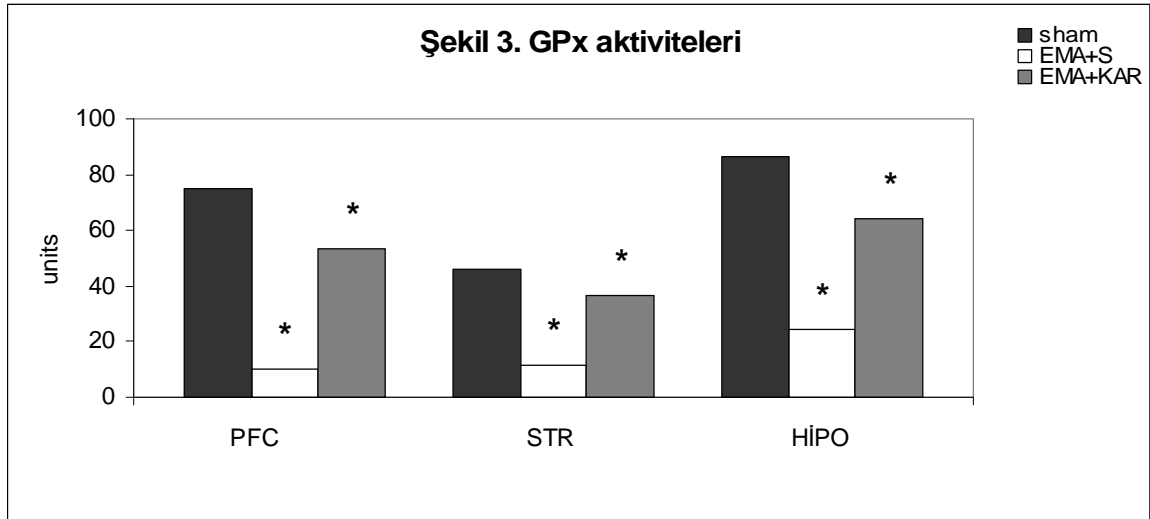
Şekil 2: SOD enzim aktiviteleri



**Tablo 2: Tüm grupların SOD aktivitesi değerleri (U/mL±SH)**

Grup	Hayvan no	Prefrontal korteks	Striatum	Hipokampus
sham	1	1,99	2,91	1,28
sham	2	1,28	1,17	1,39
sham	3	1,93	1,87	2,24
sham	4	1,45	1,99	2,05
sham	5	1,57	1,93	1,28
Grup ort+SH		1,64 ± 0,14	1,97 ± 0,27	1,64 ± 0,20
EMA+S	1	,69	,69	,69
EMA+S	2	,58	,38	,58
EMA+S	3	,09	,05	,14
EMA+S	4	,29	,69	,84
EMA+S	5	,24	,58	,19
EMA+S	6	,69	,69	,33
EMA+S	7	1,17	1,21	1,05
Grup ort+SH		0,54 ± 0,14	0,61 ± 0,13	0,54 ± 0,12
EMA+KAR	1	1,34	2,05	2,18
EMA+KAR	2	2,24	1,00	1,22
EMA+KAR	3	1,51	1,87	1,57
EMA+KAR	4	1,28	1,63	1,28
EMA+KAR	5	2,37	1,87	,74
Grup ort+SH		1,74 ± 0,23	1,68 ± 0,20	1,39 ± 0,15

**Şekil 3: GPx enzim aktiviteleri**

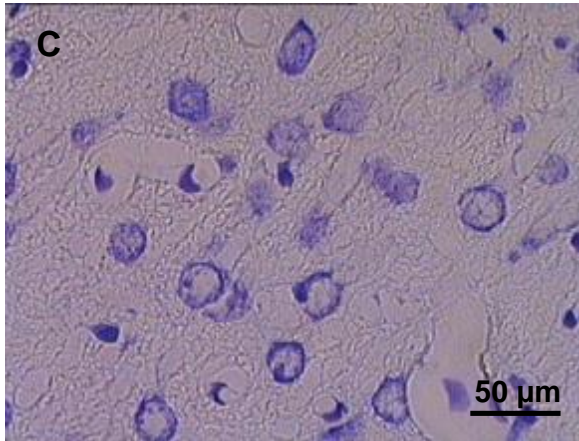
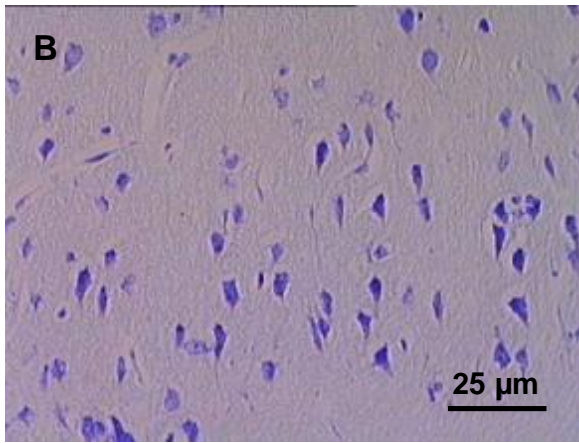
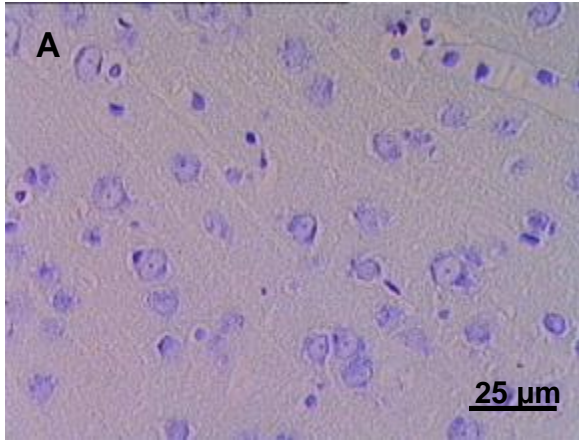


**Tablo 3: Tüm grupların ortalama GPx aktivitesi değerleri (Ünite ± SH)**

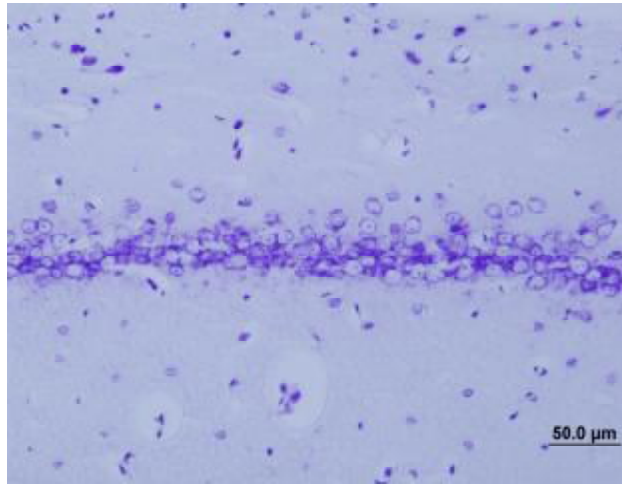
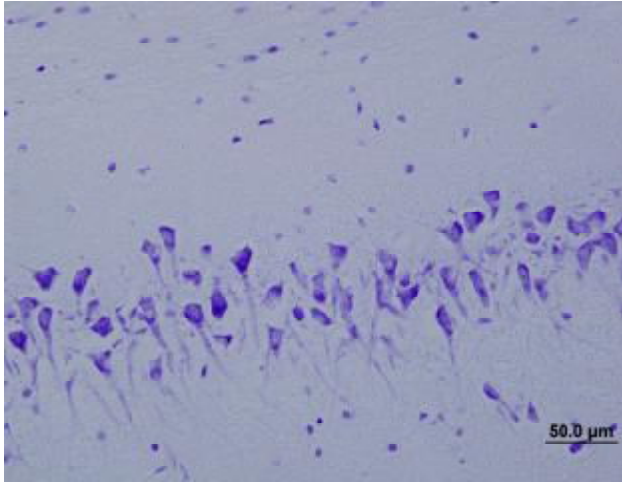
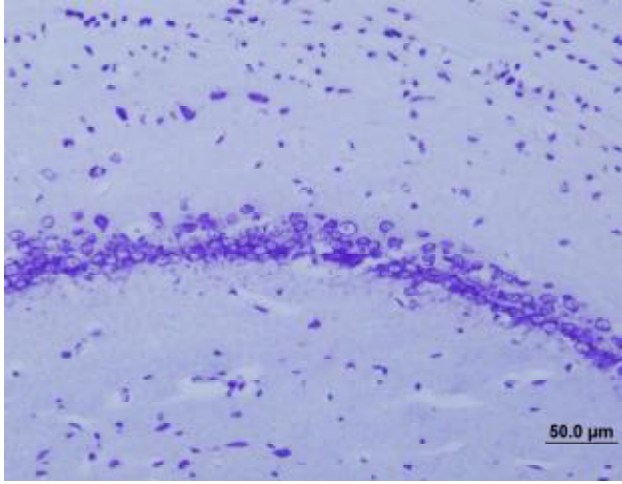
Grup	Hayvan no	Prefrontal korteks	Striatum	Hipokampus
sham	1	53,50	24,60	128,60
sham	2	111,10	72,00	89,50
sham	3	115,20	83,30	45,30
sham	4	20,50	27,70	67,90
sham	5	75,10	23,60	99,80
Grup ort+SH		75,08 ± 17,8	46,24 ± 12,9	86,22 ± 14,1
EMA+S	1	11,90	20,50	31,80
EMA+S	2	8,23	9,26	7,20
EMA+S	3	6,10	7,20	24,60
EMA+S	4	6,10	14,40	39,00
EMA+S	5	14,40	12,30	20,60
EMA+S	6	14,40	7,20	24,70
Grup ort+SH		10,18± 1,5	11,81 ± 2,1	24,65 ± 4,3
EMA+KAR	1	57,60	36,20	41,20
EMA+KAR	2	53,20	52,40	43,20
EMA+KAR	3	55,50	51,40	51,40
EMA+KAR	4	33,90	21,60	77,10
EMA+KAR	5	65,80	19,50	109,00
Grup ort+SH		53,2 ± 5,2	36,22± 7,0	64,38 ± 12,8

#### **4.3. Işık mikroskopik bulgular**

#### 4.3.1. Krezil violet boyama



Şekil 4: Krezil violet boyama (prefrontal korteks)



**Şekil 5: Krezil violet boyama (hipokampus)**

Krezil violet ile boyanan prefrontal korteks ve hipokampus kesitlerinde hücre sayımı yapılarak gruplar arasındaki fark değerlendirildi. Hücre sayımlarını belirlemek için her gruptan beşer hayvandan üçer kesit değerlendirildi. Kesit görüntüleri bir mikroskop (Olympus BH-2 Tokyo, Japan) ve video kamera (JVC TK 890E, Japan) aracılığıyla bilgisayar ekranına aktarılarak 20X objektif altında  $15800 \mu\text{m}^2$  'lik sayım çerçevesi ile değerlendirildi. Sayım çerçevesi her kesitin on farklı alanına yerleştirilerek nöron sayımları yapıldı. Ortalama nöron sayıları hesaplanarak gruplar arasındaki fark analiz edildi.

Prefrontal korteks değerlendirmesi sonucunda; EMA grubunda ortalama nöron sayısının sham grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu bulundu. Karnitin uygulamasının nöron kaybını önlediği gözlemlendi (Tablo 4). Gruplara ait görüntüler Şekil 4'de görülmektedir.

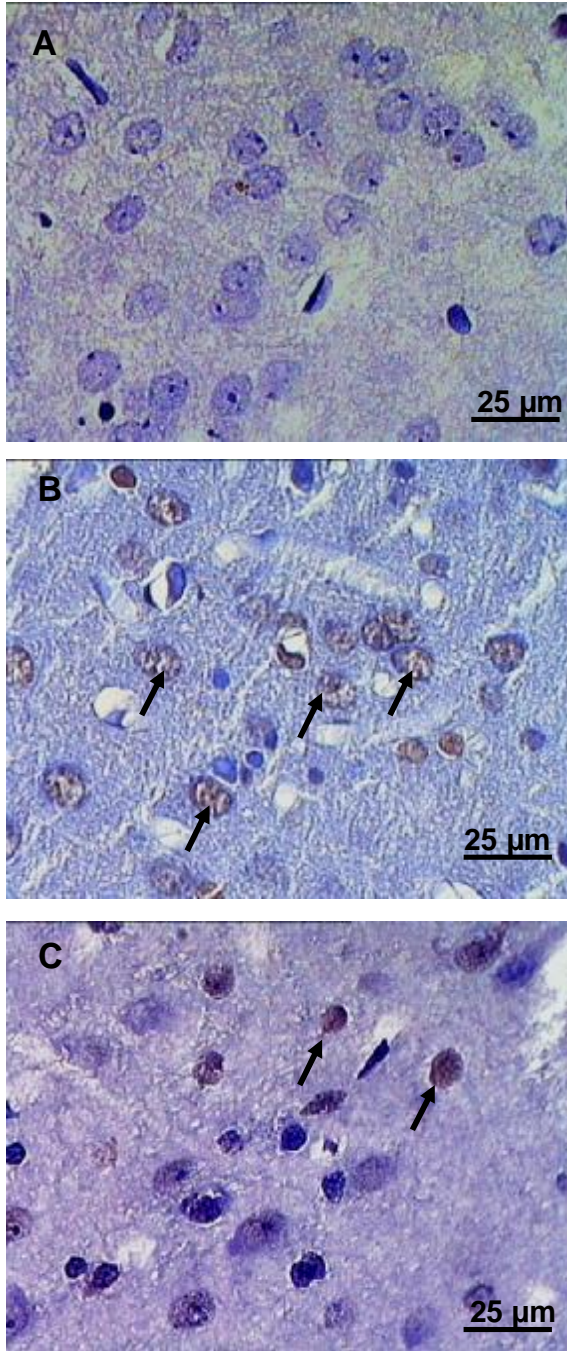
Hipokampus değerlendirmesi sonucunda; EMA grubunda sham grubuna göre anlamlı nöron kaybı olduğu gözlemlendi. EMA+KAR grubunda nöron sayısının EMA grubuna göre korunduğu gözlemlendi (Tablo 4). Gruplara ait görüntüler Şekil 5'te görülmektedir.

Bölge	grup	n	Nöron sayısı (Ort $\pm$ SH) / $15800 \mu\text{m}^2$
Prefrontal korteks	sham	5	$6,4 \pm 0,67$
	EMA	5	$4,6 \pm 0,24$
	EMA+KAR	5	$6,8 \pm 0,96$
Hipokampus	sham	5	$16,4 \pm 0,74$
	EMA	5	$9,8 \pm 0,86$
	EMA+KAR	5	$14,2 \pm 1,01$

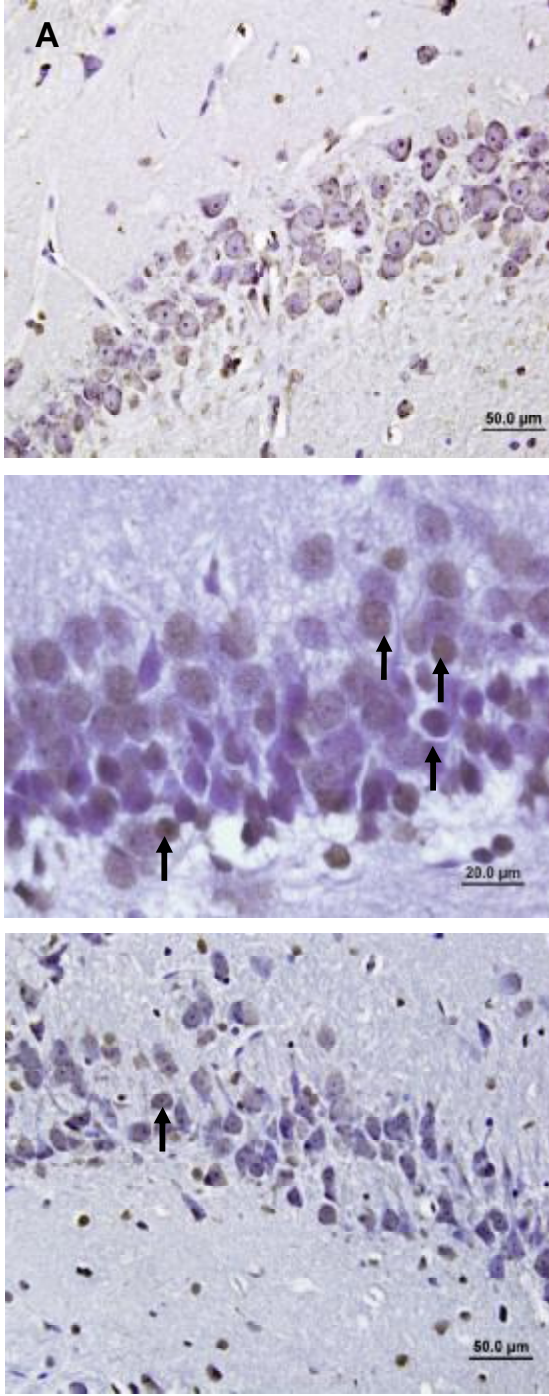
**Tablo 4: Prefrontal korteks ve hipokampus bölgelerindeki hücre sayıları**



#### 4.3.2. TUNEL boyama



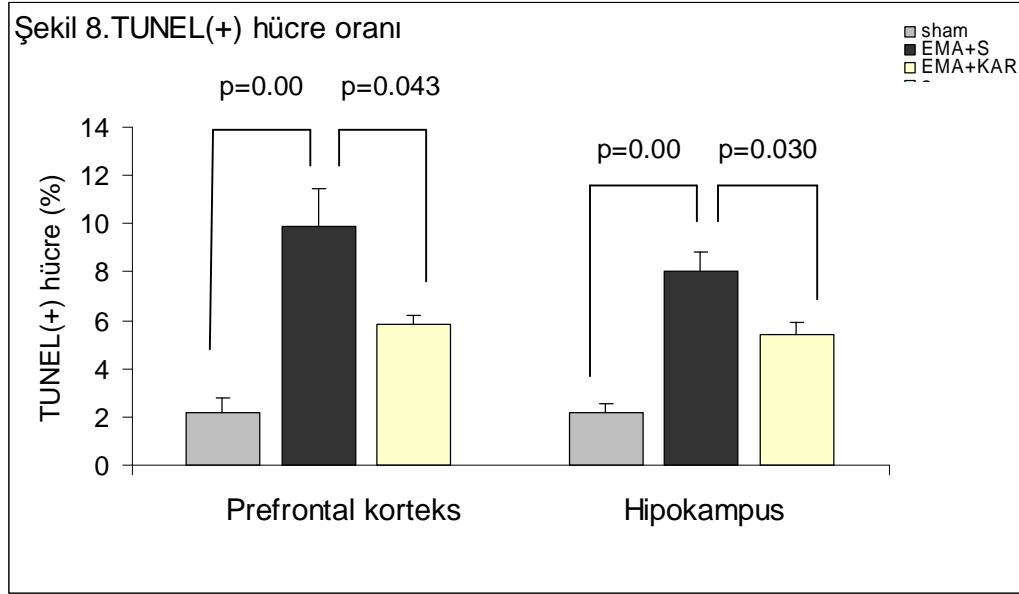
**Şekil 6:** TUNEL boyama (prefrontal korteks).Oklar TUNEL-pozitif hücreleri göstermektedir.



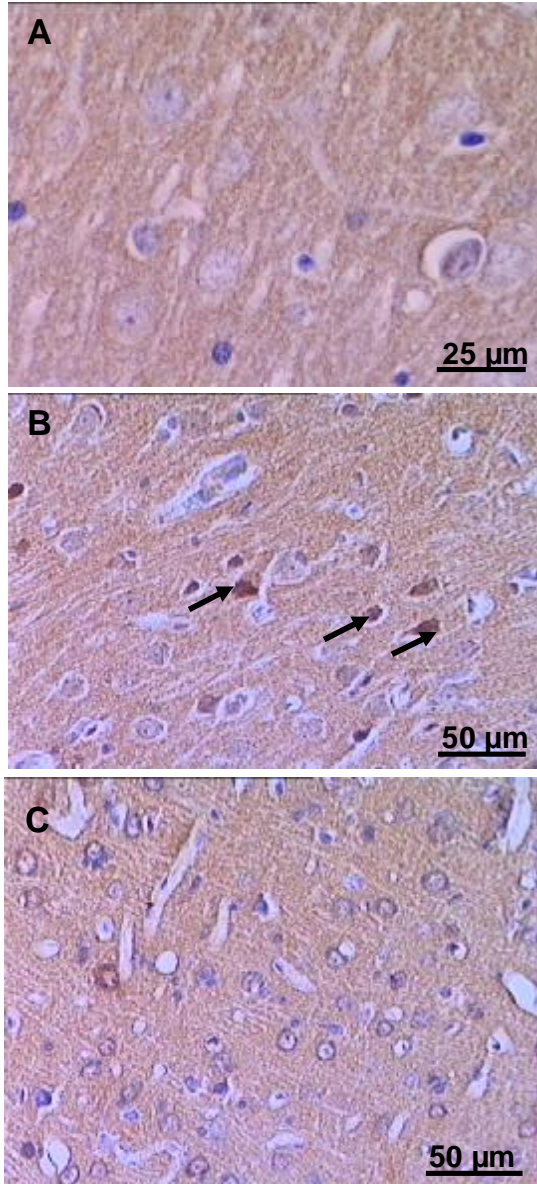
**Şekil 7:** TUNEL boyama (Hipokampus). Oklar TUNEL-pozitif hücreleri göstermektedir.

Prefrontal korteks ve hipokampusa ait kesitlerde apoptoz oranını belirlemek için 20X objektif ile her kesitte ortalama 1000 hücre sayılarak TUNEL-pozitif hücre sayısı belirlendi. Apoptotik hücre oranı yüzde cinsinden hesaplandı ve gruplar arasındaki fark analiz edildi. Her iki beyin bölgesinin değerlendirilmesi sonucu; EMA grubunda TUNEL-pozitif hücre oranının sham ve EMA+KAR gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu (Şekil 8). Gruplara ait resimler Şekil 6 ve 7'de görülmektedir.

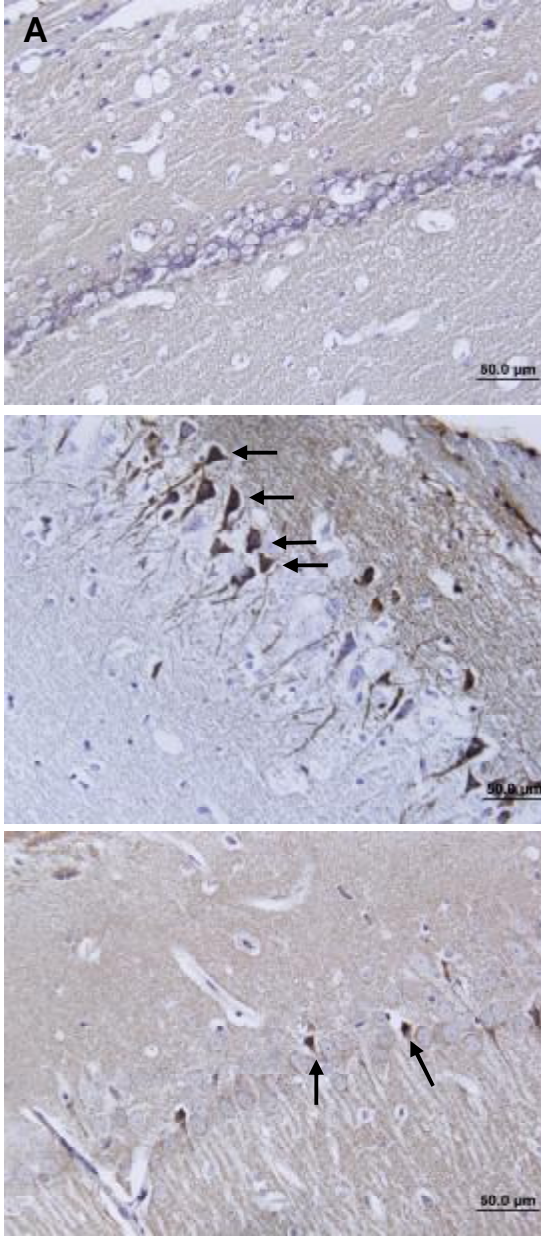
**Şekil 8: TUNEL (+) hücre oranı**



#### 4.3.3. Aktive antikaspaz-3 immunohistokimyasal boyama



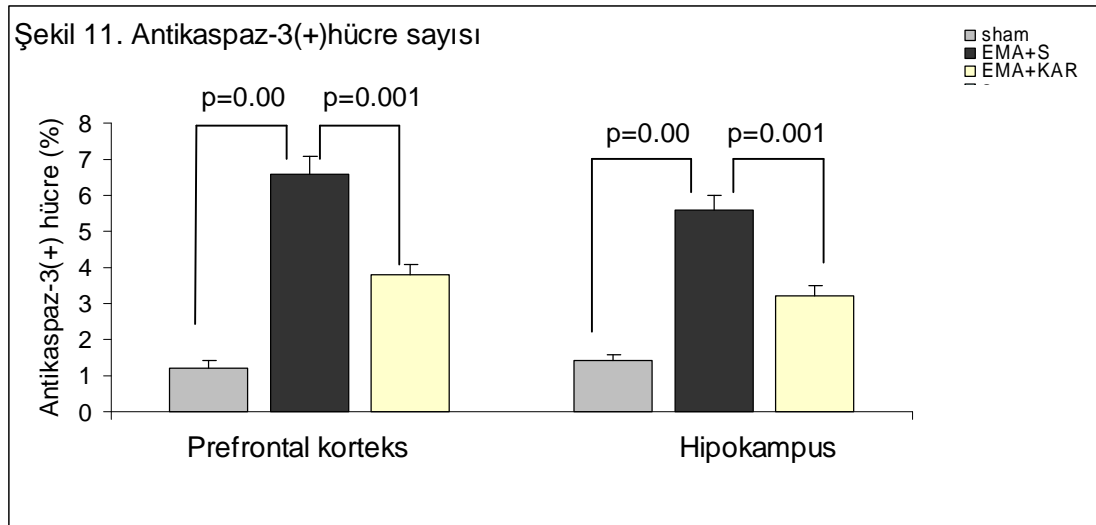
**Şekil 9:** Aktive antikaspaz-3 immunohistokimyasal boyama (prefrontal korteks). Oklar antikaspaz-3 pozitif hücreleri göstermektedir.



**Şekil 10:** Aktive antikaspaz-3 immunohistokimyasal boyama (hipokampus). Oklar antikaspaz-3 pozitif hücreleri göstermektedir.

TUNEL boyama ile belirlenen apoptozu desteklemek için prefrontal korteks ve hipokampus bölgelerine ait kesitlere aktive antikaspaz-3 immunohistokimyasal boyama uygulandı. TUNEL boyamada değerlendirilen şekilde hücre sayımları yapılarak yüzde oran cinsinden antikaspaz-3 pozitif hücre sayıları belirlendi ve analiz edildi. Yapılan değerlendirme sonucunda EMA grubunda antikaspaz-3 pozitif hücre oranının sham ve EMA+KAR gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu (Şekil 11). Gruplara ait görüntüler Şekil 9 ve 10'da görülmektedir.

**Şekil 11: Antikaspaz-3 (+) hücre sayısı**

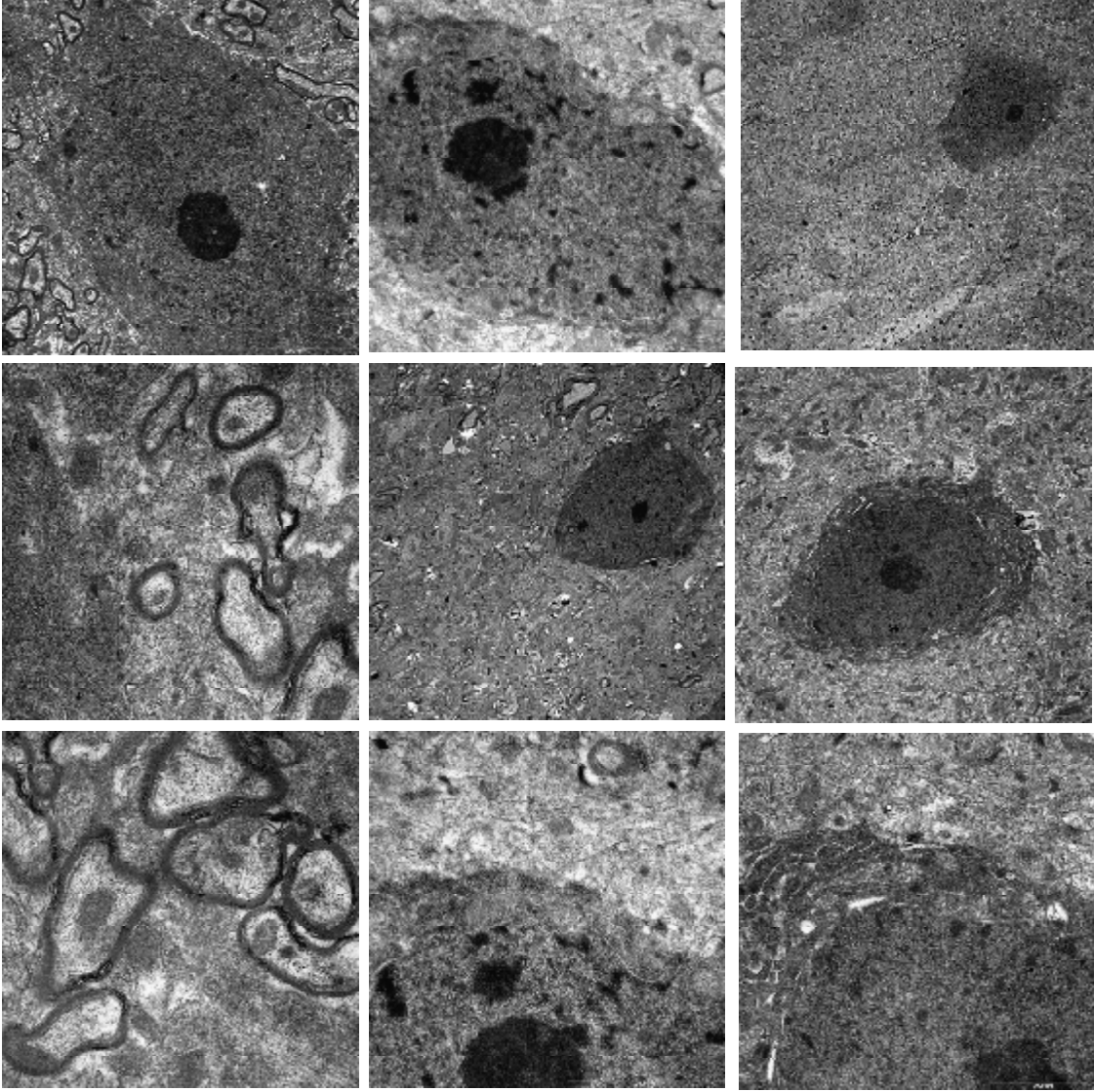


#### 4.3.4. Elektron mikroskopik inceleme

Hipokampus

Prefrontal korteks

Korpus Striatum

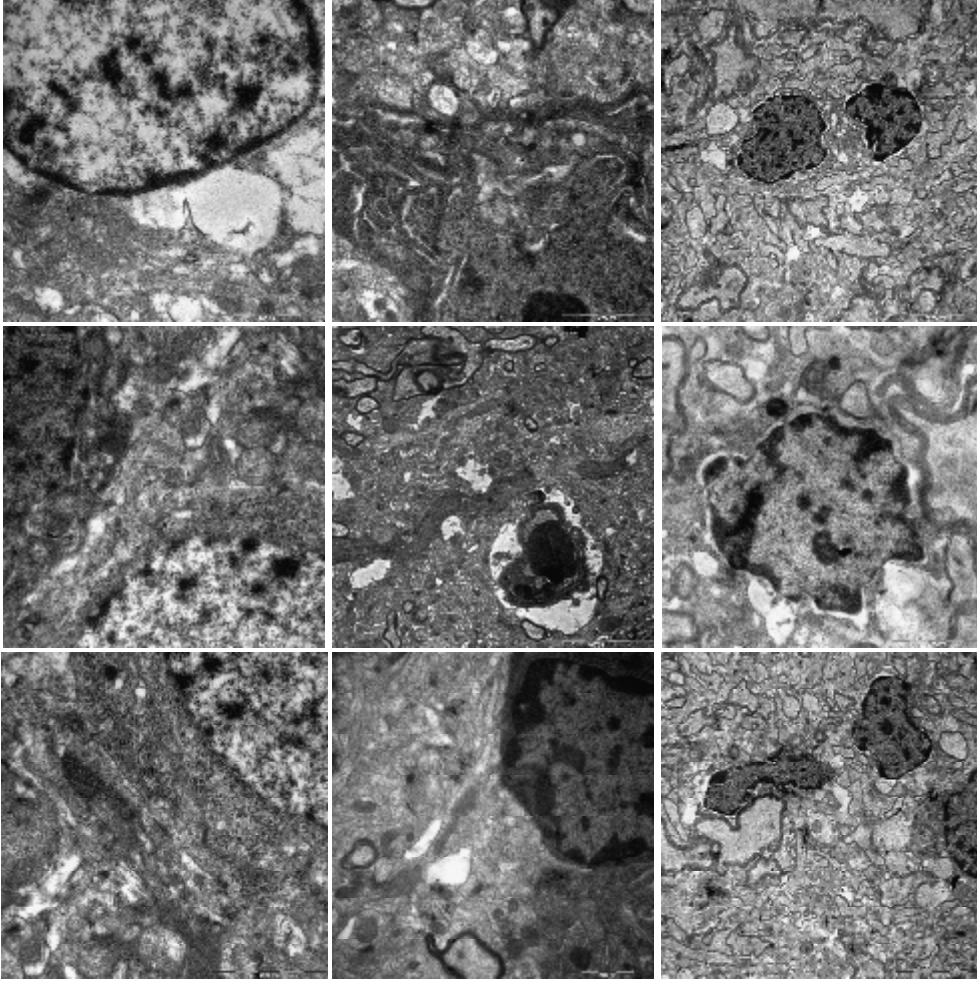


**Şekil 12:** Sham grubuna ait Hipokampal, prefrontal korteks ve korpus striatuma ait nöronlardan alınan ince kesitler.

**Hipokampus**

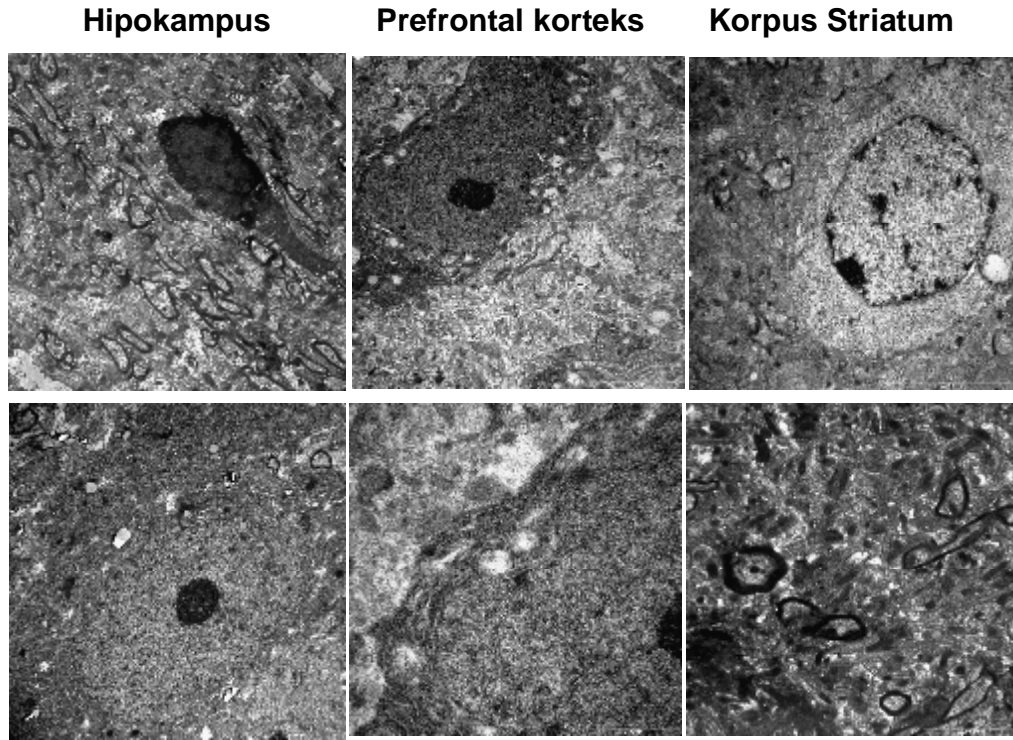
**Prefrontal korteks**

**Korpus Striatum**



**Şekil 13:** EMA grubuna ait Hipokampal, prefrontal korteks ve korpus striatuma ait nöronlardan alınan ince kesitler.





**Resim 14:** EMA+KAR grubuna ait Hipokampal, prefrontal korteks ve korpus striatuma ait nöronlardan alınan ince kesitler.

## **5. TARTIŞMA**

Bu çalışmada, 50 Hz, 3 mT EMA'na maruz kalan sıçan beyin dokusunda karnitinin yapısal, immunohistokimyasal ve antioksidatif etkileri araştırılmıştır.

EMA'nın biyolojik etkileri 19. yüzyıl başından beri çalışma konusu olmuştur. 1950'den bu yana yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Günümüzde elektromanyetik alan oluşturan birçok kaynak bulunmaktadır. Manyetik rezonans görüntüleme, baz istasyonları, yüksek gerilim hatları, elektrikli ev aletleri gibi elektromanyetik alan kaynakları sebebiyle eski doğal çevremize göre çok daha yüksek oranda elektromanyetik alana maruz kalmaktayız. Günümüzde insanlar iki tipte EMA'na maruz kalmaktadır: 1. Elektrik-elektronik cihazlar ve güç kablolarından kaynaklanan çok düşük frekanslı EMA. 2. Kablosuz cihazlar (cep telefonu ve telsiz telefon gibi) ve radyo yayın kulelerinden kaynaklanan radyofrekans dalgaları. Her iki tip de genel olarak EMA'nı tanımlamaktadır ve non-iyonizan radyasyon sınıfına girmektedir. Dolayısıyla iyonizan radyasyon gibi atom yörüngesinde elektronların kırılmasına yol açmamaktadır. EMA'nın biyolojik etkileri tek bir mekanizma ile açıklanamamaktadır. Teorilerden biri osilasyon gösteren eksternal elektrik alanların plazma membranının her iki tarafındaki her serbest iyon üzerine osilatuvar bir güç oluşturması ve membran boyunca hareket ettirilmesidir. İyonların hareketi membrandaki iyon kanallarının bozulmasına, membranda biyokimyasal değişiklik oluşmasına ve dolayısıyla tüm hücre fonksiyonunun bozulmasına yol açmaktadır. (90,91)

EMA etkisi ile biyolojik sistemlerde oluşan patolojik süreçlerin anlaşılması için serbest radikallerin hücre kaynaklarının araştırılması önem taşımaktadır. Lipidler membran yapısında bulunmaları nedeniyle hücre içi sinyal iletiminde rol oynamaktadır. Günümüzde, serbest radikallerin hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerini ve amino asitleri oksidize ederek hücre hasarına yol açtığı bilinmektedir. Membrandaki doymamış zincirlerden bir hidrojenin çıkarılması bir karbon radikalinin oluşumuna ve oksijenle reaksiyona girerek peroksil radikali oluşturmasına yol açmaktadır. Antioksidan enzimler serbest radikalleri temizleyerek, oksidatif hasara karşı koruyuculuk yapmaktadır. Bu enzimlerin beyindeki aktivitelerinin düşük olması ve nöron membranlarında kolayca okside olabilen yağ asitlerinin yüksek seviyede olması nedeniyle, beyin oksidatif hasara karşı özellikle yatkınlık göstermektedir (92,93, 94).

Bu çalışmada, EMA+S grubunda lipid peroksidasyonu üç beyin bölgesinde de sham ve EMA+KAR gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Yapılan çalışmalar

EMA maruziyeti ile lipid peroksidasyonu arasında ilişki bulunduğunu göstermektedir. Moustafa ve ark. cep telefonlarının oluşturduğu elektromanyetik alanın plazma lipid peroksidasyonunu arttırdığını göstermiştir (95). İlhan ve ark. sıçan beyinlerinde yaptıkları çalışmalarında cep telefonu maruziyetinin tüm beyin homojenatlarında lipid peroksidasyonunu arttırdığını göstermiştir (96). Meral ve ark. 900 MHz EMA maruziyeti sonucu, kobaylarda beyin dokusu ve plazmalarında MDA seviyelerinin arttığını göstermiştir (97). Bediz ve ark. yaptıkları çalışmada 50 Hz 50 mG EMA'ya maruz kalan sıçan beyin homojenatlarında TBARS seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir (98). Jelenkovic ve ark. yaptıkları çalışmada EMA'na maruz kalan sıçan beyinlerinde lipid peroksidasyonunun arttığını göstermişlerdir (99). Çalışmamızda EMA'nın sıçan beyin dokusunda bölgesel olarak MDA artışına neden olduğu gösterildi. Bizim çalışmamızda olduğu gibi farklı beyin bölgelerinde EMA'nın lipid peroksidatif etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, Karnitin uygulanması beyin dokusunda EMA'nın neden olduğu MDA artışını önlemiştir. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar karnitinin lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermektedir. Barhwal ve ark. hipoksik hasar oluşturulan sıçan hipokampusunda karnitin uygulamasının lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermiştir (100). Sıçan iskemi modelinde karnitin tedavisi hipokampusta TBARS seviyelerini düşürmüştür (101). Nörotoksisite oluşturulan sıçanlarda karnitin tedavisi MDA seviyelerini düşürmüştür (102). Exitotoksik nöron hasarı modelinde in vitro ve in vivo olarak karnitinin lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (103). Literatürde karnitinin EMA maruziyeti sonucu oluşan lipid peroksidasyonuna karşı beyin dokusundaki koruyucu etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır.

Antioksidan enzimler serbest radikalleri temizleyerek oksidatif hasara karşı koruma sağlamaktadır. Süperoksid radikalleri oksidatif hasarla sonuçlanan reaksiyon zincirini başlatır. SOD, bu radikalleri uzaklaştıran esas enzimdir. SOD, süperoksid radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizlemektedir. Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin temizlenmesinde GPx görev almaktadır. GPx, hidrojen peroksiti indirgenmiş glutatyonla bağlayarak suya indirgenmesini sağlar. Bu reaksiyon sırasında indirgenmiş glutatyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatyona çevirir (GSSG) (47).

Bu çalışmada SOD ve GPx enzim aktiviteleri EMA+S grubunda sham ve EMA+KAR gruplarına göre anlamlı olarak azalmış bulundu. Yapılan çalışmalarda EMA'na maruz kalan beyin dokusunda antioksidan enzim aktivitelerinin düştüğü gösterilmiştir. İlhan ve ark. cep telefonlarının oluşturduğu EMA'nın beyin dokusunda

SOD ve GPx aktivitelerini düşürdüğünü göstermiştir (96). Bediz ve ark. 50 Hz EMA' na maruz kalan sıçan eritrosit ve beyinlerinde glutasyon seviyelerinin düştüğünü göstermiştir (98). Meral ve ark. cep telefonlarının oluşturduğu EMA'nın kobay beyin dokusunda antioksidan enzim aktivitelerini düşürdüğünü göstermiştir (97). Çalışmamızın bulguları diğer çalışmaların bulgularını desteklemektedir.

Çalışmamızda, karnitin uygulanan grupta SOD ve GPx aktiviteleri her üç beyin bölgesinde de yükselmiş olarak bulundu. Deneysel modellerde karnitin antioksidatif etkisi gösterilmiştir. Hipoksik hasar oluşturulan sıçanlarda karnitin tedavisi hipokampusda GPx aktivitesini yükseltmiştir (100). Karnitin yaşlı sıçan beyinlerinde antioksidan enzim aktivitelerini arttırmaktadır (104). Nörotoksisite oluşturulan sıçanlarda karnitin tedavisi beyin dokusunda antioksidan etki göstermektedir (102). (105) Karnitin EMA uygulanan beyin dokusundaki farklı anatomik bölgelerde antioksidan etkilerini gösteren çalışma bulunmamaktadır.

Serbest radikallerin makromoleküllerde oluşturduğu hasarların önemli bir biyolojik sonucu hücre ölümüne yol açabilmesidir. Serbest radikaller direkt veya indirekt yollarla apoptotik hücre ölümünü başlatabilmektedir. Apoptoz birçok biyolojik, kimyasal ve fiziksel etkenle oluşabilmekte ve embriyoner gelişimde de rol oynamaktadır. Hücreler morfolojik olarak hücre volümünde azalma, membran bütünlüğünde bozulma ve çekirdek fragmantasyonu ile karakterizedir. Apoptoz iki esas sinyal ileti yolu ile tetiklenmektedir. Bunlardan birincisi, ölüm reseptörleri yolağıdır. Bu yolak tümör nekroz faktör (TNF) ailesine ait yolaktır ve kaspazların direkt olarak aktivasyonunu tetiklemektedir. İkinci yolak, mitokondriyal ileti yoludur, stres, granzim B veya p53 ileti yolağı ile aktive edilir (106). Oksidatif stres farklı apoptotik enzimleri aktive etmektedir. Yapılan çalışmalarda kaspazlar gibi birçok apoptotik proteinin oksidatif hasarı gösterilmiştir (66).

Bu çalışmada dokudaki apoptozu göstermek amacıyla TUNEL boyama ve aktive antikaspaz-3 immunohistokimyasal işaretleme yapıldı. EMA'na maruz kalma sonucunda beyin dokusunda apoptozun arttığı gösterildi. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar EMA maruziyetinin birçok dokuda DNA kırıklarına yol açtığı ve apoptotik hücre ölümünü arttırdığını göstermektedir. Değişik hücre kültürlerinde yapılan in vitro çalışmalarda EMA'nın apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (3, 107,108).

Antioksidatif ajanlar serbest radikal oluşumunu azaltarak antiapoptotik etki gösterebilmektedir. Çalışmamızda karnitin uygulanan grupta apoptozun azaldığı bulundu. Çeşitli deneysel modellerde karnitin antiapoptotik etkisi gösterilmiştir.

Selvatici ve ark. nöronal hücre kültürü modelinde nörotoksik ajanla oluşturdukları apopitoza karşı karnitinin koruyucu etkisini göstermişlerdir (109). Barhwal ve ark. hipokampal hücre kültürü modelinde hipoksik stres sonucu hücre canlılığının değerlendirilmesinde karnitinin DNA kırıklarına karşı kültür hücrelerini koruduğu gösterilmiştir (110). Zou ve ark. yavru sıçanlarda inhale anestetiklerle indüklenen nöronal hücre ölümünü karnitinin önlediğinin göstermişlerdir (111). Karnitin hipoksik hasar oluşturulan sıçanlarda hipokampal nöronları apopitoza karşı korumaktadır (112). Karnitin lipoik asitle birlikte uygulandığı zaman nörotoksite oluşturulan hipokampus kültür hücrelerini apopitoza karşı koruyucu etki göstermektedir (113). Wang ve ark. sıçan beyin kültüründe nörotoksinle oluşturulan apopitoza karşı karnitinin koruyucu etkisi bulunduğunu göstermiş ve nörodejeneratif hastalıklarda tedavi seçeneği olabileceğini ileri sürmüşlerdir (114). Bir başka hücre kültürü çalışmasında karnitinin yine apopitoza karşı etkili olduğu gösterilmiş ve Alzheimer'lı hastaların tedavisinde yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (115). Hipoglisemik hasar oluşturulan hipokampus hücrelerinde karnitin, apopitoza karşı koruyucu etki göstermektedir (116). Yapılan in vivo ve in vitro deneyler karnitinin antiapopitotik etkisi bulunduğuna işaret etmektedir, fakat EMA'nın neden olduğu nöronal apopitoza karşı etkisinin olup olmadığı belli değildir. Çalışmamızda bu konuya da açıklık getirilmiştir.

EMA uygulanması beyin dokusunda ışık ve elektron mikroskopik düzeyde belirlenebilen nöron kaybı ve hasar bulguları oluşturmaktadır. Bas ve ark. cep telefonlarından kaynaklanan EMA uygulanan sıçanlarda hipokampusta nöron sayısının anlamlı olarak azaldığını göstermiştir (117). Benzer şekilde Odacı ve ark. benzer deneysel modelde girus dentatus bölgesinde EMA uygulanması ile nöron kaybı olduğunu göstermişlerdir (118). Çalışmamızda tesbit ettiğimiz EMA grubundaki nöron kaybı literatürle paralellik göstermektedir. Önem ve ark. iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçan beyinlerinde ışık ve elektron mikroskopik olarak karnitinin etkisini incelemişlerdir. Hasar grubunda elektron mikroskopik olarak; hipokampus bölgesinde perinöral ödem, sitoplazmik yoğunluk artışı, sekonder lizozomlar, mitokondrilerde dilatasyon ve dejenerasyon, golgi ve endoplazmik retikulum sisternalarında dilatasyon saptanmıştır. Karnitin uygulanan grupta hasar bulgularının oluşmadığı gözlenmiştir. Yapılan hücre sayımı değerlendirmesinde karnitinin iskemi-reperfüzyonun neden olduğu hücre hasarını engellediği ve hasar grubunda bulunan nöron sayısındaki anlamlı düşüşün karnitin grubunda oluşmadığı gösterilmiştir (119). Shenk ve ark. yaptıkları çalışmalarında vasküler demanslı farelerde karnitinin beyin dokusu üzerindeki etkilerini

incelemişlerdir. Genetik hasarlı farelerin hipokampus bölgesindeki nöronlarda elektron mikroskopik olarak özellikle mitokondriyal hasar olduğu gözlenmiştir. Karnitin uygulanması bu farelerde mitokondriyal hasarı önlemekte, aynı zamanda nöronlarda lipofuksin ve miyelin benzeri yapıların oluşumunu da engellemektedir (120).

Sonuç olarak bu çalışmada beynin farklı bölgelerinde EMA'nın neden olduğu hasara karşı karnitinin koruyucu etkisi ilk kez gösterilmiştir. Karnitin antioksidatif etkisi aracılığıyla antiapoptotik etki göstermektedir. EMA'nın biyolojik sistemlerde oluşturduğu zararlı etkilerin önlenmesi veya hasarların en aza indirilebilmesi açısından endojen antioksidanların modifikasyonu önem taşımaktadır. Toplum sağlığının korunması amacıyla EMA'nın hasar oluşturuvcu mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve koruyucu ya da destek tedavilerinin geliştirilmesi açısından çalışmaların ilerletilmesi gerekmektedir.

## **6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Günümüzde elektrik cihazların kullanımının artması EMA'na maruz kalımı arttırmaktadır. EMA'na maruz kalma ve kanser riski arasında korelasyon bulunması konuyu toplumsal sorun haline getirmektedir. Bazı epidemiyolojik çalışmalar EMA'na maruz kalma ile beyin, meme ve hematolojik maligniteler arasında korelasyon bulunduğunu göstermektedir. EMA'dan kaçınmak mümkün olmadığı için yol açtığı zararların azaltılması veya önlenmesi gerekmektedir. EMA'nın hücresel davranışları nasıl etkilediği tam olarak açıklanamamıştır, bununla birlikte EMA'nın serbest radikal üretimiyle sonuçlanan kimyasal reaksiyonlarla etkileşmesi gibi çeşitli hipotezler mevcuttur. Redox sistemlerin uyarılması transkripsiyon genlerini, Reaktif Oksijen Türlerini ve hücre ölümüyle sonuçlanan mitokondrial komponentlerin oksidasyon/degradasyonunu aktive edebilir. Apoptozun bu üç basamaklı süreç yoluyla aktive olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple EMA, ROS üzerine etkiyerek apoptoza yol açabilmektedir.

Beyin dokusu diğer organlara göre daha fazla toksik radikaller üretmesi nedeniyle serbest radikal hasarına yatkınlık göstermektedir. EMA'na maruz kalma beyinde birçok biyolojik süreci etkilemenin yanı sıra DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına yol açabilmekte, bu durum karsinogenez gelişimi için potansiyel risk oluşturmaktadır. Bu nedenle antioksidan koruyucuların kullanılması muhtemel zararlı riskleri önlemek açısından yararlı olabilir.

Karnitin insan dokularında yaygın olarak bulunan doğal bir maddedir. Karnitin eksojen olarak verildiği zaman özgün taşıyıcısı ile hızlı bir şekilde kan-beyin bariyerini geçmektedir. Bu yönüyle karnitin nöroprotektif ajan özelliği göstermekte, nekrotik ve apoptotik nöron ölümünü engelleyebilmektedir. Gelecek çalışmalar EMA'nın etkilerinin değerlendirilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi ve koruyucu terapilerin kullanılması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre karnitin, doğal bir madde olması ve koruyucu etkileri nedeniyle bu alanda kullanılabilecek terapötik destek ajanlardan birisidir.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Ishisaka R, Kanno T, Inai Y, Nakahara H, Akiyama J, Yoshioka T, Utsumi K. Effects of a magnetic fields on the various functions of subcellular organelles and cells. *Pathophysiology*. 2000, 7: 149–152
- 2- Wolf FI, Torselloa A, Tedescoa B, Fasanellaa S, Boninsegnaa A, D'Ascenzob M, Grassib C, Azzenab GB, Cittadinia A. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: Possible involvement of a redox mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005, 1743: 120–129
- 3- Grassi C, D'Ascenzo M, Torsello A, Martinotti G, Wolf F, Cittadini A, Azzena GB. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium*. 2004, 35: 307-315
- 4- Jajte J, Grzegorzczuk J, Zmyslony M, Rajkowska E. Effect of 7 mT magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: apoptosis, necrosis and free radical processes. *Bioelectrochemistry*. 2002, 57:107-111
- 5- Tofani S, Barone D, Cintorino M, Santi MM, Ferrara A, Orlassino R, Ossola P, Peroglio Rolfo K, Ronchetto F. Static and ELF magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis. *Bioelectromagnetics*. 2001, 22:419-428
- 6- Tanaka Y, Sasaki R, Fukui F, Waki H, Kawabata T, Okazaki M, Hasegawa K, Ando S. Acetyl-L-karnitine supplementation restores decreased tissue karnitine levels and impaired lipid metabolism in aged rats. *Journal of Lipid Research*. 2004, 45:729-735
- 7- Peluso G, Barbarisi A, Savica V, Reda E, Nicolai R, Benatti P, Calvani M. Karnitine: An osmolyte that plays a metabolic role. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2000, 80:1-10
- 8- Vaz FM, Wanders RJA. Karnitine biosynthesis in mammals. *Biochemistry Journal*. 2002, 381:417-429  
Hossmann KA, Hermann DM. Effects of electromagnetic radiation of mobile phones on the central nervous system. *Bioelectromagnetics*. 2003, 24:49-62
- 9- Rosenthal RE, Bogaert YE, Fiskum G. Delayed therapy of experimental global cerebral ischemia with acetyl-L-karnitine in dogs. *Neuroscience Letters*. 2005, 378:82-87



- 10- Haripriya D, Devi MA, Kokilavani V, Sangeetha P, Panneerselvam C. Age-dependent alterations in mitochondrial enzymes in cortex, striatum and hippocampus of rat brain-potential role of L-karnitine. *Biogerontology*. 2004, 5: 355-364
- 11- Haripriya D, Sangeetha P, Kanchana A, Balu M, Panneerselvam C. Modulation of age-associated oxidative DNA damage in rat brain cerebral cortex, striatum and hippocampus by L-karnitine. *Experimental Gerontology*. 2005, 40: 129-135
- 12- Hossmann KA, Hermann DM. Effects of electromagnetic radiation of mobile phones on the central nervous system. *Bioelectromagnetics*. 2003, 24: 49-62
- 13- Sieron A, Brus R, Szkilnik R, Plech A, Kubanski N, Cieslar G. Influence of alternating low frequency magnetic fields on reactivity of central dopamine receptors in neonatal 6-hydroxydopamine treated rats. *Bioelectromagnetics*. 2001, 22: 479-486.
- 14- Generation and Measurement of Electromagnetic Fields in Geophysical Applications, *Methods in Geochemistry and Geophysics*, 2009; 43: 449-490.
- 15- Devendraa Siingha, R.P. Singh, A.K. Kamra, P.N. Gupta, Rajesh Singh, V. Gopalakrishnan, A.K. Singh. Review of electromagnetic coupling between the Earth's atmosphere and the space environment, *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics*, 2005; 67: 637–658.
- 16- Electromagnetic effects - From cell biology to medicine. Funk RH, Monsees T, Ozkucur N. *Prog Histochem Cytochem*. 2009; 43(4):177-264.
- 17- Özgüner F, Hakan Mollaoğlu H. Manyetik alanın organizma üzerindeki biyolojik etkileri. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2006; 13(1): 38-41.
- 18- Martin Rösli. Radiofrequency electromagnetic field exposure and non-specific symptoms of ill health: A systematic review. *Environ Res*. 2008; 107: 277–287.
- 19- De Sezer, Ayoub J, Peray P, Miro L, Touitou Y. The effects of radiocellul telephones on the circadian patterns of melatonin secretion, *Achronobiological rhythm marker*. *J pineal Res*, 1999; 27(4): 237-242.
- 20- Lai H, Singh NP. Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in the rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 1997;18: 446-454.
- 21- Robinson JG, Pendleton AR, Monson KO, Murray BK, O'Neill KL. Decreased DNA repair rates and protection from heat induced apoptosis mediated by electromagnetic field exposure. *Bioelectromagnetics* 2002; 23(2):106-112.

22- Rösli M, Lörtscher M, Egger M. Mortality from Neurodegenerative Disease and Exposure to Extremely Low-Frequency Magnetic Fields: 31 years of Observations on Swiss Railway Employees. *Neuroepidemiology*. 2007; 28:197-206.

23- Dubreuil D, Jay T, Edeline JM. Does head-only exposure to GSM-900 electromagnetic fields affect the performance of rats in spatial learning tasks? *Behav Brain Res*, 2002; 129(1-2): 203-270.

24- Borbely AA, Huber R, Graft T, Gallmann E, Achermann P.(1999). Pulsed high frequency fields effects human sleep and sleep electroencephalogram. *Neurosclett*, 275(3): 207-210.

25- Mclauchlan, K.A. A possible mechanism for the effects of electromagnetic fields on biological cells. *Science & Technology*, 1989; 48: 46-48.

26- Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB*. 1997, 11: 118-124.

27- Reiter RJ. Aging and oxygen toxicity: relation to changes in melatonin. *Age*. 1997, 20: 201-213.

28- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York. Oxford Science Publications. 1999.

29-Tamer L, Polat G, Eskandari G. Serbest radikaller. *Mersin Üniv.Tıp Fakültesi Dergisi*. 2000, 1: 52-58.

30- Wickens AP. Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*. 2001, 128: 379-391.

31- Schöneich C. Reactive oxygen species and biological aging:a mechanistic approach. *Experimental Gerontology*. 1999, 34: 19-34.

32- Dean RT, Fu S, Stocker R. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochemistry Journal*. 1997, 324: 1-18.

33- Chung HY, Baek BS, Song SH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age*. 1997, 20: 127-140.

34- Winterbourn CC, Kettle AJ. Radical-radical reactions of superoxide:a potential route to toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, 305: 729-736.

35-Semsei I. On the nature of aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2000,117: 93-108.

36- Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997, 1362: 116-127.

- 37- De Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN. Biomarkers of free rad damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radicals in Biology & Medicine*. 1999, 26: 202-226.
- 38- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation initiated by superoxide dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Letters*. 1984, 172(2): 245-249.
- 39- Ashok BT, Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental Gerontology*. 1999, 34:293-303.
- 40- Naoi M, Maruyama W. Cell death of dopamin neurons in aging and Parkinson's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1999, 111: 175-188.
- 41- Toussaint O, Remacle J, Dumont P. Oxidative stress induced cellular senescence. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2002, 1-6.
- 42- Yu BP. Approaches to anti-aging intervention:the promises and the uncertainties. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1999, 111: 73-87.
- 43- Hartog GJM, Haenen GR, Vegt E. Superoxide dismutase:the balance between prevention and induction of oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*. 203, 145: 33-39.
- 44- Allen RG. Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. *Age*. 1998, 21: 47-76.
- 45- Vatassery GT. Vit E and other endogenous antioxidants in the CNS. *Geriatrics*. 1998, 53: 525-527.
- 46- Schulz JB, Lindenau J, seyfried J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*. 2000, 267:4904-4911.
- 47- Pajovic SB, Saicic ZS, Spasic MB. Effects of progesterone and estradiol benzoate on glutathione dependent antioxidant enzyme activities in the female rats. *General Physiology and Biophysic*. 1999, 18: 35-44.
- 48- Sastre J, Pallardo FV, Vina J. Glutathione, oxidative stress and aging. *Age*. 1996, 19: 129-139.
- 49- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1986, 246(2): 501-514.
- 50- Joseph JA, Denisova NA, Bielinski D. Oxidative stress protection and vulnerability in aging, *Mechanisms of Ageing and Development*, 2000, 116: 141-143.
- 51- Castelvetri IC, Hale BS, Joseph JA. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2000, 18: 367-381.

- 52- Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*. 2002, 23: 795-807.
- 53- Leutner S, Eckert A, Müller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *Journal of Neural Transmission*. 2001, 108: 955-967.
- 54- Santini MT, Ferrante A, Rainaldi G, Indovina P, Indovina PL. Extremely low frequency (ELF) magnetic fields and apoptosis: a review. *Int J Radiat Biol*. 2005; 81(1): 1-11.
- 55- G.Majno, I. Joris. *Cells, tissues and diseases. Principles of general pathology*. Sec.edition, Copyright ©2004, Oxford University Press.
- 56- Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9(2): 143-148.
- 57- Yuan J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis*. 2009;14(4): 469-477.
- 58- Guerrero A and Arias M. Apoptosis. *Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach*, Third Edition, Academic Press, 2001:1171-1184.
- 59- Shield MA and Mirkes PE. Apoptosis. *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Academic Press, 1998:159-188.
- 60- Thompson C.B. Apoptosis, *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, 1999.
- 61- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Basic Pathology*, sixth edition, Elsevier, 1997.
- 62- Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer*. 1994; 30A (14): 2068-2073.
- 63- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 1992 Apr 2;356 (6368): 397-400.
- 64- Hail N, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis*, 2006; 11: 889–904.
- 65- Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 2000; 74: 281-286.
- 66- Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research*, 2009; 674: 3-22.

67- Cooper GM. *The Cell: a molecular approach* ASM press, 2th edition, Washington DC. 2000.

68- Ulukaya E, Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, 1-15

69- Hilton DA, Love S, Barber R, Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hybridization using digoxigenin-labeled poly-A oligonucleotide probes to detect thymidine-rich DNA sequences, *J Histochem Cytochem*, 1997, 42:13-20.

70- Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. *Wheater's functional histology*, 5th ed. Elsevier, 2007.

71- Gartner LP, Hiatt JP. *Color textbook of histology*, 3rd ed. Saunders, Elsevier, 2007.

72- Mills SE. *Histology for pathologists*, 3rd ed. Lippincott, 2007.

73- Tanaka Y, Sasaki R, Fukui F, Waki H, Kawabata T, Okazaki M, Hasegawa K, Ando S. Acetyl-L-carnitine supplementation restores decreased tissue carnitine levels and impaired lipid metabolism in aged rats. *Journal of Lipid Research*. 2004, 45: 729-735.

74- Arduini A, Bonomini M, Savica V, Amato A, Zammit V. Carnitine in metabolic disease: potential for pharmacological intervention. *Pharmacol Ther*. 2008;120 (2):149-156.

75- Crill CM, Helms RA. The use of carnitine in pediatric nutrition. *Nutr Clin Pract*. 2007; 22 (2):204-213.

76- Soczynska JK, Kennedy SH, Chow CS, Woldeyohannes HO, Konarski JZ, McIntyre RS. Acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid: possible neurotherapeutic agents for mood disorders? *Expert Opin Investig Drugs*. 2008;17 (6):827-843.

77- Haripriya D, Sangeetha P, Kanchana A, Balu M, Panneerselvam C. Modulation of age-associated oxidative DNA damage in rat brain cerebral cortex, striatum and hippocampus by L-carnitine. *Experimental Gerontology*. 2005, 40: 129-135.

78- Peluso G, Barbarisi A, Savica V, Reda E, Nicolai R, Benatti P, Calvani M. Carnitine: An osmolyte that plays a metabolic role. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2000, 80: 1-10.

79- Csala M, Marcolongo P, Lizák B, Senesi S, Margittai E, Fulceri R, Magyar JE, Benedetti A, Bánhegyi G. Transport and transporters in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768 (6):1325-1341.

80- Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2006;142C (2):77-85.

81- Rosenthal RE, Bogaert YE, Fiskum G. Delayed therapy of experimental global cerebral ischemia with acetyl-L-carnitine in dogs. *Neuroscience Letters.* 2005, 378: 82-87.

82- Zanelli SA, Solenski NJ, Rosenthal RE, Fiskum G. Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1053:153-161.

83- Russell S. Carnitine as an antidote for acute valproate toxicity in children. *Curr Opin Pediatr.* 2007;19 (2):206-210.

84- Liu Y, Rosenthal RE, Starke-Reed P, Fiskum G. Inhibition of postcardiac arrest brain protein oxidation by acetyl-L-carnitine. *Free Radic Biol Med.* 1993;15(6): 667-670.

85- Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G. Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. *J Neurosci Res.* 2005;79 (1-2): 240-247.

86- Calabrese V, Ravagna A, Colombrita C. Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. *J. Neurosci Res.* 2005; 79 (4): 509–521.

87- Laviano A, Meguid MM, Gujjarro A, Muscaritoli M, Cascino A, Preziosa I, Molino A, Rossi Fanelli F. Antimyopathic effects of carnitine and nicotine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006; 9 (4):442-448.

88- Izgut-Uysal VN, Agac A, Derin N. Effect of L-carnitine on carrageenan-induced inflammation in aged rats. *Gerontology* 2003; 49:287–292.

89- Dhitavat S, Ortiz D, Rogers E, et al. Folate, vitamin E, and acetyl-L-carnitine provide synergistic protection against oxidative stress resulting from exposure of human neuroblastoma cells to amyloid-beta. *Brain Res* 2005; 1061:114–117.

90- Hardell L, Sage C. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2008; 62: 104-109.

91- Panagopoulos DJ, Karabarbounis A, Margaritis LH. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2002; 298: 95–102.

92- Hashish AH, El-Missiry MA, Abdelkader HI, Abou-Saleh RH. Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and

extremely low frequency electromagnetic fields in mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008; 71: 895–902.

93- Boulton AA. Symptomatic and neuroprotective properties of the aliphatic propargylamines. *Mechanisms of Ageing and Development.* 1999, 111: 201-209.

94- Kovacic P and Pozos RS. Cell Signaling (Mechanism and Reproductive Toxicity): Redox Chains, Radicals, Electrons, Relays, Conduit, Electrochemistry, and Other Medical Implications. *Birth Defects Research (Part C).* 2006; 78:333–344.

95- Moustafa YM, Moustafa RM, Belacy A, Abou-El-Ela SH, Ali FM. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2001; 26: 605–608.

96- Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamilsı S, Iraz M, Akyol O, Ozen S. Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta.* 2004; 340: 153–162.

97- Meral I, Mert H, Mert N, Deger Y, Yoruk I, Yetkin A, Keskin S. Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs. *Brain Res.* 2007; 1169: 120–124.

98- Bediz CS, Baltacı AK, Mogulkoc R, Oztekin E. Zinc supplementation ameliorates electromagnetic field-induced lipid peroxidation in the rat brain. *Tohoku J Exp Med.* 2006; 208(2):133-140.

99- Jelenković A, Janać B, Pesić V, Jovanović DM, Vasiljević I, Prolić Z. Effects of extremely low-frequency magnetic field in the brain of rats. *Brain Res Bull.* 2006; 68(5): 355-360.

100- Barhwal K, Singh SB, Hota SK, Ilavazhagan JG. Acetyl-L-Carnitine ameliorates hypobaric hypoxic impairment and spatial memory deficits in rats. *European Journal of Pharmacology.* 2007; 570: 97–107.

101- Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Omar FA, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Shabanah OA. Carnitine esters prevent oxidative stress damage and energy depletion following transient forebrain ischaemia in the rat hippocampus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2006; 33: 725–733.

102- Tunez I, Munoz MC, Medina FJ, Salcedo M, Feijo´o M and Montilla P. Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro- and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25: 119–127

103- Silva-Adaya D, De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernandez J, Binienda Z, Ali SF and Santamaria A. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *Journal of Neurochemistry*. 2008; 105: 677–689.

104- Muthuswamy AD, Vedagiri K, Ganesan M, Chinnakannu P. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: Role of l-carnitine and dl- $\alpha$ -lipoic acid. *Clinica Chimica Acta*. 2006; 368: 84–92.

105- Onem G, Aral E, Enli Y, Oguz EO, Coskun E, Aybek H, Ozcan AV, Sacar M, Bir LS, Baltalarli A, Baycu C. Neuroprotective effects of L-carnitine and vitamin E alone or in combination against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res*. 2006;131 (1): 124-130.

106- Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009; 30: 153–170.

107- Phillips JL, Singh NP, Lai H. Electromagnetic fields and DNA damage. *Pathophysiology*. 2009; 16(2-3):79-88.

108- Lai H, Singh NP. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ Health Perspect*. 2004;112 (6):687-694.

109- Selvatici R, Previati M, Marino S, Marani L, Falzarano S, Lanzoni I, Siniscalchi A. Sodium azide induced neuronal damage in vitro: evidence for non-apoptotic cell death. *Neurochem Res*. 2009;34 (5):909-916.

110- Barhwal K, Hota SK, Prasad D, Singh SB, Ilavazhagan G. Hypoxia-induced deactivation of NGF-mediated ERK1/2 signaling in hippocampal cells: neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *J Neurosci Res*. 2008;86 (12): 2705-2721.

111- Zou X, Sadovova N, Patterson TA, Divine RL, Hotchkiss CE, Ali SF, Hanig JP, Paule MG, Slikker W Jr, Wang C. The effects of L-carnitine on the combination of, inhalation anesthetic-induced developmental, neuronal apoptosis in the rat frontal cortex. *Neuroscience*. 2008;151 (4):1053-1065.

112- Barhwal K, Singh SB, Hota SK, Jayalakshmi K, Ilavazhagan G. Acetyl-L-carnitine ameliorates hypobaric hypoxic impairment and spatial memory deficits in rats. *Eur J Pharmacol*. 2007; 570 (1-3):97-107.



113- Abdul HM, Butterfield DA. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42 (3):371-384.

114- Wang C, Sadovova N, Ali HK, Duhart HM, Fu X, Zou X, Patterson TA, Binienda ZK, Virmani A, Paule MG, Slikker W Jr, Ali SF. L-carnitine protects neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neuronal apoptosis in rat forebrain culture. *Neuroscience.* 2007;144 (1):46-55.

115- Abdul HM, Calabrese V, Calvani M, Butterfield DA. Acetyl-L-carnitine-induced up-regulation of heat shock proteins protects cortical neurons against amyloid-beta peptide 1-42-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2006;84 (2):398-408.

116- Hino K, Nishikawa M, Sato E, Inoue M. L-carnitine inhibits hypoglycemia-induced brain damage in the rat. *Brain Res.* 2005;1053 (1-2):77-87.

117- Bas O, Odaci E, Kaplan S, Acer N, Ucok K, Colakoglu S. 900 MHz electromagnetic field exposure affects qualitative and quantitative features of hippocampal pyramidal cells in the adult female rat. *Brain Res.* 2009;1265:178-185.

118- Odaci E, Bas O, Kaplan S. Effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on the dentate gyrus of rats: a stereological and histopathological study. *Brain Res.* 2008;1238:224-229.

119- Onem G, Aral E, Enli Y, Oguz EO, Coskun E, Aybek H, Ozcan AV, Sacar M, Bir LS, Baltalarli A, Baycu C. Neuroprotective effects of L-carnitine and vitamin E alone or in combination against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res.* 2006;131 (1):124-130.

120- Shenk JC, Liu J, Fischbach K, Xu K, Puchowicz M, Obrenovich ME, Gasimov E, Alvarez LM, Ames BN, Lamanna JC, Aliev G. The effect of acetyl-L-carnitine and R-alpha-lipoic acid treatment in ApoE4 mouse as a model of human Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2009;283 (1-2):199-206.