

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

**RATLARDA BEYİN L-ARGINİN METABOLİZMASI
ÜZERİNE KAFEİNİN ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN:
Fatma Ebru OFLUOĞLU

TEZ YÖNETİCİSİ:
Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU

ANKARA-2007

TEŞEKKÜR

Uzun ve değerli doktora eğitimim süresince, bilgi ve deneyimleriyle desteğini her zaman yanımda hissettiğim, tez çalışmalarım boyunca tecrübesi, titizliği ve otoritesiyle daima örnek aldığım, eğitimim boyunca yetişmem için itina ile üstüme titreyen, sayesinde birçok çalışmalara katıldığım çok değerli hocam, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu’na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca görev yaptığım Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nın değerli öğretim üyelerine ve asistan arkadaşlarıma, tez çalışmalarımın deney aşamasında çok değerli katkı ve emeklerinden dolayı Beyin ve Sinir Cerrahisi A.D öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Aydın Paşaoğlu’na ve asistanlarına, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Ünitesi çalışanlarına ve Dr. Canan Demirtaş’a, çalışmamın istatistiksel analizlerinde emeği geçen uzman Biolog Adem Ünal’a, Dr. Hüsamettin Erdamar’a ve Yrd. Doç. Dr.Ümmühani Özel Türkçü’ye, lisans ve lisans üstü eğitimimi birlikte geçirdiğim canım arkadaşım uzman Biolog Melike Erol Demirbilek’e her zaman yanımda olduğu için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca beni bu yaşa getiren ve parçaları olmaktan gurur duyduğum canım ailem’e de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Şekil, Tablo ve Grafik Listeleri	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KAFEİN	2
2.1.1. Kafein Metabolizması	3
2.1.2. Kafeinin Organizmaya Etkileri	6
2.1.3. Kafeinin Santral Sinir Sistemine Etkileri	11
2.2. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER	14
2.2.1. Serbest Radikal Kaynakları	15
2.2.2. Serbest Radikal Türevleri	16
2.2.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu	21
2.2.4. Antioksidan Sistem	22
2.3. L-ARGİNİN METABOLİZMASI	24
2.3.1. ARGİNAZ	26
2.3.1.1. Arginazın Yapısal Özellikleri	27
2.3.1.2. Metal Aktivasyonu ve Kinetik Özellikleri	28
2.3.1.3. Arginazın Biyokimyasal ve Patolojik Önemi	30
2.3.1.4. Arginaz Enzimi Eksikliği	32
2.3.2. Nitrik Oksit (NO) ve Etkileri	33
2.3.2.1. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enziminin Özellikleri	34
2.3.2.2. NO Üretimi ve Arginazın Karşılıklı Regülasyonu	36
3. MATERYAL-YÖNTEM	37
3.1. Deney Grupları	37
3.2. Kullanılan Aletler	38
3.3. Yöntemlerin Uygulanması	38
3.3.1. Beyin Dokusu Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi	39
3.3.2. Lowry Protein Tayini (Doku protein tayini)	44
3.3.3. Beyin Dokusu Malondialdehit (MDA) Analizi	45
3.3.4. Serum (Malondialdehit) MDA Analizi	46
3.3.5. Serumda Nitrit + Nitrat Analizi (NO _x)	47
3.3.6. Beyin Dokusunda Nitrit + Nitrat Analizi (NO _x)	49
3.3.7. Serumda TNF- α Tayini	49
4. BULGULAR	50
4.1. Beyin Dokusu Arginaz Aktiviteleri	51
4.2. Beyin Dokusu MDA Düzeyleri	52

4.3. Beyin Dokusu NO Düzeyleri 53

4.4. Serum MDA Düzeyleri 54

4.5. Serum NO Düzeyleri 55

4.6. Serum TNF- α Düzeyleri 56

4.7. Spearman Korelasyon Analizi 56

5. TARTIŞMA 63

6. SONUÇ 71

7. ÖZET 72

8. SUMMARY 74

9. KAYNAKLAR..... 76

10. ÖZGEÇMİŞ..... 92

Şekil Listesi

Şekil 1. Kafeinin kimyasal yapısı	2
Şekil 2. İnsanlarda kafein metabolizması	5
Şekil 3. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi.....	16
Şekil 4.Reaktif oksijen türlerinin ve reaktif nitrojen türlerinin birbirleriyle etkileşimi	21
Şekil 5. Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehitler	21
Şekil 6. Memeli hücrelerinde antioksidan sistem	23
Şekil 7. Memeli hücrelerinde arginin metabolizması	24
Şekil 8. Üre Döngüsü ve GABA oluşumu.....	27
Şekil 9. Rat karaciğer arginazı aktif merkezinin yapısı	28
Şekil 10. Nitrik Oksit Sentaz isoformları ve etkileri.....	35

Tablo Listesi

Tablo 1. Kafein ve Adenozin etkilerinin karşılaştırılması	12
Tablo 2. Arginaz I ve Arginaz II İsoformlarının Karşılaştırılması	29
Tablo 3. Tüm gruplara ait istatistiksel sonuçlar.....	50
Tablo 4. Gruplar arası doku arginaz aktivitesine ait istatistiksel sonuçlar.....	51
Tablo 5. Gruplar arası doku MDA düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar	52
Tablo 6. Gruplar arası doku NO düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar.....	53
Tablo 7. Gruplar arası Serum MDA düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar.....	54
Tablo 8. Gruplar arası Serum NO düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar	55
Tablo 9. Tüm gruplara ait serum TNF- α düzeyleri.....	56
Tablo 10. Spearman korelasyon analizi sonuçları	56

Grafik Listesi

Grafik 1. Tüm gruplara ait doku arginaz aktivite (U/mg protein/saat) düzeyleri	51
Grafik 2. Tüm gruplara ait doku MDA (nmol/g doku) düzeyleri	52
Grafik 3. Tüm gruplara ait doku NO (μ mol /g doku) düzeyleri	53
Grafik 4. Tüm gruplara ait serum MDA (nmol / ml) düzeyleri	54
Grafik 5. Tüm gruplara ait serum NO (μ mol / L) düzeyleri	55
Grafik 6. Arginaz aktivitesi ile Doku MDA düzeyleri arasındaki korelasyon.....	57
Grafik 7. Arginaz aktivitesi ile Doku NO düzeyleri arasındaki korelasyon	58
Grafik 8. Doku MDA düzeyleri ile Doku NO düzeyleri arasındaki korelasyon.....	59
Grafik 9. Serum MDA düzeyleri ile serum NO düzeyleri arasındaki korelasyon	60
Grafik 10. Doku MDA düzeyleri ile serum NO düzeyleri arasındaki korelasyon	61
Grafik 11. Doku MDA düzeyleri ile serum MDA düzeyleri arasındaki korelasyon	62

1. GİRİŞ

Kafein, hemen hepimizin her gün düzenli olarak tükettiği, merkezi sinir sistemini uyaran, uyanıklık hali, enerji ve konsantre olma yeteneği kazandıran, aşırı tüketimi halinde ise kişide uyku bozukluğu ve uykusuzluk hali, sinirlilik, endişe ve kaygı hallerine sebep olabilen bir pürin alkoloiddir ¹⁻⁸. Kafeinin; bronşial düz kasların gevşemesine olan etkisi ⁹⁻¹², bazı ağrı kesicilerin içeriğinde bulunuşu ^{3,13} ve yeni doğanlarda apne tedavisine olan etkisi ⁴ gibi sebeplerle, günümüzde birçok amaç için kullanılmaktadır.

İnsan metabolizmasında kafeinin belli başlı etkileri: lokomotor aktiviteyi arttırması, psikouyarıcı özellik göstererek dopaminerjik sistemi aktive etmesi, kardiyak kası uyarması ve diüretik etki göstermesidir ^{7,8,14}.

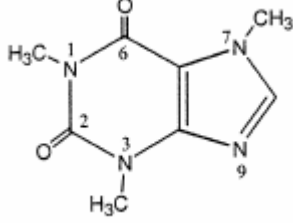
Bizim çalışma konumuzun esasını oluşturan kafein, gerek beyin metabolizması üzerine olan etkileri ve gerekse antioksidan özellik göstermesi nedeniyle bugün birçok çalışmada yerini almıştır. Biz çalışmamızın temel hedefi olarak kafeinin, beyinde L-Arginin metabolizması üzerine olan etkilerini araştırmaya çalıştık.

Çalışmamızda, esas olarak kafein verilen ratların beyin dokularında L-Arginin metabolizmasında önemli rolü olan arginaz enzim aktivitesini, nitrik oksit (NO) seviyelerini ve aralarındaki ilişkiyi ayrıca, ratların serumlarında NO ve TNF- α düzeylerini göstermeyi amaçladık ve bunların yanında kafeinin olası antioksidan özelliğini incelemek için serum ve beyin dokusunda lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) düzeylerini ölçtük.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KAFEİN

Kafein (1,3,7 trimetilksantin) bir pürin alkaloid olarak birçok yiyecek ve içeceklerin içeriğinde bulunur ¹. Kafein, hemen hepimizin her gün düzenli olarak tükettiği bir maddedir, merkezi sinir sistemini uyarır ve kahve, çay, çikolata, kola ve bazı gazlı içecekler kafein ihtiva eder ²⁻⁴.



Şekil 1. Kafeinin Kimyasal Yapısı ¹.

Yapılan araştırmalarda günümüzde insanların günde ortalama 300 mg dan daha fazla kafein tükettiği belirtilmiştir ⁵. Bir kupa kahvede yaklaşık olarak 30-175 mg kafein bulunur ¹. Eğer gün içerisinde, kişiden kişiye değişmekle birlikte alınan kafein miktarı hesaplanırsa hiç farkında olmadan günde 1 gramdan fazla kafein tüketildiği görülecektir.

Bazı yiyecek ve içeceklerde ne kadar kafein var?⁶⁻⁸

Filtre kahve	150 ml	60-180 mg kafein
Hazır kahve	150 ml	40-180 mg kafein
Kafeinsiz kahve	150 ml	2-8 mg kafein
Poşet çay	150 ml	24-50 mg kafein
Yeşil çay	150 ml	30-48 mg kafein
Kakao	150 ml	2-7 mg kafein
Sütlü çikolata	28 g	1-15 mg kafein
Bitter çikolata	28 g	5-35 mg kafein
Kola	180 ml	15-24 mg kafein
Diet kola	180 ml	13-29 mg kafein

Kafeinin günlük normal doz aralığında (yaklaşık 50-300 mg) tüketimi kişiye uyanıklık hali, enerji ve konsantre olma yeteneği kazandırmakla birlikte aşırı tüketimi halinde (300-800 ve üstü) kişide uyku bozukluğu ve uykusuzluk hali, sinirlilik, endişe, panik atak ve kaygı hallerine sebep olduğu belirtilmektedir. Aşırı dozlarda istemsiz kasılmalar da görülebilir^{4,7}.

Kafein, astım hastalarında bronşial düz kasların gevşemesine etki gösterir⁹⁻¹² ve bazı ağrı kesicilerin (aspirin,asetaminopen gibi) içeriğinde bulunur^{3,13}. Yeni doğanlarda apnea tedavisinde de vücuda ilaç formatında girer⁴.

Kahve yüksek miktarlarda tanen de (çay kateşin analogu) içerir. Tanenin antioksidan, anti-mutasyon, anjiogenez, antibiyotik etki, anti-hiperkolesterolemi, antihipertansiyon ve anti-inflamatuvar etkisi olduğu bildirilmiştir¹⁴.

Araştırmacılara göre kafein, psikouyarıcıdır ve amfetamin ve kokain gibi bağımlılık yaparak dopaminerjik sistemi aktive eder⁷.

Teobromin (3,7 dimetilksantin) ve ksantin, kafeinin katabolik ürünleridir ve hem antioksidan hem de prooksidan özelliğe sahiptirler. Bu ürünler, antioksidan olan ürik asit ile yapısal benzerlik gösterirler¹⁵.

2.1.1. Kafein Metabolizması

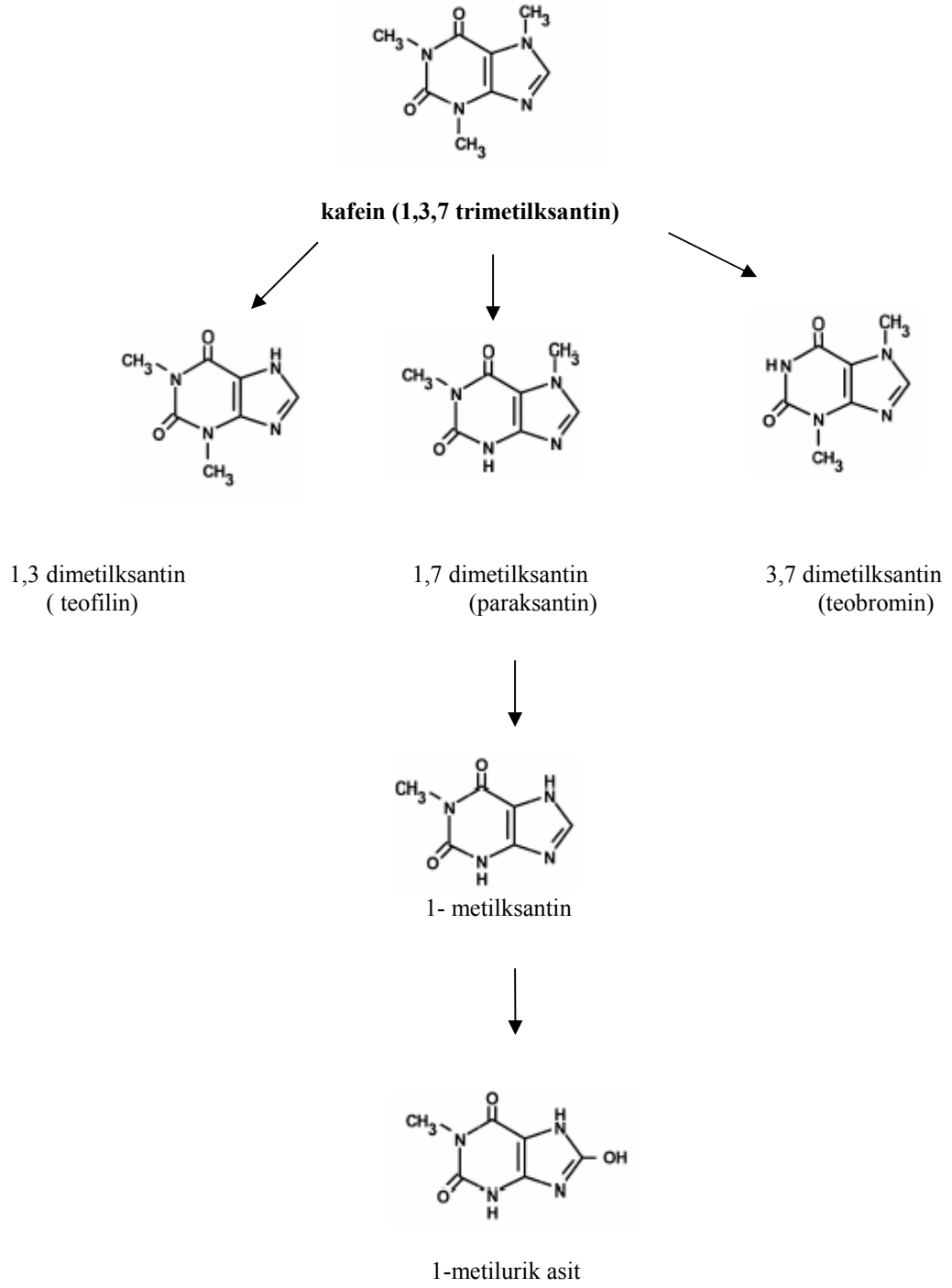
Oral yolla kafein alınımından sonra kafein, hızla ve hemen hemen tamamen (%99) gastrointestinal sistemden emilerek 30-120 dakika sonrasında, doza bağımlı olarak plazmada en yüksek düzeyine ulaşır. Hidrofobik özelliğinden dolayı bütün biyolojik zarlardan geçerek hücrelere ulaşır. Kafeinin % 5 den daha azı ürine çevrilmeden kalır. İnsanda normal plazma seviyesi kafein için 5-20 µM olarak belirtilmiştir^{6,8,16}. Kafein plazmada en yüksek konsantrasyona ulaştıktan sonra, beyinde en az bir saat kafein konsantrasyonu değişmeden kalır¹⁷.

İnsanda 300 mg (yaklaşık 4 kupa kahve; 5mg/kg) kafein alınımından 1-2 saat sonrası plazma kafein pik seviyesi yaklaşık 7,5-9,0 µg/ml (39-46 µmol/L) dir. 5,30 mg/kg (ağır içici) kafein alınımı sonrasında plazma seviyesi yaklaşık olarak 50 µmol/L olacaktır. Normal içim 2,40 mg/kg olarak kabul edilir ¹⁸.

Yetişkinlerde kafein için kan-beyin bariyeri ve plasental bariyer bulunmamaktadır. Bu nedenle ağır kafein tüketen hamile bayanların yeni doğan bebeklerinde yüksek seviyelerde kafein tespit edilmiştir. İnsanlarda kafein yarı ömrü 2,5-6 saat arasında değişmekle birlikte fare ve sıçanlarda bu süre 0,7-1,2 saat arasında değişir. Fakat fetal yaşam ve yeni doğan periyodunda kafeinin yarı ömrü, kafeinin demetilasyonu için gerekli enzimlerin noksan olması nedeniyle yaklaşık 32-149 saat arasında değişmektedir ^{6,8}.

İnsanda kafein, hepatik sitokrom P4501A₂ (CYP1A₂) enzimi tarafından demetilasyona uğrayarak paraksantine (1,7 dimetilksantin) dönüşür. Daha az olarak ta teobromine (3,7 dimetilksantin) ve teofiline (1,3 dimetilksantin) dönüşür. Aynı enzim tarafından 1,7 dimetilksantin demetilasyonu ile 1-metilksantin ve 1-metilürük asit oluşur ¹⁸. Kafein, öncelikli olarak CYP1A₂ tarafından metabolize edilir, fakat daha az olarak N-asetiltransferaz (NAT-2) tarafından ve ksantin oksidaz tarafından da metabolize olur ¹⁹.

Ratlarda, kafein metabolitlerinin %40'ını trimetil türevleri oluşturur ki bu türevler insanlarda %6 civarındadır. İnsanlarda kafein metabolizması miktar olarak en fazla paraksantin (1,7 dimetilksantin) oluşumuyla karakterizedir. Bu basamak kafein metabolizmasının ilk basamağını oluşturmakla birlikte metabolizmanın %72-80'ini kapsar. Bazı kafein metabolitlerinin farmakolojik aktiviteleri vardır; örneğin, teofilin ve paraksantin, kafein içeren içeceklerde bulunur ve biyolojik aktiviteleri vardır. Kafein alınımından sonra santral sinir sisteminde teofilin ve paraksantin seviyeleri yükselir, fakat teofilin, paraksantinden daha güçlü etki göstermektedir ⁸.



Şekil 2. İnsanlarda Kafein Metabolizması¹⁸

2.1.2. Kafeinin Organizmaya Etkileri

Kafein ve teofilin, insan dolaşımında μM konsantrasyonlarda bulunarak diyetle alınır. Bu metilksantinlerin belli başlı etkileri şöyle sıralanabilir ²⁰ ;

- İskelet kaslarının uyarılması
- anti- inflamatuvar etki
- analjezik etki
- glukoz metabolizmasının arttırılması
- insulinin lipogenez etkisinin azaltılması
- hücrel cAMP düzeylerinin arttırılması
- adenozin reseptörlerinin antogonisti
- sitozolik Ca^{+2} seviyelerinin yükseltilmesi

Kafein; lokomotor aktiviteyi arttırır, yağ hücrelerinde norepinefrin artışıyla meydana gelen lipoliz sonucu, doku yağ seviyelerini ve vücut yağ depolarını azaltır. Buna karşılık kas kütleini arttırır ²¹.

Çok yüksek miktarlarda kafein tüketen insanlarda diş hastalıkları, kemik mineralizasyonu, osteoporoz, metal absorpsiyonu ve salınımı, böbrekten ve barsaktan geri emilimi ile ilgili problemler, demir eksikliği anemisi geliştiğine dair güçlü kanıtlar mevcuttur ^{19,20}. Bazı epidemiyolojik çalışmalarda kafein tüketimiyle, barsak ve böbrekten mineral salınımı ve emilimi arasında negatif ilişkisi gösterilmiştir. Kafeinin birçok metal iyonlarını bağladığından ve insan vücut dengesini değiştirdiğinden şüphelenilmektedir. Kalsiyum, magnezyum, demir, çinko, manganez, kobalt, krom organizma için yararlı elementlerdir. Kafein ve metal iyonları arasındaki etkileşim, kafeinin oksijen ve nitrojen atomları boyunca oluşmaktadır. Kafein, metal iyonlarını oksijen atomları ile bağlar ¹.

Kafein, hücreleri ve organizmayı radyasyondan koruyucu etkiye sahiptir. Ratlarda yeni yapılan birçok çalışmada, kafein varlığında radyasyon ve diğer ajanlar tarafından artırılmış hasara karşı kafein önemli derecede korumayı sağlar. 2mM kafeinin radyasyon öncesi ya da radyasyon sonrası hemen hemen tamamen hücrelerde radyasyonla indüklenen apoptosisi önlediği belirtilmiştir. 1mM kafein rat karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyonunu düşürdüğünü ve antioksidan olarak reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulmuş hasara karşı membranları koruduğu belirtilmiştir ^{13,22}.

Farelerde, kafeinin oral alınımı tümör baskılayıcı genleri (p53 dahil) düzenlediği gösterilmiştir. Buna ek olarak kafeinin, mutasyonu hem baskılayıcı hem de arttırıcı etkisi de belirtilmiştir. Kafein ve katabolik ürünleri olan teobramin ve ksantin yüksek bakır konsantrasyonlarında, bakır iyonlarına bağlanarak, Cu(II) 'nin Cu(I)'e dönüşmesini azaltarak, prooksidan özellikte gösterir ve oksijen radikallerine öncülük eder. Ayrıca antioksidan olarak, DNA kırıklarını ve hidroksil radikallerini inhibe ettiği bildirilmiştir ¹⁵.

Kafein hidroksil radikallerini ve singlet oksijeni temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder, LDL oksidasyonunu düşürür. Ayrıca kafein protein oksidasyonu ile oluşan protein karbonillerinin seviyelerini de azaltmaktadır. Bu etkileriyle kafein, kardiyoprotektif olarak düşünülmektedir ^{23,24}.

Farelerin içme suyuna akut dozlarda (5-15 mg/kg) kafein eklenmiş ve kemik iliğinde gama ışınlarıyla indüklenen kromozomal hasarın önemli derecede ve hızlı bir şekilde düştüğü saptanmıştır. Kafein, ROS (Reaktif oksijen türleri) ve peroksil radikallerini temizler. Günde 2 kupa kahve içmenin bazı kanserli vakalarda ciddi gecikmiş radyasyonla indüklenen toksisiteyi azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca kafeinin biyokimyasal etkilerinden biri; kimyasal ve UVB indüklü karsinogenezden korumasıdır ¹⁸.

Kafein ve diğer metilksantinler, fosfodiesterazı inhibe ederler ve hücre içinde kalsiyum konsantrasyonunun artmasına neden olurlar, adenosin reseptörlerine antagonist etki gösterir. Bütün bunlar NO üretimini arttırıcı etki yaparak, hücresel siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeylerini yükseltir ²⁰. cAMP'nin hücresel seviyeleri adenilat siklaz ve fosfodiesteraz aktivitelerine bağlıdır. cAMP; bir çok hormonun (ACTH, katekolaminler, glukagon, tiroksin gibi) ikinci habercisidir ²⁵. Fosfodiesterazlar, cAMP ve siklik guanozin monofosfatı (cGMP) hidrolize ederler. cAMP ve cGMP, vazodilat intestinal peptid (VIP) ve nitrik oksit için hücre içi ikinci haberci olarak rolleri vardır ^{11,26,27}.

Metilksantinler, pürin bazlarının kimyasal yapısı ile benzerlik göstermektedir (ürik asit, adenin, guanin, hipoksantin). Bu pürin molekülleriyle ksantinlerin kimyasal benzerliği, biyokimyasal düzenleyici cAMP ile etkileşime girmeleri bakımından önem taşımaktadır ²⁵.

Kafein ve teofilin, fosfoinositid-3-kinazların (PI3Ks) lipid kinaz aktivitesini ve proteinkinaz aktivitelerini inhibe ederler. PI3Ks, bir grup aile enzimidir ve inositol döngüde fosfoinositidleri fosforillerler. Bu enzim aktiviteleri hücresel olaylarda yararlı etki göstererek, lipidkinaz aktivitelerini etkisi altına alırlar. Kafein ayrıca insulin uyarımına bağlı gelişen glukoz transportunu da bloke eder. Yapılan çalışmalarda rat soleus kasında teofilin ve kafeinin, insulinin proteinkinaz B'yi uyarma yeteneğini bloke ettiği gösterilmiştir ki bu etki PI3K aktivitesini inhibe etmesi ile benzerdir. Bununla birlikte metilksantinler serinkinaz aktivitesine karşı daha az etkilidirler ²⁰.

Kronik kafein tüketimi hamilelik sırasında fetal gelişimi etkilemesine rağmen embriyogenesis üzerine kafeinin etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Aşırı dozlarda kafein, gen ekspresyonunu değiştirebilir, düşük ağırlıkta bebek doğumuna, infertiliteye, düşük riskine ve uterus içinde bebeğin gelişme geriliğine neden olabilir. Bebekte düşük doğum ağırlığı ve uterus içinde gelişme geriliği, yetişkin çağına geldiğinde o kişide hipertansiyon ve kronik kalp yetmezliği riskini oluşturabilir. Anjiotensin II, fetoplasental dolaşımda güçlü bir

vazokonstrüktördür ve reseptörleri olan AT₁ ve AT₂ ile ilişkilidir. Hayvan modellerinde kafein ile birlikte AT₂ reseptör ekspresyonunun arttığı görülmüştür²⁸.

Kafein ; akut ve kronik olarak büyüme hormonu (GH), tiroksin (T₄) ve tiroid uyarıcı hormon (TSH) seviyelerinde değişikliğe yol açabilir ve arttırabilir. Yapılan çalışmalarda kafein tüketiminin benign veya malign tiroid neoplazisine karşı koruyucu rol oynayabileceği savunulmuştur. Geçmişteki çalışmalarda uzun süre içme suyuna kafein eklenen ratlarda, neoplazinin artmadığı görülmüştür, kafein tek başına T₄ seviyelerini azaltmış ve TSH seviyelerini ise yükseltmiştir. Ancak 1500 ppm (yaklaşık 140 mg/kg/gün; yüksek doz) kafein dozlarında tiroid foliküler hücre poliferasyonuna, karaciğer hipertrofisine neden olmuştur².

İnsanda uzun süre kafein kullanımı plazma renin aktivitesini ve plazma katekolamin seviyelerini yükseltir. Kafein renal fonksiyonların bozulmasına yol açarak renin konsantrasyonlarını arttırır. Kronik kafein alınımında, kreatinin klerensini düşer, üriner protein atılımı artar ve böbrek ağırlığında yükselme görülür. Kafein, renal ven plazma norepinefrin konsantrasyonlarının artmasına neden olur²⁹⁻³³. Yüksek konsantrasyonlarda ve kronik olarak tüketiminde kardiyak kası uyarır, kalp hızını arttırır, kardiyak performans bozulur, kalp krizi riski yükselir^{14,34}.

Kafein, histamin sekresyonunu düşürür. Yapılan araştırmalarda kafeinin 5-20 mM dozlarda, rat peritoneal mast hücrelerinden histaminin salınmasını önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. Kafeinin in vitro ve in vivo olarak acil alerjik reaksiyonları mast hücrelerini etkileyerek inhibe ettiği belirtilmiştir³⁵.

Kafein insanda, C- reaktif protein (CRP) artışına neden olabilir³⁶. Aşırı kafein tüketimi, böbrekte kalsiyum oksalat taşı oluşturur³⁷.

Kafein, diabetik ratlarda glukoz homeostazını iyileştirmiş, glukozüriyi düşürmüş ve oral glukoz toleransını iyileştirmiştir ³¹. Ayrıca tip 2 diabet riski kahve alınımla ile düştüğü belirtilmektedir ³⁸.

Farelerde 20 mg/kg (30gün) kafein uygulaması sonrasında hepatik katalaz enzimi, superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri yükselmiş, MDA ise düşmüştür ³⁹.

Alkol tüketimiyle, viral hepatitle, kilo artışı ve glukoz metabolizmasının zayıflamasıyla oluşabilecek karaciğer hasarı riski, özellikle kafein (günde 2 kupa kahve) ile azaldığı belirtilmiştir ⁴⁰.

Ratlarda uzun süre kafein uygulaması (2-12 hafta) karaciğer glukojen depolarını azaltmış, vücut yağ ağırlığını ve serum leptin seviyelerini düşürmüştür ⁴¹.

Ratlarda kafein, bazal lipolizi artırır ⁴², nötrofil aktivitesini artırarak, superoksit üretimine etkisi olmadan myeloperoksidaz (MPO) enziminin salınmasını stimule eder ⁴³.

İnsanda ve ratlarda yüksek doz kafein alınımla kan basıncını yükseltir, epinefrin salınmasını artırır. Kan basıncının günde tekrar tekrar artması kafein tüketimine bağlı olarak stres reaksiyonlarının yükselmesine neden olur. Bu durum yetişkin popülasyonunda kronik kalp hastalığı riskini arttırmaktadır ^{10,44,45}.

Kafein (10-20mg/kg) ratlarda, dalakta ve timusta adenozin deaminaz (ADA) aktivitesinde artmaya sebep olmuştur. Doz yükseldikçe aktivite de artmıştır. Kafein, dalak ve timusta ADA'yı yükselterek immünitede rol oynadığı düşünülmektedir ⁴⁶.

2.1.3. Kafeinin Santral Sinir Sistemine Etkileri

Lokal beyin metabolizması sonucu olarak indüklenen uyku, beyinde adenosin seviyelerinin artışıyla ilişkilidir. Adenosin, beyin için endojen bir uyuma faktörüdür, talamus ve kortekste asetilkolin üzerinde güçlü kontrol edici ve arttırıcı etkisi vardır. Uzun süre uyanık kalmak, bazal ön beyin adenosin konsantrasyonlarının artmasıyla ilişkilidir ⁴⁷.

Kafeinin, merkezi sinir sistemine uyarıcı etkileri adenosin A₁ ve A_{2A} reseptörlerine olan inhibisyonudur ⁴⁷⁻⁵². Kafeinin uyarıcı olarak iki mekanizması mevcuttur ;

1. Katekolaminerjik sistemi aktive etmesi, 2. Bazal ön beyin nöronlarında ilerleyen uyanıklığı sağlayarak adenosin reseptörlerini ve ilk olarak A₁'i inhibe etmesi ⁴⁸.

Adenosin A₁, bütün beyin bölgelerinde bulunur, hipokampus, serebellum, serebral korteks ve talamus bölgelerinde en yüksek seviyelerdedir. A₁ reseptörler, sinaptik aktiviteyi ayarlayarak, tüm nöronlardan transmittör salınımını inhibe ederler. Adenosin A_{2A} reseptörleri beynin dopaminden zengin bölgelerinde; striatum, nükleus acumbens, tuberculum bölgelerinde oldukça fazla bulunurlar ^{16,53}. Kafeinin adenosin reseptörlerini inhibe etmesi sonucunda uykusuzluk, lokomotor aktivitenin artması, nörotransmittör salınımı, iskelet kaslarının kasılması gibi etkiler ortaya çıkar ^{16,54}.

Tablo 1. Kafein ve Adenozin Etkilerinin Karşılaştırılması ⁵⁴

<i>Hücre sel mekanizma</i>	<i>Kafein</i>	<i>Adenozin</i>
<u>Santral sinir sistemi</u>	*Elektriksel aktivitenin yükselmesi *Nörotransmittör salınımının artması *lokomotor aktivitenin uyarılması *iskelet kaslarının istemsiz kasılması	*Elektriksel aktivitenin azalması *Nörotransmittör salınımının inhibe edilmesi *lokomotor aktivitenin azalması *iskelet kaslarının gevşemesi
<u>Kalp</u>	*Pozitif inotropik/kronotropik etki	*Negatif inotropik/kronotropik etki
<u>Böbrek</u>	*Diüretik etki *Renin salınımının artması	*Anti-diüretik etki *Renin salınımının inhibisyonu
<u>Gastrointestinal Sistem</u>	*Gastrik sekresyonunun artması	*Gastrik sekresyonunun inhibisyonu
<u>Adipoz Doku</u>	*Lipolizin uyarılması	*Lipolizin inhibisyonu
<u>Damar</u> <u>Periferal</u> <u>Santral</u>	*Genişleme *Daralma	*Daralma *Genişleme
<u>Solunum sistemi</u>	*Bronşial düz kasların rahatlatılması	*Bronşial düz kaslarda daralma/ genişleme

Adenozin; iskemi, hipoksi,epilepsi ve iskemik beyin hasarında endojen nöroprotectif ajan olarak salınır. Kafein ise iskemik hipoksik koşullarda adenozinin nöroprotektif etkileriyle çatışarak adenozin reseptörlerine antagonist etki gösterebilir. Yüksek doz (150mg/kg) kafein kafa travma iyileşme sürecini zayıflattığı, kan-beyin bariyerinde aksamaya yol açtığı ve travmatik kortekste nötrofil infiltrasyonunu, ödemi daha kötü bir hale getirdiği gösterilmiştir ⁵⁵.

Dopamin, motor davranışlarının düzenlenmesini sağlayan nörotransmittör olarak beyin için son derece önemlidir. Kafein tarafından adenozin reseptörlerinin (A_{2A}) inhibisyonu, dopamin reseptörlerini artırır, dopamin salınımını indükler ve korteksten asetilkolin salınımını uyarır ^{7,16,47,56,57}. Kafein, dopamin agonistidir. Çünkü cAMP yoluyla katekolaminlerin salınımını artırır⁵⁴. Fakat kronik tüketim, lokomotor aktiviteye tolerans gelişimine neden olur ⁵⁸, aşırı doz kafein, serebral metabolizmayı uyarmasına rağmen, serebral kan akışında uzun süreli düşmeye neden olmaktadır. Akut kafein tüketimi, beyin laktat seviyelerini yükseltir. Kafeinin indüklediği vazokonstrüksiyon beyin laktat düzeylerini artırır ^{17,59}.

Kafein, endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını uyarak, nöronlardan hücre içi kalsiyum salınımını uyarır. Çünkü artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonları nörotransmittörlerin salınması için önemlidir ⁵⁴.

Ratlarda kafein, çeşitli nörotransmittör sistemlerin fonksiyonunu değiştirir, duygusal bozukluk, korku, endişe ve uyku bozukluğuna neden olur. Kafein; serebral kortekste 25-100mg/kg dozlarda nöroaktif steroidlerin; pregnenolon, progesteron, allopregnanolon konsantrasyonunu arttırmıştır. Kafein plazmada da beyin ile benzer şekilde doza bağımlı olarak, pregnenolon ve progesteron seviyelerini arttırmıştır. Sonuç olarak kafein, plazmada kortikosteron seviyesini artırır ⁴.

Metilksantinler, diüretik ve solunum uyarıcı, ağrı kesici etkileri nedeniyle tıpta bazı ilaçların bileşiminde kullanılır. Ayrıca vasküler baş ağrısı ve Parkinson hastalığı gibi beyinsel rahatsızlıkların tedavisinde de ksantin ilaçları kullanılır ^(25,60,61)

Ratlarda oral ya da intravenöz kafein uygulaması, beynin hipokampus ve striatum bölgelerinde serotonin (5-hidroksi triptamin), dopamin ve asetilkolin salınımını arttırmıştır ⁶².

İnsanda uzun süreli kafein kullanımının Alzheimer hastalığı riskini düşürdüğü belirtilmiştir ⁶³.

Kafein anne sütüne de geçmektedir ve anne sütünden alınan kafein, yeni doğanda yağ asitlerinin kompozisyonlarını değiştirir, serebellumda doymuş yağ asiti ve tekli, çoklu doymamış yağ asitlerinin seviyelerini arttırmaktadır ⁶⁴.

2.2. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER

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 tanımlanmaktadır ⁶⁵.

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 gelmektedir ⁶⁶.

Serbest radikal, orbitalinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya atom gruplarıdır ⁶⁷⁻⁷⁰. Bu eşleşmemiş elektron, serbest radikali karasız bir konuma getirir. Serbest radikalin kararlı, stabil bir yapıyı tekrar kazanması amacıyla elektronunu bir başka elektronla eşleştirmesi gerektiğinden bu durum serbest radikale kimyasal olarak büyük bir aktivite kazandırır ^{69,71}.

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri insanlarda çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda oluşurlar⁷²⁻⁷⁵. Serbest radikallerin büyük çoğunluğu invivo olarak üretilir ve amino asitler, yağ asitleri, karbonhidratlar ve nükleotitler gibi birçok biyolojik molekülü okside edebilirler⁷⁶.

2. 2. 1. Serbest Radikal Kaynakları

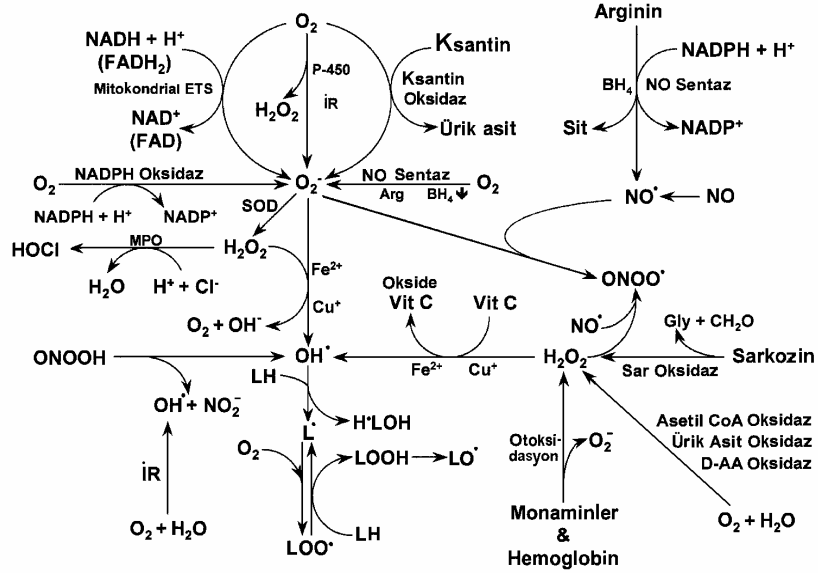
İnsanlar aerobik metabolizmaya sahip oldukları için hayatları boyunca serbest radikal üreticisi konumundadırlar. Birçok sistem ve metabolizma üzerine etkili olan serbest radikaller, normal metabolik olaylar sırasında ortaya çıkabildikleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler^{75,77-79}.

Potansiyel hasarlayıcı türler (reaktif oksijen türleri, nitrojen türleri); metabolizma ürünleri, fizyolojik mediyatörler ve sinyal molekülleri olarak ortaya çıkarlar. Hasara sebep olan ROS üretimi hem ekzojen hem de endojen kaynaklı olabilmektedir. Ekzojen kaynaklar: hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüsler⁸⁰⁻⁸¹. Endojen kaynaklar ise mitokondrial elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelyal hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır⁸². Organizmanın yapısında bulunan proteinler, serbest amino asitler, DNA, lipidler ve nükleik asitler gibi makro moleküller, bu sistemler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin etkilerine maruz kaldıklarında hasara uğrarlar⁸³.

2.2.2. Serbest Radikal Türevleri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumu için oksijen gereklidir ^{75,84} . Serbest oksijen radikallerine süperoksit: $O_2^{\cdot -}$, hidroksil radikali: $OH^{\cdot}$, alkoksil radikali: $RO^{\cdot}$, peroksil radikali: $ROO^{\cdot}$ ve hidroperoksil radikali: $OOH^{\cdot}$ örnek verilebilir ^{75,76} .

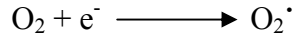
Nitrik oksit: $NO^{\cdot}$, nitrojen dioksit: $NO_2^{\cdot}$ radikalleri de RNS' yi oluşturur ⁷⁵. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit: H_2O_2 , peroksinitrit: $ONOO^-$, hipoklorik asit: $HOCl$, hipobromöz asit: $HOBr$, gibi diğer reaktiflere dönüşebilir.



Şekil 3.Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi⁷⁵
(İR:İyonize radyasyon, Sit :Sitrüllin, D-AA :D-Amino asit, BH₄ : Tetrahidrobiopterin,
Gly:Glisin, L': Lipit radikali, SOD : Süperoksit dismutaz, MPO : Myeloperoksidaz)

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$) :

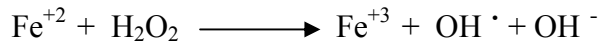
Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit radikal anyonu meydana gelir.



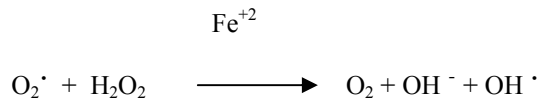
Süperoksit radikali O_2 varlığında ksantin oksidaz'ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH'nin NADPH oksidaz ile oksidasyonu, mitokondriyal elektron transport sistemi ile $NADH_2$ ve $FADH_2$ 'nin NAD ve FAD'ye dönüşümü sırasında, O_2 'nin iyonize radyasyonla, Sit p-450 ile ve arginin veya tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle oluşur^{74,75,84,85}. $O_2^{\cdot -}$ den süperoksit dismutaz enzimi ile H_2O_2 oluşur.

Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$) :

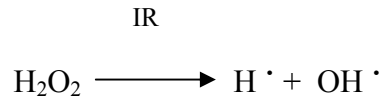
Yarılma ömrü kısa ve oldukça güçlü bir serbest radikal olan hidroksil radikali asıl olarak Fe^{+2} molekülünün de katıldığı Fenton reaksiyonu ile oluşur^{67, 86}.



Ayrıca demirin katalizlediği Haber - Weiss reaksiyonu da $OH^{\cdot}$ oluşur⁸⁷.

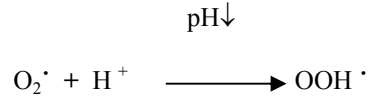


İyonize radyasyon etkisi ile de $OH^{\cdot}$ oluşur^{75, 88}.

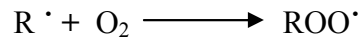


Perhidroksil radikali (OOH[•]) :

O₂[•] radikali asidik ortamda daha reaktif olup protonlanarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan OOH[•] radikalini oluşturur ⁶⁷.

**Peroksil radikali (ROO[•]) :**

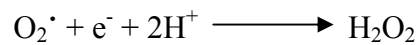
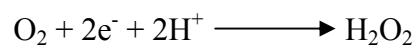
R[•] radikalleri hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek ROO[•]’yi oluştururlar⁶⁷.

**Singlet oksijen: (¹O₂)**

Yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmaması sebebiyle serbest oksijen radikali olmayıp reaktif oksijen türleri grubunda yer alan bir moleküldür. ¹O₂, oksijen elektronlarının dışardan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün ters yönündeki farklı bir yörüngeye geçmesi ile oluşabileceği gibi, O₂[•] radikalinin dismutasyonu ve MPO’nun katalizlediği H₂O₂’nin HOCl ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir ^{89,90}. Singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. DNA, proteinler ve lipitlerle reaksiyona girebilir ^{91, 92}.

Hidrojen Peroksit (H₂O₂) :

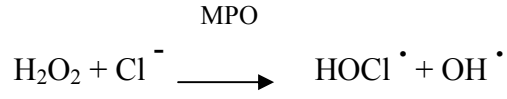
Oksijen molekülünün iki elektron alarak indirgenmesi veya yapıya iki hidrojen atomunun eklenmesiyle oluşur ⁶⁷. Süperoksit radikalinin yapısına bir elektron katılmasıyla da oluşur.



Hidrojen peroksit, O_2 den iki elektronun sit p-450, asetil CoA oksidaz, ürik asit oksidaz veya D-amino asit oksidaz ile redüksiyonu, monoaminler (dopamin, epinefrin, norepinefrin), hemoglobinin otooksidasyonu ve glisin sentezinde de oluşur^{74,84}. Fe^{+2} veya Cu^{+} varlığında güçlü bir radikal olan $OH^{\bullet}$ e indirgenir⁷⁵.

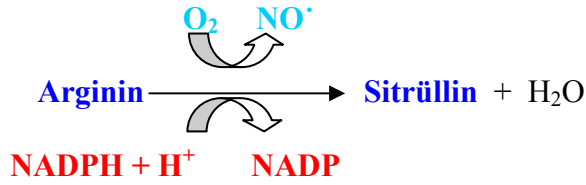
Hipoklorik Asit ($HOCl$) :

Nötrofiller, myeloperoksidaz enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü oksidatif bir yapı olan hipokloridi oluşturur⁹³.



Nitrik Oksit ($NO^{\bullet}$) :

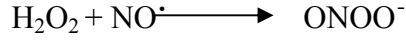
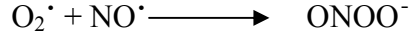
Memeli hücrelerinde NO başlıca NOS'un (NO -Sentaz) aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS, oksijeni kullanarak L-arjinin amino asitinden sitrüllin ve $NO^{\bullet}$ 'yu oluşturur⁹⁴⁻⁹⁶. Bu olay, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat ($NADPH$), flavin mononükleotit (FMN), flavin adenin dinükleotit (FAD), tetrahidrobiopterin (BH_4) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar^{95,96}.



Eşleşmemiş elektronu nedeniyle bir serbest radikal türü olarak ^{95,97} bazı memeli hücre tiplerince üretilen NO; damar tonüsünün kontrolünde, platelet agregasyonunda, lökosit adezyonunda, hücre aracılı immün sitotoksitesinde, sinaptik geçirgenlikte sinyal molekülü olarak önem taşımaktadır ⁹⁶.

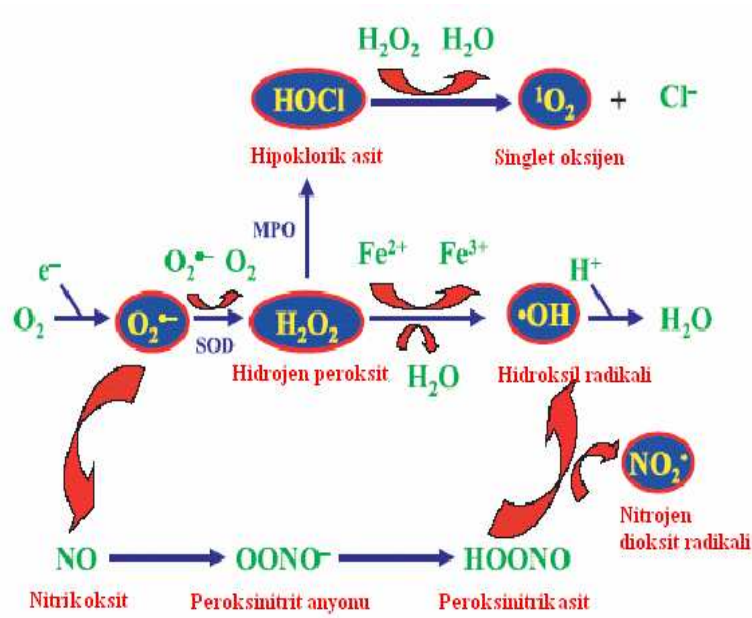
Peroksinitrit (ONOO⁻) :

Süperoksit radikali veya hidrojen peroksitin NO[•] ile reaksiyona girmesi ile oluşur⁹⁸.



Oluşan peroksinitrit radikalinin oksidatif potansiyeli O₂[•] ve H₂O₂ ye göre daha yüksektir^{75,84}.

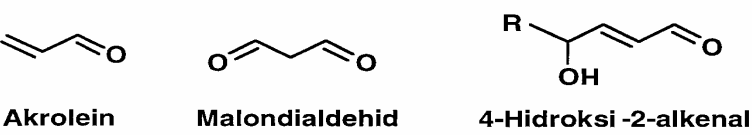
Oksidatif stresle analog olmak üzere NO'nun ve NO'dan türeyen reaktif nitrojen türlerinin (RNS) artan miktarları organizmada **nitrozatif stresi** meydana getirir^{99,100}. Nitrozatif stres ile inflamasyon olayları, nörotoksisite ve iskemi gibi patolojik olaylarla bağlantılı bulunmuştur⁹⁹. Her iki stresi ortaya çıkaran reaktif türler birbirleriyle etkileşim halindedir ^{99,101}.



Şekil 4. ROS ve RNS'nin birbirleriyle etkileşimi ¹⁰¹

2.2.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

Lipitler; biyolojik moleküler içinde reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan moleküllerdir. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden (fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler ve steroller) oldukça zengindir. Bu yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olur ⁷². Membran akışkanlığı, membran lipitlerinin yan zincirlerinde bulunan doymamış yağ asitleri ile sağlanır. Doymamış yağ asitlerinin hasarı, membran akışkanlığını azaltıcı etki gösterir ¹⁰².



Şekil 5. Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehitler ¹⁰³

Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan MDA, biyolojik örneklerde kolaylıkla ölçülebilen ve peroksidatif hasarı gösteren nispeten dayanıklı bir üründür ⁷⁷. Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metod MDA ölçümüdür^{77,103,104}. MDA, proteinlerin lizin rezidüleriyle ve fosfolipitlerin amin gruplarıyla reaksiyona girer ¹⁰³. MDA, kolaylıkla difüze olabildiğinden, DNA bazlarıyla reaksiyona girerek hasara neden olabilir.

Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehitler 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 oluşur. Üç karbonlu bir ketoaldehit olan MDA, normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO₂'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipit peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir ¹⁰⁵.

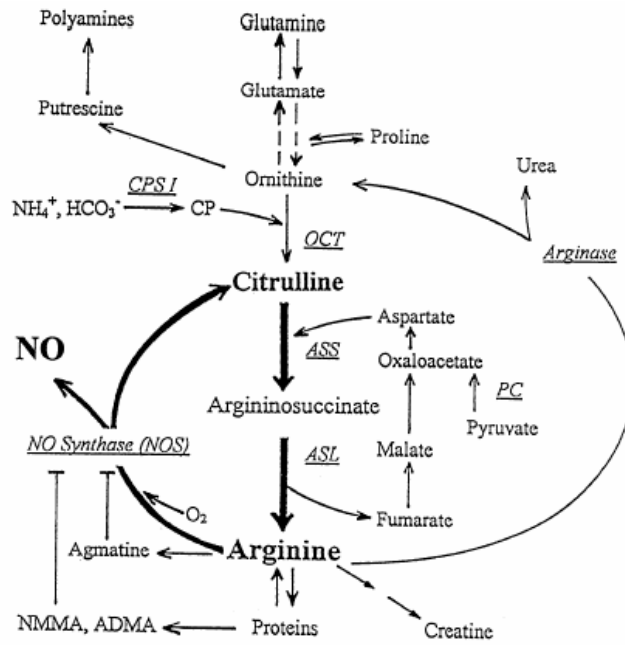
2.2.4. Antioksidan Sistem

Organizmalardaki lipid, protein, nükleik asit ve karbohidratlar gibi moleküller oksidatif hasar için hedef moleküllerdir. Antioksidanlar, oksidatif hasara karşı bu molekülleri şu prensipler doğrultusunda korurlar ^{69,106}.

- * Enzimlerin kullanılması veya doğrudan kimyasal reaksiyonlar yoluyla.
- * Oksijenden türeyen moleküllerin oluşumunu en az düzeye indirerek.
- * Radikallerle doğrudan kimyasal yolla temasa geçerek.
- * Reaktif metabolitlerin temizlenmesini veya bu radikallerin daha az aktif ve toksik olmayan ürünlere dönüşümünü sağlayarak.
- * Zayıf reaktif türlerin daha zararlı türlere dönüşümü için gereksinim duyulan metal iyonlarını bağlayarak.
- * Hedef molekülde oluşan hasarı onarma yoluyla.
- * Hasarın çok büyük olduğunda, hasara uğramış molekülü uzaklaştırarak.

2.3. L-ARGİNİN METABOLİZMASI

Beyinde L-Arginin metabolizması, beynin normal fonksiyonu için oldukça önemlidir. Arginin, protein sentezi, üre üretimi, agmatin, nitrik oksit (NO), prolin, glutamat, kreatin fosfat ve poliamin üretimi için önem taşımaktadır. Bütün bu bileşikler beyin fonksiyonları için gerekmektedir²⁵.



Şekil 7. Memeli Hücrelerinde Arginin Metabolizması¹⁰⁸

(CPS I; karbamoil fosfat sentetaz I, CP;karbamoil fosfat, PC;pirüvat karboksilaz, OCT; ornitin karbamoil transferaz, ASS; argininosüksinat sentetaz, ASL; argininosüksinat liyaz, NMMA; N^G-monometil-L-Arginin, ADMA; asimetrik N^G, N^G-dimetil-L-Arginin)

Poliaminlerin sentezi, arginin için önemli metabolik bir yoldur. Arginaz aktivitesi ile üretilen ornitin, poliaminlerin sentezi için prekürsördür²⁵.

Arginin metabolizmasının en büyük bölümü karaciğerde üre siklusunda meydana gelir. Arginin, sitrüllinden argininosüksinat sentetaz (ASS) ve argininosüksinat liyaz (ASL) tarafından sentezlenir ki bu enzimler üre siklusunun 3. ve 4. enzimleridir. Metabolizmanın diğer bölümü böbrekte meydana gelir ve arginin sitrüllinden oluşarak kan dolaşımına verilir. Bunun yanında birçok doku ve hücre tiplerinde ASS ve ASL seviyeleri düşüktür. Strüllin; arginin sentezi için böbrekten ve diğer organlardan da temin edilir. Oluşan arginin, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından tekrar sitrüllin oluşturabilir. Diğer taraftan arginin, üre siklusunda arginaz tarafından hidrolize edilerek ornitin ve üreye çevrilir. Sonuç olarak NOS ve arginaz enzimleri ortak substrat olarak arginini kullanırlar ^{108,109,110}.

Endojen arginin analogları; agmatin, N^G-monometil-L- Arginin (NMMA) ve asimetrik N^G, N^G-dimetil-L- Arginin (ADMA) NOS inhibitörleridir ¹⁰⁸.

Arginin, nitrogen dengenin temelini oluşturan esansiyel bir amino asittir. Yetişkinlerde arginin sentezinin çoğu renal proksimal tübüllerde oluşan sitrüllinden gerçekleşir. Sitrüllin; glutamin ve prolinden ince barsakta da sentezlenir. Arginin, nöronlarda NO sentezi için gereklidir. Kısıtlı NO sentezi, sinapsisleri etkileyerek motor koordinasyonu ve hafızayı zayıflatır ¹¹¹.

Santral sinir sisteminin arginin ihtiyacını beyin hücrelerine kandan arginini transfer eden özel spesifik taşıyıcılar karşılamaktadır. L- Arginin, özel katyonik amino asit taşıyıcılarıyla (CAT) hücre zarı boyunca transfer edilir. Merkezi sinir sisteminde ve nöronal hücre kültürlerinde bu taşıyıcı sistem, kan-beyin bariyerinde tanımlanmıştır. Beyinde arginin seviyeleri ve NO üretimi hiperamonyanemik hastalıkların patofizyolojisinde merkezi bir rol oynar ¹¹².

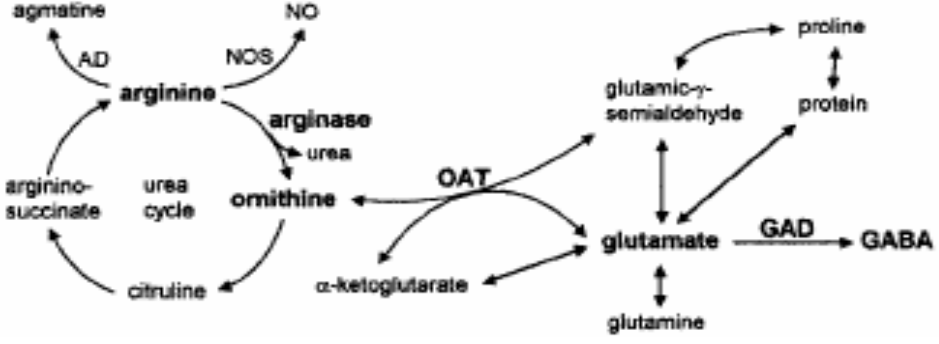
Bunun yanında arginin, aşırı açlıkta, strese, hasarlı koşullarda gerekli hale gelmektedir. Arginin yaraların iyileşmesinde, lenfositlere cevapta ve mitogeneizde yararlı olduğu bildirilmiştir ¹¹³.

2.3.1. ARGİNAZ

Arginaz (L-arginin üre amidino hidrolaz; EC 3.5.3.1), üre siklusunun son enzimi olarak argininin, üre ve ornitine hidrolizinden sorumludur ve konsantrasyon olarak en fazla karaciğerde bulunur. Metabolizmada birçok yolda görev alan anahtar enzimdir. Memelilerde arginaz için en az iki farklı genin varlığı bulunmuştur. 1996’da arginazın ikinci formu arginaz II nin varlığı tespit edilmiştir. İki arginaz izoformu farklı subselüler kompartmanlarda lokalize olmuşlardır. Arginaz II, öncelikle ekstrahepatik dokularda eksprese edilir, karaciğerde çok düşük konsantrasyonlardadır ya da hiç bulunmamaktadır. Fakat özellikle böbrek, beyin, ince barsak, prostat olmak üzere diğer organlarda bulunur. Arginaz I, sitozolik formudur ve karaciğerde çok fazla eksprese edilir, ürogenesis de rol oynar. Bunun aksine Arginaz II; mitokondriyal formudur, ornitin kaynağı olarak glutamat ve prolin biyosentesinde, hücre büyümesinde ve farklılaşmasında rol oynayan poliamin biyosentezinde, çeşitli organlarda özellikle nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından nitrik oksit (NO) sentezinin düzenlenmesinde görev alır^{25,114-118}.

Prostat ve meme bezinde ; Arginaz II, ornitin dekarboksilaz (ODC) ve ornitin aminotransferaz (OAT) ile birlikte eksprese edilirler, poliamin ve prolin sentezinde birlikte iş görürler. Arginaz II, ince barsakta da bu iki enzim ile birlikte eksprese edilir¹¹⁵.

Arginaz, nörotransmittör glutamat oluşumu için ornitin kaynağıdır. Oluşan glutamat daha sonra glutamik asit dekarboksilaz enzimi ile GABA’(gama amino bütirik asit) ya çevrilir¹¹⁷ (Şekil 8).



Şekil 8. Üre Döngüsü ve GABA oluşumu ¹¹⁷

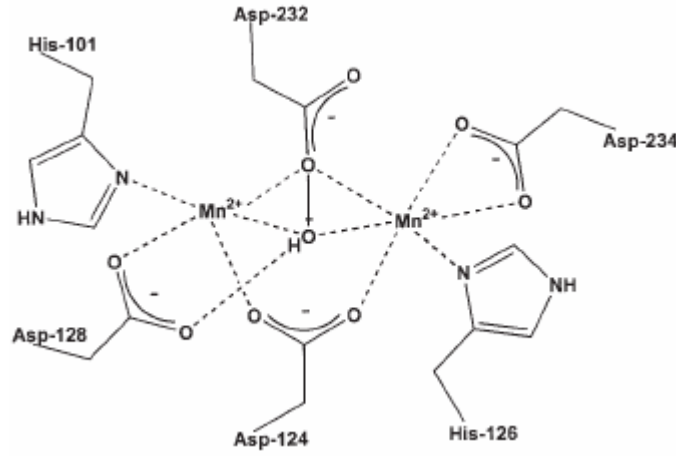
(AD;arginin dekarboksilaz, OAT;ornitin aminotransferaz, GAD;glutamik asit dekarboksilaz)

Diyet, hormonlar, sitokinlere yanıt olarak arginaz izoenzimlerinin regülasyonundaki farklılıklar arginazın, argininin metabolik geleceğine düzenleyici etki yapacağını göstermektedir²⁵.

2.3.1.1. Arginazın Yapısal Özellikleri

Arginaz I ve II'i kodlayan iki gen arasında farklılık olsa da orijin olarak ortaklırlar. İmmünojenik özellikleri, moleküler özellikleri ve ekspresyonları farklılık gösterir. Yaklaşık olarak aynı büyüklükte dirler, amino asit residülerinin % 50 sinden fazlası aynıdır ve enzimatik fonksiyon için aktif bölgeleri %100 homoloji gösterir ^{115,119,120}.

Arginaz izoenzimleri, her biri 35-40 kDa ağırlığında olan subüniteleri ile trimerik kuaterner yapı gösteren kristal bir yapıya sahiptir ve aktif merkezde iki tane Mn^{+2} çekirdeği içerir. Mn^{+2} çekirdeği katalitik aktivitede kritik rol oynar. Mn^{+2} - Mn^{+2} arasındaki uzaklık 3.3×10^{-10} m'dur ^{116,121-123}.



Şekil 9. Rat Karaciğer Arginazı Aktif Merkezinin Yapısı ¹²³

2.3.1.2 Metal Aktivasyonu ve Kinetik Özellikleri

Arginazın maksimum aktivite gösterebilmesi için bazı metal iyonlarına kofaktör olarak ihtiyacı vardır. Enzimin, +2 değerlikli metal iyonları; Mn^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , V^{+2} , Cd^{+2} , Fe^{+2} dir. Bu kofaktörler ile 55 ° C’de preinkübasyon sonucu aktivite elde edilmiştir. Bu metal iyonları arasında Mn^{+2} ile % 100 aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Arginaz aktivitesi için alkalın optimal pH 9.0-9.5 arasında olduğu ve hidroliz sonucu oluşan ürünlerden ornitin, enzimi inhibe ettiği belirtilmiştir. Rat karaciğer arginazının pK değeri 7.8-8.0 arasındayken, insan karaciğer arginazının pK değeri ise 7.8-7.9 arasında olduğu rapor edilmiştir. Enzim; lizin, izolösin, ornitin, valin, lösin, prolin amino asitleri tarafından inhibe edilir ^{120,123-125}.

T ablo 2. Arginaz I ve Arginaz II İzofomlarının Karşılaştırılması ^{115,126}

	<i>Arginaz I</i>	<i>Arginaz II</i>
Bulunduğu Doku	Karaciğer, kırmızı kan hücreleri	Böbrek,beyin, Gastro-intestinal sistem, prostat
Subünite Moleküler Ağırlık (Da)	35.000	40.000
pI Değeri	9.3	6.8
Mn ⁺² ihtiyacı (mmol/L)	20	2
Prolin ile inhibisyon	±	++
İsolösin ile inhibisyon	++	±
Hücresel bölgesi	Sitozol	Mitokondri

Yapılan çalışmalarda karaciğerde baskın olarak arginaz I’in katyonik (pI 9,3) ve anyonik (pI 7,7) formu keşfedilmiştir. Böbrekte ise arginaz II’in anyonik (pI 7,1) formu baskın olarak keşfedilmiş ve bununla beraber böbrekte ikincil olarak katyonik formu da (pI 8,9) bulunmuştur. Katyonik isoform aktivitesi ve seviyesi, kanserli dokuda daha yüksek bulunmuştur. Bu form kan serumunda bulunmuştur ve hasta kişilerde yükselmiştir. Anyonik arginaz ise sağlıklı ve hasta kişilerin serumunda hiç saptanmamıştır. İnsan meme kanserinden ve kolorektal kanserden elde edilen sonuçlara göre, arginaz II’in katyonik formunun karsinogenez için spesifik olabileceği öne sürülmektedir ¹¹⁴.

2.3.1.3. Arginazın Biyokimyasal ve Patolojik Önemi

Arginaz, prolin ve poliamin sentezi için ornitin sağlarlar ki bu moleküller hücre proliferasyonunu kontrol ederler ve kollagen üretimini sağlarlar ^{127,128}. Dolayısıyla normal yara iyileşme sürecinde arginaz önemlidir ^{119,129}. Arginaz aktivitesi yaralanmalarda artar, bu artan arginaz aktivitesi, argininin çok fazla kullanılması, ornitin ve poliaminin aşırı üretimi ile ilişkilidir ¹²⁸.

İmmun sistemde Arginaz I ve II nin ekspresyonlarının artışı, immün sitokin cevabına yol açar. Arginaz I ve II nin artışı, immün yetersizlik ile ilgili hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılmasında önemli rol oynayabilir ¹²⁸.

İnsan meme kanseri hücrelerinde arginaz seviyeleri yüksek bulunmuştur. Arginaz II'nin, özellikle kolon ve mide kanseri, akciğer kanseri ve renal hücre karsinoma hastalarında yükseldiği belirtilmiştir. Prostat kanseri de, arginaz çalışmaları için hedef gösterilmiştir. Çünkü arginaz bu dokuda da yüksek seviyede eksprese edilmektedir ve bu dokunun fonksiyonu için rol oynamaktadır. Prostat kanserli hastaların serumunda arginaz seviyeleri yüksek bulunmuştur. Arginaz aktivitesi, sküamöz hücrelerde ve insan derisinin bazal hücre kanserinde yükseldiği belirtilmiştir ve hücre ornitin konsantrasyonu yükselmiştir. Bu durum malign deri tümörlerinin gelişmesine neden olabileceği belirtilmiştir. Arginaz enziminin tümör belirteci olup olmadığının açıklanması için daha erken olduğu savunulmaktadır ^{115,119,123,129,130}.

T helper 2 (Th 2) sitokinleri (IL-4,5,9,10,13), arginaz ekspresyonlarını indükler ¹²¹. Alerjik inflamasyon sırasında bu sitokinlerin ekspresyonlarının artışı, arginaz ekspresyonlarının artışına neden olur ve beraberinde NO üretimi baskılanır, mukus ve kollagen üretiminde artış meydana gelir. Arginaz, astımda inflamasyona neden olur. Yapılan insan çalışmalarında, arginazın astımın patogeneze katkıda bulunduğu açıklanmıştır ^{127,131-133}.

Ratlarda yaşı beyinde arginaz düşük bulunmuştur. Yaşı beyinde arginazın azalmasıyla NO üretiminin arttığı, bu durumun yaşılanma sürecinde nörodejeneratif bozukluğa yol açtığı açıklanmıştır ¹³⁴⁻¹³⁷.

Yapılan rat çalışmalarında, arginazın hipertansiyonda NO'nun biyoyararlılığında kritik bir faktör olduğu açıklanmıştır: Arginaz, ayrıca endotelial ve düz kas hücrelerinden de eksprese edilir. Vasküler arginaz aktivitesi hipertansiyonda artış gösterir. Arginazın inhibisyonu, endotelial disfonksiyonu ve artmış kan basıncını iyileştirir, hipertansiyon gelişimini önler. NO'nun biyoyararlılığını artırır ^{138,139}.

Ratlarda yapılan diğer çalışmalarda arginazın, hepatoselüler hasarın erken dönem belirlenmesinde en yararlı belirteç olduğu savunulmaktadır. Kupfer hücrelerinin hepatoselüler koruyucu fonksiyonu olarak karaciğerde arginazın yükseldiği belirtilmiştir^{140,141}. Glomerulonefritte arginaz yüksek bulunmuştur ¹⁴². Tıkanma sarılığında karaciğerde hepatositlerde morfolojik değişimler gelişmekle birlikte arginaz enzimi de dahil üre siklusu aktivitesi, önemli derecede artış gösterdiği açıklanmıştır ¹⁴³.

Cerrahi indüklü travmalarda dahil, birçok travmalarda, insanda periferik mononükleer hücrelerde arginaz aktivitesi yüksek bulunmuştur. Bu sonuca göre arginaz I, travmada yükseliyor, ornitin üretimi artıyor, NO metabolitleri önemli derecede düşüyor. Travmanın sonucunda ve patofizyolojisinde arginazın önemli rol oynadığı düşünülüyor ¹²⁸.

Yapılan in vitro çalışmalarda, arginazın nöronal oksidatif stres üzerinde nöronları koruyucu özellikleri açıklanmıştır. Arginazın nöronları koruma özelliği, nörorejeneratif etkileri, poliaminleri oluşturmasıyla ilişkili olduğu savunulmaktadır ¹³⁶. Arginaz I'in, nöronlarda anti-apoptotik etki gösterdiği belirtilmiştir ¹⁴⁴. İnsanda, orak hücre hastalıklarında eritrosit arginaz aktivitesi yüksek bulunmuştur ¹⁴⁵.

2.3.1.4. Arginaz Enzimi Eksikliği

Arginaz bütün hücreler için önemlidir. Hücrelerde bu enzim eksikliğinde, büyümede azalma görülür ¹²⁹. Arginaz eksikliğinde kişide, klinik olarak nöronal hasara bağlı ilerleyen mental zayıflık, psikomotor davranışta ve büyümede gecikme görülür ^{117,127}. Arginaz I geni, 6q23'de lokalize olmuştur. Arginaz enzimi eksikliği, otozomal resesif genetik bir hastalıktır ¹⁴⁶.

Üre siklusu enzimlerinin eksikliği dramatik sonuçlar doğurur. Amonyak artışıyla oluşan ensefalopati, koma ve ölüm meydana gelebilir. Üre siklusunun son enzimi olan arginaz eksikliği, bebekliğin son dönemlerinde ve nadiren de yetişkin çağda ortaya çıkar. Gelişim gecikliği ve kasılmalarla kendini gösterir. Çok nadir ölümle sonuçlanır. Üre siklusu krizi, serebral ödeme yol açar. Fakat arginaz I eksikliği, diğer üre siklusu enzimlerinin eksikliği ile ortaya çıkan hastalıklara göre daha ılımlıdır. Diğer üre siklusu enzimlerinin eksikliği ciddi sorunlara yol açabilir. Fakat Arginaz I eksikliği tedavi edilebilir. Bu enzimin eksikliğinde, hiperargininemiye bağlı olarak ilerleyen bunama, kasılmalar, kortekste fonksiyon bozukluğu görülür ^{126,147}.

Arginaz I eksikliği tandem mass spektrometresiyle ortaya çıkartılır. Yeni doğanda Arginaz I eksikliği tablosunda; özel, ağır ve külfetli bir diyet ile bu hastalığa doğumdan itibaren etkin ve sonuç verici tedavi uygulanır. Bu hastaların çoğunda akut hiperamonyemi riski çok yüksek değildir ^{115,148}. Arginaz II eksikliğine şimdiye kadar nadir rastlanılmıştır ^{120,127}.

Arginaz I eksikliğinde, arginaz II ekspresyonu artar. Bu hastalarda arginaz II artışı, serebrospinal sıvıda beklenmedik glutamin artışına neden olur. Glutamin seviyelerinin aşırı yükselmesi, hiperamonyemi ve hücre içi osmolarite artışı ile birlikte beyinde toksik ödem meydana getirir. Ender olarak yaşlılarda arginaz eksikliği serebral ödem ve çabuk ölümle sonuçlanır ¹⁴⁷.

2.3.2. Nitrik Oksit (NO) ve Etkileri

Nitrik oksit oluşumu; Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzim grubu tarafından L-argininden L- sitrüllin oluşumu sırasında meydana gelir. Bu süreçte NOS, kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), flavin mononükleotit (FMN), flavin adenin dinükleotit (FAD) ve tetrahidrobiopterin (BH₄)’e gereksim duyar. N^G- Hidroksi-L-Arginin (NOHA) ; NO üretimi sırasında oluşan ara maddedir, reaksiyon sırasında salınır, arginazı inhibe eder. Tam kanda NO, hızlıca nitrit (NO₂⁻) ve nitrata (NO₃⁻) metabolize olur. Nitrat ve nitrit, tam kanda NO üretiminin önemli göstergesidir ^{110,119,121}.

NO’nun hem pro-inflamasyonda hem de anti-inflamasyonda etkileri vardır. Düşük dozları (pikomolar) koruyucu iken bunun aksine yüksek (mikromolar) konsantrasyonları pro-inflamasyona ve hasara yol açar ^{131,149}.

NO; vazodilatasyonda, immünitede, platelet ve lökosit adezyonunun inhibisyonunda, nörotransmittör oluşumu gibi olaylarda haberci molekül olarak fonksiyon gösterir. Vasküler hastalıklar, NO üretiminin zayıflamasıyla ilişkili olmasına karşın septik şok, serebral infarktüs, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar NO üretiminin artmasıyla ilişkili olmaktadır ^{109,119,150}.

NO, lökosit adezyonu ve kemotaksisinde güçlü etkilere sahiptir. NO üretimi, nötröfil ve endotelial hücreler üzerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonlarını düşürür. Bu etkiler lökosit adezyonunun azalmasına yol açar. NO, mast hücreleri aktivasyonunu inhibe ederek anti-inflamatuvar etki gösterir. NO, makrofaj sitokin üretimini down regule edebilir. Oksidatif stres koşulları altında NO, serbest radikal temizleyicisidir, böylelikle hücrel hasarı önler. Bununla birlikte NO’nun yüksek seviyelerinin mutageniz ve diğer DNA hasarı ile ilişkili olduğu, ayrıca demir-sülfür içeren enzimlerin fonksiyonlarını değiştirerek mitokondriyal solunumu bozduğu bildirilmiştir ¹⁴⁹.

NO, spinal kord, retina ve beyin de dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi boyunca da sentezlenir. Sinir sisteminde normal fizyolojik regülasyonda önemli olmasına karşın, aşırı miktarları beyin için nörotoksik etki yaparak, iskemi ve beyin hasarına neden olur. NO, sinir sisteminde hücre-hücre sinyalleşmesinde önemli bir moleküldür ^{108,112}. Fakat yaşlı beyinde artış gösterir ¹⁵¹.

NO; difüzyonla nöronlara girer, guanilat siklazı aktive ederek siklik guanozin mono fosfat (cGMP) üretimini ve siklooksijenaz 1'i aktive ederek de prostaglandin üretimini artırır, beyinde nöronal aktivitenin kontrolünde önemli rol oynar. Her iki aktif ajan (cGMP ve prostaglandin), NO'nun fizyolojik etkilerine aracılık ederler. Çeşitli stres ve kortikoidler nöronal hücre ölümüne neden olurlar. Bu olay glutamik asitin N-metil-D- aspartat (NMDA) reseptörü ile etkileşimi sonucu hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının artması ile artan NO miktarı ile ilişkilidir. Hipotalamusta NO, kortikotropin-releasing hormon (CRP), prolaktin – releasing faktör , büyüme hormon releasing hormon (GHRH), somatostatin, luteinleştirici hormon-RH (LHRH) salınımını uyarır. Hipotalamusta NO salınımının artışıyla, nöronal hücre ölümü meydana gelebilir ¹⁵².

2.3.2.1. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enziminin Özellikleri

NO üretimi, üç NOS isoformu tarafından argininden meydana gelir: ^{109,112,119}

- Nöronal NOS (nNOS)
- Endotelyal NOS (eNOS)
- İndüklenebilir NOS (iNOS)

Bu isoformlardan, nNOS ve eNOS Ca^{+2} - kalmodulin bağımlı formlarıdır. Aksine iNOS Ca^{+2} - kalmodulin bağımlı değildir ve patolojik uyarıya cevap olarak üretilir ^{116,119}.

nNOS ve eNOS az miktarlarda NO üretirken, iNOS ise çeşitli uyarılara cevapta yüksek miktarda NO üretir. Böylece NO hem hücrelerde koruyucu etki, hem de toksik etki gösterir. Bu olay birçok hücre tipinde meydana gelir ¹¹⁹. Beyinde patolojik uyarıya cevapta

iNOS artar. iNOS tarafından üretilen NO, beyinde diğer serbest radikallerle (örneğin süperoksit radikali ile) reaksiyona girerek reaktif nitrojen oksit türlerini; peroksinitriti (ONOO⁻) oluşturabilir. Peroksinitrit nöronlarda, mitokondriyal kompleks 2,3,4 aktivitelerini inhibe ederek hasara yol açar ^{151,153,154}. Bu reaksiyonlar normal fizyolojik koşullarda küçük miktarlarda meydana gelmesine rağmen, iNOS ekspresyonuyla patolojik koşullarda yüksek reaktif nitrojen oksit türlerinin (RNOS) meydana gelmesi, kimyasal strese neden olmaktadır. Yüksek RNOS, lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına, tirozin residülerinin nitratlanmasına neden olur ¹¹³.



Şekil 10. Nitrik Oksit Sentaz İsoformları ve Etkileri ¹⁴⁹

eNOS, santral sinir sisteminde bir çok nöronda bulunur. Serebellum, cerebral korteks, hipokampus, hipotalamusta yüksek düzeyde eksprese edilir, vasküler endoteliumda bulunur. Hücre içi kalsiyum artışı, bu enzimi aktive eder. Üretilen NO difüzyonla düz kasa geçer ve guanilat siklazı uyarır, cGMP salınımı hücre içi kalsiyum seviyelerini düşürür. Böylelikle damar düz kasları genişler. Ayrıca eNOS, damar duvarına lökosit adezyonunu, trombosit agregasyonunu ve adezyonunu inhibe eder. nNOS, santral ve periferik sinir sisteminde sentez edilerek nörotransmisyon ve hafıza oluşumunda görevlidir. Bakterial ve sitokinlerle (IL-1,2,6, TNF) ile uyarıdan sonra özellikle hepatositler, makrofajlar ve diğer immün sistem hücreleri iNOS sentezlerler. Bu enzimin kendisi kalsiyum ve kalmodulin içerdiği için son derece aktiftir ¹⁵².

Kalsiyuma bağımlı nöronal ve endotelial NOS ile üretilen NO, cGMP üzerinden anti-apoptotik etki gösterir. iNOS ile daha fazla üretilen NO ise, patolojik koşullarda apoptozisi indükler¹⁵⁵. iNOS, Santral sinir sisteminin yaşlanmasında ve nörodejeneratif sürece katkıda bulunur¹¹².

Kısa süreli tekrarlanan sistemik enfeksiyonlarda merkezi sinir sisteminde iNOS artışı, nöron ölümüne neden olarak hipokampusta hafıza zayıflığına neden olur, epifiz bezinde değişikliğe neden olarak antioksidan ve anti-aging hormon olan melatonin salınımını düşürür¹⁵².

Asimetrik N^G, N^G-dimetil-L-Arginin (ADMA); güçlü NOS inhibitörüdür. ADMA seviyeleri bazı patolojik koşullarda; hipertansiyon, ateroskleroz, hiperkolestrolemide artar. Okside NO metabolitlerinin (nitrit, nitrat) üriner atılımında ve NO'nun ikincil mesajcı olduğu koşullarda ADMA'nın azaldığı görülmüştür. Agmatin ve L-NAME (N^G-nitro-L-Arginin metil ester), NOS inhibitörüdür^{119,149}.

2.3.2.2. NO Üretimi ve Arginazın Karşılıklı Regülasyonu

Arginazlar, NOS ile aynı substratı kullandığından, NO üretimi için düzenleyicidirler¹²⁰, iNOS aktivitesini regüle ederler. NO üretiminin artması, komşu hücreler için toksiktir ve arginazlar daha fazla NO üretimini önlerler. Buna karşılık NOHA tarafından arginazların inhibisyonu^{113,142}, aktive makrofajlarda NO üretimi için yeterli arginin sağlamaktadır^{109,153}.

Arginaz II, beyinde arginin seviyelerini regüle eder, NO üretimini baskılar, NOS bağımlı apoptozisi bloke eder. NOS ekspresyonunun azalışı, beyin hücrelerinde argininin birçok amaç için kullanıldığını gösterir^{112,119,150}. Arginaz I de apoptozisi önler. Sonuç olarak hem sitozolik arginaz I hem de mitokondriyal arginaz II, NO üretiminin azalmasında etkilidir¹⁰⁹. T helper 1 (Th 1) sitokinleri (interferon γ), NO sentezini indükler ve arginazı baskılar¹¹⁹.

3. MATERYAL-YÖNTEM

Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deney Grupları

Deney hayvanları Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarından sağlanmıştır. Bilimsel araştırma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurul’undan izin alınmıştır.

Çalışmada toplam 30 adet Wistar cinsi dişi rat (ortalama 250 gr) kullanıldı ve çalışmada hayvanlar 3 eşit gruba ayrıldı :

Grup I- Kontrol grubu

Grup II- Hayvanlara 14 gün boyunca oral yolla 30mg/kg vücut ağırlığı oranında 1 ml distile suya karıştırıldı ve günlük doz ikiye bölünerek kafein verildi.

Grup III- Hayvanlara 14 gün boyunca oral yolla 100mg/kg vücut ağırlığı oranında 1 ml distile suya karıştırıldı ve günlük doz ikiye bölünerek kafein verildi.

Son uygulamadan 24 saat sonra ratlar feda edildi, kardiak kan örnekleri alındı, beyin dokuları çıkartıldı. Dokular, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra derhal sıvı azot içinde donduruldu. Kan örneklerinden ayrılan serumlar ve beyin dokuları, analiz gününe kadar - 80°C’ de saklandı. Ratların beyin dokularında lipid peroksidasyonu, nitrik oksit ve arginaz aktivitesi, serumlarında ise lipid peroksidasyonu, nitrik oksit ve TNF- α seviyeleri ölçüldü.

3.2.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 323K

Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)

Tecan Eliza okuyucu ve yıkayıcı

pH metre (Jenway)

3.3.Yöntemlerin Uygulanması

Beyin Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Beyin doku örneklerinde enzim aktivitesi ölçüleceği zaman dokular derin dondurucudan çıkartıldı ve 1/10 oranında 0.01 M Tris-HCl (pH=7.4) tamponda, buz içinde, soğukta homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlardan arginaz aktivitesi, doku malondialdehit, doku protein ve doku nitrit + nitrat tayini yapıldı ¹⁵⁶.

3.3.1. Beyin Dokusu Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Farklı tipteki doku örneklerinde arginaz aktivitesinin ölçümü için bir çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler için ölçüm; arginin konsantrasyonundaki azalmanın veya üre konsantrasyonundaki artmanın ölçülmesi esasına dayanır. Bu çalışmada beyin dokusu arginaz aktivitesi Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre (T.D.M.U) yöntemi ile ölçülmüştür. T.D.M.U yöntemi kolorimetrik olarak üre düzeyini ölçen bir metottur ¹⁵⁷.

Kullanılan Reaktifler

1. *Renk ayırıcı* : Bu ayıraç 0.0036 M tiyosemikarbazid (TSC) ile 0.0617 M diasetilmonoksimin (DAM) bir karışımını içermektedir. Bu amaçla 0.623 g DAM ve 0.0328 TSC bir miktar distile suda çözülüp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Renk ayırıcı koyu renkli şişede ve oda ısısında uzun süre saklanabilir.

2. *Asit karışımı* :

a)- 1.95 g FeCl_3 (0.12 M) bir miktar distile suda çözüldü, üzerine 66.7 ml % 85'lik (v/v) H_3PO_4 ilave edildi ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan Demir III klorür çözeltisi oda ısısında saklanır.

b)- % 20'lik (v/v) H_2SO_4

Asit karışımı : 999 ml sülfürik asit çözeltisi (b) üzerine 1 ml demir III klorür çözeltisi (a) ilave edilerek hazırlandı. Bu karışım oda ısısında saklanır.

3. *2.5 mM Mangan II Klorür Çözeltisi*: 0.247 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözüldü ve son hacim 500 ml'ye tamamlandı. Bu karışım buzdolabında saklanır.

4. *40 mM Arginin HCl (Substrat Çözeltisi)*: 0.842 g L-Arginin HCl bir miktar distile suda çözüldükten sonra NaOH ile pH 9.6'ya ayarlandı ve distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Bu karışım buzdolabında saklanır.

5. *Karbonat Tamponu* (40 mM Na₂CO₃ / NaHCO₃, pH: 9,6): Bu tampon buzdolabında saklanır.

6. *Üre Standartı* (0.1 µ M üre /ml) : 3 mg üre 100 ml 0.016 M benzoik asit içinde çözüldü. Bu standart buzdolabında saklanır Deney aşamasında 3 mg/dl olan üre çözeltisi 1/5 oranında sulandırılarak 0.1 µmol /ml (0.6 mg/dl) üre standardı elde edildi. Daha sonra konsantrasyonları 0,3-3mg/dl arasında değişen standartlar hazırlandı.

Arginaz Aktivitesinin Ölçümü

Enzim aktivite tayini için vida kapaklı cam tüpler kullanılmıştır. Deney tüpleri ; her numuneye ait inkübasyon tüpleri, her numuneye ait sıfır zaman tüpleri, standart ve kör tüpleri olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Bütün örnekler çift olarak çalışılmıştır.

Deneyin yapılışı ;

Reaktifler	İnkübasyon tüpleri	Standart tüpler	Kör	Sıfır Zaman tüpleri
Arjinin-HCl	0,4 mL	-	-	0,4 mL
Karbonat Tamponu	0,4 mL	-	-	0,4 mL
Üre standartı	-	0,2 mL	-	-
Distile su	-	0,8mL	1 mL	-

Beyin süpernatantları oda ısısına getirilmiş 2.5 mM MnCl₂ çözeltisi ile 1/3 oranında dilüe edilerek enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu **enzim kaynağı** 55°C su banyosunda 20 dakika preinkubasyona bırakılmıştır.

Preinkubasyon sonunda enzim kaynağı, inkübasyon tüpleri ve sıfır zaman tüpleri 37°C’de 3 dakika bekletilerek tüplerin aynı ısıya gelmesi sağlanmıştır.

	İnkübasyon tüpleri	Standart tüpler	Kör	Sıfır Zaman tüpleri
Enzim kaynağı	0,2 mL	-	-	-
İnkübasyon tüpleri daha sonra 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre içinde enzim kaynağından sıfır zaman tüplerine de 0,2 mL pipetlenmiştir.				
Enzim kaynağı	-	-	-	0,2 mL
Enzim kaynağından sıfır zaman tüplerine 0,2 mL eklendikten sonra üzerlerine hemen asit karışımından 3 mL pipetlenmiştir.				
37°C’de 30 dakika inkübasyonun sonunda İnkübasyon tüplerine hemen 3 mL asit karışımı eklenip reaksiyon durdurulmuştur.				

Standart ve kör tüplerine de 3 ml asit karışımı ilave edilmiştir.

Bütün tüplere (inkübasyon tüpleri, sıfır zaman tüpleri, standart, kör) 2 ml renk ayırıcı ilave edilerek tüplerin ağzı kapatılmış ve iyice karıştırılmıştır.

Bütün tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilerek reaksiyonun tamamlanması sağlanmıştır. Daha sonra bütün tüpler 5 dakika buzlu su banyosunda bekletilmiştir.

Bu sürenin sonunda 520 nm’de inkübasyon tüpleri, sıfır zaman tüpleri ve standart tüplerin absorbansları köre karşı okunmuştur.

Enzim aktivitesinin hesaplanması

Her inkübasyon tüpünün absorbansından o tüpe ait sıfır zaman tüpünün absorbansı çıkarılarak net absorbanslar elde edilmiştir. Örneklere ait protein değerleri Lowry yöntemi ile ölçülmüş ve mg/ml olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada 1 ünite enzim aktivitesi ; 1 saatte 37°C’de L-Argininden 1µM üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesi 1 ünite enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır.

Enzim aktivitesi şu şekilde hesaplanmıştır:

Numune Net Absorbans

x

üre standart konst (0,1µmol/ml)

x

EKD

x

DD

x

2

Standart Absorbans

Protein Miktarı (mg/ml)

EKD : Enzim Kaynağının MnCl₂ ile dilüsyonu

DD: Deney sırasında standart ve örneklerin dilüsyonu

* Deney sırasında örnekler 37°C’de 30 dakika inkube edildikleri için sonuçlar 2 ile çarpılmış ve enzim aktivitesi; **Unite/ mg protein / saat** (µmol üre / mg protein / saat) olarak hesaplanmıştır.

3.3.2. Lowry Protein Tayini (Doku protein tayini) ¹⁵⁸

Kullanılan Reaktifler

% 2’lik Na₂CO₃ içinde 0,1 N’lik NaOH (A1)

%2’lik Na-K tartarat (B1)

%1’lik CuSO₄ (B2)

Folin ciocalteu’s fenol reaktifi

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 reaktifi (F.c); 1 hacim F.c. + 1 hacim distile su

Deneyin yapılışı :

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

Deney tüpleri vortekslendikten sonra, 15 dakika bekletildi. Daha sonra deney tüplerine 200 µl folin reaktifi eklenerek iyice vortekslendi ve 1 saat karanlıkta bekletildi. Tüpler 750 nm’de köre karşı okundu.

Hesaplama:

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

Sonuçlar mg/ml olarak hesaplandı.

3.3.3. Beyin Dokusu Malondialdehit (MDA) Analizi

Doku MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının ¹⁵⁹ tarif ettiği yönteme göre tayin edildi. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bağlanmasından sonra örnekte bulunan MDA’nın ortam pH’sı 3,5 olduğu koşullarda tiobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

Kullanılan Reaktifler

% 8,1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ; distile su içinde hazırlandı

% 0.8 Tiobarbitürik asit (TBA) ; distile su içinde hazırlandı

% 20 Asetik asit ; distile su içinde hazırlandı (NaOH ile pH=3,5’a ayarlandı)

n-butanol/ piridin (15:1 v/v)

Deneyin yapılışı ;

	NUMUNE T�PLER�	STANDART T�PLER�
Standartlar (5-20 nmol/mL)	-	50 �L
Distile su	150 �L	150 �L
Doku s�pernatanı	50 �L	-
SDS	50 �L	50 �L
TBA	375 �L	375 �L
Asetik asit	375 �L	375 �L

Elde edilen karışım 60 dakika, 95 °C’de su banyosunda kaynatıldı ve hemen soğutularak tüm tüplere 250 µl distile su ve 1,250 ml n-butanol/ piridin (15/1 v/v) karışımı eklendi. Daha sonra 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip üst faz 532 nm.’de n-butanole karşı okundu.

MDA standart olarak 1,1,3,3 tetrametoksi propan kullanılarak standart grafik elde edildi ve örneklerin absorbans değerlerinin nmol cinsinden MDA miktarı saptandı. Sonuçlar “nmol/g yaş doku” cinsinden belirlendi.

3.3.4. Serum (Malondialdehit) MDA Analizi:

Serum MDA düzeyleri Yoshioka ve arkadaşlarının tarifledikleri yöntemle göre analiz edildi. Yöntemin temel ilkesi serumdaki proteinlerin trikloroasetikasit (TCA) ile çöktürülmesinden sonra MDA’nın TBA ile oluşturduğu kompleksin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanır¹⁶⁰.

Kullanılan Reaktifler

% 20 TCA ; distile su içinde hazırlandı

% 0,67 TBA ; distile su içinde hazırlandı

n-butanol

MDA standardı olarak 1,1,3,3 tetrametoksi propan (5–20 nmol / ml arasındaki konsantrasyonlarda hazırlandı) kullanıldı.

Deneyin yapılışı ;

	NUMUNE TÜPLERİ	STANDART TÜPLERİ
Standartlar (5-20 nmol/mL)	-	250 µL
Serum örnekleri	250 µL	-
TCA	1,250 mL	1,250 mL
TBA	500 µL	500 µL
Elde edilen karışım 30 dakika, 95 °C’de su banyosunda kaynatıldı ve hemen soğutuldu.		

Tüm tüplere 2 ml n-butanol eklendi ve 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz 532 nm’de n-butanole karşı okundu. MDA standartlarından standart grafik elde edildi ve numunelerin absorbans değerlerinin “nmol/ml” cinsinden MDA miktarı tespit edildi.

3.3.5. Serumda Nitrit + Nitrat Analizi (NO_x)

Serum örneklerdeki nitratın varlığı nitrat redüktaz ile (NADPH ve FAD ile birlikte) nitrite çevrilir. Nitrit ise griess reaktifi (Sulfanilamid ve N- naftiletilendiamin-di HCl) ile reaksiyona girerek pembe renk oluşturur^{161,162}.

Kullanılan Reaktifler

100mM Fosfat tampon (KH_2PO_4 / K_2HPO_4 ; pH 7.5)

2 mM NADPH

50 μM FAD

Aspergillus nitrat redüktaz (1 unit/ml)

0.2 M ZnSO_4

2 M NaOH

% 1 Sulfanilamid

% 1 N- naftiletilendiamin-di HCl

Sodyum nitrit standartı (100 μM)

Deneyin yapılışı ;

	NUMUNE TÜPLERİ	STANDART TÜPLERİ	KÖR
Standartlar	-	300 μL	-
Distile su	-	-	300 μL
Serum örnekleri	300 μL	-	-
Fosfat tamponu	300 μL	300 μL	300 μL
NADPH	50 μL	50 μL	50 μL
FAD	50 μL	50 μL	50 μL
Aspergillus Nitrat redüktaz	50 μL	50 μL	50 μL

Elde edilen karışım oda sıcaklığında 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda proteinleri çöktürmek amacıyla tüplerin üzerlerine 500 µl 0.2 M ZnSO₄ ve 70 µl 2 M NaOH eklenerek iyice karıştırıldı ve 3000 x g 'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki berrak sıvıdan 0.75 ml alınarak üzerlerine 1 ml % 1 sülfanilamid ilave edildi ve 10 dakika oda ısısında bekletildi. Ardından 0.75 ml % 1 N- naftiletilendiamin-di HCl ilave edildi. Serum örnekleri, oluşan pembe rengin şiddetine göre kolorimetrik olarak 550 nm'de köre karşı okundu.

Serum NO_x hesabı için, sodyum nitrit standartlarından standart grafik elde edildi ve örneklerin sonuçları 'µmol/L' cinsinden tespit edildi.

3.3.6. Beyin Dokusunda Nitrit + Nitrat Analizi (NO_x)

Nitrojen monoksit, dokularda nitrit yolu ile meydana getirilir. Örneklerdeki nitratin varlığı nitrat redüktaz ile (NADPH ve FAD ile birlikte) nitrite çevrilir ¹⁶². Nitrit ise griess reaktifi (Sulfanilamid ve N- naftiletilendiamin-di HCl) ile reaksiyona girerek pembe renk oluşturur ^{162,163,164}.

Doku NO_x tayini için süpernatantlardan 300 µl alınarak serum nitrit + nitrat yöntemi gibi çalışıldı. Doku NO_x hesabı için, sodyum nitrit standartlarından standart grafik elde edildi ve örneklerin sonuçları "µmol/g doku" cinsinden tespit edildi.

3.3.7. Serumda TNF- α Tayini

Serumda TNF- α tayini, Biosource Elisa (Biosource International, USA) kiti ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar pg/ml olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

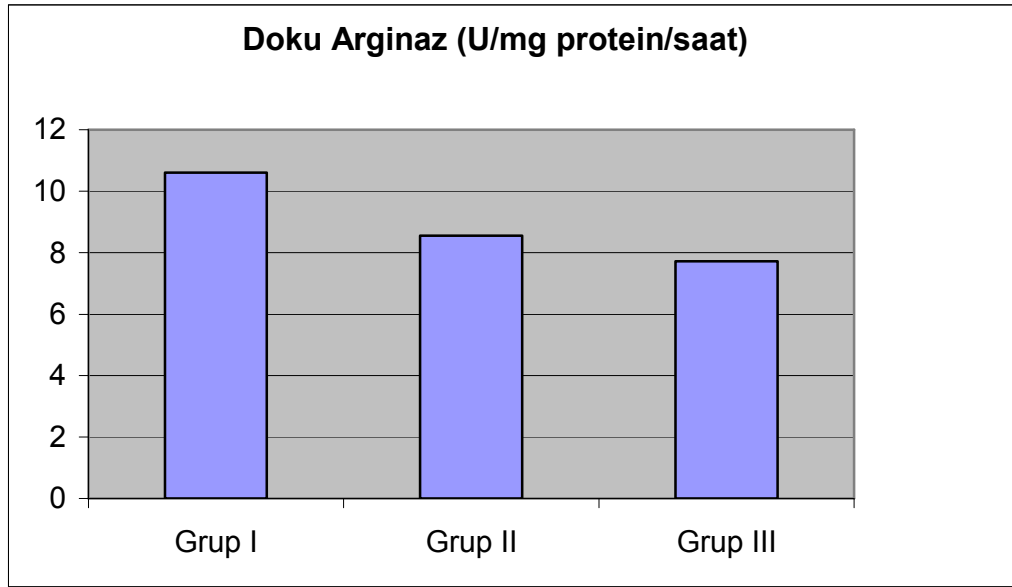
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 11.0 istatistik paket programı ile yapılmıştır. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann-Whitney U testi ve spearman korelasyon testi kullanılmıştır. P<0.001, p<0,005 ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm gruplara ait doku arginaz aktivesi (U/mg protein/saat), doku MDA (nmol/g doku), serum MDA (nmol/ml), doku NO (µmol/g doku), serum NO (µmol/L) düzeylerinin istatistiksel sonuçları (ortalama±standart hata) tablo 3’de sunulmuştur.

Tablo 3. Tüm gruplara ait istatistiksel sonuçlar ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

	Arginaz (U/mg protein /saat)	Doku MDA nmol/g doku	Serum MDA (nmol/ml)	Doku NO (µmol/g doku)	Serum NO (µmol/L)
Grup I Kontrol Grubu N=10	10,61±1,04	59,00±13,67	8,86±2,38	9,80±1,75	28,54±3,42
Grup II 30mg/kg kafein Grubu N=10	8,55±1,56	40,99±6,04	6,28±1,05	15,40±3,34	35,30±6,13
Grup III 100mg/kg kafein Grubu N=10	7,72±1,06	34,73±6,24	5,93±0,82	14,20±3,04	37,56±4,86

4.1. Beyin Dokusu Arginaz Aktiviteleri

Beyin dokusu arginaz aktivitesi için kontrol grubu (grup I) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup II) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,014$; $p<0,05$). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup III) ile karşılaştırdığımızda ise aralarında ($p=0,00$; $p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Ancak grup II ile grup III arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu ($p>0,05$).



Grafik 1. Tüm gruplara ait doku arginaz aktivite (U/mg protein/saat) düzeyleri ortalama olarak verilmiştir

Tablo 4. Gruplar arası doku arginaz aktivitesine ait istatistiksel sonuçlar

Grup	n	Arginaz Ort ± SD median	P değeri
Grup I	10	10,61±1,04 10,20	0,014 ^a
Grup II	10	8,55±1,56 8,65	0,325 ^b
Grup III	10	7,72±1,06 7,65	0,000 ^c

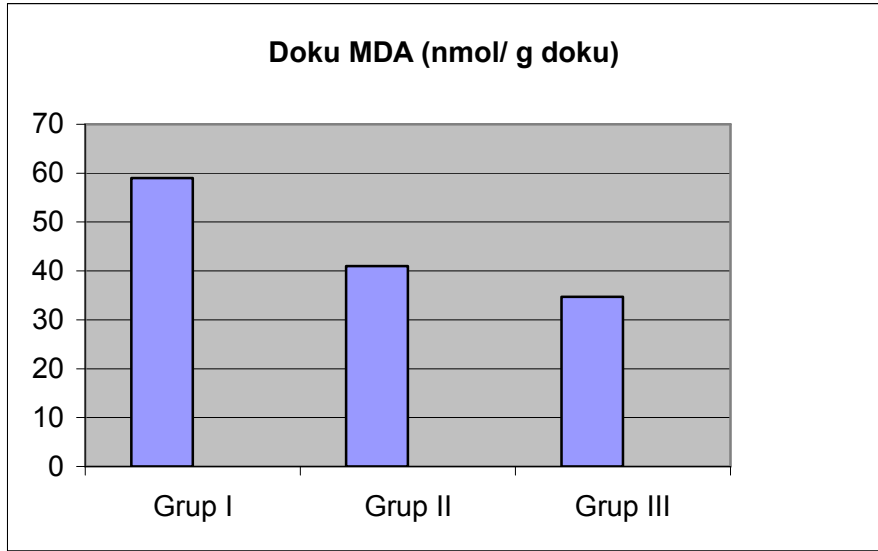
$p=0,014$ ^a grup I ile grup II karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

$p=0,325$ ^b grup II ve grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

$p=0,000$ ^c grup III ve grup I karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

4.2. Beyin Dokusu MDA Düzeyleri

Beyin dokusu MDA düzeyleri için kontrol grubu (grup I) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup II) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,001$; $p<0,005$). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup III) ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p=0,00$; $p<0,001$) istatistiksel olarak önemli fark bulundu. Grup II ile grup III arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edildi ($p=0,037$; $p<0,05$).



Grafik 2. Tüm gruplara ait doku MDA (nmol/g doku) düzeyleri ortalama olarak verilmiştir

Tablo 5. Gruplar arası doku MDA düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar

Grup	n	Doku MDA Ort $\pm$ SD median	P değeri
Grup I	10	59,00 $\pm$ 13,67 55,90	0,001 ^a
Grup II	10	40,99 $\pm$ 6,04 41,70	0,037 ^b
Grup III	10	34,73 $\pm$ 6,24 33,20	0,000 ^c

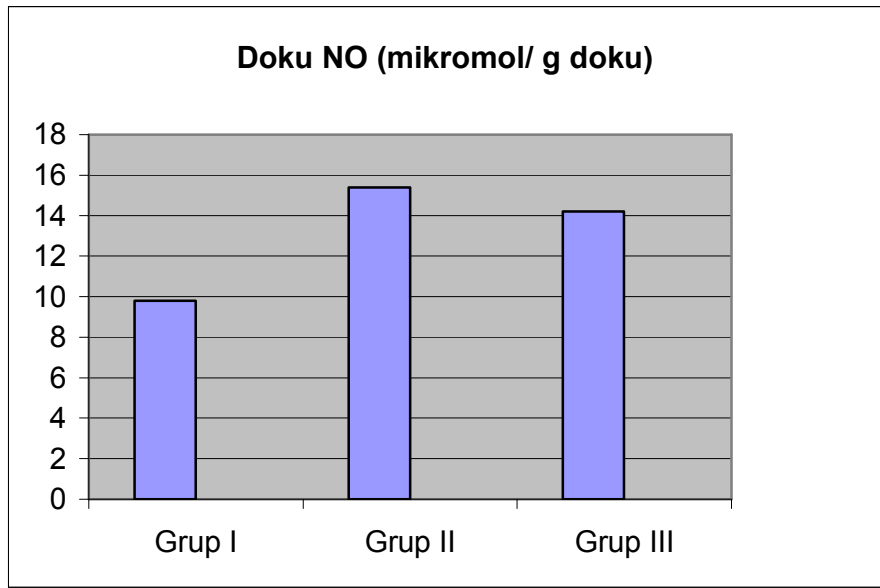
$p=0,001$ ^a grup I ile grup II karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

$p=0,037$ ^b grup II ve grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

$p=0,000$ ^c grup III ve grup I karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

4.3. Beyin Dokusu NO Düzeyleri

Beyin dokusu NO düzeyleri incelendiğinde kontrol grubu (grup I) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup II) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,001$; $p<0,005$). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup III) ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p=0,002$; $p<0,005$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Ancak grup II ile grup III karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı istatistiksel fark tespit edilemedi ($p>0,05$).



Grafik 3. Tüm gruplara ait doku NO ($\mu\text{mol/ g doku}$) düzeyleri ortalama olarak verilmiştir

Tablo 6. Gruplar arası doku NO düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar

Grup	n	Doku NO Ort $\pm$ SD median	P değeri
Grup I	10	9,80 $\pm$ 1,75 9,65	0,001 ^a
Grup II	10	15,40 $\pm$ 3,34 15,80	0,447 ^b
Grup III	10	14,20 $\pm$ 3,04 14,00	0,002 ^c

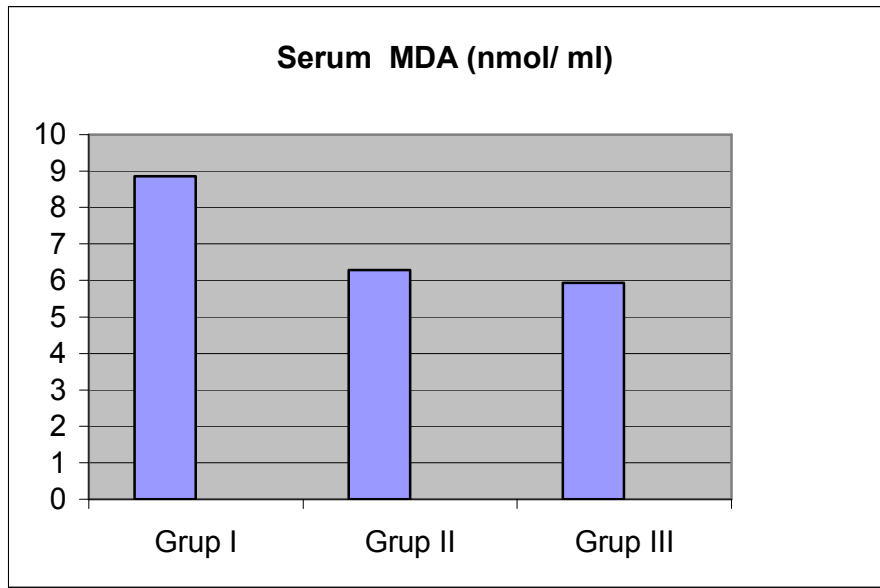
$p=0,001$ ^a grup I ile grup II karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

$p=0,447$ ^b grup II ve grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

$p=0,002$ ^c grup III ve grup I karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

4.4. Serum MDA Düzeyleri

Araştırmamızdaki ratların serum MDA düzeyleri ele alındığında kontrol grubu (grup I) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup II) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,011$; $p<0,05$). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup III) ile karşılaştırdığımızda ise aralarında ($p=0,003$; $p<0,005$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Ancak grup II ile grup III karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı istatistiksel fark yoktu ($p>0,05$).



Grafik 4. Tüm gruplara ait serum MDA (nmol / ml) düzeyleri ortalama olarak verilmiştir

Tablo 7. Gruplar arası Serum MDA düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar

Grup	n	Serum MDA Ort ± SD median	P değeri
Grup I	10	8,86±2,38 8,95	0,011 ^a
Grup II	10	6,28±1,05 6,40	0,363 ^b
Grup III	10	5,93±0,82 5,90	0,003 ^c

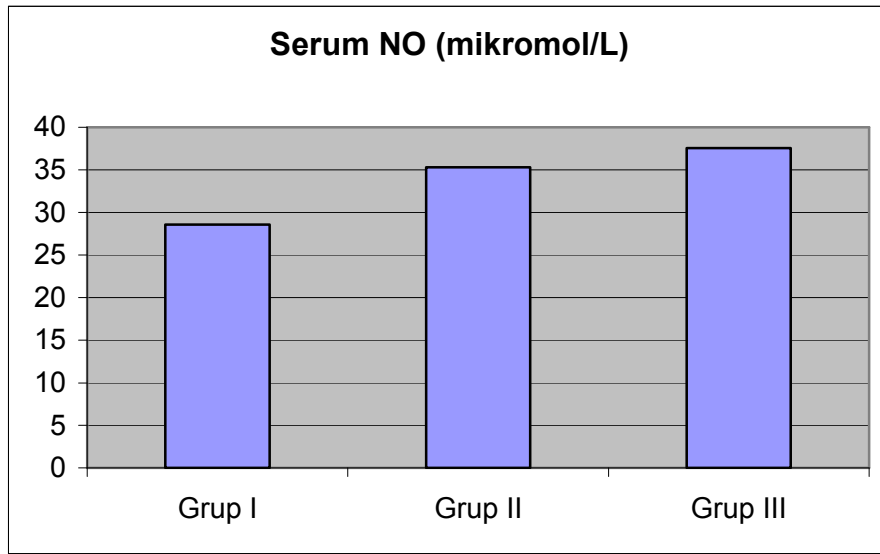
$p=0,011$ ^a grup I ile grup II karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

$p=0,363$ ^b grup II ve grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

$p=0,003$ ^c grup III ve grup I karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

4.5. Serum NO Düzeyleri

Ratların serum NO düzeyleri incelendiğinde kontrol grubu (grup I) ile 30 mg/kg doz kafein grubu (grup II) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,014$; $p<0,05$). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup III) ile karşılaştırdığımızda ise aralarında ($p=0,001$; $p<0,005$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Ancak grup II ile grup III karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı istatistiksel fark yoktu ($p>0,05$).



Grafik 5. Tüm gruplara ait serum NO ($\mu\text{mol} / \text{L}$) düzeyleri ortalama olarak verilmiştir

Tablo 8. Gruplar arası Serum NO düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar

Grup	n	Serum NO Ort $\pm$ SD median	P değeri
Grup I	10	28,54 $\pm$ 3,42 27,90	0,014 ^a
Grup II	10	35,30 $\pm$ 6,13 36,70	0,226 ^b
Grup III	10	37,56 $\pm$ 4,86 38,95	0,001 ^c

$p=0,014$ ^a grup I ile grup II karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

$p=0,226$ ^b grup II ve grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

$p=0,001$ ^c grup III ve grup I karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

4.6. Serum TNF- α Düzeyleri

Araştırmamızda ratların serum TNF- α değerleri de incelendi ve TNF- α düzeylerine bakıldığında gruplar arasında önemli istatistiksel fark bulunmadı ($p=0.052$; $p>0,05$). Tüm gruplara ait serum TNF- α düzeylerinin ortalama değer ve standart hataları tablo 9’ da belirtilmiştir.

Tablo 9. Tüm gruplara ait serum TNF- α düzeyleri, ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

Gruplar	Serum TNF- α (pg/ml)
	Ort $\pm$ SD
Grup I	38,10 $\pm$ 18,70
Grup II	25,30 $\pm$ 18,10
Grup III	47,78 $\pm$ 20,25

4.7. Spearman Korelasyon Analizi

Parametreler arasındaki korelasyonu incelemek amacıyla yaptığımız spearman korelasyon analizi tablo 10’da gösterilmiştir.

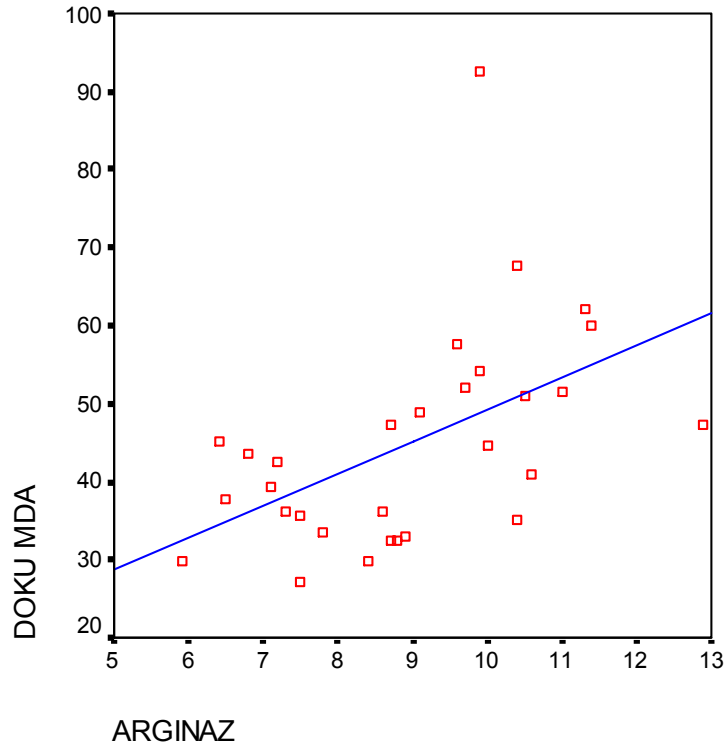
Tablo 10. Spearman korelasyon analizi sonuçları

Parametreler	r ve p değerleri				
	Arginaz	Doku MDA	Doku NO	Serum MDA	Serum NO
Arginaz	---	r: 0,578** P: 0,001	r: -0,489** P: 0,006	r: 0,417* P: 0,022	r: -0,387* P: 0,034
Doku MDA	r: 0,578** P: 0,001	---	r: -0,507** P: 0,004	r: 0,592** P: 0,001	r: -0,614** P: 0,000
Doku NO	r: -0,489** P: 0,006	r: -0,507** P: 0,004	---	r: -0,314 P: 0,091	r: 0,400* P: 0,028
Serum MDA	r: 0,417* P: 0,022	r: 0,592** P: 0,001	r: -0,314 P: 0,091	---	r: -0,550** P: 0,002
Serum NO	r: -0,387* P: 0,034	r: -0,614** P: 0,000	r: 0,400* P: 0,028	r: -0,550** P: 0,002	---

** güçlü korelasyon

* zayıf korelasyon

Spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre Arginaz aktivitesi ile Doku MDA düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Arginaz aktivitesi azalırken doku MDA düzeyleri de korele bir şekilde azalmıştır.

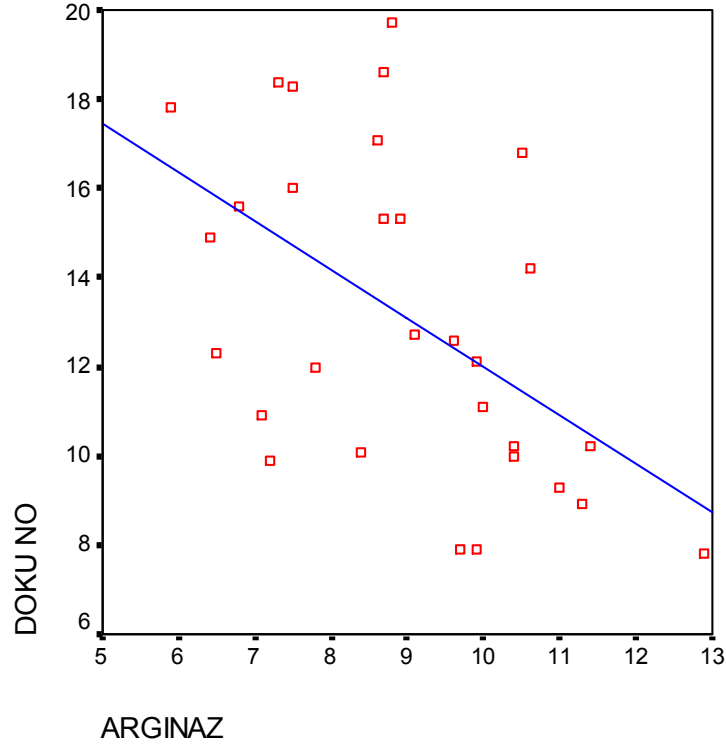


Grafik 6. Arginaz aktivitesi ile Doku MDA düzeyleri arasındaki korelasyon

r: 0,578**
P: 0,001

Arginaz aktivitesi ile Doku NO düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur.

Arginaz aktivitesi azalırken doku NO düzeyleri ise artmıştır.

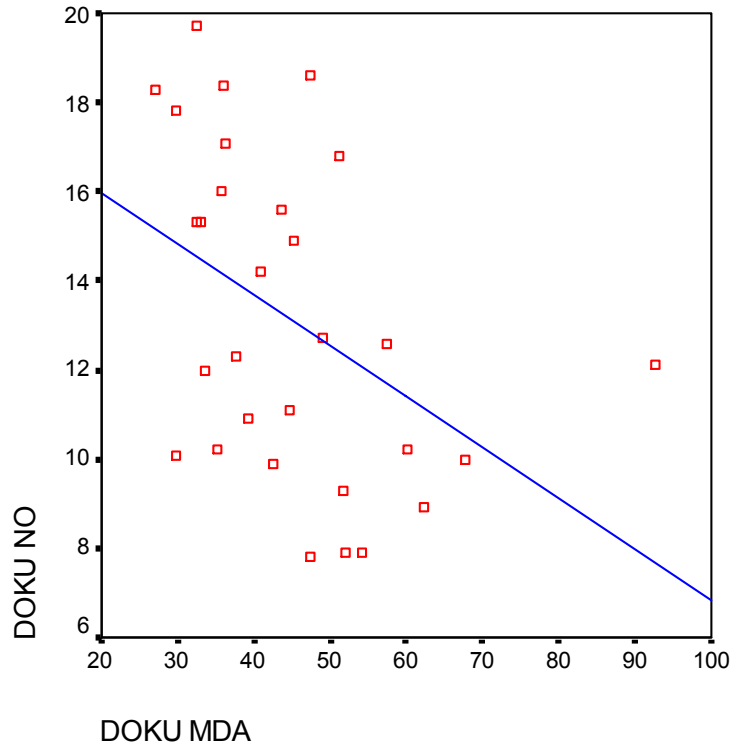


Grafik 7. Arginaz aktivitesi ile Doku NO düzeyleri arasındaki korelasyon

r: -0,489 **

P: 0,006

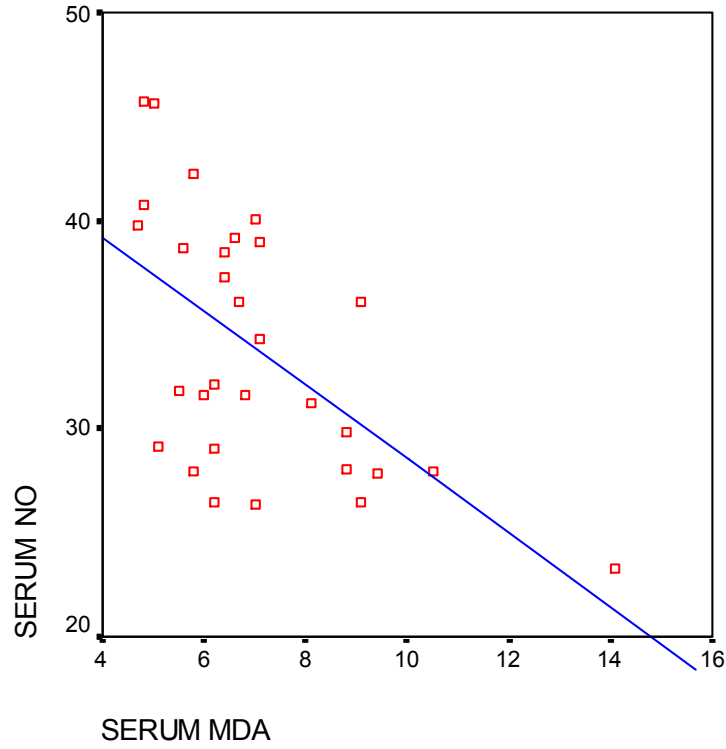
Doku MDA ile Doku NO düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Doku MDA düzeyleri azalırken doku NO düzeyleri artış göstermiştir.



Grafik 8. Doku MDA düzeyleri ile Doku NO düzeyleri arasındaki korelasyon

r: -0,507 **
P: 0,004

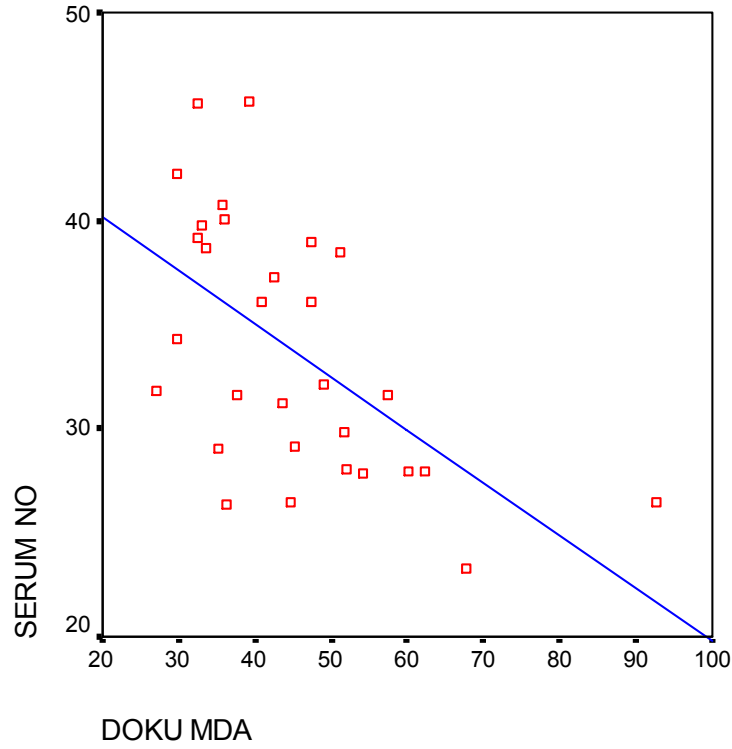
Serum MDA ile serum NO düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Serum MDA düzeyleri azalırken serum NO düzeyleri artmıştır.



Grafik 9. Serum MDA düzeyleri ile serum NO düzeyleri arasındaki korelasyon

r: -0,550**
P: 0,002

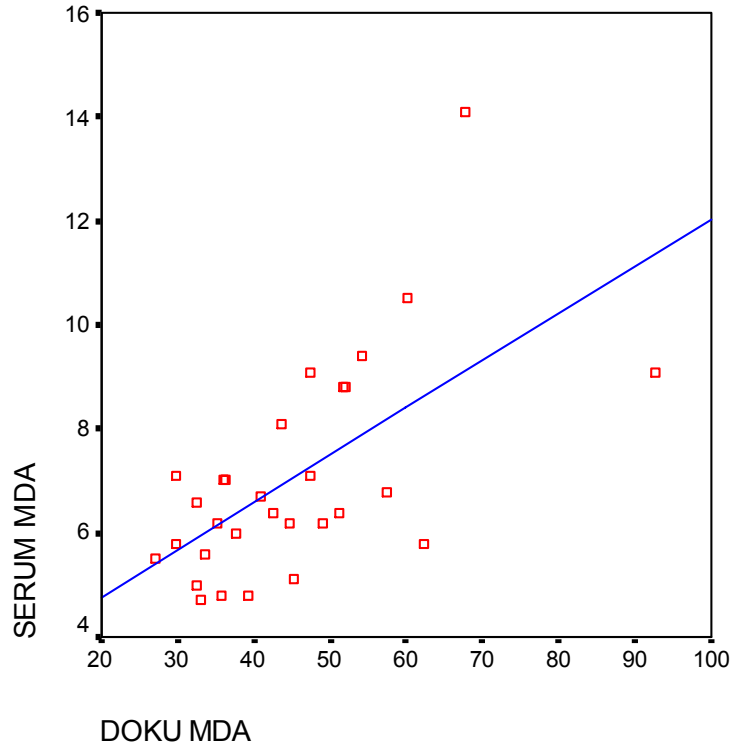
Doku MDA ile serum NO düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Doku MDA düzeyleri azalırken serum NO düzeyleri artmıştır.



Grafik 10. Doku MDA düzeyleri ile serum NO düzeyleri arasındaki korelasyon

r: -0,614**
P: 0,000

Doku MDA ile serum MDA düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Doku MDA düzeyleri azalırken serum MDA düzeyleri de korele bir şekilde azalmıştır.



Grafik 11. Doku MDA düzeyleri ile serum MDA düzeyleri arasındaki korelasyon

$r: 0,592^{**}$
 $P: 0,001$

5. TARTIŞMA

Kafein, doğal olarak metilksantin bileşiminden oluşur ve diyetle alınarak, insan dolaşımında μM konsantrasyonlarda bulunur ²⁰. Santral sinir sistemini uyaran kafein ve diğer metilksantinler, çoğunlukla içeceklerde ve yiyeceklerde, bazı ilaç preparatlarında, adale gevşeticisi ve ağrı kesici etkiyi güçlendirici olarak da kullanılırlar ³.

Kafeinin başlıca etkileri : lokomotor aktiviteyi artırır, yağ hücrelerinde norepinefrin artışıyla indüklenen lipoliz sonucu doku yağ seviyelerini ve vücut yağ depolarını azaltır, kas kütlesini artırır ²¹, hücrel cAMP düzeylerini artırır, beyinde adenosin reseptörlerinin antagonistidir, sitozolik Ca^{+2} seviyelerinin yükseltilmesinde etkilidir ²⁰, ayrıca kardiyak kası uyarır, diüretiktir ¹⁴.

Kafeinin, normal dozlarda kendini kötü hissetmeyi ve baş dönmesini azalttığı, zihinsel uyanıklık verdiği bildirilmiştir. Yüksek dozlarda sinirliliği indüklediği ve uykusuzluk yaptığı, aşırı dozlarda ise kasılmalar görülebileceği açıklanmıştır ⁴. Yüksek miktarlarda kafein tüketen insanlarda osteoporoz, metal absorpsiyonu, salınımı, böbrekten ve barsaktan geri emilimi ile ilgili problemler, demir eksikliği anemisi geliştiği belirtilmektedir ¹.

Oral yolla alınımından sonra kafein, hızla ve hemen hemen tamamen gastrointestinal sistemden emilerek 30-120 dakika sonrasında, plazmada en yüksek düzeyine ulaşır. Yetişkinlerde kafein için kan-beyin bariyeri bulunmamaktadır ve plazmada en yüksek konsantrasyona ulaştıktan sonra, beyinde en az bir saat kafein konsantrasyonu değişmeden kalır ^{6,8,17}.

Düşük doz etanol ve kafein (10mg/kg) bileşiminin (kafeynol), ratlarda distal fokal iskemiden sonra oluşan hasara karşı, beynin kortikal bölgelerini koruduğu belirtilmiştir. Etanolün tek başına felci daha kötü etkilemesine karşın, kafein ile birlikte kortikal nöronlara koruma sağladığı bildirilmiştir ^{165,166}.

Kronik düşük doz (10 mg/kg) kafein tedavisinin ratlarda iskemik beyin hasarını ve global iskemiye azalttığı belirtilmiştir. Kronik kafeinin bu nöroprotektif etkisinin nedeni ; onun adenosin reseptör yolundaki inhibitör etkisi ve adapte etme yeteneği olduğu düşünülmektedir. Akut düşük doz teofilin ratlarda, serebral hipoksi-iskemiden sonraki beyin hasarını azaltır. Kafein ve onun metabolitlerinin iskemi tedavisinde doza ve uygulamaya, iskeminin modeline bağlı olarak farklı etkileri olabileceği gösterilmiştir ⁵.

Beyinde L- Arginin metabolizması, beyinin normal fonksiyonları için oldukça önem taşımaktadır. Arginin metabolizması arginaz aktivitesine, argininosüksinat sentetaz, arginin dekarboksilaz ve nitrik oksit sentaz aktivitesine bağımlıdır. Bu enzimlerin aktivitelerinin değişmesi hücrelerdeki argininin metabolik geleceğini etkiler ²⁵.

Çalışmamızda, kafein verilen grupların beyin dokusu arginaz aktivitelerinin, kafein verilmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gösterdiğini tespit ettik. Kafein verilen grupları da kendi aralarında karşılaştırdığımızda ise grup III'ün (100mg/kg doz kafein grubu) değerleri, grup II'den (30mg/kg doz kafein grubu) daha düşük bulunmasına rağmen, grup II ile grup III arasında anlamlı istatistiksel fark bulunamadı.

Kafein ve arginaz arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, beyinde arginazın önemli derecede düştüğü ^{25,167} belirtilmektedir.

Nikolic ve ark. ²⁵ kafeinin beyinde L-arginin metabolizmasını etkilediğini açıklamışlardır. Çalışmada ratlara içme suyuna (3 gün, 2mg/ml) kafein eklenmiş ve sonrasında ise aynı ratlara doz arttırılarak (7 gün, 4mg/ml) içme suyuna kafein eklenmiştir. Kafeinin, beyinde arginaz aktivitesini ve MDA seviyelerini düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Colombatto ve ark.¹⁶⁷ uzun süre kafein uygulanan ratlarda karaciğer ornitin karbamiltransferaz aktivitesinin arttığını açıklamışlardır. Sonuçta arginaz aktivitesinin 10 gün sonra beyin ve böbrekte düştüğünü, 17 gün sonra da karaciğerde düştüğünü göstermişlerdir.

Çalışmamızda, kafein verilen grupların beyin dokusu ve serum MDA seviyeleri, kafein verilmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmalar göstermiştir. Doku MDA düzeyleri için grup II ile grup III karşılaştırdığımızda ise aralarında anlamlı istatistiksel fark tespit edildi.

Çalışmamızdaki ratların serum MDA düzeyleri ele alındığında ise serum MDA düzeylerinin de kafein ile birlikte azaldığını tespit ettik. Ancak grup III'ün değerleri, grup II'den daha düşük bulunmasına rağmen, grup II ile grup III karşılaştırdığımızda, aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunamadı.

Kafein ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların bir kısmında, kafein uygulamasıyla MDA'nın önemli derecede düştüğü^{13,18,23,39} belirtilmiş, fakat yapılan çalışmaların bir kısmında ise yükseldiği^{55,168} belirtilmiştir.

Lee ve ark.¹⁸ kafeinin, fenton reaksiyonu (Fe⁺²/ H₂O₂) oluşan hidroksil radikallerini temizlediğini belirtmişlerdir. Buna ek olarak kafeinin milimolar konsantrasyonlarda, rat karaciğer mikrozomlarında lipid hidroperoksitleri azaltarak, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve kafeinin mikrozomal lipid peroksidasyonuna karşı olan bu koruyucu özelliğinin, aynı milimolar konsantrasyondaki askorbik asidin etkisinden daha güçlü olduğunu açıklamışlardır. Aynı araştırmacılar ayrıca farelerin içme suyuna (5-15 mg/kg) kafein eklenmesinin, kemik iliğinde gama ışınlarıyla indüklenen kromozomal hasarı önemli derecede düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Devasagayam ve ark.¹³ da yayınladıkları bir makalede, 1mM kafeinin rat karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyonunu düşürdüğünü ve antioksidan olarak reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulmuş hasara karşı membranları koruduğunu belirtmişlerdir.

Yukawa ve ark.²³ insanda, 7 gün boyunca günde 3 kez ve 150 ml (8 g Arabik kahve) kahve tüketiminin, serum total kolesterol, LDL kolesterol, MDA seviyelerini düşürdüğünü, Lp(a), HDL kolesterol ve trigliserid seviyelerini ise değiştirmedığını açıklamışlardır.

Moutaery ve ark.⁵⁵ deneysel kafa travması oluşturulan ratlara intraperitoneal yüksek doz (100-150 mg/kg) kafein uygulamasının, kortekste doza bağımlı olarak, lipid peroksidasyonunu arttırdığını ve oksidatif strese neden olduğunu açıklamışlardır.

Karas ve ark.¹⁶⁸ yaptıkları bir çalışmada, allil-alkol ile düşük hepatotoksisite oluşturulan ratlara kafein (150 mg/kg, oral) verilmesinin karaciğerde MDA düzeylerini yükselttiğini bildirmişlerdir.

Mukhopadhyay ve ark.³⁹ farelerde (30 gün, 20 mg/kg,) kafein uygulaması sonrasında hepatik katalaz enzimi, superoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin yükseldiğini, MDA seviyelerinin ise azaldığını açıklamışlardır.

Kısa süreli kafein uygulaması beyin arginaz aktivitesinin azalmasına, beyin MDA düzeylerinin düşmesine neden olur. Kafein tüketiminden sonra beyinde arginaz aktivitesinin zayıflaması, kafeinin cAMP seviyeleri üzerine etkisinin bir sonucu olabilir. Kafein beyinde L-arginin metabolizmasını değiştirir, bunun sonucu olarak poliamin katabolizması da etkilenir, diamin oksidaz aktivitesinde düşmeye bağlı olarak poliamin katabolizmasını azaltır²⁵.

Çalışmamızda beyin dokusu NO düzeyleri incelendiğinde, doku NO düzeyleri kafein ile birlikte yükselmiştir. Ancak grup II ile grup III karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunamamıştır.

Ratların serum NO düzeylerini incelediğimizde ise, serum NO düzeyleri de kafein verilen gruplarda artmıştır. Grup II ile grup III karşılaştırıldığında, grup III'ün değerleri, grup II'den daha yüksek bulunmasına rağmen, aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunamamıştır.

Kafein ve NO arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda ise, kafein uygulamasıyla NO'nun önemli derecede yükseldiği^{27,169-171} belirtilmektedir.

Lee ve ark.¹⁶⁹ ratların içme suyuna kafein eklenmesinin (1gün, 40mg/kg), böbrekte α 1 ve β 1 Na^+/K^+ -ATP az aktivitelerini düşürdüğünü, endotelial NOS ekspresyonu artırarak böbrekte NO_x (nitrit + nitrat) seviyelerinin yükselmesine neden olduğunu belirtmişlerdir. Kafein içeren içecekler, natriüre ve diüre ile ilişkili olarak, proksimal tübulden sodyum geri Emilimini inhibe ederler. Sodyum geri Emiliminin tübuler epitelyal hücrelerdeki esas komponenti bazolateral zarındaki Na^+/K^+ -ATP az'dır. Na^+/K^+ -ATP az, sodyum iyonlarını transport eder. Kafein; Na^+/K^+ -ATP az regulasyonunu değiştirerek natriürenin artmasına neden olur, atrial natriüretik peptit (ANP) mRNA ekspresyonunu yükselterek, böbrekte ANP aktivitesini artırır. ANP, parakrin ve otokrin olarak böbrekten sodyum ve su çıkışında önemli rol oynar. Kafein, uriner olarak sodyum, potasyum, inorganik fosfat, magnezyum ve kalsiyum atılımını artırır. Natriüreye ve diüreye sebep olur. Tübuler sodyum geri Emilimi 2 aşamada meydana gelmektedir: bazolateral membrandaki Na^+/K^+ -ATP az aktivitesiyle ve luminal membrandaki Na^+/H^+ değişimiyle. Kafein ile birlikte hem Na^+/K^+ -ATP az aktivitesi düşer hem de Na^+/H^+ değişimi azalır.

Hashiguchi ve ark.²⁷ kafeinin beyinde NO üretimini etkilediğini açıklamışlardır. Çalışmada farelerin içme suyuna kafein (1-3 hafta, 0.6 mg/ml) eklenmesinin, beyin NO seviyelerinde yükselmeye neden olduğunu belirtmişlerdir.

Kayır ve ark.¹⁷⁰ Santral sinir sisteminde haberci molekül olarak sentezlenen NO'nun kafeinin lokomotor aktiviteyi artırıcı etkisine katkıda bulunuyor olabileceğini savunmaktadır. Çalışmada farelere kafein enjeksiyonundan sonra (0.5-16mg/kg) artan lokomotor aktivitenin, L-NAME (30mg/kg) ile bloke edildiği belirtilmiştir.

Alasehirli ve ark.¹⁷¹ 2005 yılında hamile ratlarda yaptıkları bir çalışmada, intraperitoneal kafein verilmesinin (21 gün, 25-50-100 mg/kg), artan dozlara uyumlu olarak plasentada NO üretiminde korele bir artış olduğunu belirtmişlerdir.

Nikolic ve ark.²⁵ yayınladıkları çalışmada, NO'nun vazodilatör ve antioksidan etkileri olduğunu ayrıca beyin fonksiyonu üzerinde önemli modölatör olarak etki ettiğini belirtmişlerdir. Arginin, adenosin ve NO'nun, antioksidan yapıda olmalarının yanı sıra lipid peroksidasyon seviyelerinin, kafeininin kendisinden de etkilenebildiğini açıklamışlardır.

Çalışmamızın bulgularını spearman korelasyon analizi yaparak değerlendirdiğimizde; doku arginaz aktivitesi ile doku MDA düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Arginaz aktivitesi azalırken doku MDA düzeyleri de korele bir şekilde azalmıştır. Arginaz aktivitesi ile Doku NO düzeyleri arasında ise negatif korelasyon bulunmuştur. Arginaz aktivitesi azalırken doku NO düzeyleri ise artmıştır.

Doku MDA ile Doku NO düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Doku MDA düzeyleri azalırken doku NO düzeyleri artış göstermiştir. Doku MDA ile serum NO düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Doku MDA düzeyleri azalırken serum NO düzeyleri artmıştır.

Serum MDA ile serum NO düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Serum MDA düzeyleri azalırken serum NO düzeyleri artmıştır. Doku MDA ile serum MDA düzeyleri arasında ise pozitif korelasyon bulunmuştur. Doku MDA düzeyleri azalırken serum MDA düzeyleri de korele bir şekilde azalmıştır.

Çalışmamızın spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre, doku arginaz aktivitelerinin azalmasıyla doku ve serum MDA seviyeleri düşmüş, buna karşılık doku ve serum NO seviyeleri yükselmiştir.

Arginazın düşme sebebini yorumlayan araştırmacılara göre kafein, beyinde adenoziyi reseptörlerinden uzaklaştırarak, serbest adenoziyi seviyelerini yükseltir. Adenoziyi; adenin, inosin ve arginazın kompetatif inhibitörüdür ²⁵.

Çalışmamızdaki ratların serum TNF- α düzeyleri incelendiğinde ise kontrol grubuyla kafein verilen gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır. Araştırılan literatür bilgilerinde, sadece kafein verilerek TNF- α seviyelerini inceleyen çalışmalara rastlanılamamıştır ancak aşağıdaki çalışmalarda görüleceği üzere, lipopolisakkarit (LPS) vs. gibi uyarıcılarla enjeksiyon sonrası kafein verilmesinin, serum TNF- α düzeylerine etkisi çalışılmıştır.

Sakamoto ve ark. 2000¹⁷² ve 2005 yılındaki¹⁷³ çalışmalarında, ratlarda LPS injeksiyonuyla artış gösteren TNF- α ve IL-6 düzeylerinin kafeinden (140 gün, % 0.62 ve % 1.36 kafein diyeti) etkilenmediğini açıklamışlardır.

Sakamoto ve ark. 2001 yılındaki¹⁴ çalışmalarında ise aynı süre ve aynı kafein diyeti uyguladıkları ratların ve kontrol gruplarının serumlarında ölçülebilir TNF- α ve IL-6 düzeyi tespit edememişlerdir. Bunun yanında LPS injeksiyonu yaptıkları kafein gruplarında ise TNF- α ve IL-6 düzeylerinde herhangi bir istatistiksel fark bulamamışlardır.

He ve ark.¹⁷⁴ ratlarda LPS injeksiyonuyla artan TNF- α ve IL-6 düzeylerinin, 2 g/kg kafein diyeti ile (14 gün) baskılandığını belirtmişlerdir.

Shin ve ark.³⁵ anti-dinitrofenil (anti-DNP) IgE ile rat peritoneal mast hücrelerinden indüklenen TNF- α üretimine, kafeinin (ip, 1-20mM) inhibitör etki yaptığını belirtmişlerdir.

Ritter ve ark.¹⁷⁵ farelerde yaptıkları bir çalışmada, kafeinin (3.75-10mM), concanavalin A (ConA, 5 μ g/ml) ile stimule edilmiş splenositlerde, artan TNF- α üretimini inhibe ettiğini açıklamışlardır.

6. SONUÇ

Çalışmamızın bulguları, kısa süreli düşük doz (30mg/kg) ve toksik olmayan yüksek doz (100mg/kg) kafein uygulamasının beyin arginaz aktivitesini azalttığını göstermektedir. Kafein alınımıyla, beyinde artan serbest adenosin düzeylerinin, arginazın aktivitesini azalttığını ve azalan arginaz aktivitesini takiben, arginin seviyelerinin arttığını, bunun sonucunda da argininin organizmada NO üretimi için yönlendiğini düşünmekteyiz.

Kafeinin bizim çalışmamızda lipid peroksidasyonunu azaltması, yapılan çalışmaların da ışığında, antioksidan olabileceği görüşünü desteklemektedir.

7. ÖZET

Metilksantin (1,3,7 trimetilksantin) olarak bilinen, insanlar tarafından geniş çapta çeşitli yiyecek ve içeceklerin (kahve, çay, çikolata gibi) bileşiminde tüketilen kafein, merkezi sinir sistemini uyarır. Araştırmacılara göre kafein, psikomotor uyarıcıdır ve bağımlılık yaparak dopaminerjik sistemi aktive eder. Oral yolla alınımından sonra kafein, hızla ve hemen hemen tamamen (%99) gastrointestinal sistem tarafından emilir ve kafeinin hidrofobik özelliği, onun bütün biyolojik zarlardan hücrelere geçmesine imkan verir.

Ratlarda yapılan çalışmalarda, kafeinin oksidan ajanlar tarafından oluşturulmuş hasara karşı, membranları koruduğu ve lipid peroksidasyonunu düşürdüğü belirtilmiştir. Ancak insanda ve ratlarda yapılan diğer bazı çalışmalarda, kafein alınımının kan basıncını yükselttiği, epinefrin salınmasını arttırdığı öne sürülmüş. Kan basıncının da günde tekrar tekrar artmasının kafein tüketimine bağlı olarak stres reaksiyonlarının yükselmesine ve lipid peroksidasyonunun da artışa neden olduğu açıklanmıştır.

Biz çalışmamızda, kafeinin rat beyinde L-arginin metabolizmasına olan etkilerini kısa süreli ve oral yolla 30mg/kg ve 100 mg/kg (toksik olmayan yüksek doz) olmak üzere iki farklı dozda inceledik. Çalışmamızda, kafein verilen grupların beyin dokusu arginaz aktivitelerinin, kafein verilmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gösterdiğini tespit ettik. Kafein verilen gruplarını da kendi aralarında karşılaştırdığımızda ise 100 mg/kg kafein grubu değerleri, 30mg/kg kafein grubu değerlerinden daha düşük görülmesine rağmen, aralarında istatistiksel önemli fark bulunmadı.

Kafein verilen grupların beyin dokusu ve serum MDA seviyeleri, kafein verilmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmalar göstermiştir. Kafein grupları arasında doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında; 100 mg/kg kafein grubu değerleri, 30mg/kg kafein grubu değerlerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmalar göstermiştir. Ancak serum MDA düzeyleri için kafein grupları arasında anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda beyin dokusu ve serum NO düzeyleri incelendiğinde, doku ve serum NO düzeyleri kafein ile birlikte yükselmiştir. Ancak kafein grupları karşılaştırıldığında, 100 mg/kg kafein grubu değerleri, 30mg/kg kafein grubu değerlerinden daha yüksek görülmesine rağmen, aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunamamıştır.

Spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre, doku arginaz aktivitelerinin azalmasıyla doku ve serum MDA seviyeleri düşmüş, buna karşılık doku ve serum NO seviyeleri yükselmiştir.

Çalışmamızdaki ratların serum TNF- α düzeyleri incelendiğinde ise kontrol grubuyla kafein verilen gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak çalışmamız, kısa süreli 30mg/kg ve 100mg/kg kafein uygulamasının beyin arginaz aktivitesini azalttığını göstermektedir. Kafein alınımla, arginaz aktivitesinin azaldığı ve azalan arginaz aktivitesiyle, arginin seviyelerinin arttığı ve bunun sonucunda da argininin organizmada NO üretimi için yönlendiğini söyleyebiliriz. Çalışmamızın sonuçları, kafeinin olası antioksidan etkilerine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır.

8. SUMMARY

Caffeine, known as methylxanthines (1,3,7 trimethylxantine), is widely consumed by people as a component of many beverages and food (such as coffee, tea, chocolate), stimulates central nervous system. According to researchers, caffeine is a psychomotor stimulant and it enhances dopaminergic activity which causes addiction. After oral administration caffeine is quickly and almost completely (99 %) absorbed by the gastrointestinal system and the hydrophobic properties of caffeine allow its passage through all biological membranes into cells.

Previous studies in rats have shown that caffeine, protects membranes against oxidative damage induced by oxidant agents and reduces lipid peroxidation. On the other hand, some researchs in rats and human have suggested that caffeine ingestion increases blood pressure and causes secretion of epinephrine. Repeated daily blood pressure elevations increase stress reactions caused by caffeine consumption and also cause an increase in lipid peroxidation.

In our study, effects of caffeine on L- arginine metabolism in short-term and orally given two different doses of caffeine as 30 mg/kg and 100 mg/kg (high non-toxic dose) in rat brain were investigated. Brain tissue arginase activity in caffeine groups decreased significantly compared by the control group. Although 100 mg/kg dose caffeine group levels were lower than 30 mg/kg dose caffeine group levels, there was no statistically significant change in the arginase activities between the caffeine groups.

The MDA levels of brain tissue and serum in the caffeine groups decreased significantly compared by the control group. There was a statistically significant decrease in tissue MDA levels between 30 mg/kg and 100 mg/kg dose caffeine groups. But there was no statistical significance between the changes in serum MDA levels of caffeine groups.

Brain tissue and serum NO levels increased significantly with caffeine administration. Although 100 mg/kg dose caffeine group levels were higher than 30 mg/kg dose caffeine group levels, there was no statistical significance in the change of NO levels between brain tissue and serum of caffeine groups.

According to the results of Spearman correlation analysis; tissue arginase activity decreased together with tissue and serum MDA levels. Consequently; tissue and serum NO levels increased.

TNF- α levels were also investigated in rat serum. There was no statistical significance in the difference of TNF- α levels between caffeine groups and control group.

In conclusion; our study indicates that brain arginase activity decreases with 30 mg/kg dose and 100 mg/kg dose of caffeine administrations. Arginase activity decreases with caffeine administration and arginine levels increase with decreased arginase activity. As a result, we can say that arginine induces to produce NO in the organism. Our findings provide strong evidences for possible antioxidant effects of caffeine.

9. KAYNAKLAR

1. Kolaylı S., Ocak M., Kucuk M., Abbasoglu R.: Does caffeine bind to metal ions? Food Chemistry, 84, 383–388 (2004).
2. Son HY., Nishikawa A., Kanki K., Okazaki K., Kitamura Y., Lee KY., Umemura T., Hirose M.: Synergistic interaction between excess caffeine and deficient iodine on the promotion of thyroid carcinogenesis in rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. Cancer Sci., 94, No. 4, 334–337 (2003).
3. Deeb SA., Moutaery KA., Arshaduddin M., Biary N., Tariq M.: Effect of acute caffeine on severity of harmaline induced tremor in rats. Neuroscience Letters, 325, 216–218 (2002).
4. Concas A., Porcu P., Sogliano C., Serra M., Purdy PH., Biggio G.: Caffeine-Induced Increases in the Brain and Plasma Concentrations of Neuroactive Steroids in the Rat. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 66, No. 1, 39–45 (2000).
5. Strong R., Grotta JC., Aronowski J.: Combination of low dose ethanol and caffeine protects brain from damage produced by focal ischemia in rats. Neuropharmacology, 39, 515–522 (2000).
6. Tanda G., Goldberg SR.: Alteration of the Behavioral Effects of Nicotine by Chronic Caffeine Exposure. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 66, No. 1, 47–64 (2000).
7. Nehlig A., Boyet S.: Dose–response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. Brain Research, 858, 71–77 (2000).
8. Fredholm BB., Battig K., Holmen J., Nehling A., Zvartau EE.: Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. Pharmacological Reviews, 51, No. 1, 84–125 (1999).
9. Ferrer I., Costell M., Grisolia S.: Lesch-Nyhan Syndrome-Like Behavior in rats from caffeine ingestion, Changes in HGPRTase activity, urea and some nitrogen metabolism enzymes. FEBS Letters, 141, No. 2, 275–278 (1982).

10. Khalil RH., Soliman MRI.:Diazepam Alters caffeine-induced effects on β -endorphin levels in specific rat brain regions. *Life Sciences*, 61, 2485-2490 (1997).
11. Bruce C., Yates DH., Thomas PS.:Caffeine decreases exhaled nitric oxide. *Thorax*, 57, 361–363 (2002).
12. Cauli O., Morelli M.:Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacology*, 16, No: 2, 63-77 (2005).
13. Devasagayam TP., Kamat JP., Mohan H., Kesavan PC.: Caffeine as an antioxidant; inhibition of lipid peroxidation induced by ROS. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1282 (1), 63-70, (1996).
14. Sakamoto W., Nishihira J., Fujie K., Iizuka T., Handa H., Ozaki M., Yukawa S.: Effect of Coffee Consumption on Bone Metabolism. *Bone*, 28, No. 3, 332–336 (2001).
15. Azam S., Hadi N., Khan NU., Hadi SM.: Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit*, 9(9), 335-330 (2003).
16. Lorist MM., Tops M.: Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain and Cognition*, 53, 82–94 (2003).
17. Dager SR., Layton ME., Strauss W., Richards TL., Heide A., Friedman SD., Artru AA., Hayes CE., Posse S.: Human Brain Metabolic Response to Caffeine and the Effects of Tolerance. *Am J Psychiatry*, 156, 229–237 (1999).
18. Lee C.: Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta*, 295, 141–154 (2000).
19. Benowitz NL., Peng M., Jacob P.: Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 74, No:5, 468-474 (2003).
20. Foukas LC., Daniele N., Ktori C., Anderson KE., Jensen J., Shepherd PR.: Direct Effects of Caffeine and Theophylline on p110 and Other Phosphoinositide 3-Kinases. Differential Effects On Lipid Kinase and Protein Kinase Activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, No:40, 37124–37130 (2002).

21. Michna L., Lu YP., Lou YR, Wagner GC., Conney AH.: Stimulatory effect of oral administration of green tea and caffeine on locomotor activity in SKH-1 mice. *Life Sciences*, 73, 1383–1392 (2003).
22. George KC., Hebbar SA.,Kale SP.,Kesavan PC.:Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of γ –irradiation. *J. Radiol. Prot.*, 19, No: 2, 171–176 (1999).
- 23.Yukawa GS., Mune M., Otani H., Tone Y., Liang M., Iwahashi H., Sakamoto W.: Effects of Coffee Consumption on Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoproteins and Serum Lipid Levels in Humans. *Biochemistry (Moscow)*, 69, No:1, 70-74 (2004).
- 24.Kamat JP.,Bloor KK.,Devasagayam TPA.,Jayashree B.,Kesavan PC.:Differential modification by caffeine of oxygen-dependent and independent effects of γ -irradiation on rat liver mitochondria. *Int. J. Radiat. Biol*, 76, No: 9, 1281-1288 (2000).
25. Nikolic J., Bjelakovic G., Stojanovic I.: Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 244, 125–128 (2003).
26. Lindaman BA., Hinkhouse MM., Conklin JL.,Cullen JJ.:The Effect of Phosphodiesterase Inhibition on Gallbladder Motility *in Vitro*. *Journal of Surgical Research*, 105, 102–108 (2002).
27. Hashiguchi W., Nagatomo I., Akasaki Y., Uchida M., Tominaga M., Takigawa M.:Influences of caffeine to nitric oxide production and zonisamide concentration in the brain of seizuresusceptible EL mice. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 55 (4), 319–324 (2001).
28. Tanuma A., Saito S., Ide I., Sasahara H., Yazdani M., Gottschalk S., Nakamoto T., Abiko Y.: Caffeine Enhances the Expression of the Angiotensin II Type 2 Receptor mRNA in BeWo Cell Culture and in the Rat Placenta. *Placenta*, 24, 638–647 (2003).
- 29.Tofovic SP, Kusaka H, Rominski B, Jackson EK.: Caffeine increases renal renin secretion in a rat model of genetic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 33 (3), 440-50 (1999).
- 30.Tofovic SP, Jackson EK.: Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 33(3), 360-6 (1999).
- 31.Tofovic SP., Kost CK., Jackson EK., Bastacky SI.:Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (fa-fa^{cp}) rats. *Kidney International*, 61(4), 1433–1444 (2000).

32. Tofovic SP., Rominski BR., Bastacky S., Jackson EK., Kost CK.:Caffeine augments proteinuria in puromycin- aminonucleoside nephrotic rats. *Ren Fail.*, 22(2),159-179 (2000).
33. Tofovic SP., Kusaka H., Jackson EK., Bastacky SI.: Renal and metabolic effects of caffeine in obese (fa/fa(cp), diabetic, hypertensive ZSF1 rats. *Ren Fail.*, 23(2), 159-73 (2001).
34. Berry NM., Rickards CA., Newman DG.: The effect of caffeine on the cardiovascular responses to head-up tilt. *Aviat Space Environ Med.*, 74(7), 725-30 (2003).
35. Shin HY., Lee CS., Chae HJ., Kim HR., Baek SH., An NH., Kim MH.:Inhibitory effect of anaphylactic shock by caffeine in rats. *Int J Immunopharmacol.*, 22(6), 411-8 (2000).
36. Ganapathi MK., Mackiewicz A., Samols D., Brabenec A., Kushner I., Schultz D., Hu SI.: Induction of C-reactive protein by cytokines in human hepatoma cell lines is potentiated by caffeine. *Biochem J.*, 269(1), 41-6 (1990).
37. Massey LK., Sutton RA.: Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. *J Urol.*, 172(2), 555- 8 (2004).
38. Van Dam RM., Feskens EJM.: Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet*, 360,1477–78 (2002).
39. Mukhopadhyay S., Mondal A., Poddar MK.:Chronic administration of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Indian J Exp Biol.*, 41(4), 283-9 (2003).
40. Ruhl CE., Everhart JE.: Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States.. *Gastroenterology*, 128(1), 24-32 (2005).
41. Martin JV., Nolan B., Wagner GC., Fisher H.: Effects of dietary caffeine and alcohol on liver carbohydrate and fat metabolism in rats. *Med Sci Monit.*,10(12), 455-61 (2004).
42. Han LK., Kai F., Okuda H.:Effects of long-term administration of caffeine on fat storage in ovariectomized rats. *Yakugaku Zasshi*, 124(11), 841-6 (2004).
43. Sullivan GW., Luong LS., Carper HT., Barnes RC., Mandell GL.:Methylxanthines with adenosine alter TNF alpha-primed PMN activation. *Immunopharmacology*, 31(1), 19-29 (1995).
44. Lane JD., Pieper CF., Phillips-Bute BG., Bryant JE., Kuhn CM.:Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home. *Psychosom Med.*, 64(4), 595-603 (2002).

45. Sondermeijer HP., Van Marle AG.J, Kamen P., Krum H.: Acute Effects of Caffeine on Heart Rate Variability. *The American Journal of Cardiology*, 90, 906-907, (2002).
46. Bandyopadhyay BC., Poddar MK: Caffeine-induced increase of adenosine deaminase activity in mammalian lymphoid organs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*,16(10),731-3 (1994).
- 47.Acquas E., Tanda G., Chiara GD.:Differential Effects of Caffeine on Dopamine and Acetylcholine Transmission in Brain Areas of Drug-naïve and Caffeine-pretreated Rats. *Neuropsychopharmacology*, 27, No:2, 182-193 (2002).
48. Murphy JA., Deurveilher S., Semba K.: Stimulant doses of caffeine induce c-Fos activation in orexin/hypocretin-containing neurons in rat. *Neuroscience*, 121, 269–275 (2003).
49. Jain NS., Hirani K., Chopde CT.: Reversal of caffeine-induced anxiety by neurosteroid 3-alpha-hydroxy-5-alpha-pregnane-20-one in rats. *Neuropharmacology*, 48, 627-638 (2005).
- 50.Prediger RDS.,Batista LC, Takahashi RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiology of Aging* , 26, 957–964 (2005).
51. Leon D., Albasanz JL., Ruiz MA., Martin M.: Chronic caffeine or theophylline intake during pregnancy inhibits A1 receptor function in the rat brain. *Neuroscience*, 131, 481–489 (2005).
52. Yacoubi ME., Ledent C., MeÂnard JF., Parmentier M., Costentin J., Vaugeois JM.:The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *British Journal of Pharmacology*, 129, 1465 – 1473 (2000).
53. Silva RS., Bruno AN., Battastini AMO., Sarkis JF., Lara DR., Bonan CD.:Acute Caffeine Treatment Increases Extracellular Nucleotide Hydrolysis from Rat Striatal and Hippocampal Synaptosomes. *Neurochemical Research*, 28, No:8, 1249–1254 (2003).
54. Garrett BE.,Griffiths R.: The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 57, No:3, 533-541 (1997).
55. Al Moutaery K., Al Deeb S., Ahmad Khan H., Tariq M.:Caffeine impairs short-term neurological outcome after concussive head injury in rats. *Neurosurgery*, 53(3), 704-11; discussion 711-2 (2003).

56. Powell KR., Iuvone PM., Holtzman SG.: The role of dopamine in the locomotor stimulant effects and tolerance to these effects of caffeine. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 69, 59-70 (2001).
57. Solinas M., Fere S., You ZB., Kubicha MK., Popoli P., Goldberg SR.: Caffeine Induces Dopamine and Glutamate Release in the Shell of the Nucleus Accumbens. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6321–6324 (2002).
58. Gasior M., Jaszyna M., Munzar P., Witkin JM., Goldberg SR.: Caffeine potentiates the discriminative stimulus effects of nicotine in rats. *Psychopharmacology*, 162 (4), 385-95 (2002).
59. Gotoh J., Kuang TY., Nakao Y., Cohen DM., Melzer P., Itoh Y., Pak H., Pettigrew K., Sokoloff L.: Regional differences in mechanisms of cerebral circulatory response to neuronal activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280, 821–829 (2001).
60. Ascherio A., Chen H.: Caffeinated clues from epidemiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 61(11 Suppl 6) , 51-4 (2003).
61. Schwarzschild MA., Xu K., Oztas E., Petzer JP, Castagnoli K., Castagnoli N., Chen JF.: Neuroprotection by caffeine and more specific A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *Neurology*, 61(Suppl 6), 55–61 (2003).
62. Yamato T., Yamasaki S., Misumi Y., Kino M., Obata T., Aomine M.: Modulation of the stress response by coffee: an in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. *Neuroscience Letters*, 332, 87–90 (2002).
63. Maia L., Mendonca A.: Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol.*, 9(4), 377-382 (2002).
64. Yazdani M., Ide K., Asadifar M., Gottschalk S., Joseph F., Nakamoto T.: Effects of caffeine on the saturated and monounsaturated Fatty acids of the newborn rat cerebellum. *Ann Nutr Metab.*, 48(2), 79-83 (2004).
65. Sies H.: Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Am. J. Med.*, 91,31-38 (1991).
66. Floyd RA.: DNA Damage and Repair in "Oxidative Damage and Repair", (Davies K.J.A. ed). Pergamon Press,. 175-180 (1992).

67. Cheeseman KH., Slater TF.: An Introduction to Free Radical Biochemistry. Brit. Med. Bulletin, 149, 481-93 (1993).
68. Gerald K.: Cell and Molecular Biology. The Chemical Basis of Life. John Wiley and Sons. Inc., 31-79 (1999).
69. Gutteridge JM., Halliwell B.: Antioxidants in Nutrition, Health and Disease. Oxford University Press (1994).
70. Maher P., Schubert D.: Signaling by Reactive Oxygen Species in the Nervous System. Cell. Mol. Life Sci., 57, 1287-1305 (2000).
71. Gutteridge JM., Halliwell B.: Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, 1-276 (1991).
72. Başaga HS.: Biochemical aspect of free radicals. Biochem Cell Biol, 68, 989-998 (1990).
73. Beal MF.: Oxidatively modified proteins in aging and disease. Free Radical Biology & Medicine, 32, 797–803 (2002).
74. Evans P., Halliwell B.: Micronutrients: oxidant/antioxidant status. Br J Nutr, 85, 67 (2001).
75. Fang YZ., Yang S., Wu G.: Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. Nutrition, 18, 872– 879 (2002).
76. Cooper CE., Vollaard NBJ., Choueiri T., Wilson MT.: Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochemical Society Transactions, 30, 280-5 (2002).
77. De Zwart LL., Meerman JHN., Commandeur JNM., Vermeulen NPE.: Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology & Medicine, 26, 202–226 (1999).
78. Kaneda H., Taguchi J., Ogasawara K., Aizawa T., Ohno M.: Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. Atherosclerosis, 162, 221– 225 (2002).
79. Podrez EA., Abu-Soud HM., Hazen SL.: Myeloperoxidase generated oxidants and atherosclerosis. Free Radical Biology & Medicine, 28, 1717–1725 (2000).
80. Halliwell B., Gutteridge JM.: Free Radical in Biology and Medicine, Third ed., Oxford University Press, Oxford, 160-165 (2000).

81. Podda M., Traber MG., Weber C., Yan LJ., Pakcer L.: UV-irradiation Deplets Antioxidants and Causes, Damage in A Model Human Skin. *Free. Radic. Biol. Med*, 92, 5259-5265 (1998).
82. Akkus I.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1.Baskı , Mimoza Yayınları, Konya, 13-19 (1995).
83. Beckman KB., Ames BN.: The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.*, 78, 547–581 (1998).
84. Freidovich I.: Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann NY Acad Sci*, 893:13 (1999).
85. Gilbert DL.: Fifty years of radical ideas. *Ann NY Acad Sci*, 899: 1 (2000).
86. Karbownik M., Lewinski A.: Melatonin reduces fenton reaction-induced lipid peroxidation in porcine thyroid tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90, 806–811 (2003).
87. Chen S., Schopfer P.: Hydroxyl-radical production in physiological reactions A novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, 260, 726-735 (1999).
88. Greenstock CL.: Radiation and Aging: Free Radical Damage, Biological Response and Possible Antioxidant Intervention. *Med. Hypotheses*, 41, 473-82 (1993).
89. Daugherty A., Dunn JL., Rateri DL., Heinecke JW.: Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.*, 94, 437–444 (1994).
90. Gutteridge JM.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41, 1819-1828 (1995).
91. Davies MJ.: Singlet oxygen mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, 305, 761-770 (2003).
92. Kiryu C., Makiuchi M., Miyazaki J., Fujinaga T., Kakinuma K.: Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase H₂O₂ chloride system. *FEBS Letter*, 443, 154-158 (1999).
93. Hawkins CL., Pattison DI., Davies MJ.: Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*, 25, 259–274 (2003).

94. Anggard E.: Nitric Oxide: Mediator, Murderer and Medicine. *The Lancet*, 343, 1199-1206 (1994).
95. Knowles RG., Moncada S.: Nitric Oxide Synthesis in Mammals. *Biochem. J.*, 298, 249-258 (1994).
96. Mayer B., Hemmens B.: Biosynthesis and Action of Nitric Oxide in Mammalian Cells. *TIBS*, 22, 477-481 (1997).
97. Matsuo M., Kaneko T.: The Chemistry of Reactive Oxygen Species and Related Free Radicals. Edit. Zsolt Radak. (Free Radicals in Exercise and Aging). *Human Kinetics*, 1-33, (2000) .
98. Berlett BS., Stadtman ER.: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 272(33), 20313-6 (1997).
99. Jerry P., Liu L., Zeng M., Stamler JS.: An Apoptotic Model for Nitrosative Stress. *Biochemistry*, 39, 1040-1047 (2000) .
100. Hausladen A., Stamler JS.: Nitrosative Stress. *Methods in Enzymology*, 300, 389-395 (1999).
101. Haddad JJ.: Oxygen Sensing and Oxidant/Redox-Related Pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316, 969-977 (2004).
102. Halliwell B., Gutteridge JM.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Second ed. ; 19: 234 , Clarendon Press , Oxford (1983).
103. Uchida K.: Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, 1685-1696 (2000).
104. Valenzuela A.: The Biological Significance of Malondialdehyde Determination in the Assesment of Tissue Oxidative Stress. *Life Sci.*, 48, 301-309 (1990).
105. Uchida K.: 4-Hydroxy-2-Nonenal: A Product and Mediator of Oxidative Stress. *Progr. Lip. Res.*, 569, 1-26 (2003).
106. Splettstoesser WD., Werner SP.: Oxidative Stress in Phagocytes "The Enemy Within". *Microscopy Research And Technique* ,57,441-455 (2002).

107. Rahman Q., Abidi P., Afaq F., Schiffman D., Mossman TB., Kamp WD., Athar M.: Glutathione Redox System in Oxidative Lung Injury. *Crit. Rev. in Toxicol.*, 29, 543-568 (1999).
108. Wiesinger H.: Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 64, 365–391 (2001).
109. Mori M., Gotoh T.: Regulation of Nitric Oxide Production by Arginine Metabolic Enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275, 715–719 (2000).
110. Wu G., Morris SM.: Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 336, 1-17 (1998).
111. Jonge WJ., Marescau B., D’Hooge R., De Deyn P., Hallemeesch MM, Deutz NEP, Ruijter JM., Lamers WH.: Overexpression of Arginase Alters Circulating and Tissue Amino Acids and Guanidino Compounds and Affects Neuromotor Behavior in Mice. *J. Nutr.*, 131, 2732–2740, (2001).
112. Braissant O., Gotoh T., Loup M., Mori M., Bachmann C.: L-arginine uptake, the citrulline–NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Molecular Brain Research*, 70, 231–241 (1999).
113. Satriano J.: Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines. *Amino Acids*, 26, 321–329 (2004).
114. Porembska Z., Luboinski G., Chrzanowska A., Mielczarek M., Magnuska J., Baranczyk-Kuzm A.: Arginase in patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, 328, 105– 111 (2003).
115. Cederbaum SD., Yu H., Grody W., Kern RM., Yoo P., Iyer RK.: Arginases I and II: do their functions overlap? *Molecular Genetics and Metabolism*, 81, 38–44 (2004).
116. Liu P., Smith PF., Appleton I., Darlington CL., Bilkey DK.: Potential involvement of NOS and arginase in age-related behavioural impairments. *Experimental Gerontology*, 39, 1207–1222 (2004).
117. Yu H., Iyer RK., Kern RM., Rodriguez WI., Grody W., Cederbaum SD.: Expression of Arginase Isozymes in Mouse Brain. *Journal of Neuroscience Research*, 66, 406–422 (2001).

118. Morris SM., Bhamidipati D., Kepka-Lenhart D.: Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene*, 193, 157–161 (1997).
119. Grillo MA., Colombatto S.: Arginine revisited: Minireview article. *Amino Acids*, 26, 345–351 (2004).
120. Lopez V., Alarco' n R., Orellana MS., Enriquez P., Uribe E., Martinez J., Carvajal N.: Insights into the interaction of human arginase II with substrate and manganese ions by site-directed mutagenesis and kinetic studies. Alteration of substrate specificity by replacement of Asn149 with Asp. *FEBS Journal*, 272, 4540–4548 (2005).
121. Boucher JL., J. P.Tenu CM.: Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55,1015–1028 (1999).
122. Busnel O., Carreaux F., Carboni B., Pethe S.,Vadon-Le Goff S., Mansuy D., Boucher JL.: Synthesis and evaluation of new borono-alpha-amino acids as rat liver arginase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 2373–2379 (2005).
123. Ash DE.: Structure and Function of Arginases. *J. Nutr.*, 134, 2760S–2764S (2004).
124. Mohamed SA., Fahmy AS., Mohamed TM., Hamdy SM.: Urea cycle of *Fasciola gigantica*: Purification and characterization of arginase. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 142, 308 – 316 (2005).
125. Dabir S., Dabir P., Somvanshi B.: Purification, properties and alternate substrate specificities of arginase from two different sources: *Vigna catjang cotyledon and buffalo liver*. *International Journal of Biological Sciences*, 1(3), 114-122 (2005).
126. Iyer R., Jenkinson CP., Vockley JG., Kern RM., Grody W., Cederbaum S.: The human arginases and arginase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.*, 21(Suppl 1), 86-100 (1998).
127. Vercelli D.: Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma? *J. Clin. Invest.*, 111, 1815–1817 (2003).
128. Bansal V., Ochoa JB.: Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6, 223–228 (2003).
129. Wheatley DN., Campbell E.: Arginine Catabolism, Liver Extracts and Cancer. *Pathology Oncology Research*, 8, No:1, 18–25 (2002).

130. Zea AH., Rodriguez PC., Atkins MB., Hernandez C., Signoretti S., Zabaleta J., McDermott D., Quiceno D., Youmans A., O'Neill A., Mier J., Ochoa AC.: Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.*, 65(8), 3044-8 (2005).
131. Meurs H., Maarsingh H., Zaagsma J.: Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 24, No:9, 450-455 (2003).
132. Morris SM.: Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7, 45–51 (2004).
133. King NE., Rothenberg ME., Zimmermann N.: Arginine in Asthma and Lung Inflammation. *J. Nutr.*, 134, 2830–2836 (2004).
134. Liu P., Smith PF., Appleton I., Darlington CL., Bilkey DK.: Nitric Oxide Synthase and Arginase in the Rat Hippocampus and the Entorhinal, Perirhinal, Postrhinal, and Temporal Cortices: Regional Variations and Age-Related Changes. *Hippocampus*, 13, 859–867 (2003).
135. Liu P., Smith PF., Appleton I., Darlington CL., Bilkey DK.: Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience*, 119, 679–687 (2003).
136. Lange PS., Langley B., Lu P., Ratan R.: Novel Roles for Arginase in Cell Survival, Regeneration, and Translation in the Central Nervous System. *J. Nutr.*, 134, 2812–2817 (2004).
137. Liu P., Smith PF., Appleton I., Darlington CL., Bilkey DK.: Hippocampal Nitric Oxide Synthase and Arginase and Age-Associated Behavioral Deficits. *Hippocampus*, 15, 642–655 (2005).
138. Demougeot C., Prigent-Tessier A., Marie C., Berthelot A.: Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 23, 971–978 (2005).
139. Luft FC.: Arginase is an enzyme that nephrologists can love. *Journal of Hypertension*, 23, 933–934 (2005).
140. Ikemoto M., Tsunekawa S., Toda Y., Totani M.: Liver-Type arginase is a highly sensitive marker for hepatocellular damage in rats. *Clin Chem*, 47, 46-48 (2001).

141. Prins HA., Meijer C., Nijveldt RJ., Wiezer MJ., van Leeuwen PA.: High plasma levels of arginine and liver arginase in Kupffer-cell-depleted rats after partial hepatectomy. *J Hepatol*, 32, 399-405 (2000).
142. Waddington SN.: Arginase in glomerulonephritis. *Kidney International*, 61, 876-881 (2002).
143. Beck B., Ciszek M., Polaniak R., Beyga Z., Król W., Drozd M., Shani J.: The Activity of Ornithine Transcarbamoylase and Arginase during Mechanical Jaundice in the Rat Model. *Journal of Surgical Research*, 126, 19–26 (2005).
144. Cai D., Deng K., Mellado W., Lee J., Ratan R., Filbin MT.: Arginase I and Polyamines Act Downstream from Cyclic AMP in Overcoming Inhibition of Axonal Growth MAG and Myelin In Vitro. *Neuron*, 35, 711–719 (2002).
145. Iyamu EW., Cecil R., Parkin L., Woods G., Ohene-Frempong K., Asakura T.: Modulation of erythrocyte arginase activity in sickle cell disease patients during hydroxyurea therapy. *British Journal of Haematology*, 131, 389–394 (2005).
146. Crombez EA., Cederbaum SD.: Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 84, 243–251 (2005).
147. Picker JD., Puga AC., Levy HL., Marsden D., Shih VE., Degirolam U., Ligon KL., Cederbaum SD., Kern RM., Cox GF.: Arginase Deficiency with lethal neonatal expression: Evidence for the glutamine hypothesis of cerebral edema. *J Pediatr*, 142, 349-52 (2003).
148. Scaglia F., Brunetti-Pierri N., Kleppe S., Marini J., Carter S., Garlick P., Jahoor F., O'Brien W., Lee B.: Clinical Consequences of Urea Cycle Enzyme Deficiencies and Potential Links to Arginine and Nitric Oxide Metabolism. *J. Nutr.*, 134, 2775–2782 (2004).
149. Cross RK., Wilson KT.: Nitric Oxide in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 9 (3), 179–189 (2003).
150. Mori M., Tomomi Gotoh T.: Arginine Metabolic Enzymes, Nitric Oxide and Infection. *J. Nutr.*, 134, 2820–2825 (2004).
151. Liu P., Smith PF., Appleton I., Darlington CL., Bilkey DK.: Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex. *Neurobiology of Aging*, 25, 547–552 (2004).

152. Mccann SM.: The Nitric Oxide Hypothesis of brain aging. *Experimental Gerontology*, 32, 431-440 (1997).
153. Clarkson AN., Liu H., Pearson L., Kapoor M., Harrison JC., Sammut IA., Jackson DM., Appleton I.: Neuroprotective effects of spermine following hypoxiaischemia-induced brain damage: A mechanistic study. *FASEB J.*, 18(10), 1114 -6 (2004).
154. Minin EA., Buchwalow IB., Wellner M., Palmes D., Spiegel HU, Neumann J., Boecker W., Herbst H.: L-Arginine-NO-cGMP signaling following acute liver injury in the rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57, 161–171 (2005).
155. Weller R.: Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology. *Clinical and Experimental Dermatology*, 28, 511–514, 2003.
156. İlhan A., Akyol O., Gurel A., Armutcu F., Iraz M., Oztas E.: Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis induced oxidative stress in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, No:3, 386-394 (2004).
157. Geyer JW., Dabich D.: Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem*, 39, 412-7 (1971).
158. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ.: Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem*, 193, 265-75 (1951).
159. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction . *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358 (1979).
160. Yoshioka T., Kawada K., Shimada T., Mori M.: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol.*, 135(3), 372-6 (1979).
161. Bories PN., Bories C.: Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one- step assay with nitrate reductase. *Clin Chem.*, 41/6, 904-907 (1995).
162. Granger DL., Hibbs JB., Perfect JR., Durack DT.: Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J Clin. Invest.*, 85, 264-273 (1990).

163. Smarason AK., Allman KG., Young D., Redman CW.: Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with preeclampsia. *Br.J.Obstet. Gynaecol*, 104,538-43 (1997).
164. Pasaoglu H., Bulduk G., Ogus E., Pasaoglu A., Onalan G.: Nitric oxide, Lipid peroxides, and Uric acid levels in Pre-eclampsia and eclampsia. *Tohoku J. Exp. Med.*, 202, 87-92 (2004).
165. Belayev L., Khoutorova L., Zhang Y., Belayev A., Zhao W., Busto R., Ginsberg MD.: Caffeinol confers cortical but not subcortical neuroprotection after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 1008, 278–283 (2004).
166. Aronowski J., Strong R., Shirzadi A., Grotta JC.: Ethanol plus caffeine (caffeinol) for treatment of ischemic stroke. *Stroke*, 34, 1246 (2003).
167. Colombatto S., Fasulo L., Mondardini A., Malabaila A., Grillo MA.: Effect of caffeine on ornithine metabolism in rat brain, liver and kidney. *Ital J Biochem.*, 38(2), 75-82 (1989).
168. Karas M., Chakrabarti SK.: Influence of caffeine on allyl alcohol-induced hepatotoxicity in rats. In vivo study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.*,20(2), 141-54 (2001).
169. Lee J., Ha JH., Kim S., Oh YW., Kim SW.: Caffeine decreases the expression of Na⁺/K⁺-ATPase and the type 3 Na⁺/H⁺ exchanger in rat kidney. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29 (7), 559–563 (2002).
170. Kayir H., Uzbay IT.: Evidence for the role of nitric oxide in caffeine-induced locomotor activity in mice. *Psychopharmacology*,172(1), 11–15 (2004).
171. Alasehirli B., Cekrnen M.,Nacak M., Balat A.: Effects of Caffeine on Placental Total Nitrite Concentration: A 21-Day, Vehicle-Controlled Study in Rats. *Current Therapeutic Research*, 66, No:2, 130-7 (2005).
172. Sakamoto W., Nishihira J., Fujie K., Mizuno S., Ozaki M., Yukawa S.: Coffee and fitness-coffee suppresses lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 46(6), 316-20 (2000).
173. Sakamoto W., Isomura H., Fujie K., Takahashi K., Nakao K., Izumi H.: Relationship of coffee consumption with risk factors of atherosclerosis in rats. *Ann Nutr Metab.*, 49(3), 149-54 (2005).

174. He P., Noda Y., Sugiyama K.: Green tea suppresses lipopolysaccharide-induced liver injury in d-galactosamine-sensitized rats. *J Nutr.*, 131(5), 1560-7 (2001).
175. Ritter M., Hohenberger K., Alter P., Herzum M., Tebbe J., M. Maisch M.: Caffeine inhibits cytokine expression in lymphocytes. *Cytokine*, 30, 177-181 (2005).

10. ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Zonguldak'ta doğdum. 1991 yılında T.E.D. Zonguldak kolejini bitirdim. 1992 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim. 1996 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesinden Pedagojik Formasyon sertifikası aldım. 1997-2000 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimi yaptım. 1999-2003 yılları arasında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulunda Öğretim Görevlisi olarak çalıştım. 2003 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandım.