

156873

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**RAT BEYİN DOKUSUNDA ETANOLLE İNDÜKLENEN
OKSİDATİF STRESE
ANTIOKSİDAN OLAN KARNOZİNİN ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ
ÜMMÜHANİ ÖZEL

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. AYŞE BİLGİHAN

ANKARA-2004

TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu Doktora eğitimim sırasında her zaman yakın ilgisini ve desteğini esirgemeyen, sabır gösteren, tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, danışman hocam Prof.Dr. Ayşe BİLGİHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarında emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN, Prof. Dr. Gürsel BİBEROĞLU'na ve asistan arkadaşım Dr. Ilgım SEVEN'e, çalışmamızın histopatolojik incelemelerini büyük bir titizlikle gerçekleştiren Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Candan ÖZOĞUL'a, hayvan çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı Dr. Şeyda Diker'e ve Araş. Gör. Ebru OFLUOĞLU'na, çalışmalarında verdikleri destekten dolayı başta Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU olmak üzere Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez hazırlanmasında emeği geçen ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Dr. Nilüfer BAYRAKTAR, Dr. Cemile KOCA ve Öznur MERTOĞLU ÇAĞLAR'a da çok teşekkür ediyorum.

Hiç bir zaman desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve nişanlım Semih İlker Türkçü'ye teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Ümmühani ÖZEL

Şekiller veTablolar.....iv	iv
1. GİRİŞ.....1	1
2. GENEL BİLGİLER.....3	3
2.1 Oksidatif Stres ve Biyolojik Sistemlerdeki Etkileri.....3	3
2.2. Beyin ve Oksidatif stres.....11	11
2.3. Beyinde Etanol Metabolizması.....14	14
2.3.1. Oksidatif Yol.....15	15
2.3.1. 1. Alkol Dehidrogenaz (ADH).....16	16
2.3.1.2. Mikrozomal Etanol Oksidasyon Sistemleri (MEOS).....16	16
2.3.1.3. Katalaz17	17
2.3.2. Non-oksidatif Yol.....18	18
2.3.2.1. Yağ asit etil ester (FAEE).....18	18
2.3.2.2. Fosfaditiletanol.....18	18
2.3.3. Beyinde Etanolla İndüklenen Oksidatif Stres.....18	18
2.3.4. Beyin Dokusundaki Antioksidan Savunma Sistemleri.....20	20
2.3.4.1. Enzimler.....21	21
2.3.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; E.C 1.15.1.1).....22	22
2.3.4.2. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (DMAA).....24	24
2.3.4.2.1. Karnozin (β -alanil-L-histidin).....24	24
2.3.4.2.1.1. Kimyasal Yapısı.....25	25
2.3.4.2.1.2. Karnozin Metabolizması.....26	26
2.3.4.2.1.3. Biyolojik Dokularda Karnozin Tayini.....28	28
2.3.4.2.1.4. Biyolojik Fonksiyonları.....28	28
2.3.4.2.1.5. Karnozinin Antioksidan Aktivitesi.....29	29
3. MATERYAL-YÖNTEM.....31	31
3.1.Kullanılan Gereçler.....31	31
3.1.1.Deney Grupları.....31	31
3.1.2. Kullanılan Aletler.....31	31
3.1.3.Kullanılan Kimyasallar.....31	31
3.2. Uygulanan Yöntemler.....32	32
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması.....32	32
3.2.2.Yöntemlerin Uygulanması.....33	33
3.2.2. 1. Beyin Dokusu SOD Aktivitesinin Tayini.....33	33
3.2.2. 2. Beyin Dokusunda Protein Karbonil Düzeylerinin Ölçümü.....35	35
3.2.2. 3. Beyin Dokusu Total MDA Düzeylerinin Ölçümü.....37	37
3.2.2. 4. Beyin Dokusu Karnozin Düzeylerinin Ölçümü.....40	40
3.2.2. 5. Histolojik İnceleme.....44	44

4. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	44
5. BULGULAR.....	45
6. TARTIŞMA.....	48
7.ÖZET	55
8. SUMMARY.....	57
9. ÖZGEÇMİŞ.....	59
10. KAYNAKLAR.....	60



Şekiller

Şekil 1: Oksidatif Stres.....	3
Şekil 2: Oksidatif DNA Hasarı	7
Şekil 3: PUFA'ların Enzimatik ve Non-Enzimatik Lipit Peroksidasyonu.....	9
Şekil 4: Reaktif Aldehitlerin Genel Yapıları.....	10
Şekil 5: Beyin Dokusunda Etanolün Oksidasyon Mekanizmaları.....	15
Şekil 6: Etanolün Asetata Metabolizması.....	15
Şekil 7: Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Mekanizmalar Ve Antioksidan Sistem.....	21
Şekil 8: Dokularda Karnozin Sentezi	27
Şekil 9: Protein Standart Eğrisi.....	36
Şekil 10: Agilent 1100 Serisi HPLC Cihazı	37
Şekil 11: MDA standart Eğrisi.....	38
Şekil 12: Bir numuneye ait MDA kromatogramı.....	39
Şekil 13: Aynı numunenin standartla birlikte bir MDA kromatogramı.....	39
Şekil 14 :HPLC (Waters).....	40
Şekil 15: Karnozin Standart Eğrisi.....	41
Şekil 16 : 0,5 nmol/ml'lik karnozin standartına ait bir kromatogram.....	42
Şekil 17: Karnozin grubundaki bir numuneneye ait kromatogram.....	43
Şekil 18: Kontrol grubu rat beynine ait histolojik bir kesit.....	46
Şekil 19: Etanol grubu rat beynine ait histolojik bir kesit.....	46
Şekil 20 :Karnozin grubu rat beynine ait histolojik bir kesit	47
Şekil 21 : Karnozin+etanol grubu rat beynine ait histolojik bir kesit	47

Tablolar

Tablo 1: Reaktif oksijen ve nitrojen türleri.....	4
Tablo 2: Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonları	6
Tablo 3: Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin sınıflandırılması	22
Tablo 4: Memeli beyninde karnozin varlığı.....	25
Tablo 5: Bulgular	45

1. GİRİŞ

Son yıllardaki çalışmalar; reaktif oksijen türlerinin (ROS), etanol aracılı oksidatif doku hasarıyla ilişkili olduğunu göstermektedir^{1,2}. ROS oluşumundaki artış; hücrelerdeki ve/veya dokulardaki prooksidan ve antioksidan dengenin bozulmasına yol açar³.

Etanolla indüklenen oksidatif stres etanolün başlıca metabolize olduğu karaciğer ile sınırlı değildir. Deneysel veriler, ratlarda yapılan akut ve kronik etanol intoksikasyonunda merkezi sinir sistemi, kalp ve testis gibi çeşitli ekstrahepatik dokuların da etkilenebileceğini göstermiştir. Akut etanol yüklenmesinin serebellumda lipit peroksidasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir⁴.

Etanol, nöronlar ve astrositler gibi farklı serebral alanlarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve lipit peroksidasyonunun artışı ile ilişkilidir⁵. Etanol reaktif oksijen türlerinin, lipit peroksidasyonun, demir türlerinin konsantrasyonunun ve tiyol bağlı grupların oksidasyonunun artışı ile oksidatif strese yol açar ve çeşitli hücre komponentlerinin hasarına sebep olur⁶⁻⁸. Merkezi sinir sisteminin hücresel komponentleri üzerinde etanol toksisitesinin etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için şöyle açıklayabiliriz; nöronlar etanol için seçilmiş bir hedeftir, fakat astrositler yüksek antioksidan içeriğine rağmen, hem insan hem de hayvan modellerinde etanol maruziyeti astroglial hasara neden olmaktadır⁹⁻¹⁰.

Histidin içeren dipeptitler (karnozin, homokarnozin ve anserin) kas ve beyin dokusunda sentezlenebilen önemli ve eşsiz antioksidanlardır¹¹. Yapılan çalışmalarda; karnozinin etkili bir antioksidan olduğu gösterilmiştir¹²⁻¹³. Karnozin β -alanin ve L-histidinden oluşmuş bir dipeptittir¹⁴. Endojen olarak sentezlenen bu dipeptit, dokularda yaygın olarak bulunmasına karşılık, özellikle iskelet kası ve beyin dokusu gibi uyarılabilen dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunur¹⁵⁻¹⁶. Karnozin, suda çözünebilen serbest radikalleri temizlerken, hücre membranını lipit peroksidasyonundan korur¹⁷. Karnozin aldehitlerle ve hipokloritle kolayca reaksiyona girerek proteinleri MDA ve hipoklorit aracılı modifikasyonlardan koruyabilir¹⁸⁻¹⁹.

Brown'ın yaptığı bir çalışmada; karnozinin etkili bir bakır (Cu) şelatlayıcı ajan olduğunu göstermiştir²⁰. Yine bir başka çalışmada da; karnozinin, bakır (Cu) ve çinko (Zn)

şelatlayıcı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir²¹. Karnozin, hem metal şelatlayıcı hem de serbest radikal temizleyici özellikleriyle lipit peroksidasyonunu inhibe edebilmektedir²¹

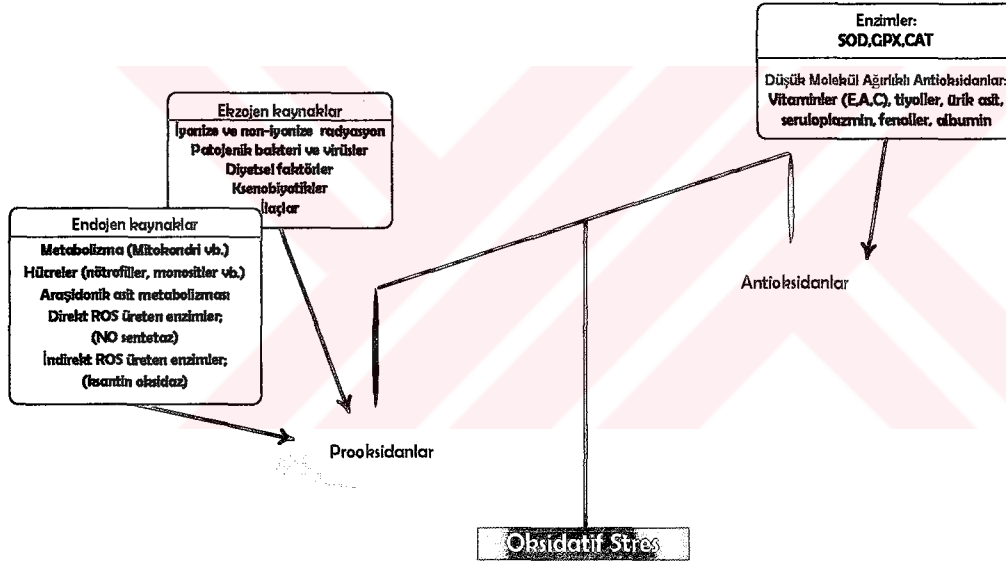
Deneysel çalışmalar karnozinin in-vitro ortamda yaşlanmayla ilişkili olan protein karbonillerinin oluşumu ve çapraz bağlanmaların oluşumunu inhibe ettiğini göstermektedir²².

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, rat beyininde etanolle indüklenen oksidatif strese, antioksidan özelliği olan karnozinin etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla dokuda bir antioksidan enzim olan SOD, lipit peroksidasyon belirteci olarak MDA ve protein oksidasyon belirteci olarak da protein karbonil düzeylerini inceledik. Ayrıca diyet karnozinin beyindeki karnozin düzeyleri etkilerini araştırmak için doku karnozin düzeylerini ölçmeyi ve deneysel oksidatif stresi de histolojik bulgularla desteklemeyi amaçladık. Bu çalışmalar ışığında; kronik alkol tüketimi sonucunda artan ROS ve lipit peroksidasyonunun antioksidan olan karnozinin serbest radikal temizleyici ve metal şelatör etkisiyle indirgenebileceğini düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Oksidatif Stres ve Biyolojik Sistemlerdeki Etkileri

Oksidatif stresin, bir çok hastalığın patolojisinin başlamasında ve gelişmesinde önemli bir faktör olduğu bilinmektedir²³. Oksidatif stres, pro-oksidan (reaktif oksijen türleri (=ROS) ve reaktif nitrojen türleri (=RNS)) ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin, prooksidan ve oksidan maddelerin lehine kayması olarak tanımlanmaktadır²⁴.



Şekil 1: Oksidatif Stres

Oksidatif stres doğal bir süreçtir, oksijene ihtiyaç duyan tüm canlı sistemlerde, çeşitli basamaklarda oluşmaktadır. Biyolojik sistemler, bu stresi kontrol altında tutan, spesifik mekanizmalar içermektedir. Kontrol mekanizmalarının yetersiz olduğu durumlarda oksidatif hasar meydana gelmektedir²³. Potansiyel hasarlayıcı türler (reaktif oksijen türleri, nitrojen ve klorin türleri); metabolizma ürünleri, fizyolojik mediyatörler ve sinyal molekülleri olarak ortaya çıkarlar²⁵ (Tablo.1). Hasara sebep olan ROS üretimi hem ekzojen hem de endojen kaynaklı olabilmektedir (Şekil.1). Ekzojen kaynaklar: hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), iyonize ve non-

iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüsler²⁶⁻²⁸. Endojen kaynaklar ise mitokondrial elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelial hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır²⁹. Organizmanın yapısında bulunan proteinler, serbest amino asitler, DNA, lipitler ve nükleik asitler gibi makro moleküller, bu sistemler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin etkilerine maruz kaldıklarında hasara uğramaktadırlar³⁰.

Tablo 1: Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri²⁶

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)♦			
Radikal	Sembol	Radikal Olmayanlar	Sembol
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$HO^{\cdot}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO^{\cdot}$	Ozon	O_3
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet oksijen	$O_2^{\cdot-}$
Hidroperoksil	$NO^{\cdot}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
REAKTİF NİTROJEN TÜRLERİ (RNS)*			
Radikal	Sembol	Radikal Olmayanlar	Sembol
Nitrik oksit	NO	Nitröz asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	NO_2	Nitrosil katyon	NO^+
		Nitroksil anyon	NO^-
		Dinitrojen tetroksit	N_2O_4
		Dinitrojen trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Nitronyum katyon	NO_2^+
		Nitril klorit	NO_2Cl
		Akil peroksinitratlar	$ROONO^-$
		Nitroksil anyon	NO^-
REAKTİF KLORİN TÜRLERİ (RKS)			
Radikal	Sembol	Radikal Olmayanlar	Sembol
		Hipokloröz asit	$HOCl^*$
		Nitril klorit	NO_2Cl

♦ROS; hem reaktif oksijen hem de okside edici ajanlarla ve/veya kolaylıkla radikallere dönüşen non-radikalleri içeren kolektif bir terimdir. *RNS hem nitrojen içeren radikalleri hem de non-radikalleri içerir. Peroksinitrit de ROS ve RNS olarak da ifade edilir. *HOCl gibi bazı türler hem ROS hem de RNS grubuna girer.

Oksidatif strese bağı olarak oluşan in vivo DNA ve protein hasarının, lipitlerdeki hasardan daha önemli olduğu öne sürülmektedir³¹. Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücrel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücrel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir³²⁻³⁴.

Protein oksidasyonu; hem ROS ile direkt hem de oksidatif stresin sekonder ara ürünlerinin reaksiyonlarıyla indüklenen proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Protein oksidasyonu, bir çok mekanizmayla gerçekleşebildiği ve amino açıl yan zincirlerinin hepsi oksidatif olarak modifiye olabildiği için, çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonları vardır³⁵. Protein oksidasyonu; öncelikle proteinlerin fizikokimyasal karakteristiklerinin ve sonra da fonksiyonlarının bozulmalarına yol açabilir³⁶. Oksidatif protein modifikasyonların biyokimyasal sonuçları: yan zincir grupların oksidasyonu, omurganın fragmentasyonu, çapraz bağlanmalar, yanlış katlanmalar, konformasyon ve hidrofobik yapıda değişiklikler ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı olarak sıralanabilir³⁷⁻⁴⁰. Bu modifikasyonlar sonucunda yeni gruplar oluşmaktadır. Bu gruplar Tablo. 2’de gösterilmiştir³⁵.

Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit kalıntısında ve/veya peptit omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda protein karbonilleri (PCO) ürünleri meydana gelir³²⁻³⁴.

Protein oksidasyonun en yaygın olarak ölçülen ürünü protein karbonilleridir. PCO düzeylerinin saptanmasının, oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir³²⁻³⁴. Karbonillerin tayini oldukça hassas metotlarla yapılabilir⁴¹. Bu metotların bir çoğunda karbonil grup 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile derivatize edilmektedir⁴². Derivatizasyon sonucu stabil dinitrofenilhidrazon ürünü oluşmaktadır. Bu ürün daha sonra çeşitli yöntemlerle tayin edilebilir. DNP grubu 370 nm’de absorbans verir ve molar ekstinsiyon katsayısı $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ’dir. Bu yüzden total protein içeriği veya protein karışımı 370nm/280nm absorbans oranı ile hesaplanabilir⁴². Spektrofotometrik DNPH ölçümüne

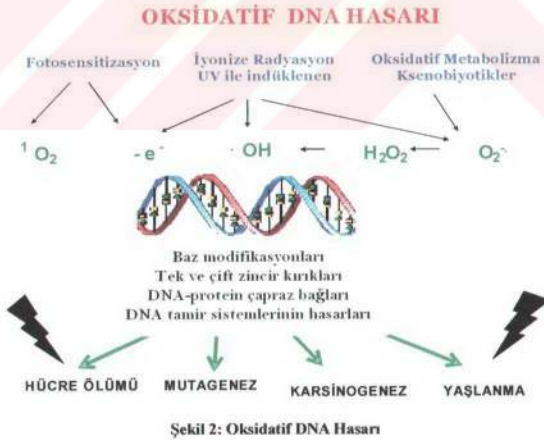
yüksek performanslı sıvı kromatografi (high-performance liquid chromatography=HPLC) yoluyla protein fraksiyon tayini eklenerek bir protein karışımı içindeki toplam karbonil gruplarının ölçümünden daha duyarlı ve spesifik bir yöntem elde edilmiş olur. DNPH aracılı diğer yöntemler, karbonil içeriğinin saptanması için anti-DNP antikorları kullanılır³³. Total karbonil içeriği enzim bağlı immunosorbent yöntemi (ELISA)⁴³, slot blotting⁴⁴ veya immunohistokimyasal⁴⁵ olarak da ölçülebilir. Her bir proteinin karbonil içeriği bir yönlü⁴⁶⁻⁴⁸ veya iki yönlü⁴⁹ sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektroforezini takiben immunoblotting (Western blotting) ile tayin edilebilir. Son iki metot tüm diğer total karbonil metotlarından daha hassas ve spesifiktir, fakat bunlar sadece semi-kantitatifdir^{33,41,46,50-51}.

Tablo 2: Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonları³⁵

Modifikasyon	Amino asitler	Oksidasyon kaynakları (*)
Disülfidler, glutatyonlanma	Cys	Hepsi, ONOO ⁻
Metionin sülfoksit	Met	Hepsi, ONOO ⁻
Karboniller (aldehitler, ketolar)	Hepsi (Lys, Arg, Pro, Thr)	Hepsi
Okso-histidin	His	γ -Ray, MCO, ¹ O ₂
Ditirozin	Tyr	γ -Ray, MCO, ¹ O ₂
Klorotirozin	Tyr	HOCl
Nitrotirozin	Tyr	ONOO ⁻
Triptofanil modifikasyonlar (N-formyl)kinürenin	Trp	γ -Ray
Hidro(pero)ksi deriveleri	Val, Leu, Tyr, Trp	γ -Ray
Kloraminler, deaminasyon	Lys	HOCl
Lipit peroksidasyon reaksiyonları (MDA, HNE, akrolein)	Lys, Cys, His	γ -Ray, MCO (HOCl hariç)
Amino asit oksidasyon reaksiyonları	Lys, Cys, His	HOCl
Glikooksidasyon reaksiyonları	Lys	Glukoz
Çapraz bağlar, agregatlar, fragmentler	Çeşitli	Hepsi

(*) : MCO-Metal katalizli oksidasyon Hepsi: γ -ray, MCO, HOCl, Ozon, ¹O₂

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif hasarlardan en yaygın olanlarından biri de hücrel DNA hasarıdır. Stabil bir molekül olan DNA, çok iyi korunur, fakat ROS ile etkileşime girdiğinde çeşitli tiplerde hasarlar oluşur (Şekil.2). Oksidatif DNA hasarları; DNA bazlarının modifikasyonu, tek ve çift zincirli DNA kırıkları, pürinlerin kayıpları (apurinik alanlar), deoksiriboz şekerlerin hasarları, DNA tamir sistemlerinin hasarı ve DNA-protein çapraz bağlarıdır⁵². Bu hasarlar sonucu; mutagenesis, karsinogenezis ve hücre ölümü meydana gelir⁵³. Yapılan çeşitli çalışmalar süperoksit anyonunun ve onun dismutasyonu ile oluşan H_2O_2 'in doğrudan DNA ile etkileşerek baz oksidasyonuna veya zincir kırıklarına yol açmadığı ancak, geçiş metal iyonları varlığında fenton reaksiyonu ile oluşan ve daha reaktif bir tür olan $OH\cdot$ radikalinin DNA hasarına yol açtığıdır⁵⁴⁻⁵⁵. Yine güçlü bir oksidan olan peroksinitröz asitin de DNA hasarı oluşturduğu bilinmektedir⁵⁶. Yapılan çalışmalarda DNA hasarının çeşitli hastalıkların etiolojisinde ve yaşlanmada önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir⁵⁷.

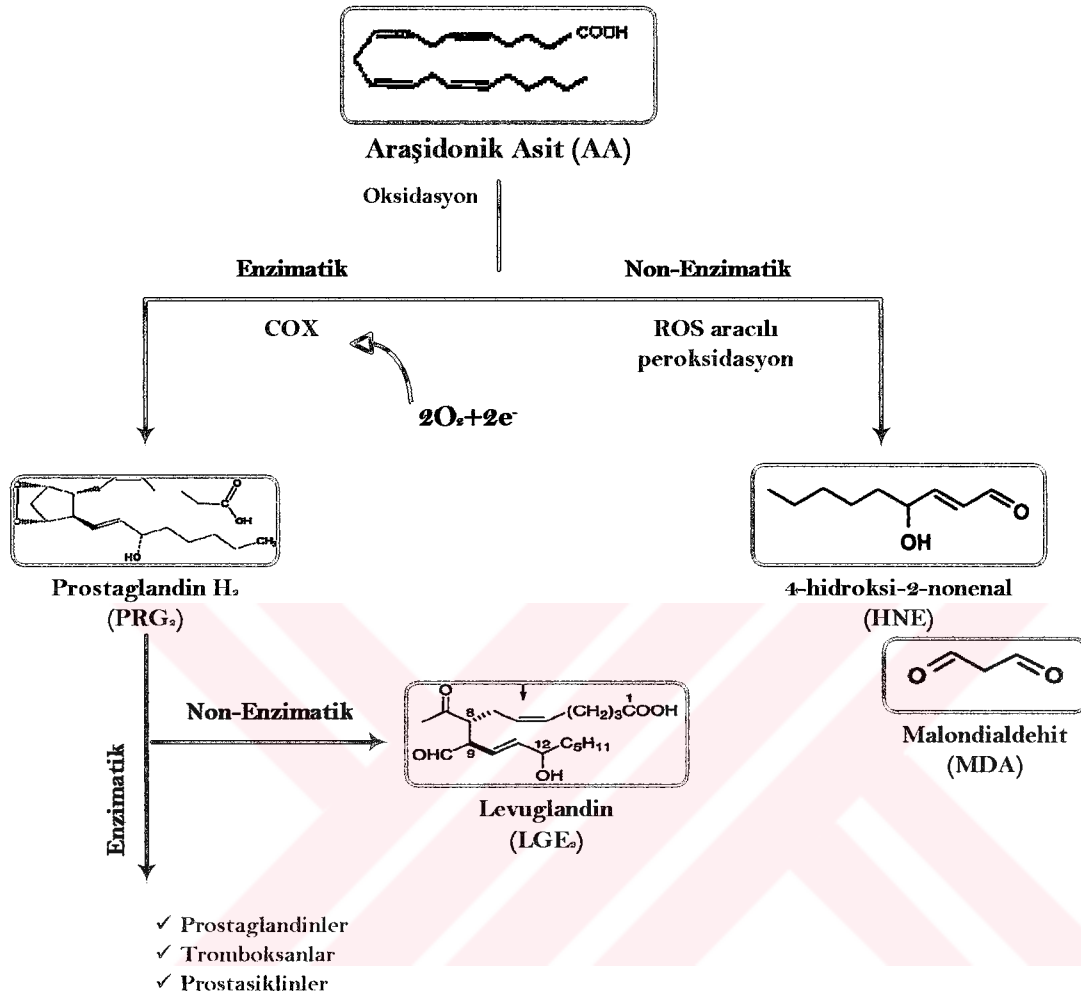


Şekil 2: Oksidatif DNA Hasarı

Günümüzde hassas yöntemlerle dokuda, kanda ve idrarda düzeyi belirlenebilen⁵⁸⁻⁶² 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdGua) ve onun serbest bazı olan 8-hidroksi-guanozin (7,8-dihidro-8-okso guanin, 8-OH-Gua, 8-oxoGua), ROS tarafından oluşturulan DNA hasarının belirlenmesinde en çok kullanılan belirteçlerdir⁶³. İn-vivo reaktif oksijen türleri hasarının hassas birer göstergesi olan 8-OH-dGua ve 8-OH-Gua mutajenik olmaları nedeniyle potansiyel birer karsinogenez belirteci olarak düşünülebilirler⁶³. Bu ürünler DNA oksidasyon ürünleri içinde en çok oluşan ve en mutajenik olanlardır. Normal DNA metabolizması sırasında bir günde her hücrede 178 adet 8-OH-Gua kalıntısı oluştuğu belirlenmiştir⁶⁴. 8-OHdG, ROS'un DNA hasarı sonucu oluşan 23 tane oksidatif baz ürününden biridir. Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-guanozin, guaninin 8. karbon atomuna OH⁻ radikali atakları ile oluşur⁶⁵.

Yine bir oksidasyon (hidroksilasyon) ürünü olan timil glikol hücre içinde oluştuktan 24 saat sonra kandan temizlenerek idrara geçer. İdrarda bulunan deoksitimin glikol diyet kaynaklı değildir. İdrar timin glikol düzeyi de oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak değerlendirilir⁶⁶.

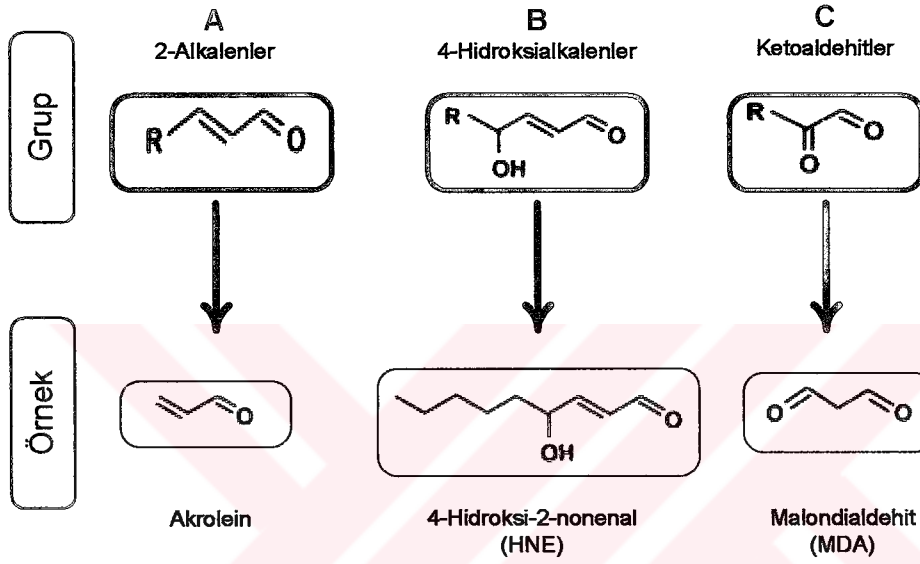
Tüm hücre membranları, yüksek konsantrasyonda poliansature yağ asitlerini (=PUFA) içerdiklerinden oksidatif hasara uğrarlar^{26,67}. Membrandaki kolesterol ve PUFA'ların oksidasyonu ile peroksidasyon ürünleri oluşur. Bu durum lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır⁶⁸. Lipitler, hem enzimatik hem de non-enzimatik yolla oksidasyona uğrayabilirler (Şekil.3). Enzimatik lipid peroksidasyonunda, lipitler siklooksijenazlar (COX) ve lipooksijenazlar (LOX) ile okside olurlar. Bu yolda araşidonik asit (AA) metabolizması ile serbest radikal oluşur. Non-enzimatik lipid peroksidasyonu ise ROS ile indüklenen bir peroksidasyondur²⁹. Serbest radikal aracılı lipid peroksidasyonu; bir kez başladıktan sonra kendini devam ettiren bir zincir reaksiyonu şeklinde sürdüğü için oldukça zararlıdır⁶⁹⁻⁷¹. Direkt membran yapısına, indirekt olarak da reaktif aldehit üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylelikle bir çok hastalığa ve doku hasarına sebep olur²⁹.



Şekil 3: PUFA'ların enzimatik ve non-enzimatik lipid peroksidasyonu ile biyoaktif aldehytlerin oluşumu. Araşidonik asit (AA) COX enziminin oksidasyonu ile PRG₂'ye dönüşür. PRG₂'de enzimatik bir yolla tromboksanlara, prostasiklinlere ve diğer prostaglandinlere dönüşebilir. PRG₂ sulu bir ortamda non-enzimatik olarak tekrar düzenlendiğinde LGE₂ gibi reaktif aldehytler oluşturur⁷². Ayrıca, AA'nın ROS aracılı peroksidasyonu difüze olabilen MDA ve HNE gibi biyoaktif aldehytlerin oluşumuna yol açar⁷³.

Serbest radikal aracılı lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan kısa zincirli reaktif ürünleri başlıca 3 sınıfa ayırabiliriz: 4-hidroksialkenler (HNA), ketoaldehytler ve 2-alkalenler gibi son ürünler oluşmaktadır⁷⁴ (Şekil. 4). Düşük molekül ağırlıklı olan bu ürünlerden 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ve malondialdehit (MDA), oksidatif hasarın belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan markırlardır⁷⁵⁻⁷⁶ (Şekil. 4). Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehytler

serbest radikallere göre daha stabildirler ve hücre içinde veya hücreden dışarıya çıkarak daha uzaktaki bölgelerdeki protein, DNA ve fosfolipit gibi hedeflere ataklarda bulunabilirler. Bu ataklar sonucunda molekül içi ve moleküller arası kovalent etkileşimler oluşur⁷⁴.



Şekil 4: Grup:Reaktif Aldehitlerin Genel Yapıları; Örnek: Reaktif aldehitlerin genel yapılarına birer örnek.

Üç karbonlu bir ketoaldehit olan malondialdehit, normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO_2 'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir⁷⁷. MDA, proteinlerin lizin rezidüleri veya fosfoditiletanolamin ve fosfoditilserin gibi fosfolipitlerin amin gruplarıyla kovalent modifikasyonlar oluşturabilir⁷⁸⁻⁷⁹.

MDA ölçümünün en yaygın metodu; 2-tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik ölçümdür⁸⁰. Ne yazık ki TBA, biyolojik numunelerde bulunabilecek diğer bileşiklerle reaksiyona girebildiğinden, bu metotla ölçüm sonrası MDA ifade edilirken, direkt MDA ifadesi yerine tiyobarbutirik asit reaktif bileşikleri (TBARS) olarak ifade edilmektedir⁸¹. UV veya florometrik detektörlü HPLC kullanımı bu metodun seçiciliğini geliştirmiş ve hassasiyetini arttırmıştır⁸²⁻⁸⁴.

MDA tayini için diğer bir metot, aldehitler ve ketonların düşük pH'da 2,4-dinitrofenilhidrazinle (DNPH) reaksiyonuna dayanır ve DNPH derivelerinin oluşur ki bu deriveler 300-380 nm olan bölgede güçlü bir absorbansdır. Bu metot plazmadaki, idrardaki ve diğer biyolojik örneklerdeki MDA, diğer aldehitler ve ketonların ölçümü için kullanılmıştır⁸⁵⁻⁸⁷.

Başlıca genotoksik bir bileşik olan MDA⁸⁸, bakteri ve memeli hücreleri için mutajeniktir⁷⁵. MDA düzeyleri lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir⁶⁹⁻⁷¹.

İrreversibl oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre ölür, daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve fonksiyonel defektler ortaya çıkabilir. Özellikle iki doku, merkezi sinir sistemi (MSS) ve kas dokusu, oksidatif strese duyarlıdır. Her iki doku da yüksek miktarda oksijen kullanır ve bu dokular post mitotik (yenilenemeyen) hücreler içerirler. Bu nedenle bu hücreler aşırı oksidatif hasar birikimine maruz kalırlar⁸⁹. Oksidatif stresin, hem akut nörolojik hastalıklarda (iskemi gibi) hem de kronik nörolojik hastalıklar da (Parkinson, Alzheimer ve Huntington gibi) kritik bir role sahip olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir⁹⁰⁻⁹¹.

2.2. Beyin ve Oksidatif stres:

Beyin, vücudun diğer organlarıyla karşılaştırıldığında oksidatif strese en hassas dokudur⁹². Bu hassasiyetin sebeplerini şöyle sıralayabiliriz;

1. *Oksidatif metabolik aktivite hızının yüksek oluşu*⁹³:

İnsan beyni, vücut ağırlığının yaklaşık %2'si olmasına karşın, solunan oksijenin %20'sini kullanmaktadır⁹⁴. Bu nedenle beyin sürekli ve yüksek konsantrasyonda O₂'ye maruz kalmaktadır. Oksijen, beyin için esansiyel bir molekül olmasına karşın aynı zamanda yapısal özelliğinden dolayı serbest radikal kaynağı olarak da görev yapabilir⁹⁵. ROS'un % 95-98'lik bir kısmı aerobik solunum esnasında mitokondrideki elektron transport sisteminde üretilmektedir⁹⁶. Yüksek oranda oksijen kullanan beyin diğer organlarla karşılaştırıldığında nispeten daha fazla ROS üretir⁹⁷.

2. Düşük antioksidan aktivite:

Beyin diğer dokularla karşılaştırıldığında antioksidan düzeyleri düşüktür⁹⁸.

3. Membran / sitoplazma oranının yüksek oluşu⁹⁹:

Beyin, yüksek oranda kolayca okside olan unsature yağ asitleri içerdiğinden (özellikle 20:4 ve 22:6 yağ asitleri)¹⁰⁰ lipid peroksidasyon reaksiyonların bir kaynağıdır¹⁰¹.

4. Yüksek oranda geçiş metal iyonlarının varlığı:

Beyin, yüksek oranda demir, bakır ve çinko gibi geçiş metallerini içermektedir. Bu redoks-aktif metalleri, metal aracılı Haber-Weiss reaksiyonları aracılığıyla, yüksek oranda reaktif radikal oluşumunu katalizleme yeteneğine sahiptir²⁶.

Beyindeki konsantrasyonu yüksek olan demirin beyin fonksiyonları için esansiyel olduğu ileri sürülmektedir¹⁰². Demir mitokondrial solunum zincir enzimleri, krebs siklusu enzimleri ve DNA replikasyonu için gerekli bir kofaktördür¹⁰³.

5. Yenilenemeyen nöronal hücreler:

Nöronlar yenilenemeyen (post-mitotik) hücrelerdir ve ROS ve RNS'in giderek artan birikimiyle beyin dokusu zarar görebilir¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

6. Askorbik asitin Janus yönü:

Beyinin hem gri hem de beyaz maddesinde yüksek konsantrasyonda bulunan askorbik asit bir antioksidan olduğu kadar prooksidan olarak da görev yapabilir. Askorbik asit intraserebral hemorjide beyin bölgelerinde serbest demirin artmasıyla prooksidan özellik kazanır¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Beyindeki başlıca reaktif oksijen kaynakları; mitokondri, nitrik oksit sentetaz, araşidonik asit metabolizması, ksantin oksidaz, monoamin oksidaz ve sitokrom P450 enzim sistemleridir¹⁰⁷.

Mitokondrial elektron transport zinciri, sitokrom P450 sistem, ksantin ve aldehit oksidaz, prostaglandin metabolizması, hemoglobin ve katekolaminler gibi sistemler tarafından üretilen süperoksit anyonu, beyinde bol miktarda bulunan bir antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz tarafından dismute edilerek hidrojen peroksit'e dönüştürülür¹⁰⁸. Patolojik şartlarda, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve $O_2^{\cdot-}$ anlamlı olarak artmaktadır⁹⁰⁻⁹¹.

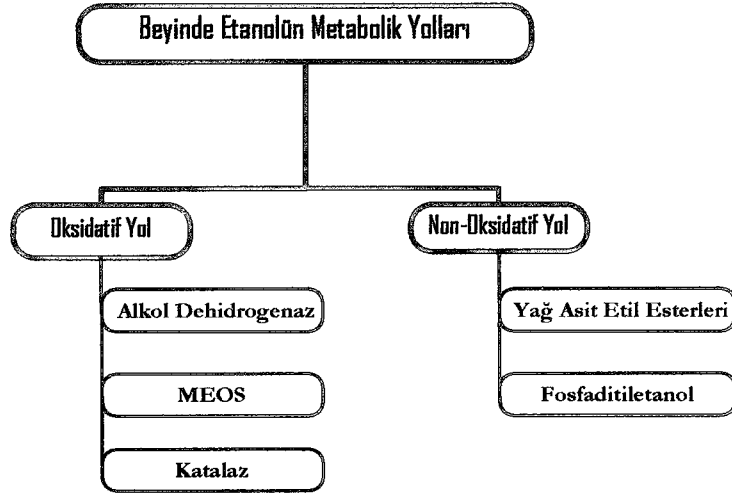
Monoamin oksidaz ile biyogenik aminlerin oksidatif deaminasyon yolunda da hidrojen peroksit üretilir ve bu durum iskemi-reperfüzyonda artar¹⁰⁹. Beyinde yüksek konsantrasyonda bulunan, askorbik asit hidrojen peroksit üretimini artırır¹¹⁰. Beyinde bulunan flavin içeren monooksijenazlar da¹¹¹ hidrojen peroksit oluşturalabilirler¹¹². Ayrıca nitrik oksit sentetaz da hidrojen peroksit üretir. Bu yolların hidrojen peroksit üretme kapasitesi değişkendir¹¹³. H_2O_2 , Fe^{+2} , Mn^{+2} ve Cu^{+2} gibi geçiş metal iyonları ile reaksiyona girerek $OH^{\cdot}$ radikalini oluşturduğu için^{26,114-115} sinir dokusu için toksiktir⁹⁰⁻⁹¹. $OH^{\cdot}$ radikali güçlü bir reaktiftir. Kolaylıkla biyolojik moleküllerden hidrojen (dolayısıyla bir elektron) koparabilir. Eğer hedef molekül PUFA ise lipit peroksidasyonu oluşabilir ve sonunda plazma membran bütünlüğü kaybolur. Plazma membran bütünlüğü bozulduğunda, iyon gradiyenti korunamaz ve bu durum kalsiyum gibi ekstrasellüler iyonların plazma membranından hücre içine akışıyla sonuçlanır ve hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu etkili bir şekilde artar¹¹⁶. Bu olay hücre ölümüyle sonuçlanır.

Diğer taraftan, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek peroksinitriti ($ONOO^{\cdot}$) oluşturabilir. Peroksinitritin, iskemik ataklar ve reperfüzyon gibi nörodejeneratif durumlarda aşırı amino asit atılımı ile sonuçlanan nöropatolojik şartlarda rol oynadığına inanılmaktadır. Ayrıca peroksinitrit; DNA'yı, proteinleri ve lipitleri okside edebilir. Böylece nöropatolojik şartlarda ROS, DNA, protein ve lipitleri oksidatif hasarlayarak, eksitotoksititeyi promote eder¹¹⁷⁻¹¹⁸.

ROS veya oksidanlar beyin fonksiyonlarının bozulması ve bir çok nörolojik hastalığın gelişmesinde rol oynamaktadır¹¹⁹⁻¹²¹. ROS ile oluşan oksidatif hasar, hücre içi organellerden organlara kadar bir çok deneysel çalışmada, in-vivo ve in-vitro modellerde gösterilmiştir. İn vivo ortamda etanolle indüklenen ROS oluşumu birçok hayvan ve insan çalışmalarında bildirilmiştir¹²². Etanol birçok mekanizma aracılığıyla ROS üretimini artırabilir¹²³⁻¹²⁴. Artan ROS üretimi karaciğer, kalp, böbrek¹²⁵⁻¹²⁷ ve beyin¹²⁸ gibi dokularda oksidatif hasar oluşturmaktadır. Etanol ile indüklenen oksidatif strese bu organlar içinde beyin ve sinir sistemi, karaciğerden daha hassastır¹²⁹.

2.3. Beyinde Etanol Metabolizması:

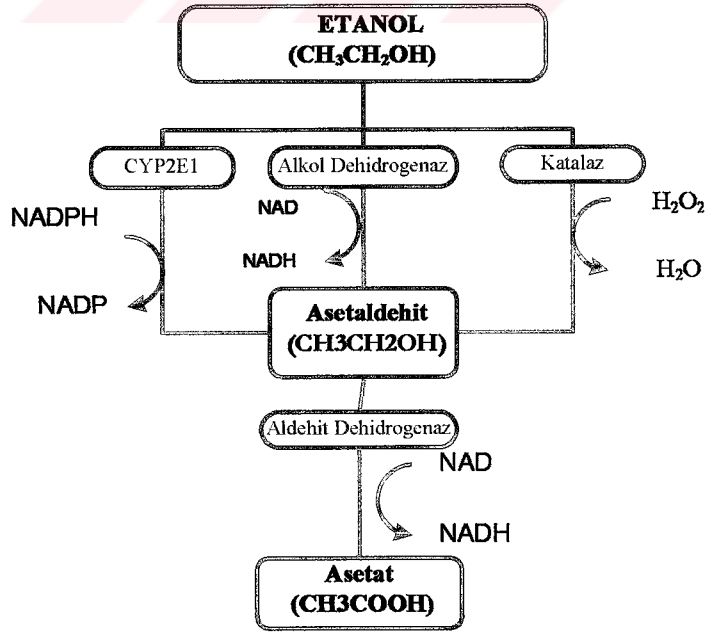
Kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen etanol¹³⁰, beyinde oksidatif (enzimatik bir sistem) ve non-oksidatif olmak üzere 2 yol ile katalize olur¹³¹ (Şekil 5). Oksidatif yolda; etanol beyinde asetaldehite kadar başlıca 3 farklı enzim sistemi ile metabolize olmaktadır: alkol dehidrogenaz (ADH), mikrozomal etanol oksidasyon sistemi (MEOS) ve katalaz¹³¹. Etanol, bu enzim sistemlerinin oksidasyonu ile ilk metabolit olan asetaldehit dönüşür¹³¹⁻¹³⁴. Her bir sistem spesifik bir hücre içi lokalizasyona sahiptir. İzozimler ve dağılım dokudan dokuya çeşitlilik gösterir¹³⁵. Asetaldehit de aldehit dehidrogenaz (EC 1.2.1.3; ALDH) enziminin oksidasyonu ile asetik asite dönüştürülerek, vücuttan atılır¹³⁶⁻¹³⁷. Asetaldehit etanol gibi kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçemez, bu nedenle periferik dokulardan gelen asetaldehit, beyin membranlarında bulunan aldehit dehidrogenaz (ALDH) enzimi ile asetik asite dönüştürülür¹³⁸⁻¹⁴⁰ (Şekil 6).



Şekil 5: Beyin Dokusunda Etanolün Oksidasyon Mekanizmaları

2.3.1. Oksidatif Yol:

Bu yol 2 aşamalı olup; ilk aşamada etanol enzim sistemleri ile asetaldehite, ikinci aşamada ise asetaldehit asetata okside edilerek metabolize olur. Bu aşamalar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.



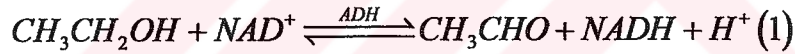
Şekil 6: Etanolün Asetata Metabolizması

2.3.1. 1. Alkol Dehidrogenaz (ADH):

Alkol dehidrogenaz (alkol: NAD-oksidoredüktaz, EC 1.1.1.1) sitozolik bir enzimdir. Hepatositlerde çok yüksek konsantrasyonda bulunan bu enzim, aynı zamanda sindirim kanalı, akciğer, kalp ve beyinde de bulunmaktadır¹⁴¹. Memelilerde ADH'nin 6 farklı sınıfı bulunmaktadır¹⁴². Beyinden izole edilen ve düşük aktiviteye sahip olan sadece sınıf III tipidir. ADH'nin multiple izozimleri hem sitoplazmada hem de mitokondrial matrikste bulunmaktadır¹⁴⁰.

ADH aktivitesi ilk olarak 1968'de Raskin ve Sokoloff tarafından tanımlanmıştır¹⁴³. Bu enzim 1975'te rat beyininden izole edildikten sonra, saflaştırılmıştır¹²³. İzole edilen ADH'nin moleküler ağırlığı 80.000, maksimum aktivite gösterdiği pH ise 9.8'dir ve 1 mM pirazol ile %98 oranında inhibe olmaktadır¹⁴⁴.

ADH enzimi kofaktör olarak okside nikotin amid dinükleotite (NAD⁺) ihtiyaç duyar¹⁴³ (Reaksiyon. 1).

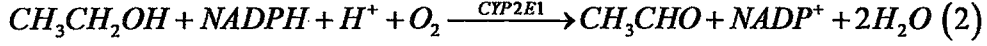


Rat beynindeki ADH'nin beyindeki dokularda bulunma miktarı serebellum, korteksin beyaz ve gri maddesi ve subkortekse doğru azalmaktadır¹⁴⁵. Bu aktivite nöronal sitoplazma ile özellikle serebral korteks nöronları, arka hipotalamus, hipofizin infundibulum sapı ve serebellumun purkinje hücreleri ile sınırlıdır¹⁴⁶.

2.3.1.2. Mikrozomal Etanol Oksidasyon Sistemleri (MEOS):

Mikrozomal etanol oksidasyon sistemleri, birçok hücre tipinin endoplazmik retikulumunda bulunur ve etanolün varlığında upregüle olur. Etanol, hepatositlerdeki düz endoplazmik retikulumun poliferaşyonunu indükler¹⁴⁷.

MEOS, etanolün asetaldehite oksidasyonu için kofaktör olarak redükte nikotin amid dinükleotit fosfat (NADPH) kullanır¹⁴⁸ (Reaksiyon. 2)

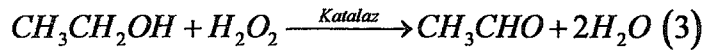


Bu sistem 1977'de Sasame tarafından keşfedilen sitokrom P450' yi de (CYP) içermektedir¹⁴⁹. Sitokrom P450'nin spesifik bir formu olan sitokrom P450 2E (CYP2E1), etanolün oksidasyonundan sorumludur ve ilk olarak 1982'de Morgan¹⁵⁰ ve arkadaşları tarafından rat beyinde bulunmuştur¹⁵⁰. Sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) rat beynin çeşitli bölgelerinde (örn; koku loblarında) ve hücre tiplerinde (örn; astrositler) eksprese edildiği bulunmuştur¹⁵¹⁻¹⁵³. İmmunohistokimyasal olarak hem glial hem de sinir hücrelerinde olduğu gösterilmiştir¹⁵¹.

CYP2E1 aktivitesinin, kronik alkole maruz kalan hayvanlardan izole edilen beyin mikrozomlarında %496 kadar arttığı gösterilmiştir¹⁵⁴. Etanolün CYP2E1 indüksiyonu en fazla bazal ganglia, serebellum, substantia nigra ve hipokampusta gözlenmiştir¹⁵⁵. Aktivitedeki bu artışın, etanol metabolizmasının artışıyla asetaldehit düzeylerinin arttığı ve asetaldehitin de beyin hücrelerini hasara uğrattığı ileri sürülmüştür. CYP2E1'in indüksiyonuyla lipid peroksidasyonu ve membran değişiklikleri arasında pozitif bir korelasyonun bulunduğu gösterilmiştir¹⁵⁶.

2.3.1.3. Katalaz :

Beyindeki etanolün oksidasyonunu sağlayan bu 3 metabolik yoldan en kritik role sahip olan katalazdır. Katalaz, etanolün asetaldehite oksidasyonu esnasında, H₂O₂'yi indirgeyerek 2 molekül su oluşturur (Reaksiyon. 3). Bu aktivite beyindeki mikroperoksizomlarda, özellikle aminojirik nöronların mikroperoksizomlarında ve beyaz madde glial hücrelerinde, lokalizedir¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.



2.3.2. Non-oksidatif Yol:

Non-oksidatif etanol metabolizmasında, bu iki yolun etanolün nörotoksik etkilerinde bir rol oynadığı ileri sürülmüştür¹⁶⁰.

2.3.2.1. Yağ asit etil ester (FAEE):

Yağ asit etil esterlerinin üretimi ilk olarak; 1987'de Laposata tarafından rapor edilmiştir¹⁶⁰. FAEE sentetaz aktivitesinin nöronlarda lokalize olduğu görülmektedir. FAEE sentetaz nöronların membran fraksiyonlarına zayıf bağlı olarak veya sitoplazmasında bulunmaktadır. EtOH fizyolojik düzeylerde bulunduğunda, bu enzim FAEE oluşumunu katalizler¹⁶⁰⁻¹⁶¹. FAEE'nin mitokondrial fonksiyonları, hücre membranlarını, protein sentezini ve miyelin metabolizmasını bozmaktadır¹⁶²⁻¹⁶³.

2.3.2.2. Fosfatidiletanol

Beyindeki etanol metabolizmasının son yolu fosfatidiletanolün oluşumudur. Etanolün, protein kinaz C'nin (PKC) aktivitesini arttırdığı görülmüştür, ki PKC fosfatidilkolin ve etanolden fosfatidiletanol oluşumu arasındaki reaksiyonu katalizleyen fosfolipaz D'yi aktive eder¹⁶⁴. Fosfatidiletanol PKC'nin gama izomerini aktive edebilme yeteneğine sahiptir¹⁶⁵. Fosfatidiletanol düzeyleri, kronik düzeylerde etanole maruz kalan ratların serebrum ve serebellumunda artmaktadır¹⁶⁶.

2.3.3. Beyinde Etanolle İndüklenen Oksidatif Stres

Bir seri enzimatik oksidasyon reaksiyonları ile metabolize olan etanol, potansiyel bir oksidatif stres kaynağıdır¹⁶⁷. Etanolün oksidatif metabolizmasıyla; asetaldehit¹⁶⁸, reaktif oksijen türleri (süperoksit ve hidrojen peroksit vb.), reaktif nitrojen türleri (nitrik oksit ve peroksinitrit vb.)¹⁶⁹, etanolün α -hidroksietil radikali¹⁷⁰, 4-hidroksinonenal ve malondialdehiti içeren çeşitli lipid peroksit türleri¹⁵⁷ gibi çeşitli reaktif metabolitler üretir. Etanolün indüklediği serbest radikal üretimini ilk olarak Di Luzio göstermiştir¹⁷¹.

Etanol birçok mekanizma ile ROS oluşumunu arttırabilir. Bir çok çalışmada etanolün metabolik dönüşümü, özellikle sitokrom P4502E1 (CYP2E1) indüksiyonuyla

tanımlanmıştır^{124,172}. Santral sinir sisteminde (SSS) CYP2E1 varlığı düşük düzeylerde olduğu halde^{173, 174}, kronik alkol alınımlı sonrası rat beyinde bu enzimin aktivitesinin indüksiyonuyla birlikte ROS oluşumunun arttığı bildirilmiştir¹²⁸. CYP2E1 ile hem $O_2^{\cdot-}$ hem de H_2O_2 üretilir. H_2O_2 , özellikle tehlikelidir, çünkü üretildiği yerden uzak bölgelerde hasara neden olabilir. Ayrıca H_2O_2 diğer bileşiklerle birleşebilir ve daha sonra taşıyıcılarla uzak bölgelere hareket eder. Sonunda, H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ metal katalizli reaksiyonlar ile serbest radikallerin en zararlı ve hasarlayıcısı olan $OH^{\cdot}$ radikalini oluştururlar¹⁷⁵.

Yapılan çalışmalarda CYP2E1'in alkol verilen ratların karaciğer ve beyin mikrozom preparatlarında α -hidroksietanol radikalini oluşturduğu gösterilmiştir¹²⁷ α -hidroksietil radikali; etanol ile $OH^{\cdot}$ radikalinin reaksiyonu sonucu oluşur^{170,176}. Hidroksietil radikali, $OH^{\cdot}$ radikalinden daha reaktif ve daha uzun ömürlüdür. Hidroksietil radikali kritik bölgelere difüze olabilir ve lipitler, proteinler ve diğer makro moleküllerle reaksiyona girer ve $OH^{\cdot}$ radikalinin tek başına vereceği zarardan daha fazlasını verir¹⁷⁷.

Kronik alkol, rat serebral kortekste, nitrik oksit sentetaz aktivitesini indükler ve bununla birlikte nitrik oksit üretimi de artar. Nitrik oksitin, süperoksit radikalleriyle reaksiyona girmesiyle de sitotoksik peroksinitrit oluşur¹⁷⁸.

Etanol özellikle glial hücrelerde sitotoksik sitokinlerin üretimini artırır ve bu sitokinler, astrositler veya mikrogial/makrofaj hücreler aracılığıyla otoimmün cevapla direkt veya indirekt olarak nöronal yapıları hasarlayabilir¹⁷⁹⁻¹⁸⁰.

Etanolün indüklediği serbest radikal üretiminde, etanolün oksidasyonu ile oluşan asetaldehit oluşumu da önemli bir rol oynayabilir¹⁸¹. Etanol nörotoksitesi, onun oksidatif metaboliti olan asetaldehit deriveleri ve etanol metabolize edici enzim sistemlerinden oluşur¹⁸²⁻¹⁸³. ROS veya asetaldehit nörotübüline¹⁸⁴ bağlanarak nörotubulin polimerizasyonunu bozabilir¹⁸⁵⁻¹⁸⁶.

Etanolün non-oksidatif metabolizması; proinflamatuvar eikozonoidlerin üretiminin artmasına veya yağ asit etil esterlerinin aşırı miktarlarına sebep olabilir¹⁶¹.

Beyinde etanolle indüklenen oksidatif stres, azalmış antioksidan savunma sistemi ve serbest radikal oluşumu arasındaki dengesizlikten oluşabilir¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Beyindeki düşük α -tokoferol konsantrasyonlarından dolayı; özellikle serebellum oksidatif hasara karşı oldukça hassastır¹⁹⁰ ve α -tokoferol eksikliğinde bu hassasiyet oldukça fazladır¹⁹¹. Akut doz etanolün serebellumdaki selenyum, çinko, bakır, α -tokoferol ve askorbatı azaltırken¹⁹²; düşük molekül ağırlıklı demir türleri¹⁹³ ve lipid peroksidasyonun arttırdığı¹⁹²⁻¹⁹⁴ rapor edilmiştir. Kronik etanol alınımları; serebellumda α -tokoferol düzeylerinin azalmasına ve düşük molekül ağırlıklı demir türlerinin de artmasına neden olmaktadır¹⁹⁵.

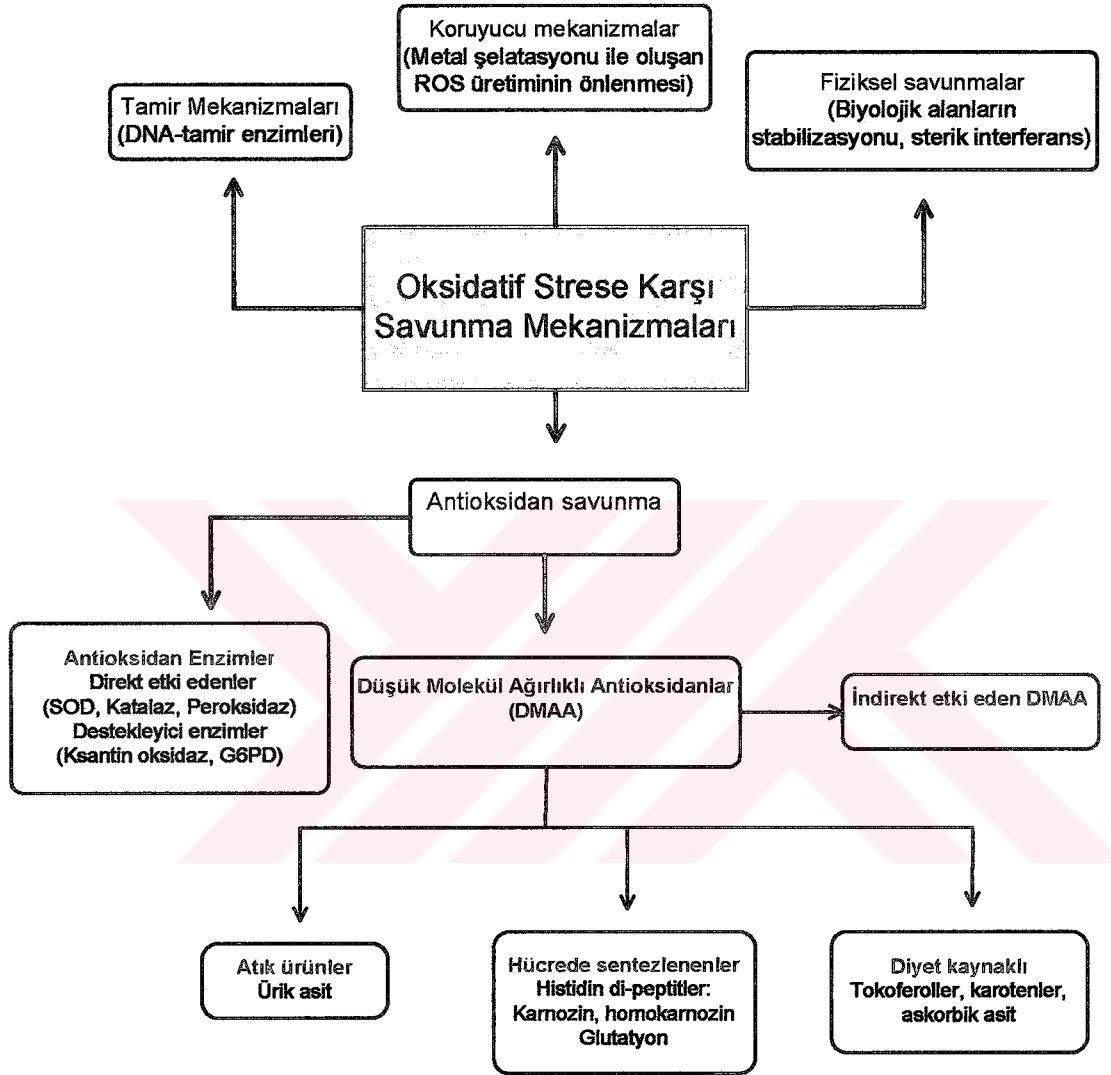
2.3.4. Beyin Dokusundaki Antioksidan Savunma Sistemleri:

Sürekli prooksidanlara maruz kalan hücreler çeşitli savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bunlar; oksidatif hasara karşı koruyucu mekanizmalar, tamir mekanizmaları ve antioksidan savunma sistemidir. Antioksidan savunma sistemi hücreleri direkt ROS'a karşı korur ve oksidatif hasarı önler (Şekil 7)¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

Bir antioksidanın fonksiyonu; subsellüler lokalizasyon, oksijenin parsiyel basıncı, antioksidan sistemin kapasitesi ve rejenerasyonu, ve o maddenin transport özellikleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır¹⁹⁹.

Beyin dokusu farklı antioksidan tipleri içermektedir. Detoksifikasyon enzimleri ve antioksidanlar beyindeki bölge, hücre tipi ve subsellüler organellere göre farklı dağılım gösterirler¹⁹⁹. Örneğin katalaz, oligodentrositlerdeki endozomlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunurken astrositlerde düşük konsantrasyonlarda bulunur¹⁹⁹. Glutatyon peroksidaz düzeyleri ise striatum ve substantia nigra'da yüksektir ve astrositlerdeki miktarı nöronlardan daha fazladır¹⁹⁹⁻²⁰⁰.

Antioksidan sistem; enzimler ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (DMAA) (=non-enzimatik) olmak üzere 2 ana grupta toplanabilir¹⁹⁷⁻¹⁹⁸.



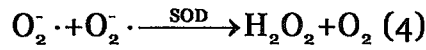
Şekil 7: Oksidatif hasara karşı koruyucu mekanizmalar ve antioksidan sistem.

2.3.4.1. Enzimler

Bu gruba, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, peroksidazlar ve bazı destekleyici enzimler girmektedir. Enzimlerin düzeyleri beyinin farklı bölgelerine ve türlere göre değişiklik göstermektedir¹⁹⁷⁻¹⁹⁸.

2.3.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; E.C 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz enzimi (SOD) [E.C.1.15.1.1] 1969'da Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır²⁰¹. SOD, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismute eden bir metalloenzimdir²⁰² (Reaksiyon 4):



Bu reaksiyon oksidatif strese karşı “ilk savunma” olarak da adlandırılır²⁰³. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır²⁰⁴. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki $O_2^{\cdot-}$ düzeyleri kontrol altında tutulur²⁰⁵.

Memelilerde 3 tip SOD izoenzimi tanımlanmıştır ve bunların sınıflandırılması bu izoenzimlerin prostetik metal iyonu ve hücrel lokalizasyonuna göre yapılmaktadır²⁰⁶ (Tablo 3).

Tablo 3: Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin sınıflandırılması²⁰⁶

	CuZn-SOD	Mn-SOD	EC-SOD
Lokalizasyon	Sitozol	Mitokondri	Ekstrasellüler Boşluk
Moleküler ağırlık	32,000	88,000	120,000
Yapı	Dimer	Tetramer	Tetramer
Metaller, g-atomlar/subünite	Cu 1, Zn 1	Mn 1	Cu 1, Zn 1
Kromozom	21 (insan) 16 (fare)	6 (insan) 17 (fare)	?
Gen tanımı	SOD 1	SOD 2	SOD 3

CuZn: Bakır, Çinko; Mn: Mangan; EC: Ekstrasellüler

1. **CuZn-SOD (SOD1):** Genellikle sitozolde ve lizozomal fraksiyonlarda bulunur, fakat mitokondrial boşlukta da bulunmaktadır²⁰⁷. Cu-Zn SOD enzimi 32 kDa molekül ağırlığında ve iki alt birimden oluşmuştur ve birbirlerine disülfid bağları ile bağlanmıştır²⁰⁸. Kofaktörleri çinko ve bakırdır²⁰¹. Bu enzimlerin aktivitelerinden bakır, stabilitelelerinden çinko sorumludur²⁰⁹.

2. Mitokondrial SOD (Mn-SOD, SOD2): Mitokondride bulunur ve kofaktörü mangandır²¹⁰.

3. Ekstrasellüler SOD (EC-SOD, SOD3): Tetramerik bir proteindir, ekstrasellüler bölümlere salgılanır²¹¹. Heparin bağlayan bir domaine sahiptir ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilir²¹². CuZnSOD enzimi gibi EC-SOD enziminin de kofaktörleri çinko ve bakırdır²¹³. Ekstrasellüler boşluklarda bulunan süperoksit (örneğin; membran bağlı NAD(P)H oksidaz ile üretilen veya proinflamatuvar hücrelerde üretilen²¹⁴) karşı savunmayı sağladığı düşünülmektedir²⁰⁰. Ekstrasellüler bölüm küçüktür ve bundan dolayı ekstrasellüler bölümdeki EC-SOD konsantrasyonları biyolojik ilgiyi sağlamakta yeterli olabilir²⁰⁰. Bu enzim beyinde de eksprese edilmektedir fakat SOD1 ve SOD2'den daha düşük konsantrasyonlardadır²¹⁵.

SOD hücrelerde heterojen bir şekilde dağılmaktadır. Beyin SOD'un en yüksek konsantrasyonu sitoplazmada bulunmaktadır. Mitokondri ve mikrozomların içerdiği SOD düzeyleri, sitoplazmik SOD'un sadece %13-15'tir. Ayrıca astrositlerdeki SOD konsantrasyonu nöronal düzeylerden fazladır¹⁹⁸. Bu nedenle nöronlarda da tayin edilebilmektedir²⁰⁰.

Sinir sisteminde SOD aktivite dengesi; nöronal apoptosis esnasında²¹⁶⁻²¹⁷, serebral iskemide²¹⁸⁻²¹⁹ ve amiotrofik lateral siklerozisin ailesel formunda²²⁰⁻²²¹ bozulmaktadır. SOD eksitotoksik ve iskemik/hipoksik lezyonlara karşı sinir dokusunu koruyucu major bir faktör olabilir²²². Cu-Zn SOD enzimi iskemik kalp, beyin ve diğer dokularda reperfüzyon hasarı indirgemektedir²²²⁻²²³.

Dokulardaki SOD aktivitesinin lokalizasyonuna ve tayinine büyük ilgi vardır ve dokunun oksidatif strese cevabı hakkında bilgi verebilir²²⁴. SOD için direkt ve indirekt tayin yöntemleri vardır. Direkt ölçüm yöntemleri; "pulse radiolizis ve stopped flow" olup mevcut tekniklerin en iyisi olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu metotlar için gerekli donanım her zaman bulunamamaktadır²⁸.

İndirekt ölçüm yöntemlerinde kullanılan yaygın bir yaklaşım SOD varlığında süperoksit üreten bir sistem kullanılarak (örn;ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu) SOD aktivite

tainidir. Bu yaklaşım sitokrom c veya nitrotetrazolium (NBT) gibi optikçe hassas bir bileşiğin indirgenmesinin ölçümüdür. Diğer bir yöntem ise sülfid veya epinefrin kullanan otooksidasyon tekniklerinin kullanımıdır. Bu yöntemlerde kullanılan teknikler ile SOD'un 2 izoformu siyanitle CuZn-SOD'un inhibisyonu yoluyla ayırt edilebilir²²⁵.

2.3.4.2. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (DMAA)

Direkt etki edenler (örn; şelatlayıcı ajanlar) ve indirekt etki edenler (süptürücü ve zincir kırıcı antioksidanlar) olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. 2. grup antioksidanlar önemli derecede oksidatif strese karşı savaş vermektedirler. Bu alt grup endojen ve ekzojen kaynaklı birçok bileşik içermektedir. Hücre tarafından sentezlenen antioksidanlar (glutasyon, NAD(P)H ve karnozin gibi) bu bileşiklerin küçük bir kısmını oluştururken, diyet ile alınan antioksidanlar (askorbik asit, lipoik asit, fenoller, ve karotenoit gibi) ise büyük bir kısmını oluşturmaktadırlar. DMAA'nın diğer bir kaynağı da ürik asit gibi hücrelerin metabolik ürünleridir¹⁹⁷⁻¹⁹⁸.

2.3.4.2.1. Karnozin (β -alanil-L-histidin)

Doğal karnozin deriveleri, karnozin ilişkili dipeptitler (CRCs) veya aminoasıl-histidin dipeptitleri olarak da adlandırılmaktadırlar. Bunlar; Karnozin (β -alanil-L-histidin), homokarnozin (γ -aminobutiril-L-histidin), anserin (β -alanil-L-1-metil-histidin), balain (*ophidin*, β -alanil-L-3-metil histidin)'dir. Karnozin, aminoasıl-histidin dipeptitleri olarak bahsedilen bileşikler serisinin ilk örneğidir²²⁶. Karnozin, 1900 yılında, ilk olarak Gulewitsch ve Amiradzibi adlı Rus bilim adamları tarafından et ekstraktlarından saflaştırılmıştır²²⁷. Endojen olarak sentezlenen bu dipeptit²²⁷⁻²²⁸, β -alanin ve L-histidinden oluşmuş²²⁹ multifonksiyonel bir dipeptittir²³⁰. Özellikle beyin, iskelet ve kalp kası gibi uyarılabilen dokularda²³⁰⁻²³¹ yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına karşın, lenste, midede ve böbrekte de yaygın olarak bulunmaktadır^{21,232}. (Bazı memelilerin beynindeki karnozin varlığı Tablo. 4'de gösterilmiştir²³¹)

Karnozinin esas biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda karnozinin; antioksidan, tamponlayıcı aktivite,

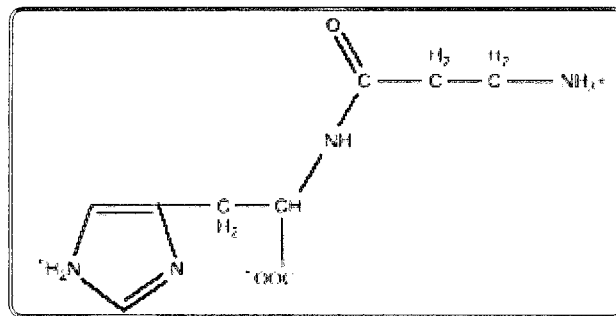
nörotransmitter, yara iyileştirici bir ajan ve savunma sistemini güçlendiren bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir²³⁰. Yapılan son çalışmalarda ise bu fonksiyonlarına ek olarak karnozinin homeostatik fonksiyonunun olduğu ileri sürülmüştür²³³.

Tablo 4: Bazı Memelilerin CNS'de Karnozin Varlığı²³¹

Dipeptitler	Sınıflar	Lokalizasyon	Referanslar
Karnozin	Fare	Beyin	234
		Olfactory bulb/ epithelium	234, 235
			14, 236
	Rat	Beyin	14, 237, 238
			239, 240
		Olfactory bulb/ epithelium	14, 241, 234
	Hamster	Olfactory bulb/ epithelium	241, 242
	Tavşan	Olfactory bulb	242
	Köpek	Olfactory bulb	242, 243
	Domuz	Olfactory bulb	241
	İnsan	Brain / Olfactory bulb	244

2.3.4.2.1.1. Kimyasal Yapısı :

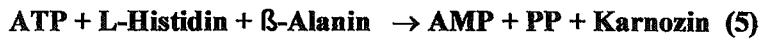
β -alanin ve L-histidinden oluşan basit bir dipeptit olan karnozin²²⁸ yapısında, β -alaninin karboksil grubu histidinin amino grubu ile amid bağı ile bağlanır. (Şekil. 8).



Şekil. 8: Karnozin²⁴⁵

2.3.4.2.1.2. Karnozin Metabolizması :

Karnozin dokularda metabolik kontrol altındadır. Karnozin *karnozin sentetaz* (EC 6.3.2.11) enzimi tarafından β -alanin ve L-histidinden sentezlenir²⁴⁶⁻²⁴⁸ (Reaksiyon 5). Karnozin sentetaz enzimi % 98 sitozolik aktiviteye sahiptir²⁴⁹. Enzim genel substrat özgülüğü gösterir ve farklı aminoasit histidin dipeptidleri (homokarnozin ve anserin gibi) sentezleme yeteneğine sahiptir^{238, 246-248}.



Karnozinin yıkımı *karnozinaz* enziminin 2 izoformuyla sağlanır. Bu izoformlar, *doku* (aminoasit-histidin dipeptidaz, EC 3.4.13.3) ve *serum karnozinaz* (β -Ala-His dipeptidaz, EC 3.4.13.20)'dır²⁵⁰⁻²⁵³.

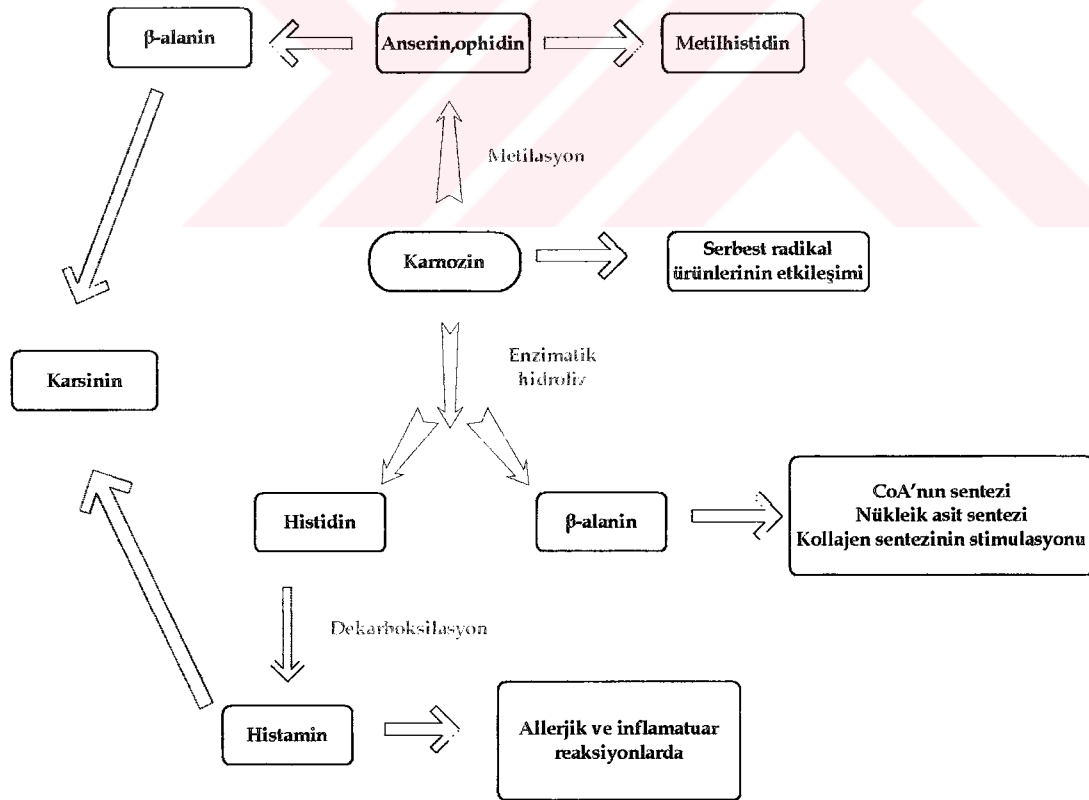


Sitozolik bir enzim olan doku karnozinaz, β -alanil-histidin dipeptidaz, karnozinaz, X-His dipeptidaz ve Xaa-His dipeptidaz olarak da adlandırılmaktadır²⁵⁴. Bu enzim 1949 yılında Hanson ve Smith²¹ tarafından keşfedilmiştir. Farelerin kalp, karaciğer ve akciğerlerinde karnozinaz aktivitesi gösterilmiş olup en çok aktivite böbrek, uterus ve nasal olfaktory mukozada tespit edilmiştir²⁵⁵. İnsanlarda karaciğer, böbrek ve dalakta bulunmaktadır²⁵⁰. 1957 yılında Wood²⁵⁶, karnozinazın rat dokularında yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir. Doku karnozinaz, tiyollerle aktive olurken, metal şelatlayıcı ajanlarla inhibe olur²⁵⁷. Domuz böbreğinde bulunan karnozinazın aktivasyonu ve stabilizasyonu Mn^{+2} iyonları ile olmaktadır²⁵⁶.

Serum karnozinaz beyinde sentezlenir ve önce serebrospinal sıvıya ve daha sonra sistemik dolaşıma salınır²⁵⁸⁻²⁵⁹. Serum karnozinaz ise Cd^{+2} ve sitrat ile inhibe olmaktadır²⁶⁰. Serum karnozinaz serum, beyin ve serebrospinal sıvıda bulunmaktadır²⁵⁴. Serum veya intrasellüler karnozinaz tarafından yıkılabilen karnozin, α -peptidleri hidrolizi eden peptidazlara dirençlidir. Karnozinazın serumda bulunma sebebi bilinmemektedir, belki de serumdaki karnozinazın varlığı toksik olmayan histidininin (göreceli olarak toksik)

kaynağıdır²⁶¹. İnsanlarda bu enzimin bir formunun eksikliği mental retardasyon ile ilişkilidir^{7, 258-259}. Yapılan çalışmalarda, Parkinson, multipl skleroz ve serebrovasküler hastalıklarda serum karnozinaz konsantrasyonlarının azaldığı bildirilmiştir²⁶².

Karnozinin imidazol halkasının 1-N pozisyonundan metilasyonu ile anserin (insan beyin dokusunda bulunmamaktadır), 3-N pozisyonundan metilasyonu ile de ophidin (yunus kas dokusunda) oluşmaktadır. Karnozinin hidroliziyle histidin ve β -alanin oluşur. Non-proteinik bir amino asit olan β -alanin koenzim-A'nın (CoA) vazgeçilmez bir parçası olup pirimidin yıkımının sonucunda da oluşur. β -alaninin kollajen sentezini artırıcı bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Histidinin dekarboksilasyonu ile histamin meydana gelir. β -alanin ve histaminin reaksiyonu sonucunda karsinin oluşmaktadır. Karsinin fonksiyonu bilinmemektedir²⁶³ (Şekil. 9).



Şekil. 9: Dokularda karnozin sentezi²⁵³

2.3.4.2.1.3. Biyolojik Dokularda Karnozin Tayini

İnsan ve hayvan dokularındaki karnozin ve CRCs'lerin direkt ölçümü için HPLC, immunoassay ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi kullanılmaktadır. Solid faz ekstraksiyonu ile kombine edilmiş reverz faz gradient HPLC metotları karnozin ve ilişkili dipeptidlerin miktar tayini için hassas, tekrarlanabilir ve seçicilik sağlar²⁶⁴.

2.3.4.2.1.4. Biyolojik Fonksiyonları :

Karnozin ve metabolizması hakkında çok az bilgiye sahibiz. Son yıllardaki araştırmalar karnozinin hücreleri oksidatif stres hasarına karşı koruyucu etkisinden başka; karnozinin kültüre edilmiş hücrelerin yaşam sürelerini uzattığı, yaşlı hücreleri gençleştirdiği, hücreleri hipoklorit, MDA ve amiloid peptidin toksik etkilerine karşı koruduğu, proteinlerin ve protein-DNA'nın glikasyonunu ve protein-protein çapraz bağlanmayı inhibe ettiği ve hücreler homeostazinin korunmasına yardımcı olduğunu göstermiştir. Ayrıca karnozin, yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan görme bozukluklarını geciktirmekte ve kataraktı da etkili bir şekilde önlemektedir. Bu yüzden, karnozin belki de insanlarda, yaşlanmaya karşı bir ilaç olarak uygulanabilir²⁶⁵.

Karnozin içeren göz damlaları korneal hastalıklar, artmış intraoküler basınç, katarakt ve glukoma gibi göz hastalıklarının tedavisinde etkilidirler. Rusya Sağlık Bakanlığının izniyle geliştirilen %5'lik karnozin göz damlası tıpta kullanılmaktadır. 1997 yılında, 109 optalmik hasta üzerinde yapılan klinik bir çalışmada karnozin içeren bir göz damlası kullanılmıştır. Sonuçlar; korneal erozyon, keratitiz, bullöz keratopati, primer ve sekonder korneal distrofi ve post herpetik epitelyapatinin iyileşmesini hızlandığını doğrulamıştır. Karnozinin var olan kataraktı yok edebilmesi oldukça çarpıcıdır. Karnozin lenste protein karbonilleriyle reaksiyona girerek, proteinleri onarmaktadır²⁶⁶.

Kataraktlı hayvanlarda karnozin konsantrasyonu düşük bulunmuştur. Düşük karnozin konsantrasyonunda, kataraktın şiddeti yüksektir. Yüksek oranda kolesterol içeren diyetle beslenen tavşanlara karnozin yüklemesi yapılırsa, ateroskleroz ve katarakta karşı koruma bir hayli artmaktadır²⁶⁷.

Karnozinin anti-ageing etkisi diyetle karnozin alındığında hem hücre kültürlerinde hem de tüm hayvan çalışmalarında gösterilmiştir²⁶⁸. Karnozin, lizin-metilgliksal-AGE'ler tarafından indüklenen protein modifikasyonlarını inhibe etmektedir. Karnozin in vitro ortamda yaşlanmayla ilişkili olan protein karbonillerinin oluşumu ve çapraz bağlanmaların oluşumunu inhibe etmektedir. Glike edilmiş lizin (glukoz+lizin) öldürücü iken, glike edilmiş karnozin (glukoz+karnozin) öldürücü değildir. Karnozin; asetaldehit ve formaldehit kaynaklı DNA/protein çapraz bağlanmalarının oluşumunu önlemektedir^{265,16-18, 269-}

270

Karnozin ve anserin fizyolojik pH'da dikkate değer bir tamponlama aktivitesi gösterir²⁷¹. Zayıf bazik pH'da, karnozin, kolaylıkla lipit peroksidasyonunu baskılayabilir. Kastaki aktivite esnasında intrasellüler ortamda asidifikasyonun artmasıyla, karnozin tamponlama etkisi gösterir. Böylelikle karnozin peroksidasyonu baskılayarak homeostazinin korunmasını sağlar¹¹.

2.3.4.2.1.5. Karnozinin Antioksidan Aktivitesi

Karnozin, suda eriyebilen hayvansal dokuların doğal bir metabolitidir. Karnozin reaktif oksijen türlerini temizleyici fonksiyonundan dolayı antioksidan özelliğe sahiptir. Karnozin antioksidan özelliğinin yanı sıra membran koruyucu rolü de vardır. Suda çözünebilen serbest radikalleri temizlerken, hücre membranını lipit peroksidasyonundan korur^{12,13, 272}.

Birçok antioksidanın amacı dokulara serbest radikallerin girişini engellemektir, fakat ilk savunmanın aşılmasından sonra etkili değildirler. Karnozin sadece korumada etkili değildir, serbest radikallerin reaksiyonlarıyla oluşan tehlikeli bileşiklere karşı da etkilidirler. Böylelikle dokuları ikinci bir kimyasal etkiden korumaktadır^{18,270}. Örneğin; yüksek reaktiviteye sahip lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA, serbest radikal reaksiyonlarının tehlikeli bir ürünüdür ve karnozin tarafından bloke edilebilir. MDA, eğer kontrol edilemezse, enzimleri, lipitleri ve DNA'yı hasara uğratarak ve eklem inflamasyonu,

aterosikleroz, katarakt oluşumu ve yaşlanmada rol oynar. Karnozin MDA ile reaksiyona girerek MDA'yı inaktifleştirir, ve böylece proteinlerdeki amino asitleri korur²⁷³⁻²⁷⁵.

Karnozin, kültüre edilmiş rat beyin endotel hücrelerini MDA toksitesine¹⁸, insan lenfositleri ve fibroblastlarını asetaldehit ve formaldehite karşı¹⁷, kültüre edilmiş insan fibroblastlarını ise lizin/deoksiriboz ile inkübe edilmesiyle oluşan AGEs'lere karşı korumaktadır²⁶⁹.

Yaşlanma; serbest oksijen radikalleriyle oluşan makromoleküler hasar ve okside/çapraz bağlanmış/denatüre proteinlerin birikimiyle ilişkilidir. Yaşlanma esnasında proteinler okside olurlar ve çapraz bağlanmalar meydana getirirler. Bu modifikasyonlar glukoz ve fruktoz gibi zararlı aldehyitlerin, peroksidasyon ürünü olan MDA ile reaksiyona girmesiyle artmaktadır. Metilglioksal benzeri protein modifikasyonlarını arttırmaktadır (özellikle diabetin ikincil komplikasyonlarında). Karnozin, olasılıkla, proksimal imidazol amino grup ve karboksil gruplara sahip olduğu için zararlı aldehyitlerle reaksiyona girebilmektedir²⁷⁶.

Makrofaj myeloperoksidaz ile H_2O_2 ve klorit iyonlarından hipoklorit oluşmaktadır. Hipoklorit, protein çapraz bağlanmaları ve protein oksidasyonuna (karbonil grupların oluşumunu) sebep olmaktadır. Karnozin in-vitro ortamda; hipoklorit ile reaksiyona girerek stabil kloramin deriveleri oluşturur²⁶⁹ ve hipoklorit aracılı protein modifikasyonunun oluşumunu engeller²⁷⁷.

Karnozin; kültüre edilmiş insan fibroblastlarının maksimum hücre bölünme kapasitesini arttırarak olgun/yaşlanmış hücreleri genç hücrelere dönüştüren birkaç ajandan biridir. Karnozin kültüre edilmiş insan fibroblast DNA'larında bulunan 8-hidroksiguanin (DNA oksidasyon ürünü) düzeylerini azaltır²⁷⁸.

3. MATERYAL-YÖNTEM

Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve Pediatri Anabilim Dalı Metabolizma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.Kullanılan Gereçler

3.1.1.Deney Grupları

Deney hayvanları Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı'na bağlı Serum Çiftliği'nden sağlanmıştır. Ağırlıkları 250-300 gram arasında 40 adet Wistar cinsi erkek rat kullanılmıştır. Bilimsel araştırma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurul'undan izin alınmıştır.

3.1.2.Kullanılan Aletler

- ◆ Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)
- ◆ Homojenizatör (Virtis-Virtisheur)
- ◆ Vorteks (Heidolf Reax 200)
- ◆ Benmari (Heto)
- ◆ Santrifuj (Hermle Z 380K)
- ◆ Soğutmalı santrifuj (Damon IEC, B-20A soğutmalı , Hermle Z 323 K)
- ◆ Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)
- ◆ HPLC (Waters)
- ◆ HPLC (Agilent HP 1100 serisi)
- ◆ 0,2 µl ve 0,45 µl'lik filtreler

Ayrıca araştırma laboratuvarında biyokimyasal analizler için gerekli olan malzemeler kullanıldı.

3.1.3.Kullanılan Kimyasallar

EDTA, nitrobluetetrazolium (NBT), 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP), 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), karnozin, streptomisin sülfat, guanidin hidroklorür, bovin serum

albumin (BSA), Folin ciocalteu's fenol ve Trietilenamin (TEA) **Sigma**, o-pitoaldehit (OPA), ksantin oksidaz (XO), sodyum karbonat (Na_2CO_3), kloroform, etanol, metanol, amonyum sülfat, trikloroasetikasit (TCA), bakır klorür (CuCl_2), asetonitril (HPLC grade), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), perklorik asit, sodyum tetra borat, dipotasyum fosfat (K_2HPO_4), monopotasyum fosfat (KH_2PO_4), sodyum potasyum tartarat (Na-K tartarat), bakır sülfat (CuSO_4) ve etil asetat **Merck** kullanıldı.

Ketamin (Ketanes ®), Alcon, xylazin HCl (Rompun ®) **Bayer** kullanıldı.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

10 adet rattan oluşan dört grup oluşturulmuştur.

1. **Kontrol Grubu;** 13 gün boyunca günde bir kez (sabah 9:30-10:00), intraperitoneal olarak izotonik tuz çözeltisi verildi.

2. **Etanol Grubu;** 13 gün boyunca günde bir kez (sabah 9:30-10:00), kontrol grubunda uygulanan izotonik tuz çözeltisiyle aynı hacimde etanol (2g/kg/vücut ağırlığı, %18 v/v) intraperitoneal olarak verildi²⁷⁹.

3. **Karnozin Grubu;** 13 gün boyunca günde bir kez (sabah 9:30-10:00), oral yolla 1 mg/ kg vücut ağırlığı oranında karnozin 1 ml distile suya karıştırılarak verildi²⁸⁰.

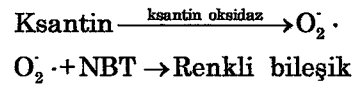
4. **Etanol+Karnozin Grubu;** 13 gün boyunca günde bir kez (sabah 9:30-10:00), hem intraperitoneal etanol (2g / kg / vücut ağırlığı, % 18 v/v) hem de oral yolla 1 mg/ kg vücut ağırlığı oranında karnozin 1 ml distile suya karıştırılarak verildi.

Uygulamadan 24 saat sonra yüksek doz anestezi (2,5 mg/kg ketamin ve 2,5 mg/kg xylazine HCl karışımı intramusküler uygulama) ile feda edildi. Kafatası açılarak hızla beyin dokusu çıkarıldı. Dokular % 0,9'luk NaCl ile yıkandı. Her gruptaki yarım beyin dokuları kendi aralarında randomize edildi. Biyokimyasal inceleme için ayrılanlar ise alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta donduruldu ve analiz süresine kadar - 70 ° C'de saklandı.

3.2.2.Yöntemlerin Uygulanması

3.2.2. 1. Beyin Dokusu SOD Aktivitesinin Tayini

Doku SOD aktivitesi, Yi-Sun'un²⁸¹ 1988'de tanımladığı, ksantin ksantin oksidaz ile $O_2^{\cdot -}$ oluşturmaları ve bunun da NBT ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise $O_2^{\cdot -}$ 'yi ortadan kaldıracak için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır.



Reaktifler :

- ✗ Stok ksantin : 3mmol/ L
- ✗ BSA : 1 g/L
- ✗ NBT : 150 µmol/L
- ✗ CuCl₂ : 0.8 mmol/L
- ✗ Na₂CO₃ : 400 mmol/L

Ksantin oksidaz (XO) enzim çözeltisi : 1/100 (v/v) 2 M'lık amonyum sülfat çözeltisi ile dilüe edilir.

Kloroform / etanol : 3/5 (v/v)

Reaktif karışımı : 40 ml 10 kat dilüe edilmiş stok ksantin çözeltisi + 20 ml

NBT +12 ml Na₂CO₃ + 6 ml BSA karıştırılır. 250 ml'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı :

Dokular distile su ile ½ oranında teflon metal uçlu homojenizatörle homojenize edildi. Süpernatant, kloroform / etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırıldı. 5000xg'de +4 °C'de 2 saat santrifuj edildi. Enzim aktivitesi tayini ve protein tayini bu süpernatandan yapıldı. Protein miktarları Lowry metodu ile ölçüldü.

	Kör	Numune
Reaktif karışımı	2.9 ml	2.9 ml
Numune	--	50µl
Distile su	50µl	--
XO çözeltisi	50µl	50µl

25 °C'de 20 dakika inkübasyondan sonra tüplere 0.8 mM CuCl₂'den 1 ml eklenir ve 560 nm'de distile suya karşı okunur.

Hesaplama:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Kör abs} - \text{Numune abs})}{\text{Kör abs}} \times 100$$

% 50 inhibisyonu 1Ü aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapıldı.

Lowry Protein Tayini²⁸²:

Reaktifler:

- ✘ % 2'lik Na₂CO₃ içinde 0.1 N'lik NaOH (A1) ✘ %1'lik CuSO₄ (B2)
- ✘ %2'lik Na-K tartarat (B1) ✘ Folin ciocalteu's fenol

Standart olarak 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) kullanıldı.

C solüsyonu; 0,5 ml B₁+ 0,5 ml B₂+ 16,5 ml A

Folin çekolte (F.c); 1 hacim F.c. + 1 hacim distile su

Deneyin yapılışı :

	BSA	Distile su	C solüsyonu
Kör	-	100 µl	2 ml
Standart-1	40 µl	60 µl	2 ml
Standart-2	80 µl	20 µl	2 ml
Numune	40 µl	60 µl	2 ml

Deney tüpleri vortekslelendikten sonra, 15 dakika bektilir. Daha sonra deney tüplerine 200 µl folin çekolte eklenerek iyice vortekslenir ve 1 saat karanlıkta bekletilir. Tüpler 750 nm’de köre karşı okunur.

Hesaplama:

$$\text{Protein miktarı} : \frac{\text{Numune Abs}}{\text{Standart Abs}} \times \text{standart konsantrasyonu.}$$

Sonuçlar mg/ml olarak verilir.

SOD enzim tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek Ü/mg protein olarak verildi.

3.2.2. 2. Beyin Dokusunda Protein Karbonil Düzeylerinin Ölçümü:

Protein karbonil grubu düzeyleri Reznick ve arkadaşlarının³², 2,4-dinitrofenilhidrazin’in karbonil grupları ile reaksiyonu sonucu 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşması prensibine dayanan spektrofotometrik metoduna göre tayin edilmiştir.

Reaktifler :

- | | |
|---|---|
| ✗ 100 mM Potasyum fosfat tamponu pH=7.4 | ✗ %10’luk streptomisin sülfat |
| ✗ %20 TCA | ✗ 10 mM 2,4 DNPH (2M HCl’de hazırlandı) |
| ✗ 2 M HCl | ✗ Etanol/Etil asetat (1/1) |

6M Guanidin HCl (20mM KH₂PO₄ tamponunda hazırlandı, HCl ile pH=2,3’e ayarlandı).

Deneyin yapılışı :

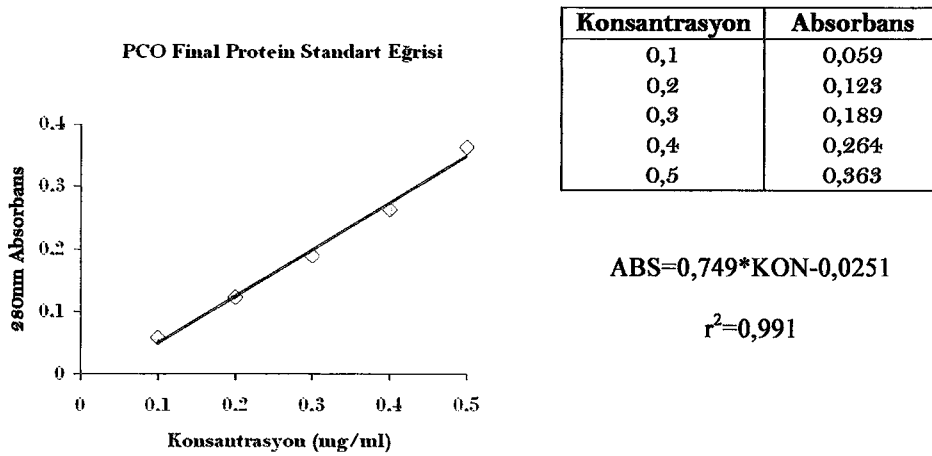
100 mg beyin dokusu 1ml 100 mM KPO₄ tamponda (pH= 7.4) homojenize edildi. Homojenat 12000xg’de 10 dakika +4°C’de santrifüj edildi. Süpernatandaki protein değerleri Lowry metoduna göre tespit edildi ve 1mg/ml olacak şekilde dilüsyonlar hazırlandı. Süpernatandaki nükleik asitlerin interferansını önlemek için %10’luk streptomisin (100 mM KPO₄ içinde, pH: 7,2) ile 1streptomisin / 9 numune (v/v) oranında numuneler hazırlanarak 15 dakika oda ısında bekletildi. Bu numuneler 2800xg’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant

alınır. Süpernatantlar 280 ve 260 nm'deki absorbanları okundu ve absorbanlar birbirine oranlandı. Oran 1'den büyükse nükleik asitler yeteri kadar elimine edilmiştir.

Analiz için kullanılacak olan numunelerin her biri için iki ayrı ependorf tüp hazırlandı. Tüplerden birine 0,5 ml numune ve 0,5 ml 10mM DNPH; diğerine 0,5 ml numune ve 0,5 ml 2 mM HCl eklenerek, inkübasyon için 1 saat boyunca oda ısısında bekletildi ve her 5-10 dakikada bir iyice vortekslendi. Daha sonra her bir tüpe 0,5 ml %20'lik TCA ilave edildi. 3400xg'de 10 dakika oda ısısında santrifüj edilerek proteinler yeniden çöktürüldü. Elde edilen pelletler, üzerlerine 1,5 ml 1/1 etanol/etil asetat eklendikten sonra 3400g'de 10 dakika santrifüj edilerek 3 kez yıkandı. Bundan sonra pelletlerin üzerine 1,25 ml Guanidin HCl eklenerek çözünene kadar vortekslendi. Önce kör tüplerin (yani numune içermeyen HCl tüpleri) 280 nm'de protein absorbanları ölçüldü. Daha sonra numuneler 370 nm'de, her bir numunenin 2 M HCl ilave edilerek hazırlanan ikinci tüpüne karşı okundu.

Hesaplama:

280 nm'deki protein miktarının hesabı : 6M Guanidin HCl içinde hazırlanan 0,1—0,4 mg/ml arasındaki BSA standartları ile elde edilen standart eğri üzerinde hesaplandı.



Şekil 8: 280nm'deki BSA protein standart eğrisi

370 nm'deki PCO konsantrasyonunun hesabı :

$$\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = 22 \times 10^3 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{PCO konsantrasyon: } \frac{\Delta A_{370} (\text{DNPH}_{370} - \text{HCL}_{370})}{22,000/10^6} = \text{nmol/ml}$$

Sonuçlar protein miktarlarına bölünerek nmol/mg protein olarak verildi.

3.2.2. 3. Beyin Dokusu Total MDA Düzeylerinin Ölçümü

MDA, HPLC'de Pils ve arkadaşlarının⁸⁷, numunenin oda sıcaklığında 2,4-dinitrofenilhidrazinle (DNPH) türevlendirilmesi ile oluşturulan MDA hidrazonunun kolondan ayrılması esasına dayalı bir yöntemle ölçülmüştür.

HPLC analiz şartları:

- ✗ Dedektör: 310 nm. UV dedektör
- ✗ Kolon: Hypersil ODS C₁₈, reverz faz kolon, 5 µm, 125 x 4 mm
- ✗ Kolon sıcaklığı: 30⁰C
- ✗ Mobil faz : % 0.2 asetik asit (v/v) içeren asetonitril-distile su (38:62, v/v)
- ✗ Mobil faz hızı: 1 ml/dak. izokratik



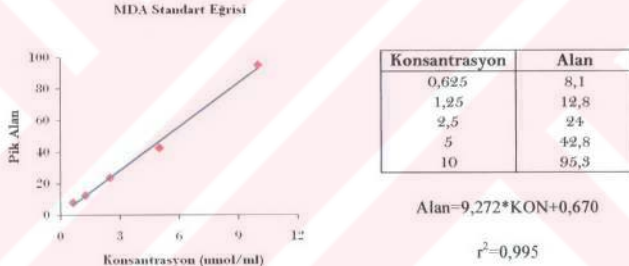
Şekil 9: Agilent 1100 serisi HPLC cihazı

Total MDA standartlarının hazırlanışı:

Stok TEP standardı (1mM): 25 µl TEP 100 ml distile su içinde hazırlandı.

Ara stok standardı (20 nM): 1 ml TEP stok solüsyonu, 50 ml %1 (v/v) sülfirik asit (H_2SO_4) içinde hidroliz edildi ve 2 saat oda ısısında, karanlıkta inkübe edildi. Çalışma standartları 20 nmol/ml'lik ara stok standarttan %1 (v/v) H_2SO_4 ile 10 nM, 5 nM, 2,5 nM, 1,25 nM ve 0,625 nM olacak şekilde dilüe edildi.

Derivatizasyon: Çalışma standartlarından 250 µl alınarak üzerine 25 µl DNPH eklendi ve 10 dakika oda ısısında, karanlıkta türevlendirildi. Türevlendirilen standartlardan HPLC'ye 20 µl enjekte edildi.



Şekil 10: MDA standart eğrisi

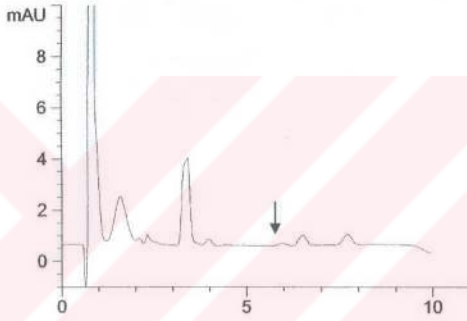
Numunelerin hazırlanışı:

% 1,15 (w/v) soğuk KCl ile %10'luk doku homojenatları hazırlandı. Numunelerin hidrolizi için; bir ependorf tüpe için 1 ml homojenat ve 200 µl 6 NaOH eklenerek vortekslendi ve 60°C'de bir su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Hidroliz olmuş numunelere eşit hacimde asetonitril eklenerek, 30 sn vortekslendi ve proteinler çöktürüldü. Daha sonra numuneler 15.000xg'de 10 santrifüj edilir. Ependorf tüpün üst kısmındaki berrak süpernatant alınarak yeni bir ependorf tüpe aktarılır.

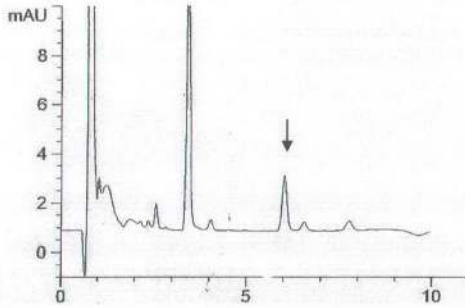
Derivatizasyon: Numunelerden 250 µl alınarak üzerine 25 µl DNPH eklenir ve 10 dakika oda ısısında, karanlıkta türevlendirilir. Türevlendirilen numuneler 0,45 µl'lik filtreden geçirilerek 20 µl HPLC'ye enjekte edildi.

Hesaplama:

Numunelerdeki total MDA değerleri standart eğri üzerinden hesaplanarak lowry protein miktarlarına bölünerek pmol/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 11: Bir numuneye ait MDA kromatogramı



Şekil 12: Aynı numunenin standartla birlikte bir kromatogramı

3.2.2. 4. Beyin Dokusu Karnozin Düzeylerinin Ölçümü^{264,283}

HPLC analiz şartları:

- ✗ Dedektör: 310 nm eksitasyon, 375 nm emisyon, floresans dedektör
- ✗ Kolon: Hypersil ODS C₁₈, reverz faz kolon, 5 µm, 250 x 4,6 mm
- ✗ Kolon sıcaklığı: 27°C
- ✗ Mobil faz : % 50 oranında B solventi solvent A'ya eklenir ve degaze

edildikten sonra pH: 6,4'e ayarlanır.

Solvent A: 0,06 M potasyum mono bazık HPLC grade su içinde hazırlanır. Trietilenamin, %0,4 olacak şekilde eklenir

Solvent B: 60 : 40 (v/v) oranında metanol-asetonitril.

- ✗ Mobil faz hızı: 1 ml/dakika



Şekil 13 : HPLC (Waters)

Karnozin Standartlarının hazırlanışı:

Stok karnozin standartının hazırlanışı (10 mM): 56,56 mg karnozin 25 ml

HPLC grade su içinde çözülür.

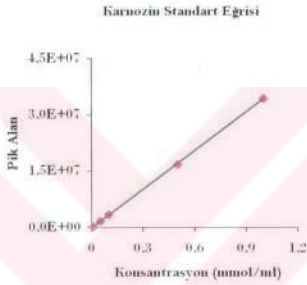
Ara stok standardı (1 mM): 500 µl stok standarttan alınıp 0,4 M'lık borat

tamponuyla 5 ml'ye tamamlanarak hazırlanır. Çalışma standartları 1 mM'lık ara stok standarttan

0,4 M'lık borat tamponu ile 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM olacak şekilde dilüe edildi.

Derivatizasyon: 1:1 oranında (25:25 µl) OPA ile türevlendirilen standartlardan 25 µl HPLC'ye enjekte edildi.

Karnozin standart eğrisi:

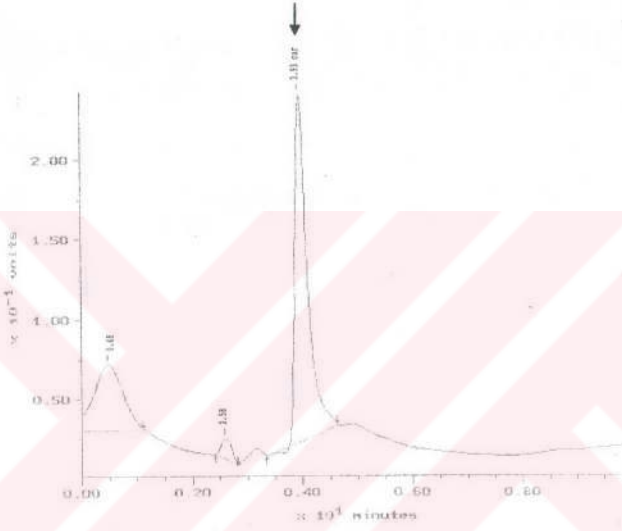


Konsantrasyon	Absorbans
0,01	307185,47
0,05	16681744
0,1	3522264,1
0,5	16866927
1	34454787

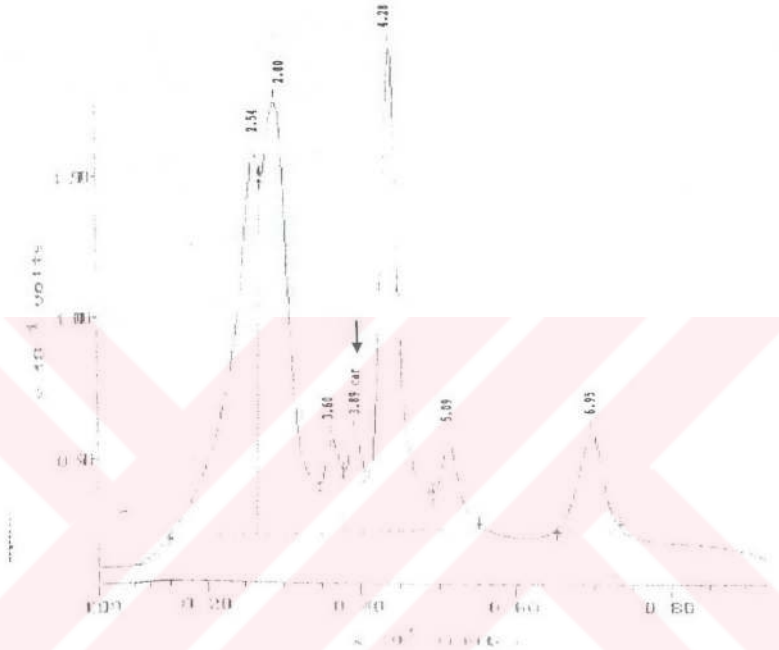
$$\text{Alan} = 34383169,93 \cdot \text{KON} + 51345,22$$

$$r^2 = 0,999$$

Şekil 14: Karnozin standart eğrisi



Şekil 15 : 0,5 nmol/ml'lik karnosin standartına ait bir kromatogram



Şekil 16: Karnozin grubundaki bir numuneneye ait kromatogram

Numunelerin hazırlanışı:

100 mg doku 1,5 ml 0,3 M perklorik asit ile 30 sn homojenize edildi. Numuneler polietilen tüplerde 5 dakika kaynatıldı. Numuneler ependorf tüplere aktararak 10 dakika, 0°C'de 11360xg'de santrifüj edildi. Pellet atılarak süpernatant 0,2 µl'lik filtrelerden geçirildi.

Derivatizasyon: Filtreden geçirilen numuneler ve standartlar 1:1 oranında (25:25 µl) OPA ile türevlendirildi. Türevlendirilen numunelerden 25 µl HPLC'ye enjekte edildi.

Hesaplama:

Numunelerdeki karnozin değerleri standart eğri üzerinden hesaplanarak mg doku miktarına bölünerek nmol/mg doku olarak ifade edildi.

3.2.2. 5. Histolojik İnceleme:

Beyin dokuları elektron mikroskobik takip yöntemine göre, 1 mm³'lük parçalara ayrıldıktan sonra % 2,5'lik gluteraldehit ön tespit solüsyonunda 72 saat bekletildi. Daha sonra 1/1 oranında fosfat tamponu ve OSO₄ içinde 1saat bekletilerek ikinci kez tespit edildi ve boyandı. Örnekler, fosfat tamponunda yıkandıktan sonra sırasıyla dereceleri artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Bu dokular % 80'lik etil alkol içinde uranil asetat solüsyonunda 30 dakika bekletildi. 10 dakika propilen oksitte bekletildi. 2 saat Araldit CY212+dodesil süksinik anhidrat (DDSA) karışımından oluşan ön gömme materyalinde bekletilerek Araldit CY212+dodesil süksinik anhidrat (DDSA) ve benzil dimetil amin (BDMA) karışımı gömme materyaline gömüldü. Elde edilen bloklar 24 saat 90⁰ C'de ve 48 saat 60⁰ C'lik etüvde polimerize edildi. Alınan kalın kesitler toludin mavi ile boyanarak, Olympus BH₂ foto mikroskopta değerlendirildi.

4. VERİLERİN DEğERLENDİRİLMESİ

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 10.0 istatistik paket programı ile yapılmıştır. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi ve gruplar arasındaki farklılığı tespit etmek için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. P<0.001, p<0,005 ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

Tüm gruplara ait doku SOD aktivitesi (Ü/ mg protein), total MDA (pmol/mg protein), PCO (nmol/mg protein) ve karnozin (nmol/mg doku) düzeylerinin istatistiksel sonuçları (ortalama±standart hata) Tablo. 5'te sunulmuştur. Ayrıca beyin dokusundaki histolojik bulgular da saptanarak Şekil. 18-21 arasında verilmiştir.

Tablo 5: Tüm gruplara ait doku SOD aktivite (U/mg protein), total MDA (pmol/mg protein), PCO (nmol/mg protein) ve karnozin (nmol/mg protein) düzeyleri ortalama± standart hata olarak verilmiştir.

<i>Biyokimyasal Parametreler</i>	<i>Gruplar</i>			
	<i>Grup I (n=10)</i>	<i>Grup II (n=10)</i>	<i>Grup III (n=10)</i>	<i>Grup IV (n=10)</i>
<i>SOD (U/mg protein)</i>	17,68±0,58	18,45±0,71	19,21±0,49	20,06±0,58 ^a
<i>MDA (nmol/mg protein)</i>	29,12±1,24	23,79±1,31 ^a	51,59±5,04 ^{b, c, d}	30,59±3,24
<i>PCO (nmol/mg protein)</i>	3,33±0,87	3,94±1,34	5,59±1,32 ^{e, f, g}	3,87±1,28
<i>Karnozin (nmol/mg protein)</i>	0,161±0,009	0,280±0,021 ^{e, h}	0,210±0,013 ^a	0,504±0,053 ^{b, h, i}

Grup I : Kontrol, Grup II : Karnozin, Grup III : Etanol, Grup IV : Etanol+ Karnozin

^a : p <0,05 Grup I ile karşılaştırıldığında,

^f : p <0,05 Grup II ile karşılaştırıldığında,

^b : p <0,001 Grup I ile karşılaştırıldığında,

^g : p <0,005 Grup IV ile karşılaştırıldığında.

^c : p <0,001 Grup II ile karşılaştırıldığında,

^h : p <0,005 Grup II ile karşılaştırıldığında,

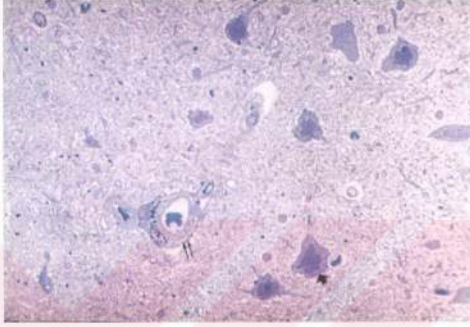
^d : p <0,005 Grup IV ile karşılaştırıldığında,

ⁱ : p <0,001 Grup III ile karşılaştırıldığında,

^e : p <0,005 Grup I ile karşılaştırıldığında,

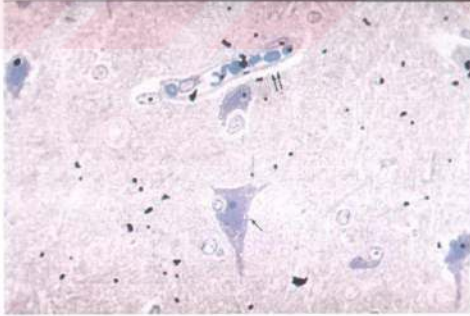
Histolojik Bulgular

Kontrol grubunda piramidal hücreler (→), kapiller (⇨) normal yapılarında izleniyor (Şekil. 10).



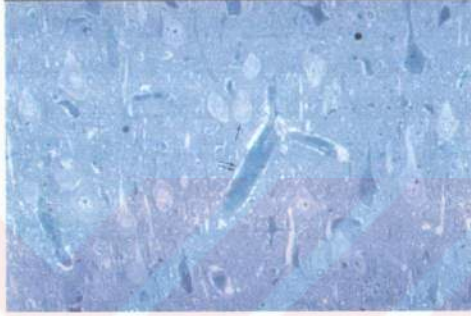
Şekil 17: Kontrol grubu rat beyni, piramidol hücre (→) ve kapiller (⇨), (Toluidin mavisi x400).

Etanol uygulanan grubun beyin dokusu yarı ince kesitlerinde piramidal nöronlarının sitoplazmalarındaki yoğun vakuolizasyon var (→). Damar duvarındaki ödem son derece belirgindir (⇨).



Şekil 18: Etanol grubu rat beyni, nöronlarının sitoplazmalarındaki yoğun vakuolizasyona (→) ve damar duvarındaki ödem (⇨). (Toluidin mavisi x200).

Karnozin grubunda granüler (→) hücreler izleniyor. Damar duvarındaki ödem (⇨) alkol grubundaki kadar çok olmamakla birlikte belirgindir (⇨). Ayrıca glial hücreler de belirgin (*).



Şekil 19 :Karnozin grubu rat beyni, granüler hücre (→), çok belirgin olmayan damar duvarındaki ödem (⇨) ve belirgin glial hücre (*), (Toluidin mavisi x200).

Karnozin+etanol grubunda, glial hücrelerde (→) normal yapıları izleniyor. Kapiller duvarı ve çevre doku arasında açılma (ödem) (⇨)izleniyor.



Şekil 20 : Karnozin+etanol grubu rat beyni, normal yapı glial hücreler (→) ve kapiller duvarı ve çevre doku arasında açılma (ödem) (⇨). (Toluidin mavisi x200).

6. TARTIŞMA

Oksidatif stres nöronal dejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon hasarı ve deneysel toksisite modelleri dahil bir çok nörodejeneratif bozuklukla ilişkilidir²⁸⁴⁻²⁸⁵. Beyin yüksek oksidatif metabolik aktivite, düşük antioksidan kapasite, membran/sitoplazma oranının yüksek oluşu, geçiş metal iyonlarının yüksek konsantrasyonu ve yenilenemeyen nöronal hücrelerden dolayı oksidatif strese duyarlıdır¹⁰⁰.

Hem insan hem de hayvan çalışmalarında etanol tüketiminin gastrointestinal kanal, karaciğer, kalp, ve beyin dokularında hasara yol açtığı gösterilmiştir^{1,286-287}. Özellikle beyin dokusu etanol toksisitesine hassastır. Bu hem etanolün hücre membranlarına direkt etkisinden hem de membran bağlı reseptörlerle etkileşiminden ya da etanolün kendi metabolizmasından kaynaklanmaktadır. Etanol kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmektedir ve farklı yollarla metabolize olabilmektedir¹⁵⁹. Beyin homojenatları ve mikrozomal preperasyonlarda yapılan çalışmalarda etanolün serbest radikal oluşturabildiği gösterilmiştir^{1,156,170}.

Ayrıca, bir çok nörodejeneratif hastalık ve kronik alkol tüketimi beyindeki serbest radikal artışı ile ilişkilidir. Bu yüzden kronik ve aşırı etanol tüketimi ile oksidatif değişiklikler diğer nörodejeneratif bozuklukların ilerlemesini hızlandırabilir^{30,288}.

Uzun süreli etanol alınımı sonrası ratların nöronal ve glial hücre kültürlerinde etanol ile indüklenen beyin hasarı kanıtlanmıştır²⁸⁹. Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada rat periferel sinirlerinde etanol toksisitesinin artmış lipit peroksidasyonu ve azalmış hücresel antioksidanlarla seyrettiği dolayısıyla oksidatif stresle ilişkili olduğu gösterilmiştir²⁹⁰.

Bir çok klinik ve deneysel çalışmada etanolla indüklenen toksisitenin antioksidan yükleme ile indirgenebileceği ileri sürülmüştür²⁹¹. Doğal antioksidanlar biyoorganizmaları serbest radikal hasarına karşı koruyucudur ve bu yüzden yakın zamanda oldukça ilgi çekmektedirler²⁹².

Nöronlardaki oksidatif stres ve hasar; membran lipitleri, proteinler ve DNA gibi hücresel komponentlere serbest radikal ataklarıyla oluşur ve bu hasar çeşitli hücre içi mekanizmalarla üretilen reaktif oksijen türlerinin üretiminin artışıyla koreledir¹⁰⁴. İn vitro deneylerde karnozinin oksidatif hasara karşı nöronları²⁹³ ve non-nöronal²⁹⁴⁻²⁹⁵ hücreleri koruduğu bildirilmiştir.

Endojen olarak sentezlenen karnozin β -alanin ve histidinden oluşmaktadır. Karnozin ve histin içeren dipeptitler iskelet kası ve beyin gibi uyarılabilen dokularda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır^{227, 229-230}. Karnozinin astroglialden zengin primer kültürler (kemirgen beyni) ve kas hücrelerinin primer kültürlerinde, karnozin sentetaz enzimi ile β -alanin ve histidinden, sentezlediği bildirilmiştir²⁶¹.

Karnozinin esas biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda karnozinin; antioksidan, tamponlayıcı aktivite, nörotransmitter, yara iyileştirici bir ajan ve savunma sistemini güçlendiren bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir²³⁰.

Karnozinin antioksidan özelliklerini metal iyonlarına karşı şelatasyon, SOD benzeri aktivite ve reaktif oksijen radikallerini süpürücü etkisi olarak sayabiliriz. Karnozin singlet oksijeni temizlemede histidinden daha etkilidir ve hidroksil radikali, lipooksijenaz, hemoglobin, ferrik iyonlar ile indüklenen peroksidatif hasarı etkili bir şekilde inhibe etmektedir^{272, 296-298}.

Karnozin suda çözülebilir, serbest radikal süpürücü ve hücre membranlarını lipid peroksidasyonuna karşı da koruyucudur. Karnozin, belkide sadece ROS süpürücü değil aynı zamanda ROS oluşumunu da önleyebilir²⁹⁹. İn vitro çalışmalarda, karnozin güçlü bir oksidan olan hidroksil radikalının oluşumunu geçiş metal iyonlarının şelatasyonu ile önler³⁰⁰.

Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda, rat beyininde etanolle indüklenen oksidatif strese, antioksidan özelliği olan karnozinin etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla dokuda bir antioksidan enzim olan SOD, lipid peroksidasyon belirteci MDA ve protein oksidasyon belirteci PCO düzeylerini inceledik. Ayrıca diyet karnozinin beyindeki karnozin

düzeyleri etkilerini araştırmak için doku karnozin düzeylerini ölçmeyi ve deneysel oksidatif stresi de histolojik bulgularla desteklemeyi amaçladık.

Rat beyninin çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarda, etanolün başlıca katalaz ve etanolle indüklenen sitokrom P450 formu (CYP2E1) ile metabolize olduğu belirtilmiştir¹⁵¹. Guerri ve arkadaşları¹⁴⁸ ise yayınladıkları bir makalede ise sadece CYP2E1 değil total sitokrom P450'nin de nöral aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. CYP2E1'in indüksiyonu prooksidan serbest radikallerin oluşumunu artırır. Ayrıca etanol metabolizması demir iyonlarının salınımına neden olmaktadır³⁰¹⁻³⁰². Bu iyonlar karaciğer ve beyin için oldukça reaktiftir. Serbest demir iyonları demir içeren proteinlerden salınırlar ve hidroksil radikalının oluşumuna katılırlar. Hidroksil radikalleri serbest oksijen radikallerinin en reaktif olanlarıdır ve bu radikaller organik moleküller dahil bir çok hücresel komponentle kolaylıkla reaksiyona girebilir. Özellikle membran fosfolipitlerinin yağ asitleri ve proteinler etkilemektedirler³⁰³.

Birçok çalışmada etanolün serbest radikal oluşumunu artırarak ve/veya antioksidan savunma sistemini zayıflatarak lipid peroksidasyonunu indüklediği ve beyinde oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir⁴. Lipid peroksidasyonu serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biridir. Lipid peroksidasyonunun başlıca son ürünlerinden olan MDA oksidan hasarı değerlendirmede sıklıkla kullanılmaktadır³⁰⁴. MDA organizma için oldukça zararlı bir madde olup, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin bozulması ve DNA bazlarıyla reaksiyona girerek mutajenik karakter kazanması gibi pek çok olumsuz etkiye sahiptir³⁰⁵.

MDA, proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipitler veya nükleik asitlerle reaksiyona girebilir, molekül içi ve moleküller arası 1-amino-3-imino propen (AIP) köprüleri oluşturabilir ve biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlar oluşturabilir²⁶.

Protein oksidasyonu yaşlanma ve birçok nörodejeneratif hastalığın patogeneziinde önemli bir rol oynamaktadır. Protein karbonil oluşumu protein oksidasyonunu erken dönemde gösteren bir markıdır³⁰⁶⁻³⁰⁷.

Kronik karaciğer hastalıklarının deneysel modellerinde artmış protein oksidasyonunun ve hücrel proteinlerin inaktivasyonu ve oksidatif hasarlı birikiminin etanol toksisitesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür³⁰⁸. Protein oksidasyonunun etanolle indüklenen nörotoksositeye katkıda bulabileceği olasılığı oldukça ilgi çekicidir. Yaptığımız literatür taramalarında beyin dokusunda etanolle indüklenen oksidatif stresin proteinler üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlayamadık.

Çalışmamızda, etanol verilen grubun MDA ve protein karbonil düzeylerinin kontrol, karnozin ve etanol+karnozin gruplarına göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (MDA için sırasıyla ($p<0,001$), ($p<0,001$), ($p<0,005$), protein karbonil için sırasıyla ($p<0,005$), ($p<0,005$), ($p<0,001$)). Bulgularımız, etanolün beyin dokusu lipit peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu arttırdığını göstermektedir.

Karnozin+etanol verilen gruptaki MDA ve protein karbonil düzeyleri ise, kontrol grubunun düzeylerine yakın bulunmuştur. Diyetle verilen karnozin, oksidatif şartlardaki lipit peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu normal düzeylere indirgeyebilecek kadar etki göstermiştir.

Aydın ve ark.³⁰⁹ Rat beyin dokusunda etanol ve N-asetil sistein yüklemesinden sonra MDA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada etanol grubundaki MDA düzeylerinin, kontrol grubundaki MDA düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir.

Ostrowska ve arkadaşlarının³¹⁰ 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada ise, ratların beyin ve karaciğer organlarında etanolle indüklenen lipit peroksidasyonuna karşı yeşil çayın koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışmada etanol uygulanan grubun beyin dokusundaki MDA düzeyleri, diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir artışın olduğu rapor edilmiştir.

Yine bir başka çalışmada ise Nadiger²⁹¹ ve arkadaşları; ratlara etanol ve vitamin E yüklemesi sonrası beyinde lipit peroksidasyon düzeylerinin etanol uygulanan gruba göre azaldığı gözlenmiştir.

Pirlich ve arkadaşlarının³¹¹ yaptıkları in vitro bir çalışmada, klonal hippocampal hücre dizilerinde etanolle indüklenen protein oksidasyonunun α -lipoik asit kullanılarak önlenebileceği saptanmıştır.

Karnozin lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA gibi zararlı aldehytlerle reaksiyona girerek, hücredeki protein agregasyonunu azaltmaktadır^{12,13}. Karnozinin oksidatif stres şartlarında proteinleri ve membran lipidlerinin oksidatif hasarını önleyebildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir³¹².

Karnozin hücresel düzeyde koruyucu olabilir. Yapılan çalışmalarda bu dipeptidin kültüre edilmiş insan fibroblastlarını ve lenfositlerini asetaldehitin toksik etkilerine karşı ayrıca kültüre edilmiş rat beyin endotel hücrelerini MDA' ya karşı koruduğu bildirilmiştir¹⁷⁻¹⁸.

Karnozin uygulanan grubun MDA düzeyleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,05$). Daha önce in vitro ve in vivo çalışmalarda karnozinin hem MDA ile etkileşime girerek hem de lipid peroksidasyonuna neden olacak mekanizmaları inhibe ederek antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Karnozin verilen grubun MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre düşüş göstermesi oldukça önemli bir bulgudur.

Nagasawa ve arkadaşları³¹³, in vitro ve in vivo ortamdaki deneysel çalışmada karnozinin iskelet kası dokusunda hem lipid peroksidasyonu hem de protein oksidasyonunu üzerinde koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda karnozinin hem in vivo hem de in vitro ortamda lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu indirdiği gözlenmiştir.

Diğer çalışmalarda da karnozinin, MDA ve metilglioksal aracılı oksidatif protein modifikasyonlarını inhibe ettiği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise, karnozinin serum albuminini oksidatif modifikasyona karşı koruduğu rapor edilmiştir²⁷⁰.

Karnozinin antioksidan özelliği ilk olarak in vitro ortamda 1984 yılında tanımlanmıştır³¹⁴. Cu^{+2} ve Zn^{+2} ile karnozin kompleksleri SOD benzeri aktiviteye sahiptir. Bu özellik dipeptidin antioksidan aktivite göstermesine katkıda bulunur. Bir çok in vitro deneysel

çalışmada, karnozin ve ilişkili histidin içeren bileşiklerin hidroksil ve singlet oksijen radikalini yok edici etkisi ve süperoksit radikalini süpürücü etkisi gösterilmiştir³¹⁵.

SOD, hücrede önemli bir antioksidan enzimdir. CuZn-SOD ROS metabolizmasında iki yönlü bir rol oynar. ROS için CuZn-SOD bir hedeftir. ROS, hem in-vitro³¹⁶ hem de ROS ile ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda bu enzimi inhibe edebilmektedir^{104, 284}. Choi ve arkadaşlarının³¹⁶ 1999 yılında in vitro ortamda yaptıkları bir çalışmada; karnozin, homokarnozin ve anserinin H₂O₂ aracılığıyla Cu, Zn-SOD'un oksidatif hasarının önleyebileceği gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda SOD aktivite düzeylerindeki değişiklik sadece karnozin+etanol uygulanan grupta gözlenmiştir. Bu grupta aktivite düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak artmıştır (p<0,05). Oral yolla verilen karnozin, etanol aracılı oksidatif stresden dolayı artan MDA ve protein karbonil düzeylerini azaltarak, bazal SOD düzeylerinin artmasına neden olmuş olabilir.

Doku karnozin konsantrasyonları diyetten etkilenmektedir. Diyetle alınan karnozin; öncelikle jejunumda bir taşıyıcı sistem aracılığıyla herhangi bir değişikliğe uğramadan kolaylıkla absorbe olmaktadır. İnce barsak hücrelerinde karnozinaz ile hidrolize edilmektedir ve daha sonra kas ve beyin gibi dokularda tekrar sentezlenebilmektedir. Tamaki ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada diyetteki histidin eksikliğinin, ratların iskelet kasındaki karnozin konsantrasyonu azaltırken, diyetle histidin eklenmesiyle karnozin konsantrasyonunun arttığını saptamışlardır. Diyet karnozin konsantrasyonu artırıldığında iskelet karnozin konsantrasyonu da artmıştır.

Abdel-Niad ve arkadaşlarının³¹⁷ yaptıkları bir çalışmada 2 g/kg doz intraperitoneal etanolün amino asitler ve ilişki bileşikler üzerine etkileri rat plazma, kalp, aort, bronşlar ve pankreas dokularında incelenmiştir. Dokularda etanolle indüklenen değişikliklerin farklı olduğunu ve plazma ile korele olmadığını saptamışlardır. Etanol grubunun plazma karnozin düzeylerinin kontrole göre düşüken, kalp dokusunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda, etanol, karnozin ve karnozin+etanol gruplarında beyin dokusu karnozin düzeylerinde değişiklik gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre doku karnozin düzeylerinin etanol ($p<0,05$), karnozin ($p<0,005$) ve karnozin+etanol ($p<0,001$) gruplarında belirgin olarak arttığı bulunmuştur. Karnozin verilen sağlıklı ratların karnozin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,005$). Bu bulgu oral karnozinin dokulara geçtiğini ve beyin karnozin düzeylerini arttırdığını göstermektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında etanol verilen grubunda karnozin düzeylerinin yükseldiği bulunmuştur. Muhtemelen etanolle indüklenen oksidatif strese cevap olarak endojen karnozin sentezi artmış olabilir. Karnozin+etanol grubundaki karnozin düzeyleri ise kontrol ($p<0,001$), etanol ($p<0,005$) ve karnozin gruplarına ($p<0,001$) göre oldukça yüksek bulunmuştur. Hem oksidatif strese maruz kalınması hem de ekzojen karnozin verilmesinin beyin karnozin düzeylerini arttırdığını düşünmekteyiz.

Etanol ve karnozinin dokulardaki etkilerini histolojik olarak incelediğimizde ise etanol grubunda, kontrol ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında damar duvarlarındaki ödem son derece belirgindir ve piramidal hücrelerde vakuolizasyon görülmüştür. Bu histopatolojik bulgular bu dozdaki etanolün beyinde nörotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın sonuçlarına göre etanol bu etkisini lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu artırarak yapmakta diyebiliriz. Karnozin grundaki histolojik bulgular kontrole yakın olmasına karşın damar duvarlarında hafif ödem saptanmıştır ve glial hücreler normaldir. Karnozin+etanol grubu ise etanol grubu kadar dejenerasyon görülmeyip bulgular karnozin grubuna yakındır.

Çalışmamızın bulguları, etanolün oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Bulgularımıza göre karnozinin, etanole bağlı beyin hasarı üzerinde iyileştici bir etkisi olduğu ve bu etkiyi beyinde oksidatif stresi azaltarak yaptığını söyleyebiliriz.

7. ÖZET

Etanol birçok mekanizma aracılığıyla ROS üretimini arttırabilir. Etanol çeşitli organlarda oksidatif strese indükleyebilir. Etanol ile indüklenen oksidatif strese beyin ve sinir sistemi, diğer organlardan daha hassastır. Beyin yüksek oksidatif metabolik aktivite, düşük antioksidan kapasite, membran/sitoplazma oranının yüksek oluşu, geçiş metal iyonlarının yüksek konsantrasyonu ve yenilenemeyen nöronal hücrelerden dolayı oksidatif strese elverişlidir.

Endojen olarak sentezlenen karnozin β -alanin ve histidinden oluşmaktadır. Karnozin ve histidin içeren dipeptitler iskelet kası ve beyin gibi uyarılabilen dokularda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Karnozinin esas biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda karnozinin; antioksidan, tamponlayıcı aktivite, nörotransmitter, yara iyileştirici bir ajan ve savunma sistemini güçlendiren bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Karnozinin antioksidan etkilerini metal iyonlarına karşı şelatasyon, SOD benzeri aktivite ve reaktif oksijen radikallerini süpürücü etkisi olarak sayabiliriz.

Çalışmamızda, rat beyininde etanolla indüklenen oksidatif strese antioksidan olan karnozinin etkilerini ve histolojik bulguları inceledik.

Bir lipid peroksidasyon markırı olan MDA'nın, etanol uygulanan gruptaki düzeyleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış bulunmuştur ($p<0,001$). Karnozin uygulanan grubun MDA düzeyleri ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,05$). Karnozin+etanol uygulanan gruptaki MDA düzeyleri ise kontrol grubunun MDA düzeylerine yakın bulunmuştur.

SOD aktivite düzeylerindeki değişiklik sadece karnozin+etanol uygulanan grupta gözlenmiştir. Bu grupta aktivite düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

Etanol grubundaki PCO düzeyleri ise diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görülmüştür. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Diyet karnozinin endojen karnozin üzerine etkileri, etanol, karnozin ve karnozin+etanol gruplarında gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre doku karnozin düzeylerinin etanol ($p<0,05$), karnozin ($p<0,005$) ve karnozin+etanol ($p<0,001$) gruplarında belirgin olarak arttığı bulunmuştur. Karnozin grubundaki doku karnozin düzeyleri de etanol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,005$). Karnozin+etanol uygulanan grubun karnozin düzeyleri ise diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır.

Etanol ve karnozinin dokulardaki etkilerini histolojik olarak inceledik. Etanol grubu kontrol ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında damar duvarlarında son derece belirgin bir ödem ve piramidal hücrelerde vakuolizasyon görülmüştür. Karnozin grubundaki histolojik bulgular kontrole yakın olmasına karşın damar duvarlarında hafif ödem saptanmıştır ve glial hücreler normaldir. Karnozin+etanol grubu ise etanol grubu kadar dejenerasyon görülmeyp bulgular karnozin grubuna yakındır.

Çalışmamızın biyokimyasal ve histolojik bulguları etanolün oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Bulgularımıza göre karnozinin etanole bağlı beyin hasarı üzerinde iyileştici bir etki gösterdiği ve bu etkiyi beyinde oksidatif stresi azaltarak yaptığı söyleyebiliriz.

8. SUMMARY

Ethanol may enhance the production of ROS through a number of mechanisms. Ethanol promotes oxidative stress in several organs. Brain and nervous system are more vulnerable to ethanol-induced oxidative damage than other organs. The brain is the tissue most vulnerable to oxidative damage because of its higher rate of oxidative metabolic activity, low antioxidant activity, non replicatory nature of neuronal cells, high membrane surface to cytoplasm ratio and high levels of transition metals.

Carnosine is an endogenously synthesized dipeptide which is formed from β -alanine and L-histidine. Excitable tissues such as brain and skeletal muscle contain high levels of carnosine and histidine-containing dipeptides. Many functions have previously been proposed for carnosine; these include antioxidant and free radical scavenger, physiological buffer, neurotransmitter, metal chelator, immunostimulator and wound healing agent.

The antioxidant mechanism of carnosine is attributed to its chelating effect against metal ions, SOD-like activity, ROS and free radicals scavenging ability.

In the current study, the oxidative stress induced by ethanol, the antioxidant effects of carnosine and the histological observations in the rat brain were investigated.

The MDA levels in the ethanol group increased significantly according to the other groups ($p < 0,001$). There was a significant decrease in the carnosine group with respect to the control group ($p < 0,05$). The MDA levels were almost similar in both of the ethanol+carnosine group and the control group.

The protein carbonyl levels in the ethanol group were increased significantly compared with the other groups. There was no statistical significance in the protein carbonyl levels between the other groups.

The SOD activities increased only in the ethanol+carnosine group with respect to the control group ($p < 0,05$).

The effects of the dietary carnosine on the endogenous carnosine were investigated in the ethanol ($p < 0,05$), carnosine ($p < 0,005$) and the ethanol+carnosine ($p < 0,001$) groups. The tissue carnosine levels were increased significantly with respect to the control group

in ethanol, carnosine and the ethanol+ carnosine groups. Also, the carnosine levels in the carnosine group increased significantly compared with the ethanol group ($p<0,005$). With respect to the other groups, the carnosine levels were higher in the carnosine group.

The effects of ethanol and carnosine on the brain tissues were observed histologically. In the ethanol group, an obvious edema in the vessel walls and vacuolization in pyramidal cells were observed compared with the control and with the other groups.

Though the histological observations at the carnosine group was almost the same with control group, a slight edema was investigated in the cell walls. The glial cells were normal.

The biochemical and histological results of the study were similar with the studies in those the ethanol was an oxidant. According to the results, carnosine was an antioxidant ameliorating the oxidant effects of ethanol in the brain.

9. ÖZGEÇMİŞ

1977 Yılında Trabzon'da doğdum. İlk öğrenimimi Erzurum, orta ve lise öğrenimimi Trabzon'da tamamladım. 1998 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2000 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında master programını tamamladım. 2000 yılında aynı Anabilim Dalında doktora programına başladım.



10. KAYNAKLAR

1. NORDMANN, R., RIBIERE, C., ROUACH, H.: Implication of Free Radical Mechanism in Ethanol Induced Cellular Injury, *Free Radic. Biol. Med.*, 12, 219-240. (1992)
2. FRIDOVICH, I.: Oxygen Radicals from Acetaldehyde, *Free Radic. Biol. Med.*, 7(5), 557-558. (1989)
3. LECOMTE, E., HERBETH, B., PIROLLET, P., CHANCERELLE, Y., ARNAUD, J., MUSSE, N., PAILLE, F., SIEST, G., ARTUR, Y.: Effect of Alcohol Consumption on Blood Antioxidant Nutrients and Oxidative Stress Indicators, *Am. J. Clin. Nutr.*, 60(2):255-261. (1994)
4. NORDMANN, R., RIBIERE, C., ROUACH, H.: Ethanol-Induced Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in Extrahepatic Tissues, *Alcohol Alcohol.*, 25(2-3):231-237. (1990)
5. RUSSO, A., PALUMBO, M., SCIFO, C., CARDILE, V., BARCELLONA, M.L., RENIS, M.: Ethanol-Induced Oxidative Stress in Rat Astrocytes: Role of HSP70, *Cell Biol. Toxicol.*, 17 (3), 153-168. (2001)
6. MONTOLIU, C., SANCHELO-TELLO, M., AZORIN, I., BURGAL, M., VALLES, S., RENAUPQUERAS, J., GUERRI, C.: Ethanol Increases Cytochrome P4502E1 and Induces Oxidative Stress in Astrocytes, *J. Neurochem.*, 65 (6), 2561-2570. (1995)
7. CALABRESE, V., RENIS, M., CALDERONE, A., RUSSO, A., BARCELLONA, M.L., RIZZA, V.: Stress Proteins and SH-Groups in Oxidant-Induced Cell Damage After Acute Ethanol Administration in Rat, *Free Radic. Biol. Med.*, 20 (3), 391-397. (1996)
8. CALABRESE, V., RENIS, M., CALDERONE, A., RUSSO, A., REALE, S., BARCELLONA, M.L., RIZZA, V.: Stress Proteins and SH-Groups in Oxidant-Induced Cellular Injury After Chronic Ethanol Administration in Rat, *Free Radic. Biol. Med.*, 24 (7-8):1159-1167. (1998)
9. CAMMER, W., TANSEY, F., ABRAMOVITZ, M., ISHIGAKI, S., LISTOWSKY, I.: Differential Localization of Glutathione-S-Transferase Yp and Yb Subunits in Oligodendrocytes and Astrocytes of Rat Brain, *J. Neurochem.*, 52(3):876-883. (1989)
10. COPIN, J.C., LEDIG, M., THOLEY, G.: Free Radical Scavenging Systems of Rat Astroglial Cells in Primary Culture: Effects of Anoxia and Drug Treatment, *Neurochem. Res.*, 17 (7), 677-682. (1992)
11. BOLDYREV, A.A., DUPIN, A., BUNIN, Y.A., BABIZHAEV, M.A., SEVERIN, E.: The Antioxidant Properties of Carnosine, A Natural Histidine Containing Dipeptide, *Biochem. Inter.*, 15, 1105-1113. (1987)

12. KOHEN, R., YAMAMOTO, Y., CUNDY, K.C., AMES, B.N.: Antioxidant Activity of Carnosine, Homocarnosine, and Anserine Present in Muscle and Brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5 (9), 3175-3179. (1988)
13. PAVLOV, A.R., REVINA, A.A., DUPIN, A.M., BOLDYREV, A.A., YAROPOLOV, A.I.: The Mechanism of Interaction of Carnosine with Superoxide Radicals in Water Solutions, *Biochim. Biophys. Acta*, 1157 (3), 304-312. (1993)
14. FERRIERO, D., MAROGOLIS, F.L.: Denervation in The Primary Olfactory Pathway of Mice. II. Effects on Carnosine and Other Amine Compounds, *Brain Res.*, 94 (1), 75-86, (1975)
15. ABRAHAM, D., PISANO, J.J., UDENFRIEND, S.: The Distribution of Homocarnosine in Mammals, *Arch. Biochem. Biophys.*, 99, 210-213. (1962)
16. HIPKISS, A.R., MICHAELIS, J., SYRRIS P.: Non-Enzymatic Glycosylation of The Dipeptide L-Carnosine, A Potential Anti-Protein-Cross-Linking Agent, *FEBS Lett.*, 371 (1), 81-85. (1995)
17. HIPKISS, A.R., PRESTON, J.E., HIMSWOTH, D.T., WORTHINGTON, V.C., ABBOT, N.J.: Protective Effects of Carnosine Against Malondialdehyde-Induced Toxicity Towards Cultured Rat Brain Endothelial Cells, *Neurosci. Lett.*, 238 (3), 135-138. (1997)
18. HIPKISS, A., MICHAELIS P., SYRRIS, M.: Strategies for The Extension of Human Life-Span, *Perspect Human Biol.*, 1, 417-422. (1995)
19. BROWN, C.E.: Interactions Among Carnosine, Anserine, Ophidine and Copper in Biochemical Adaptation, *J. Theor. Biol.*, 88 (2), 245-56. (1981)
20. GULYAEVA, N.V.: Superoxide-Scavenging Activity of Carnosine in The Presence of Copper and Zinc Ions, *Biochemistry (Moscow)*, 52 (7), 1051-1054. (1987)
21. CRUSH, K.G.: Carnosine and Related Substances in Animal Tissues, *Comp. Biochem. Physiol.*, 34, 3-30. (1970)
22. HIPKISS, A.R., BROWNSON, C.: Carnosine Reacts with Protein Carbonyl Groups: Another Possible Role for The Anti-Ageing Peptide?, *Biogerontology*, 1, 217-223. (2000)
23. FLOYD, R.A.: DNA Damage and Repair in "Oxidative Damage and Repair", (Davies K.J.A. ed), Pergamon Press., 175-180. (1992)
24. SIES, H.: Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application, *Am. J. Med.*, 91, 31S-38S. (1991)
25. EVANS, P., HALLIWELL, B.: Micronutrients: Oxidant/Antioxidants Status, *Brit. J. Nutr.*, 85, (Suppl. 2), S67-S74. (2001)

26. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C.: Free Radical in Biology and Medicine, Third ed., Oxford University Press, Oxford, 160-165. (2000)
27. MENZAL, D.B.: The Toxicity of Air Pollution in Experimental Animals and Humans: The Role of Oxidative Stress, *Toxicol. Lett.*, 72, 269-77. (1994)
28. PODDA, M., TRABER, M.G., WEBER, C., YAN, L.J., PAKCER, L.: UV-irradiation Deplets Antioxidants and Causes Damage in A Model Human Skin, *Free. Radic. Biol. Med.*, 92, 5259-5265. (1998)
29. AKKUŞ, I. : Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1.Baskı , Mimoza Yayınları, Konya, 13-19. (1995)
30. BECKMAN, K.B., AMES, B.N.: The Free Radical Theory of Aging Matures, *Physiol. Rev.*, 78, 547-581. (1998)
31. STADTMAN, E.R., OLIVER, C.N.: Metal-Catalysed Oxidation of Proteins, Physiological Consequences, *J. Biol. Chem.*, 266, 2005-2008. (1996)
32. REZNICK, A.Z., PACKER, L.: Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay, *Methods Enzymol.*, 233, 357-363. (1994)
33. LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.R., SHACTER, E.: Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins, *Methods Enzymol.*, 233, 347-357, (1994)
34. EVANS, P., LYRAS, L., HALLIWELL, B.: Measurement of Protein Carbonyls in Human Brain Tissue, *Methods Enzymol.*, 300, 145-156. (1999)
35. SHACTER, E.: Quantification and Significance of Protein Oxidation in Biological Samples, *Drug Met. Rev.*, 32 (3-4), 307-326. (2000)
36. REINHECKEL, T., NEDELEV, B., PRAUSE, J., AUGUSTIN, W., SCHULZ, H., LIPPERT, H., WALTER HALANGK, W.: Occurrence of Oxidatively Modified Proteins: An Early Event in Experimental Acute Pancreatitis, *Free Radic. Biol. Med.*, 24 (3), 393-400. (1998)
37. STADTMAN, E.R.: Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 797- 821. (1993)
38. DAVIES, M.J.: Chemistry to Medicine in "Radical-Mediated Protein Oxidation", (Dean, R.T. ed), Oxford University Press, Oxford, (1997)
39. DEAN, R.T., FU, S., STOCKER, R., DAVIES, M.J.: Biochemistry and Pathology of Radical-Mediated Protein Oxidation, *Biochem. J.*, 324, 1- 18. (1997)

40. HAWKINS, C.L., DAVIES, M. J.: Generation and Propagation of Radical Reactions on Proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1504, 196–219. (2001)
41. SHACTER, E.: Protein Oxidative Damage, *Methods Enzymol.*, 319, 428–436. (2000).
42. LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A., H.N., SHALTIEL, S.B., STADTMAN, E.R.: Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins, *Methods Enzymol.*, 186, 464–478. (1990).
43. BUSS, H., CHAN, T.P. , SLUIS, K.B. , DOMIGAN, N.M., WINTERBOURN, C.C.: Protein Carbonyl Measurement by A Sensitive ELISA Method, *Free Radical Biol. Med.*, 23, 361–366. (1997).
44. ROBINSON, C.E., KASHAVARZIAN, A., PASCO, D.S., FROMMEL, T.O., WINSHOP, D.H., HOLMES, E.W. : Determination of Protein Carbonyl Groups by Immunoblotting, *Anal. Biochem.*, 266, 48–57. (1999).
45. SMITH, M. A., SAYRE, L.M., ANDERSON, V.E. , HARRIS, P. L.R., BEAL, M.F. , KOWALL, N., PERRY, G.: Cytochemical Demonstration of Oxidative Damage in Alzheimer Disease by Immunochemical Enhancement of The Carbonyl Reaction with 2,4-Dinitrophenylhydrazine, *J. Histochem. Cytochem.*, 46, 731–735. (1998).
46. SHACTER, E., WILLIAMS, J.A., LIM, M. , LEVINE, R.L.: Differential Susceptibility of Plasma Proteins to Oxidative Modification. Examination by Western Blot Immunoassay, *Free Radical Biol. Med.*, 17, 429–437. (1994).
47. KELLER, R.J., HALMES, N.C., HINSON, J.A., PUMFORD, N.R.: Immunochemical Detection of Oxidized Proteins, *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 430–433. (1993).
48. YAN, L.J., ORR, W.C., SOHAL, R.S.: Identification of Oxidized Proteins Based on Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Immunochemical Detection, Isoelectric Focusing, and Microsequencing, *Anal. Biochem.*, 263, 67–71. (1998)
49. NAKAMURA, A., GOTO, S.: Analysis of Protein Carbonyls with 2,4-Dinitrophenyl Hydrazine and Its Antibodies by Immunoblot in Two-Dimensional Gel Electrophoresis, *J. Biochem.*, 119, 768–774. (1996).
50. SHACTER, E., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.R., LEVINE, R.L.: Determination of Carbonyl Groups in Oxidized Proteins, in “Free Radicals: A Practical Approach”, (Punchard, N., Kelly, F., eds.), Oxford University Press, Oxford, 159–170. (1994)
51. LEE, Y.J., SHACTER, E.: Role of Carbohydrates in Oxidative Modification of Fibrinogen and Other Plasma Proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, 321, 175–181. (1995).

52. KOHEN, R., NYSKA, A.: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantitation, *Toxic. Pathol.*, 30 (6), 620–650. (2002)
53. WARD, R.J., PETERS, T.J.: Free Radicals in “Clinical Biochemistry: Metabolic & Clinical Aspects”, (Marshall, W.J., Bangert, S.K. eds.), Chapter 42, 765-777. (1995)
54. ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., DIZDAROGLU, M.: Iron Ion-Dependent Modification Bases in DNA by The Superoxide Radical-Generating System Hypoxanthine/Xanthine Oxidase, *J. Biol. Chem.*, 264 (22), 13024-13028. (1989)
55. ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., GAJEWSKI, E., DIZDAROGLU, M.: Damage to The Bases in DNA Induced by Hydrogen Peroxide and Ferric Ion Chelates, *J. Biol. Chem.*, 264 (34), 20509-20512. (1989)
56. THOMAS, S., LOWE, J.E., KNOWLES, R.G., GREEN, I.C., GREEN, M.H.: Factors Affecting The DNA Damaging Activity of Superoxide and Nitric Oxide, *Mutat. Res.*, 402 (1-2), 77-84. (1998)
57. MICHIKAWA, Y., MAZZUCHELLI, F., BRESOLIN, N., SCARLATO, G., ATTARDI, G.: Aging-Dependent Large Accumulation of Point Mutations in The Human mtDNA Control Region for Replication, *Science*, 286 (5440), 774-749. (1999)
58. KASAI, H., CRAIN, P.F., KUCHINO, Y., NISHIMURA, S., OOTSUYAMA, A., TANOOKA, H.: Formation of 8-Hydroxyguanine Moiety in Cellular DNA by Agents Producing Oxygen Radicals and Evidence for Its Repair, *Carcinogenesis*, 7, 1849–1851. (1986)
59. FRAGA, C.G., SHIGENAGA, M. K., PARK, J.W., DEGAN, P., AMES, B.N.: Oxidative Damage to DNA During Aging: 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Rat Organ DNA and Urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4533–4537. (1990)
60. LOFT, S., VISTISEN, K., EWERTZ, M., TJONNELAND, A., OVERVAD, K., POULSEN, H.E.: Oxidative DNA Damage Estimated by 8-Hydroxydeoxyguanosine Excretion in Humans: Influence of Smoking, Gender and Body Mass Index, *Carcinogenesis*, 13, 2241–2247. (1992.)
61. HELBOCK, H. J., BECKMAN, K.B., SHIGENAGA, M.K., WALTER, P.B., WOODALL, A.A., YEO, H.C., AMES, B.N.: DNA Oxidation Matters: The HPLC-Electrochemical Detection Assay of 8-Oxo-Deoxyguanosine and 8-Oxo-Guanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 288–293. (1998.)
62. HALLIWELL, B.: Why and How Should We Measure Oxidative DNA Damage in Nutritional Studies? How Far Have We Come?, *Am. J. Clin. Nutr.*, 72, 1082–1087. (2000)

63. LUNEC, J., HOLLAWAY, K.A., COOKE, M, S.: Urinary 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine: Redox Regulation of DNA Repair In Vivo?, *Free Rad. Biol. Med.*, 33 (7), 875-885. (2002)
64. SHIGENAGA, M.K., GIMENO, C.J., AMES, B.N.: Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxy-Guanosine as A Biological Marker of In Vivo Oxidative DNA Damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9697-9701. (1989)
65. YOKUŞ, B., ÇAKIR, D.Ü.: In-vivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkını, 8-Hydroxy-2'-Deoxy-Guanosine., *Türk. Klin. Bil. Tıp Bil.*, 22 (5), 535-543. (2002)
66. CATHCART, R. SCHWIERS, E., SAUL, R.L. AMES, B.N.: Thymine Glycol and Thymidine Glycol in Human and Rat Urine: A Possible Assay for Oxidative DNA Damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5633-5637. (1984)
67. MERAL, A., TUNCEL, P., SURMEN-GUR, E., OZBEK, R., OZTURK, E., GUNAY ,UC.: Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Beta-Thalassemia, *Pediat. Hematol. Oncol.*, 17, 687-693. (2000)
68. CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F.: An Introduction to Free Radical Biochemistry, *Br. Med. Bull.*, 49, 481-493. (1993).
69. BAST, A., HAENEN, G.R., DOELMAN, C.J.: Oxidants and Antioxidants: State of The Art, *Am. J. Med.*, 91(3C), 2S-13S. (1991)
70. STOCKS, J., KEM,P M., DORMANDY, T.L.: Increased Susceptibility of Red-Blood-Cell Lipids to Autooxidation in Haemolytic States, *Lancet*, 1(7693), 266-269. (1971)
71. MCCORD, J.M.: Human Disease, Free Radicals, and The Oxidant/Antioxidant Balance, *Clin. Biochem.*, 26(5), 351-357. (1993)
72. FOREMAN D., ZUK, L., MILLER, D.B., SALOMON R.G.: Effects of E₂ Levuglandins on The Contractile Activity of The Rat Uterus, *Prostaglandin*, 34, 91-98. (1987)
73. ESTERBAUER, H., SCHAUR, R.J., ZOLLNER, H.: Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.*, 11, 81-128. (1991)
74. UCHIDA, K.: 4-Hydroxy-2-Nonenal: A Product and Mediator of Oxidative Stress, *Progr. Lip. Res.*, 569, 1-26. (2003)
75. BASU, A.K., MARNETT, L.J.: Unequivocal Demonstration that Malondialdehyde is A Mutagen, *Carcinogenesis*, 4 (3), 331-333. (1983)
76. SHIMIZU, T., KONDO, K., HAYAISHI, O.: Role of Prostaglandin Endoperoxides in The Serum Thiobarbituric Acid Reaction, *Arch. Biochem. Biophys.*, 206 (2), 271-376. (1981)
77. <http://www.4adi.com/flr/mda.html>

78. LEE, S.H., BLAIR, I.A.: Characterization of 4-Oxo-2-Nonenal as A Novel Product of Lipid Peroxidation, *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 698–702. (2000)
79. RINDGEN, D., LEE, S.H., NAKAJIMA, M., BLAIR, I.A.: Formation of A Substituted 1,N(6)-Etheno-2'-Deoxyadenosine Adduct by Lipid Hydroperoxide-Mediated Generation of 4-Oxo-2-Nonenal, *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 846–52. (2000)
80. BIRD R.P., DRAPER, H.H.: Comparative Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination, *Methods Enzymol.*, 105, 299-305. (1994)
81. ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H.: Determination of Aldehyc Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal, *Methods Enzymol.*, 186 (42), 407-421. (1990)
82. HALLIWELL, B, CHIRICO, S.: Lipid Peroxidation: Its Mechanism, Measurement and Significance, *Am. J. Clin. Nutr.*, 57 (suppl 2), 715S –25S. (1993)
83. AGARWAL, R., CHASE, S.D.: Rapid, Fluorimetric-Liquid Chromatographic Determination of Malondialdehyde in Biological Samples, *J. Chromatogr. B*, 775, 121-126. (2002)
84. ESTERBAUER, H., LANG, J., ZADRAVEC, S., SLATER, T.F.: Detection of Malonaldehyde by High-Performance Liquid Chromatography, *Methods Enzymol.*, 105, 319-328. (1984)
85. LUCAS, D., MENEZ, J.F., BERTHOU, F., PENNEC, Y., FLOCH, H.H.: Determination of Free Acetaldehyde in Blood as The Dinitrophenylhydrazone Derivative by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A*, 382, 57-66.(1986)
86. CORDIS G.A., DAS D.K., REIDEL, W.: High-Performance Liquid Chromatographic Peak Identification of 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivatives of Lipid Peroxidation Aldehydes by Photodiode Array Detection, *J. Chromatogr. A*, 798, 117-123.(1998)
87. PILZ, J, MEINEKE, I., GLEITER, C.H.: Measurement of Free and Bound Malondialdehyde in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography as The 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivative, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 742(2), 315-325.(2000)
88. NIEDERNHOFER, L.J., DANIELS, J.S., ROUZER, C.A., GREENE, R.E., MARNETT, L.J.: Malondialdehyde, A Product of Lipid Peroxidation, is Mutagenic in Human Cells, *J Biol Chem.*, 278 (33), 31426-31433. (2003)
89. PANSARASA, O., CASTAGNA, L., COLOMBI, B., VECCHIET, J., FELZANI, G., MARZATICO, F.: Age and Sex Differences in Human Skeletal Muscle: Role of Reactive Oxygen Species, *Free Radic. Res.*, 33, 287-293. (2000)

90. COLTON, C.A., FAGNI, L., GILBERT, D.: The Action of Hydrogen Peroxide on Paired-Pulse and Long-Term Potentiation in The Hippocampus, *Free Radic. Biol. Med.*, 7, 3-8. (1989)
91. PELLMAR, T.C., HOLLINDEN, G.E., SORVEY, J.M.: Free Radicals Accelerate The Decay of Long Term Potentiation in Fields CAI of Guinea Pig Hippocampus, *Neuroscience*, 44, 353-359. (1991)
92. SHOHAMI, E., BEIT-YANNAL, E., HOROWITZ, M.: Oxidative Stress in Closedhead Injury, *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.*, 17, 1007-1019. 81997)
93. AMES, B.N., SHIGENAGA, M.T., HAGEN, M.: Oxidants, Antioxidants and The Degenerative Diseases of Aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915-7922. (1993)
94. FLOYD, R.A.: Free Radical Damage to Protein and DNA: Mechanism Involved and Revelant Observations on Brain Undergoing Oxidative Stress, *Ann. Neurol.*, 32, 22-27. (1992)
95. GATE, L., PAUL, J., NGUYEN BA, G., TEW, K.D., TAPIERO, H.: Oxidative Stress Induced in Pathologies: The Role of Antioxidants, *Biomed. Pharmacol.*, 53, 169-180. (1999)
96. HENSLEY, K., MAIDT, M.L., STEWART, C.A., PYE, Q.N., Robinson, K.A., Floyd, R.A.: Mitochondrial alteration in aging and inflammation: a possible site of action of nitron-based free radical traps in "Understanding the pocessof aging the roles of mitochondria, free radicals, and antioxidants", (CADENAS, E., PACKER, L., eds.) Marcel Dekker, New York, 311-325. (1999)
97. CUI, K., LUO, X., XU, K., VEN MURTHY M.R: Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: Recent Developments in Assay Methods for Oxidative Stress and Nutraceutical Antioxidants, *Prog. Neuro-Psycho. Biol. Psych*, 28 (5), 771-799. (2004)
98. BEHL, C.: Alzheimer's Disease and Oxidative Stress: Implications for Novel Therapeutic Approaches, *Prog. Neurobiol.*, 57, 301-323. (1999)
99. EVANS, P.H.: Free Radicals in Brain Metabolism and Pathology, *Br. Med. Bull.*, 49, 557-587. (1993)
100. FLOYD, R.A.: Antioxidants, Oxidative Stress, and Degenerative Neurological Disorders, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222, 236-245. (1999)
101. BECKMAN, J.S., CHEN, L., ISCHIROPAULES, H.: Oxidative Chemistry of Peroxynitrite, *Methods Enzymol.*, 233, 229-40. (1994)
102. WIGGLESWORT, J.M., BAUM, H. Eds. Iron Dependent Enzymes in The Brain. *Brain Iron: Neurochemical and Behavioural Aspects*, ed. M.B.H. youdim. 1988, Taylor-Francis: New-York. 25-66.
103. REITER, R.J.: Oxidative Processes and Antioxidative Defense Mechanisms in The Aging, Brain, *FASEB J.*, 9 (7), 526- 533. (1995)

104. OLANOW, C.W.: A Radical Hypothesis for Neurodegeneration, *Trends Neurosci.*, 16, 439-444. (1993)
105. MULLER, D.P.R., 1997. Neurological Disease. in: Sies, H. (Ed.), *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy*. Academic Press, New York, pp. 557- 580.
106. HALLIWELL, B.: Role of Free Radicals in The Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications for Antioxidant Treatment, *Drug. Agi.*, 18, 685-716. (2001)
107. GUTTERIDGE, J.M., HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants in The Year 2000. A Historical Look to The Future, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 899, 136-147. (2000)
108. CROSS, A., JONES, O.T.G.: Enzymic Mechanisms of Superoxide Production, *Biochim. Biophys. Acta*, 1057, 281-298. (1991)
109. SIMONSON, S.G., ZHANG, J., CANADA JR, A.T., SU, Y.F., BENVENISTE, E., PIANTADOSI, C.A.: Hydrogen Peroxide Production by Monoamine Oxidase During Ischemia-Reperfusion in The Rat Brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 13, 125-134. (1993)
110. PRATT, A.G., TURRENS, J.F.: Ascorbate and Hemoglobin-Dependent Brain Chemiluminescence, *Free Radic. Biol. Med.*, 8, 319-325. (1990)
111. BHAMRE, S., BHAGWAT, S.V., SHANKAR, S.K., WILLIAMS, D.E., RAVINDRANATH, V.: Cerebral Flavin-Containing Monooxygenase-Mediated Metabolism of Antidepressants in Brain: Immunochemical Properties and Immunocytochemical Localization, *J. Pharma. Exper. Therap.*, 267, 555-566. (1993)
112. TYNES, R., SABOURIN, P. J., HODGSON, E., PHILPOT, R.M.: Formation of Hydrogen Peroxide and N-Hydroxylated Amines Catalyzed by Pulmonary Flavine-Containing Monooxygenases in The Presence of Primary Alkylamines, *Arch. Biochem. Biophys.*, 251, 654-664. (1986)
113. HEINZEL, B., JOHN, M., KLATT, P., BOHME, E., MAYER, B.: Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Formation of Hydrogen Peroxide by Brain Nitric Oxide Synthase, *Biochem. J.*, 281, 627-630. (1992)
114. BIELSKI, B.H.J.: Studies of Hypervalent Iron, *Free Radic. Res. Commun.*, 12, 469-477. (1991)
115. YAMAZAKI, I., PIETTE, L.H.: ESR Spin Trapping Studies on The Reaction of Fe^{+2} Ions with H_2O_2 -Reactive Species in Oxygen Toxicity in Biology, *J. Biol. Chem.*, 265, 13589-13594. (1990)
116. HALLIWELL, B.: Oxidants and The Central Nervous System: Some Fundamental Questions. Is Oxidant Damage Relevant to Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease, Traumatic Injury or Stroke?, *Acta Neurol. Scand.*, 126, 23-33. (1989)

117. BECKMAN, J.S.: The Double-Edged Role of Nitric Oxide in Brain Function and Superoxide-Mediated Injury, *J. Dev. Physiol.*, 15(1), 53-59. (1991)
118. TERADA, L.S., WILLINGHAM, L.R., ROSANDICH, M.E., LEFF, J.A., KINDT, G.W., REPINE, J.E.: Generation of Superoxide Anion by Brain Endothelial Cell Xanthine Oxidase., *J. Cell Physiol.*, 148(2), 191-196. (1991)
119. KONTOS, H.A.: Oxygen Radicals in Cerebral Vascular Injury, *Circ. Res.*, 57, 508-516. (1985)
120. SIESJO, B.K., AGARDH, C.D., BENGTSSON, F.: Free Radicals and Brain Damage, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 1, 165-211. (1989)
121. CHAN, P.H.: Oxygen Radicals in Focal Cerebral Ischemia, *Brain Pathol.*, 4, 59-65. (1994)
122. MAXWELL, S.R.J.: Prospects for the Use of Antioxidant Therapies, *Drugs*, 49, 345-361. (1995)
123. PUNTARULO, S., CEDERBAUM, A.I.: Role of Cytochrome P450 2E1 in The Stimulation of Microsomal Production of Reactive Oxygen Species by Ferritin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1289, 238-246. (1996)
124. YANG, M.X., CEDERBAUM, A.I.: Interaction of Ferric Complexes with NADH-Cytochrome 65 Reductase and Cytochrome 65: Lipid Peroxidation, H₂O₂ Generation and Ferric Reduction, *Arch. Biochem. Biophys.*, 331, 69-78. (1996)
125. KNECHT, K.T., BRADFORD, B.U., MASON, R.P., THURMAN, R.G.: In-Vivo Formation of A Free Radical Metabolite of Ethanol, *Mol. Pharmacol.* 38, 26-30. (1990)
126. REINKE, L.A., LAI, E.K., DUBOSE, L.M., MCCAY, P.B.: Reactive Free Radical Generation In-Vivo Heart and Liver of Ethanol-Fed Rats: Correlations with Radical Formation In-Vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9223-9227. (1987)
127. REINKE, L.A., KATOKI, Y., MCCAY, P.B., JANZEN, E.G.: Spin-Trapping Studies of Hepatic Free Radicals Formed Following The Acute Administration of Ethanol to Rats: In-Vivo Detection of 1-Hydroxyl Radicals with PBN, *Free Radic. Biol. Med.*, 11, 31-39. (1991)
128. LIEBER, C.S.: Medical Disorders of Alcoholism, *N. Eng. J. Med.*, 333, 1058-1065. (1995)
129. FRAZBISZEWSKI, R., WITEK, A., SKRZDLEWSKA, E.: N-Acetylcysteine or Tolox Derivative Mitigate The Toxic Effects of Methanol on The Antioxidant System of Rat Brain. *Toxicol.*, 156, 47-55. (2000)

130. GONTHIER, B., JEUNET, A., BARRET, L.: Electron Spin Resonance Study of Free Radicals Produced from Ethanol and Acetaldehyde After Exposure to A Fenton System or to Brain and Liver Microsomes. *Alcohol*, 8, 369-375. (1991).
131. ZIMATKIN, S.M., DEITRICH, R.A.: Ethanol Metabolism in The Brain, *Addict. Biol.*, 2, 387-399. (1997)
132. LAMBOEUF, G., LATOE, C., ROUMEC, C., SAINT BLANQUAT, G.: Ethanol Tolerance in The Rat After Inhalation of Acetaldehyde for A Period of 21 Days, *Alcohol Alcohol.*, 1, 441-447. (1987)
133. BERGAMASCHI, S., YOYOVONI, S., RIUS, R.A., TRABUCCHI, M.: Acute Ethanol and Acetaldehyde Administration Produce Similar Effects on L-Type Calcium Channels in Rat Brain, *Alcohol*, 5, 337-340. (1988)
134. ARNOLD, G., HOLTZMAN, E. : Microperoxisomes in The Central Nervous System of The Postnatal Rat, *Brain Res*, 155, 1-17. (1978)
135. GUNNETT, A.C.: Studies on Lipid Peroxidation in Brain, Heart and Liver During Oxidative Stress, The Degree Doctor of Philosophy, The Graduated Faculty of The University of Georgia, Athens, Georgia, (1996)
136. SMITH, B.R., ARAGON, C.M.G., AMIT, Z.: Catalase and The Production of Brain Acetaldehyde: A Possible Mediator of The Psychopharmacological Effects of Ethanol, *Addict. Biol.*, 2, 277-289. (1997)
137. HUNT, W. A.: Role of Acetaldehyde in The Actions of Ethanol on The Brain, *Alcohol*, 13, 147-151. (1996)
138. ZIMATKIN, S. M., OSTROVSKY, Y.U, M.: Aldehyde Dehydrogenase Activity in Barrier Brain Structures, *Bullet. Eksp. Biol. Med.*, 9, 283-284. (1988)
139. TABAKOFF, B., ANDERSON, R.A., RITZMANN, R.F.: Alcohol Aldehyde Metabolizing Systems, 555-565, Academic Press, New York, (1977).
140. SIPPEL, H. W. The Acetaldehyde Content in Rat Brain During Ethanol Metabolism, *J. Neurochem.*, 23, 451-452. (1974)
141. BEISSWENDER, T.V., HOLMQUIST, B., VALLEE, B.L.: CADH is The Sole Alcohol Dehydrogenase Isozyme of Mammalian Brains: Implications and Inferences, *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA*, 82, 8369-8373. (1985)
142. VON WARTBURG, J. P., BERGER, D., RIS, M., TABAKOFF, B.: Enzymes of biogenic aldehyde metabolism, in: (GROSS, M. Ed.) *Alcohol Intoxication and Withdrawal*, 119-138, Plenum Press, New York, (1975)

143. RASKIN, N.H., SOKOLOFF, L.: Brain Alcohol Dehydrogenase, *Science*, 162, 131-132. (1968)
144. TABAKOFF, B., VON WARTBURG, J.P.: Separation of Aldehyde Reductases and Alcohol Dehydrogenase from Brain by Affinity Chromatography: Metabolism of Succinic Semialdehyde and Ethanol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 957-966. (1975)
145. CHERNIKEVICH, I.P., LOMEKO, I.E., VOSKOBOYEV, A.I., OSTROVSKY, Y.M.: Evidence on The Presence of Alcohol Dehydrogenase in Rat and Bovine Brain, *Neurokhim.*, 3, 130-138. (1984)
146. BUHLER, R., PESTALOZZI, D., HESS, M., VON WARTBURG, J.P.: Immunohistochemical Localization of Alcohol Dehydrogenase in Human Kidney, Endocrine Organs and Brain., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18, 55-59. (1983)
147. LANE, B.P., LIEBER, C.S.: Ultrastructural Alterations in Human Hepatocytes Following Ingestion of Ethanol with Adequate Diets, *Am. J. Pathol.*, 49, 593-603. (1966)
148. GUERRI, C., MONTOLIU, C., RENAULT-PIQUERAS, J.: Involvement of Free Radical Mechanisms in The Toxic Effects of Alcohol: Implications for Fetal Alcohol Syndrome in "Advances in Experimental Medicine and Biology", (Armstrong D., Ed.), 366, Plenum Press, New York, (1994)
149. SASAME, H.A., AMES, M.M., NELSON, S.D.: Cytochrome P450 and NADPH Cytochrome C Reductase in Rat Brain: Formation of Reactive Catechol Metabolites, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78, 919-926. (1977)
150. MORGAN, E.T., KOOP, D.R., COON, M.J.: Catalytic Activity of Cytochrome P450 Isozyme 3a Isolated from Liver Microsomes of Ethanol-Treated Rabbits, *J. Biol. Chem.*, 257, 13951-13957. (1982)
151. HANSSON, T., TINBERG, N., INGELMAN SUNBERG, M., KUHLER, C.: Regional Distribution of Ethanol-Inducible Cytochrome P450 IIE1 in The Rat Central Nervous System, *Neuroscience*, 34, 451-463. (1990)
152. UPADHYA, S.C., TIRUMALAI, P.S., BOYD, M.R., MORI, T., RAVINDRANATH, V.: Cytochrome P4502E (CYP2E1) in Brain: Constitutive Expression, Induction by Ethanol and Localization by Fluorescence In-Situ Hybridization, *Arch. Biochem. Biophys.*, 373, 23-34. (2000)
153. HOWARD, L.A., MIKSYS, S., TYNDALE, R.F.: Chronic Nicotine and Ethanol Induce CYP2E1 in Rat Brain and Liver in Vitro. in: 13th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. Stresa, Italy.
154. ANANDATHEERTHA VARADA, H.K., SHANKAR, S.K., BHARME, S., BOYD, M.R., SONG, B.J., RAVINDRANATH, V.: Induction of Brain Cytochrome P450 IIE1 by Chronic Ethanol Treatment, *Brain Res.*, 601, 279-285. (1993)

155. SOHDA, T., SHIMIZU, M., KAMIMURA, S., OKUMURA, M.: Immunohistochemical Demonstration of Ethanol-Inducible P4502E1 in Rat Brain, *Alcohol Alcohol.*, 28 (S1B), 69-75. (1993)
156. MONTOLIU, C., VALLES, S., RENAU-PIQUERAS, J., GUERRI, C.: Ethanol-Induced Oxygen Radical Formation and Lipid Peroxidation in Rat Brain: Effect of Chronic Alcohol Consumption, *J. Neurochem.*, 63, 1855-1862. (1994)
157. ARAGON, C. M. G., AMIT, Z.: The Effect of 3-Amino-1,2,4-Triazole on Voluntary Ethanol Consumption: Evidence for Brain Catalase Involvement in The Mechanism of Action, *Neuropharm.*, 31, 709-712. (1992)
158. ARAGON, C. M. G., SPIVAK, K., AMIT, Z.: Effect of 3-Amino-1,2,4-Triazole on Ethanol-Induced Narcosis, Lethality and Hypothermia in Rats, *Pharm. Biochem. Behav.*, 39, 55-59. (1991)
159. GILL, K., MENEZ, J.F., LUCAS, D., DEITRICH, R.A.: Enzymatic Production of Acetaldehyde from Ethanol in Rat Brain Tissue, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16, 910-915. (1992)
160. LAPOSATA, E.A., SCHERRER, D.E., MAZOW, C., LANGE, L.G.: Metabolism of Ethanol by Human Brain to Fatty Acid Ethyl Esters, *J. Biol. Chem.*, 262, 4653-4657. (1987)
161. BORA, P. S., LANGE, L.G.: Molecular Mechanism of Ethanol Metabolism by Human Brain to Fatty Acid Ethyl Esters, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 17, 28-30. (1993)
162. LANGE, L.G., SOBEL, B.E.: Mitochondrial Dysfunction Induced by Fatty Acid Ethyl Esters, Myocardial Metabolites of Ethanol, *J. Clin. Invest.*, 72, 724-731. (1983)
163. LANGE, L.G.: Mechanism of Fatty Acid Ethyl Ester Formation and Biological Significance, *Annal. N.Y. Acad. Sci.*, 625, 802-805. (1991)
164. WRIGHTON, S.A., PAI, J.K., MUELLER, G.C.: Demonstration of Two Unique Metabolites of Arachidonic Acid from Phorbol Ester-Stimulated Bovine Lymphocytes, *Carcinogenesis*, 4, 1247-1251. (1983)
165. ASAOKA, Y., KIKKAWA, U., SEKIGUCHI, K., SHEARMAN, M.S., KOSAKA, Y., NAKANO, Y., SATOH, T., NISHIZUKA, Y.: Activation of A Brain-Specific Protein Kinase C Subspecies in The Presence of Phosphatidylethanol, *FEBS Letters*, 231, 221-224. (1988)
166. LINDQVIST, C., ARADOTTIR, S., AILING, C., BOYANOADANEZ, M., DEL, C., GUSTAVSSON, L.: Phosphatidylethanol Formation and Degradation in Brains of Acutely and Repeatedly Ethanol Treated Rats, *Neurosci. Lett.*, 179, 127-131. (1994)
167. ISHII, H., KUROSE, I., KATO, S.: Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease with Particular Emphasis on Oxidative Stress, *J. Gastroenter. Hepatol.*, 12, 272-82. (1997)

168. EYSSERIC, H., GONTHIER, B., SOUBEYRAN, A., BESSARD, G., SAXOD, R., BARRET, L.: Characterization of The Production of Acetaldehyde by Astrocytes in Culture Following Ethanol Exposure, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 211, 1018– 1028. (1997)
169. ROUACH, H., PARK, M.K., ORFANELLI, M.T., JAVIER, B., NORDMANN, R.: Ethanol-Induced Oxidative Stress in Rat Cerebellum, *Alcohol Alcohol.*, S1, 202-211. (1987)
170. ALBANO, E., TOMASI, A., GORIA-GATTI L., DIANZANI, M.U.: Spin Trapping of Free Radical Species Produced During The Microsomal Metabolism of Ethanol, *Chem. Biol. Interact.*, 65, 223–234. (1988)
171. DI LUZIO, N.R.: Prevention of The Acute Ethanol-Induced Fatty Liver by Antioxidants. *Physiol.*, 6, 169. (1963)
172. LIEBER, C.S.: Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role, *Physiol. Rev.*, 77, 517-544. (1997)
173. FARIN, F.M., OMIECINSKI, C.J.: Regiospecific expression of cytochrome p-450s and Microsomal Epoxide Hydrolase in Human Brain Tissue, *J. Toxicol. Environ. Health.*, 40, 317-335. (1993)
174. WARNER, M., GUSTAFSSON, J.A.: Effect of Ethanol on Cytochrome P450 in The Rat Brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1019–1023. (1994)
175. SARAN, M., BORN, M.: Direct and Indirect Measurement of Oxygen Radicals, *Klin. Wochenschr.*, 69, 954-957. (1991)
176. KNECT, K.T., THURMAN, R.G., MASON, R.P.: Role of Superoxide and Trace to Transition Metals in Production of α -hydroxy-ethyl Radical from Ethanol by Deermice, *Arch. Biochem. Biophys.*, 303, 339-348. (1993)
177. SUN, A.Y., INGELMAN-SUNDERG, M., NEVE, E., MATSUMOTO, H., NISHITANI, Y., MINOWA, Y., FUKUI, Y., BAILEY, S.M., PATEL, V.B., CUNNINGHAM, C.C., ZIMA, T., FIALOVA, L., MIKULIKOVA, L., POPOV, P., MALBOHAN, I., JANEBOVA, M., NESPOR, K., SUN, G.Y.: Ethanol and Oxidative Stress. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 25(5), 237S-242S. (2001)
178. NAASILA, M., BEAUGE, D., DAOUST, M.: Regulation of Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase Activity by Chronic Alcoholization. *Alcohol Alcohol.*, 32, 13-17. (1997)
179. SINGER, D.S., PARENT, L.J., KOLBER, M.A.: Ethanol Enhancer of Transplantation Antigen Expression. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 13,480-484. (1989)
180. LANCASTER, F.E.: Ethanol And White Matter Damage in The Brain, in "Alcohol-Induced Brain Damage", (Hunt W.A., Nixon, S.J., Eds.), 387-399, US Government Printing Office, Rockville, (1999)

181. FRIDOVICH, I.: The Mechanism of The Enzymatic Oxidation of Acetaldehydes, *J. Biol. Chem.*, 241, 3126-3128. (1966)
182. BRIEN, J.F, LOOMIS C.W.: Pharmacology of Acetaldehyde, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 61(1), 1-22. (1983)
183. LINDROS, K.O.: Acetaldehyde: Its Metabolism and Role in The Actions of Alcohol, in "Research Advances in Alcohol and Drug Problems", (ISRAEL, Y., GLASER, F. B., KALANT, H., Eds), 111-176, Plenum Press, New York, (1978)
184. JENNET, R.B., TUMA, D.J., SORRELL, M.F.: Effect of Ethanol and its Metabolites on Tubule Formation, *Pharmacol.*, 21, 363-368. (1980)
185. SMITH, S.L., JENNET, R.B., SORREL, M.F., TUMA, D.J.: Acetaldehyde Substoichiometrically Inhibit Bovine Neurotubulin Polymerization, *J. Clin. Invest.*, 84, 337-341. (1989)
186. MCKINNON, G., DAVIDSON, M., DE JERSEY, J., SHANLEY, B., WARD L.: Effects of Acetaldehyde on Polymerization of Microtubule Proteins, *Brain Res.*, 416, 90-99. (1987)
187. GUERRI, C., GRISOLIA, S.: Changes in Glutathione in Acute and Chronic Alcohol Intoxication, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13, 53-61. (1980)
188. ETAL. L.M: Combined Effects of Ethanol and Manganese on Cultured Neurons and Glia, *Neurochem. Res.*, 16, 591-596. (1991)
189. NORDMAN, R.: Alcohol and antioxidant system, *Alcohol Alcohol.*, 29, 513-522. (1994)
190. MEYDANI, M., MACAULEY, J.B., BLUMBERG, J.B.: Influence on Dietary Vitamin E, Selenium and Age on Regional Distribution of α -Tocopherol in The Rat Brain, *Lipids*, 21, 786-791. (1986)
191. LEBEL, C.P., ODUNZE, I.N., ADAMS, J.D., BONDY, S.C.: Perturbations in Cerebral Oxygen Radical Formation and Membrane Order Following Vitamin E Deficiency, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163, 860-866. (1989)
192. ROUACH, H., RIBIÉRE, C., PARK, M.K., SAFFER, C., NORDMANN, R.: Lipid Peroxidation and Brain Mitochondrial Damage Induced by Ethanol, *Bioelectrochem. Bioenerge.*, 18, 211-217. (1987)
193. ROUACH, H., HOUZE, P., ORFANELLI, M.T., GENTIL, M., BOURDON, R., NORDMANN, R.: Effect of Acute Ethanol Administration on The Subcellular Distribution of Iron in Rat Liver and Cerebellum, *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1095-1100. (1990)
194. NORDMANN, R. RIBIÉRE, C., ROUACH, H., SINACEUR, J., SABOURAULT, D.: Alcool Et Radicaux Libres. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 169, 1201-1206. (1985)

195. LI, G.C.: Induction of Thermotolerance and Enhanced Heat Shock Protein Synthesis in Chinese Hamster Fibroblast by Sodium Arsenite and Ethanol, *J. Cell. Physiol.*, 116, 116-122. (1983)
196. WILLCOX, J.K., ASH, S.L., CATIGNANI, G.L.: Antioxidants and Prevention of Chronic Disease, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44, 275-295. (2004)
197. SINET, P.M., HEIKKILA, R.E., COHEN, G.: Hydrogen Peroxide Production in Rat Brain, In-Vivo, *J. Neurochem.*, 34:1421-1428. (1980)
198. GOTZ, M.E., KUNIG, G., RIEDERER, P., YODIUM, M.B.: Oxidative Stress: Free Radical Production in Neural Degeneration, *Pharmacol. Therapeut.*, 63 (1), 37-122. (1994)
199. MCKENNA, O., ARNOLD, G., HOLTZMAN, E.: Microperoxisome Distribution in The Central Nervous System of The Rat, *Brain Res.*, 117(2), 181-194. (1976)
200. BRANNAN, T.S., MAKER, H.S., WEISS, C., COHEN, G.: Regional Distribution of Glutathione Peroxidase in The Adult Rat Brain, *Brain Res.*, 200, 474-477. (1980)
201. FRIDOVICH, I. : Superoxide Dismutases. An Adaptation to a Paramagnetic Gas., *J. Biol. Chem.*, 263, 17025-17028 . (1998)
202. STEINMAN, H. M.: Superoxide Dismutase, 1, 12-68, CRC Press, Boca Raton, (1982)
203. FRIDOVICH, I.: Superoxide Radical and Superoxide Dismutase, *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97-112. (1995)
204. FRIDOVICH, I.: Biological Effects of the Superoxide Radical, *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 1-11. (1986)
205. TYLER, D.D.: Polarographic Assay and Intracellular Distribution of Superoxide Dismutase in Rat Liver, *Biochem. J.*, 147, 493-504. (1975)
206. OKADO-MATSUMOTO, A., FRIDOVICH, I.: Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver. *J. Biol. Chem.* 276, 38388-38393. (2001)
207. KEELE, B., MCCORD, J., FRIDOVICH, I.: Further Characterization of Bovine Superoxide Dismutase and The Isolation From Bovine Heart, *J. Biol. Chem.*, 246, 2875. (1971)
208. FORMAN, H., FRIDOVICH, I.: On The Stability of Bovine Superoxide Dismutase. The Effects of Metals, *J. Biol. Chem.*, 248, 2645, (1973)
209. WARNER, D.S., HUAXIN SHENG, H., HABERLE, L.B.: Oxidants, Antioxidants and The Ischemic Brain, *J. Exp. Biol.*, 207, 3221-3231. (2004)

210. TIBELL, L., HJALMARSSON, K., EDLUND, T., SKOGMAN, G., ENGSTOM, A., MARKLUND, S. L.: Expression of Human Extracellular Superoxide Dismutase in Chinese Hamster Ovary Cells and Characterization of The Product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6634-6638. (1987)
211. SANDSTROM, J., CARLSSON, L., MARKLUND, S.L., EDLUND, T.: The Heparin-Binding Domain of Extracellular Superoxide Dismutase C and Formation of Variants with Reduced Heparin Affinity, *J. Biol. Chem.*, 267, 18205-18209. (1992)
212. PINEDA, J.A., AONO, M., SHENG, H., LYNCH, J., WELLONS, J.C., LASKOWITZ, D.T., PEARLSTEIN, R.D., BOWLER, R., CRAPO, J., WARNER, D.S.: Extracellular Superoxide Dismutase Overexpression Improves Behavioral Outcome From Closed Head Injury in The Mouse, *J. Neurotrauma.*, 18, 625-634. (2001)
213. QURY, T.D., HO, Y.S., PIANTADOSI, C.A., CRAPO, J.D.: Extracellular Superoxide Dismutase, Nitric Oxide, and Central Nervous System O₂ Toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9715-9719. (1992)
214. MARKLUND, S. L.: Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissues and Human Cell Lines, *J. Clin. Invest.*, 74, 1398-1403. (1984)
215. TROY, C.M., SHELANSKI, M.L.: Down-Regulation of Copper/Zinc Superoxide Dismutase Causes Apoptotic Death in PC12 Neuronal Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 384-6387. (1994)
216. LUETJENS, C.M., BUI, N.T., SENGPIEL, B, MUNSTERMANN, G, POPPE, M, KROHN, A.J., BAUERBACH, E.: Delayed Mitochondrial Dysfunction in Excitotoxic Neuron Death: Cytochrome c Release and A Secondary Increase in Superoxide Production, *J. Neurosci.*, 20, 5715-5723. (2000)
217. MURAKAMI, K., KONDO, T., KAWASE, M., LI, Y., SATO, S., CHEN, S.F., CHAN, P.H.: Mitochondrial Susceptibility to Oxidative Stress Exacerbates Cerebral Infarction That Follows Permanent Focal Cerebral Ischemia in Mutant Mice with Manganese Superoxide Dismutase Deficiency, *J. Neurosci.*, 18, 205-213. (1998)
218. FUJIMURA, M., MORITA-FUJIMURA, Y., KAWASE, M., COPIN, J.C., CALAGUI, B., EPSTEIN, C.J., CHAN, P.H.: Manganese Superoxide Dismutase Mediates The Early Release of Mitochondrial Cytochrome c and Subsequent Dna Fragmentation After Permanent Focal Cerebral Ischemia in Mice, *J. Neurosci.*, 19, 3414-3422. (1999)
219. DENG, H.X., HENTATI, A., TAINER, J.A., IQBAL, Z., CAYABYAB, A., HUNG, W.Y., GETZOFF, E.D.: Amyotrophic Lateral Sclerosis and Structural Defects in Cu/Zn Superoxide Dismutase, *Science*, 261, 1047- 105. (1993)

220. ROSEN, D.R., SIDDIQUE, T., PATTERSON, D., FIGLEWICZ, D.A., SAPP, P., HENTATI, A., DONALDSON, D.: Mutations in Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Nature*, 362, 59–62. (1993)
221. NELSON, C.W., WEI, E.P., POVLISHOCK, J.T., KONTOS, H.A., MOSKOWITZ, M.A.: Oxygen Radicals in Cerebral Ischemia, *Am. J. Physiol.*, 263, H1356–1362. (1992)
222. KAWAMOTO, S., INOUE, M., TASHIRO, S., MORINO, Y., MIYAUCHI, Y.: Inhibition of Ischemia and Reflow-Induced Liver Injury by An SOD Derivative That Circulates Bound to Albumin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 277(1), 160-5. (1990)
223. MCCORD, J.M.: Free Radicals and Myocardial Ischemia: Overview and Outlook, *Free Radic. Biol. Med.*, 4(1), 9-14. (1988)
224. MORENO, S., NARDACCI, R., CERU, M.P.: Regional and Ultrastructural Immunolocalization of Copper-Zinc Superoxide Dismutase in Rat Central Nervous System, *J. Histochem. Cytochem.*, 45, 1611–1622. (1997)
225. POWERS, S.K., JI, L.L., LEEUWENBURGH, C.: Exercise Training-Induced Alterations in Skeletal Muscle Antioxidant Capacity: A Brief Review, *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 31(7), 987-97. (1999)
226. SANO, I.: Simple Peptides in Brain, in “International Reviews of Neurobiology”, (PFEIFFER, C.C., SMYTHIES, S.R., Eds.), 12, 235, 263, Academic Press, New York and London, (1970).
227. GULEWITSCH, W., AMIRADZIBI, S.: Ueber Das Carnosin, Eine Neue Organische Base Des Fleischextractes, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 33, 1902-1903. (1900)
228. BOLDYREV, A., SEVERIN, S.E.: The Histidine-Containing Dipeptides, Carnosine and Anserine: Distribution, Properties and Biological Significance, *Adv. Enzyme Regul.*, 30, 175–194. (1990)
229. DECKER, E.A., LIVISAY, S.A., ZHOU S.: A Re-Evaluation of The Antioxidant Activity of Purified Carnosine, *Biochemistry (Moscow)*, 65 (7), 766-770. (2000)
230. QUINN, P.J., BOLDYREV, A.A., FORMAZUYK, V.E.: Carnosine: Its Properties, Functions and Potential Therapeutic Applications, *Molec. Aspects Med.*, 13, 379-444. (1992)
231. BONFANTI, L., PERETTO, P., DE MARCHIS, S., FASOLO, A.: Carnosine-Related Dipeptides in The Mammalian Brain, *Prog. Neurobiol.*, 59, 333–353. (1999)
232. CHAN, W.K.M., DECKER, E.A., CHOW, C. K., BOISSONNEAULT, G.A.: Effect of Dietary Carnosine on Plasma and Tissue Antioxidant Concentrations and on Lipid Oxidation in Rat Skeletal Muscle, *Lipids*, 29, 461–466. (1994)

233. HIPKISS, A.R.: Carnosine, Protective, Anti-Ageing Peptide?, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30 (8), 863-868. (1998)
234. NEIDLE, A., KANDERA, J.: Carnosine An Olfactory Bulb Peptide. *Brain Res.* 80, 359-364. (1974)
235. MARGOLIS, F.L.: Carnosine in The Primary Olfactory Pathway, *Science*, 184, 909-911. (1974)
236. WIDEMAN, J., BRINK, L., STEIN, S.: New Automated Fluorometric Peptide Microassay for Carnosine in Mouse Olfactory Bulb, *Analyt. Biochem.*, 86, 670-678. (1978)
237. QUINN, M.R., FISHER, H.: Effect of Dietary Histidine Deprivation in Two Rat Strains on Hemoglobin and Tissue Concentrations of Histidine-Containing Dipeptides, *J. Nutrition.*, 107, 2044-2054. (1977)
238. NG, R.H., MARSHALL, F.O.: Regional and Subcellular Distribution of Homocarnosine-Carnosine Synthetase in The Central Nervous System of Rats, *J. Neurochem.*, 30, 187-190. (1978)
239. CAIRNS, M.T., MILLER, D.J., O'DOWD, J.J.: Detection and Estimation of Carnosine, Homocarnosine, N-Acetyl Histidine and its 1-Methyl Derivative in Rat Brain by Analytical HPLC, *J. Physiol.*, 407, 51. (1988)
240. O'DOWD, J.J., CAIRNS, M.T., ROBINS, D.J., MILLER, D.J.: Analysis of Carnosine, Homocarnosine, and Other Histidyl Derivatives in Rat Brain, *J. Neurochem.*, 55, 446-452. (1990)
241. MARGOLIS, F.L.: Carnosine: An Olfactory Neuropeptide, in *The Role of Peptides, in "Neuronal Function"*, (Baker, J.L., Smith, T. Eds.), 545-572, Dekker Press, New York, (1980)
242. BURD, G.D., DAVIS, B.J., MACRIDES, F., GRILLO, M., MARGOLIS, F.L.: Carnosine in Primary Olfactory System: An Autoradiographic and Biochemical Study, *J. Neurosci.*, 2, 244-255. (1982)
243. NADI, N.S., HIRSCH, J.D., MARGOLIS, F.L.: Laminar Distribution of Putative Neurotransmitter Amino acids and Ligand Binding Sites in The Dog Olfactory Bulb, *J. Neurochem.*, 34, 138-146. (1980)
244. KISH, S.J., PERRY, T.L., HANSEN, S.: Regional Distribution of Homocarnosine, Homocarnosine-Carnosine Synthetase and Homocarnosinase in The Human Brain, *J. Neurochem.*, 32, 1629-1636. (1979)
245. HOBART, L.J., SEIBEL, I., YEARGANS, G.S., SEIDLER N.W.: Anti-Crosslinking Properties of Carnosine: Significance of Histidine, *Life Sci.*, 75, 1379-1389. (2004)
246. WINNICK, R.E., WINNICK, T.: Carnosine-Anserine Synthetase of Muscle, *Biochim. Biophys. Acta.*, 31, 47-55. (1959)
247. KALYANKAR, G., MEISTER, A.: Enzymatic Synthesis of Carnosine and Related β -Alanyl and γ -Aminobutyryl Peptides, *J. Biol.Chem.*, 234, 3210-3218. (1959)

248. HORINISHI, H., GRILLO, M., MARGOLIS, F.L.: Purification and Characterization of Carnosine Synthetase from Mouse Olfactory Bulbs, *J. Neurochem.*, 31, 909-919. (1978)
249. HARDING, J.W., MARGOLIS, F.L.: Denervation in The Primary Olfactory Pathway of Mice. III. Effect of Enzymes of Carnosine Metabolism, *Brain Res.*, 110, 351-360. (1976)
250. MURPHEY, W.H., PATCHEN, L., LINDMARK, D.G.: Carnosinase: A Fluorometric Assay and Demonstration of Two Electroporetic Forms in Human Tissue Extracts, *Clin. Chim. Acta*, 42, 309-314. (1972)
251. MURPHEY, W.H., LINDMARK, D.G., PATCHEN, L.I., HOUSLER, M.E., HARROD, E.K., MOSOVICH, L.: Serum Carnosinase Deficiency Concomitant with Mental Retardation, *Pediatr. Res.*, 7, 601-606. (1973)
252. WOLOS, A., PIEKARSKA, K., GLOGOWSKI, J., KONIECKZA, I.: Two Molecular Forms of Swine Kidney Carnosinase, *Int. J. Biochem.* 9, 57-62. (1978)
253. LENNEY, J.F., KAN, SC., SIU, K., SUGIYAMA, G.H.: Homocarnosine A Hog Kidney Dipeptidase with A Broader Specificity than Carnosinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 184, 257-266. (1977)
254. JACKSON, M.C., KUCERA, C.M., LENNY, J.F.: Purification and Properties of Human Serum Carnosinase, *Clin. Chim. Acta.*, 196, 193-206. (1991)
255. HANSON, H.T. AND SMITH, E.L.: Carnosinase: An Enzyme of Swine Kidney, *J. Biol. Chem.*, 179, 789-801. (1949)
256. WOOD, T. : Carnosine and Carnosinase in Rat Tissue. *Nature*, 180 (4575), 39-40. (1957)
257. ROSEMBERG, A.: The Activation of Carnosinase by Divalent Ions, *Biochem. Biophys. Acta.*, 45, 297-316. (1960)
258. LENNEY, J.F., PEPPERS, S.C., KUCERA, C.M., SJAASTAD, O.: Homocarnosinosis: Lack of Serum Carnosinase is The Defect Probably Responsible for Elevated Brain and CFS Homocarnosine, *Clin. Chim. Acta.*, 132, 157-165. (1982)
259. WILLI, S.M., ZHANG, Y., HILL, J.B., PHELAN, M.C., MICHEALIS, R.C., HOLDEN, K.R.: Adeletion in The Long Arm of Chromosome 18 in A Child with Serum Carnosinase Deficiency, *Pediatr. Res.*, 47, 210-213. (1997)
260. LENNY, J.F., GEORGE, R.P., WEISS, A.M., KUCERA, C.M., CHAN, P.W.H., RINZLER, G.S.: Human Serum Carnosinase: Characterization, Distinction From Cellular Carnosinase, and Activation by Cadmium, *Clin. Chim. Acta*, 123, 221-231. (1982)

261. BAUER, K., SCHULTZ, M.: Biosynthesis of Carnosine and Related Peptides by Skeletal Muscle Cells in Primary Culture, *Eur. J. Biochem.*, 219, 43-47. (1994)
262. WASSIF, W.S., SHERWOOD, R.A., AMIR, A., IDOWU, B., SUMMERS, B., LEIGH, N.: Serum Carnosinase Activities in Central Nervous System Disorders, *Clin. Chim. Acta.*, 225, 57-64. (1994)
263. NAGAI, K., SUDA, T.: Relization of Spontaneous Healing Function by Carnosine, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 10, 497-507. (1988)
264. DUNNETT, M., HARRIS, R.C.: High-Performance Liquid Chromatography Determination of Imidazole Dipeptides, Histidines, 1-Methylhistidine and 3-Methylhistidine in Equine and Camel Muscle and Individul Muscle Fibre, *J. Chromatog. B. Biochem. Appl.*, 688, 47-55. (1977)
265. HIPKISS A.R.: Carnosine, A Protective, Anti-Ageing Peptide?, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 30, 863-868. (1998)
266. MAICHUK, I.F., FORMAZIUK, V.E., SERGIENKO, V.I.: Development of Carnosine Eye Drops and Assessing Their Efficacy in Corneal Diseases, *Vestn. Oftalmol.*, 113, 27-31. (1977)
267. MICHAELIS, J., HIPKISS, A.R., Panagiotopoulos, S.: Method for The Treatment of The Complications and Pathology of Diabetes, Approved United States Patent (5,561,110). (1996)
268. MCFARLAND, G.A., HOLLIDAY, R.: Retardation of Senescence of Cultured Human Diploid Fibroblasts by Carnosine, *Exp. Cell Res.*, 212, 167-175. (1994)
269. HIPKISS, A.R., PRESTON, J.E., HIMSWOTH, D.T., WORTHINGTON, V.C., Keown, M., Michaelis, J., Lawrence, J.C., Mateen, A., Allende, L., Eagles, P.A.M., Abbott, J.: Pluripotent Protective Effects of Carnosine, A Naturallyoccurring Dipeptide, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85 (4), 37-53. (1998)
270. HIPKISS, A.R., WORTHINGTON, V.C., HIMSWORTH, D.T., HERWIG, W.: Protective Effects of Carnosine Against Protein Modification Mediated by Malondialdehyde and Hypochlorite, *Biochim. Biophys. Acta*, 1380, 46-54. (1998)
271. BATE-SMITH, E.C.: The Buffering of Muscle in Rigor; Protein, Phosphate and Carnosine, *J. Physiol.*, 92, 336-343. (1938)
272. DAHL, T.A., MIDDEN, W.R., HARTMANN, P.E.: Some Prevalent Biomolecules as Defenses Against Singlet Oxygen Damage, *Photochem. Photobiol.*, 47, 357-362. (1988).
273. LIBONDI, T., RAGONE, R., VINCENLI, D., STIUSO, P., AURICCHIO, G., COLLONA, G.: In Vitro Cross-Linking of Calf Lens α -Crystallin by Malondialdehyde, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 44, 342-347. (1994)
274. STADTMAN, E.R.: Protein oxidation and aging, *Science*, 257, 1220-1224. (1992)

275. ALLEN, R.G.: Role of Free Radicals in Senescence, *Annu. Rev. Gerontol. Geriatr.*, 10, 198–213. (1990)
276. HIPKISS, A.R., CHANA, H.: Carnosine Protects Proteins Against Methylglyoxal-Mediated Modifications, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248, 28-32. (1998)
277. BOLDYREV, A.A., FORMAZYULS, V.E., SERGIENKO, V.I.: Biological Significance of Histidine-Containing Dipeptides with Special Reference to Carnosine: Chemistry, Distribution, Metabolism and Medical Application, *Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol.*, 13, 1–60. (1994)
278. KANTHA, S.S., WADA, S., TANAKA, H., TAKEUCHI, M., OCHI, S., OCHI, H.: Carnosine Sustains The Retention of Cell Morphology in Continuous Fibroblast Culture Subjected to Nutritional Insult, *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 223, 278-282. (1996)
279. LINDHOLM, S., PLOJ, K, FRANK, J., NYLANDER, I.: Repeated Ethanol Administration Induces Short and Long-Term Changes in Enkephalin and Dynorphin Tissue Concentrations in Rat Brain. *Alcohol*, 22, 165-171. (2000)
280. SOLIMAN, KM., EL-ANSARY A.K., MOHAMED, A.M.: Effect of Carnosine Administration on Certain Metabolic Parameters in Bilharzial Infected Hamsters, *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 30(2), 455-68. (2000)
281. YI-SUN, S., OBERLEY, L.W. AND LI , Y.: A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase, *Clin. Chem.*, 34 (13) , 497-500 . (1988)
282. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Biochem.*, 193, 145-157. (1951)
283. KASIBA, E., FLANCAUM, L., FITZPATRICK, J.C., SCHNEIDRMAN, J., FISHER, H.: Simultaneous Determination of Histidine-Containing Dipeptides, Histamine, Methylhistamine and Histidine by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatog.*, 432, 315-320. (1988)
284. COYLE, J.T., PUTTFARCKEN, P.: Oxidative Stress, Glutamate, and Neurodegenerative Disorders, *Science*, 262, 689–695. (1993)
285. LOCKHART, B., JONES, C., CUISINIER, C., VILLAIN, N., PEYROULAN, D., LESTAGE, P.: Inhibition of L-Homocysteic Acid and Buthionine Sulphoximine-Mediated Neurotoxicity in Rat Embryonic Neuronal Cultures with α -Lipoic Acid Enantiomers, *Brain Res.*, 855, 292–297. (2000)
286. UYSAL M, KUTALP G, ÖZDEMIRLER G AND AYKAÇ G.: Ethanol-induced changes in lipid peroxidation and glutathione content in rat brain, *Drug Alcohol Depend.* 23, 227-230 (1989).

287. REYES, E., OTT, S., ROBINSON, B.: Effects of in utero administration of alcohol on glutathione levels in brain and liver, *Alcohol Clin Exp Res* 17, 877-881 (1993).
288. HARMAN, D.: Role of Antioxidant Nutrients in Aging: Overview, *Age*, 18:51-62. (1995)
289. GOTZ, M.E., JANETZKY, B., POHLI, S., GITTSCHALK, A., GSELL, W., TATSCHNER, T., RANSMAYR, G., LEBLHUBER, F., GERLACH, M.: Chronic Alcohol Consumption and Cerebral Indices of Oxidative Stress: Is There A Link?, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 25, 717-725. (2001)
290. ROMERO, F.J.: Antioxidants in Peripheral Nerve. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 992-932. (1996)
291. NADIGER, H.A., MARCUS, S.R., CHANDRAKALA, M.V.: Lipid Peroxidation and Ethanol Toxicity in Rat Brain: Effect of Vitamin E Deficiency and Supplementation, *Med. Sci. Res.*, 16, 1273-1274. (1988)
292. CUTLAR, R.G.: Genetic Stability and Oxidative Stress: Common Mechanisms in Aging and Cancer. in "Free Radicals and Aging", (Emerit, I. and Chance, B. Eds.), 31-46, Basel, Switzerland, (1992)
293. BOLDYREV, A.A., SONG, R., DYATLOV, V., LAWRENCE, D., CARPENTER, D.: Neuronal Cell Death and Reactive Oxygen Species, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 20, 433-450. (2000)
294. KANG, K.S., YUN, J.W., LEE, Y.S.: Protective Effect of L-Carnosine Against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-Acetate or Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis on v-myc Transformed Rat Liver Epithelial Cells, *Cancer Res.*, 178, 53-62. (2002)
295. TABAKMAN, R., LAZAROVICI, PH., KOHEN, R.: Neuroprotective Effects of Carnosine and Homocarnosine on Pheochromocytoma PC12 Cells Exposed to Ischemia, *J. Neurosci. Res.*, 68, 463-469. (2002)
296. CHAN, K.M., DECKER, E.A.: Endogenous Skeletal Muscle Antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34, 403-426. (1994)
297. BABIZHAYEV, M.A., SEGUIN, M.C., GUEYNE, J., EVSTIGNEEVA, R.P., AGEYEV, E.A., ZHELTUKHINA, G.A.: L-Carnosine (B-Alanyl-L-Histidine) and Carcinine (B-Alanylhistamine) Act as Natural Antioxidants with Hydroxyl Radical-Scavenging and Lipid-Peroxidase Activities, *Biochem. J.*, 304, 509-516. (1994)
298. CHAN, W.K.M., DECKER, E.A., LEE, J.B., BUTTERFIELD, D.: EPR Spin-Trapping Studies of The Hydroxy Radical Scavenging Activity of Carnosine and Related Dipeptides, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1407-1410. (1994)

299. BOLDYREV, A.A., STVOLINSKY, S.L., TYULINA, O.V.: Biochemical and Physiological Evidence that Carnosine is an Endogenous Neuroprotector Against Free Radicals, *Cell Mol. Neurobiol.*, 17, 259-271. (1997)
300. WADA, A.M., TUCKER, H.N.: Antioxidant Characteristics of L-Histidine, *J. Nutr. Biochem.*, 9, 308-315. (1998)
301. SHAW, S., JAYATILLEKE, E.: The Role of Aldehyde Oxidase in Ethanol-Induced Hepatic Lipid Peroxidation in The Rat, *Biochem. J.*, 268, 579-583. (1990)
302. SCHISLER, N. J., SINGH, S.M.: Effect of Ethanol In-Vivo on Enzymes which Detoxify Oxygen Free Radicals, *Free Radic. Biol. Med.*, 7, 117-123. (1989)
303. DOUBLE, K. L., MAYWALD, M., SCHMITTEL, M., RIEDERER, P., GERLACH, M.: In-Vitro Studies of Ferritin Iron Release and Neurotoxicity, *J. Neurochem.*, 70, 2492-249. (1998).
304. SHEU, J., KU, H., TSENG, W., CHEN, M., TSAL, L., HUANG, Y.: Determination of Thiobarbitric Acid Adduct of Malondialdehyde Using On-line Microdialysis Coupled with Hig-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Sci.*, 19, 621-624. (2003)
305. MOSLEN, M.T.: Reactive Oxygen Species in Normal Physiology, Cell Injury and Phagocytosis, Free Radicals, in "Dianostic Medicine" (ARMSTRONG, D. Ed), 1-15, Plenum Press, New York, (1994)
306. BERLETT, B.S., STADTMAN, E.R.: Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress, *J. Biol. Chem.*, 272, 20313-20316. (1997)
307. STADTMAN, E.R., BERLETT, B.S.: Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease, *Drug Metab. Rev.*, 30, 225-243. (1998)
308. FATACCIOLI, V., ANDRAUD, E., GENTIL, M., FRENCH, S.W., ROUACH, H., Effects of Chronic Ethanol Administration on Rat Liver Proteasome Activities: Relationship with Oxidative Stress, *Hepatology*, 29, 14-20. (1999)
309. AYDIN, S., OZARAS, R., HAFIZE, U., BELCE, A., USLU, E., TARAN, V., TUNCAY, A., DUMEN, E., SENTURK, H.: N-acetylcystein Reduced The Effect of Ethanol on Antioxidant System in Rat Plasm and Brain Tissue, *Tohoku. J. Exp. Med.*, 198, 71-77. (2002)
310. OSTROWSKA, J., LUCZAJ, W., IRENA KASACKA, I., ROZANSKI, A., SKRZYDLEWSKA, E.: Green Tea Protects Against Ethanol-Induced Lipid Peroxidation in Rat Organs, *Alcohol*, 32, 25-32. (2004)
311. PIRLICH, M., KIOK, K., SANDIG, G., LOCHS, H., GRUNE, T.: α -Lipoic Acid Prevents Ethanol-Induced Protein Oxidation in Mouse Hippocampal HT22 Cells, *Neurosci. Lett.*, 328, 93-96. (2002)

312. SOROKINA, E.V., BASTRIKOVA, N.A., STVOLINSKY, S.L., FEDOROVA, T.N.: Effects of Carnosine and Selegiline under MPTP Induced Parkinsonism in Senescence Accelerated Mice, *Neurochem. (Moscow)*, 20, 133–138. (2003)
313. NAGASAWA, T., YONEKURA, T., NISHIZAWA, N., KITTS, D.D.: In-Vitro and In-Vivo Inhibition of Muscle Lipid and Protein Oxidation by Carnosine, *Mol. Cell. Biochem.*, 225, 29–34. (2001)
314. DUPIN, A.M., BOLDYREV, A.A., ARKHIPENKO, Y.V., KAGAN, V.E.: Protection by Carnosine of Ca²⁺ Transport from Lipid Peroxidation, *Byul. Exp. Biol. Med. (Moscow)*, 98(8), 186–188. (1984)
315. BOLDYREV, A. A., ABE, H.: Metabolic Transformation of Neuropeptide Carnosine Modifies its Biological Activity, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 19, 163-175. (1999)
316. CHOI, S.Y., KWON, H.Y., KWON, O.B., KANG, J.H.: Hydrogen Peroxide-Mediated Cu,Zn-Superoxide Dismutase Fragmentation, *Biochim. Biophys. Acta*, 1472, 651-657. (1999)
317. ABDEL-NABI, R., MLAKOFSKY, L., HOHHORD, J.M., HARE, T.A., VOGEL, W.H.: Effect of Ethanol on Amino Acids and Related Compounds in Rat Plasma, Heart, Aorta, Bronchus, and Pancreas, *Alcohol*, 13 (2), 171-174. (1996)