

**T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÖĞRENME VE HAFIZANIN ŞEKİLLENDİĞİ BEYİN BÖLGELERİNDE  
ALKOLÜN OLUŞTURDUĞU HASARLARDA PROPOLİSİN ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ZÜMRÜT YILMAZ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. M. HANİFİ EMRE**

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu tarafından 2005/88 proje  
numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA-2006**

## TEŞEKKÜR

Bilim gibi geniş bir okyanusta kulaç atmasını öğreten, bu çalışmanın gerçekteŐme sinde yardımlarını esirgemeyen danıŐmanım Prof. Dr. M. Hanifi Emre'ye, değerli hocalarım Doç. Dr. Ersin Fadıllıoğlu' na, Doç. Dr. Yunus Karakoç' a, Yrd. Doç. Dr. Halil Düzova' ya; tecrübeleriyle çalıŐmalarına ışık tutan Dr. Aladdin Polat' a, Doç.Dr. Özkan Ateş'e, Doç. Dr. Saim Yoloğlu'na, Yrd. Doç. Dr. Nigar Vardı'ya, Dr. Sedat Sevil'e, Bio.Cebrail Gürsul'a ayrıca öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve her zaman yanımda olup bana büyük destek veren arkadaşım Uz. FM. Songül Barlaz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	1
İÇİNDEKİLER.....	2
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	5
TABLolar DİZİNİ.....	6
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	7
1.GİRİŞ.....	8
2.GENEL BİLGİLER.....	9
2.1 HİPOKAMPUS.....	9
2.1.1 Hipokampusun Anatomisi.....	9
2.1.2 Hipokampal Yollar.....	11
2.1.2.1 Aferent Yollar.....	11
2.1.2.2 Eferent Yollar.....	12
2.1.3. Hipokampusun Fonksiyonları.....	12
2.2 ÖĞRENME VE BELLEK.....	13
2.2.1 Nonassosiyatif Öğrenme.....	13
2.2.2 Assosiyatif Öğrenme.....	13
2.2.3 Bellek.....	14
2.2.3.1 Net Bellek.....	14
2.2.3.1.1 Kısa Süreli Bellek.....	15
2.2.3.1.2 Uzun Süreli Bellek.....	15
2.2.3.2 Gizli Bellek.....	15
2.3 ALKOLÜN ÖĞRENME VE HAFIZA MEKANİZMALARI	
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ.....	15
2.3.1 Alkol ve Beyin Bölgelerinde oluşturduğu Hasarlar.....	17
2.3.1.1 Alkolün NMDA Reseptörleri Üzerine Olan Etkileri.....	19
2.3.1.2 Alkolün GABA Reseptörleri Üzerine Olan Etkileri.....	19
2.4 OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN ENZİMLER.....	21
2.4.1 Oksidatif Stres.....	21

2.4.2 Serbest Radikaller.....	22
2.4.2.1 Serbest Oksijen Radikal Kaynakları.....	22
2.4.2.1.1 Eksojen Kaynaklar.....	23
2.4.2.1.2 Endojen Kaynaklar.....	23
2.4.2.2 Serbest Oksijen Radikal Türleri.....	24
2.4.2.2.1 Süperoksit Radikalleri.....	24
2.4.2.2.2 Hidrojen Peroksit.....	24
2.4.4.4.3 Hidroksil Radikali.....	24
2.4.2.2.4 Singlet Oksijen.....	25
2.4.2.2.5 Hipokloröz asit.....	25
2.4.2.3 Reaktif Nitrojen Türleri.....	26
2.4.2.3.1 Nitrik Oksit.....	26
2.4.2.3.2 Peroksinitrit anyonu.....	26
2.4.2.3.3 Peroksil Radikali.....	26
2.4.3 Serbest Radikallerin Hücresel Yapılara Etkileri.....	26
2.4.3.1 Membran Lipitlerine Etkileri.....	26
2.4.3.2 Proteinler Üzerine Olan Etkileri.....	27
2.4.3.3 Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri.....	27
2.4.4 Alkolün Oluşturduğu Oksidatif Stres.....	28
2.5 ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR.....	29
2.5.1 Hücresel Antioksidan Komponentler.....	29
2.5.2 Membran Antioksidanları.....	29
2.5.3 Ekstrasellüler Antioksidanlar.....	29
2.6 PROPOLİS VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ.....	31
3.MATERYAL METHOD.....	35
3.1Hipotez.....	35
3.2Araştırma Tipi.....	35
3.3 Araştırmanın Evreni.....	35
3.4 Örneklem Büyüklüğü ve Yöntemi.....	35
3.4.1 Deney Grupları.....	35
3.5 T-Labirent Uygulaması.....	36
3.6 Cerrahi Uygulama.....	37
3.7 Analizler.....	37
3.7.1 Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması.....	37

3.7.2 Nitrik Oksit (NO) Miktarının Tayini.....	38
3.7.3 Malondialdehit Miktarının Ölçülmesi.....	38
3.7.4 Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	38
3.7.5 Katalaz Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	39
3.7.6 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi.....	39
3.7.7 Potein Ölçümü.....	40
3.8 İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1 T- Labirent Değerlerinin Karşılaştırılması.....	42
4.2 Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	46
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
7. ÖZET.....	55
8. SUMMARY.....	57
9. KAYNAKLAR.....	59
10. ÖZGEÇMİŞ.....	67

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1: Hipokampusun insan beyinde yerleşimi.....	2
Şekil 2: Hipokampal formasyonun bağlantıları.....	3
Şekil 3: Koronal kesitte hipokampusun yapısı.....	4
Şekil 4: Belleğin Çeşitleri.....	7
Şekil 5: Beyinde net belleğin oluşumu.....	8
Şekil 6: Alkolün Bellek üzerindeki hasarlayıcı etkisi.....	11
Şekil 7: Alkolün NMDA reseptörleri üzerine olan etkisi.....	13
Şekil 8: Alkolün GABA <sub>A</sub> reseptörleri üzerine olan etkisi.....	14
Şekil 9: Alkolün hipokampal hücre aktivitesine olan etkisinin zamana bağlı değişimleri.....	15
Şekil 10: Mitekondriyal elektron transportu sırasında serbest oksijen radikallerinin oluşması.....	18
Şekil 11: Hidroksil radikali ve hücredeki çeşitli moleküllere olan etkisi.....	19
Şekil 12: T- labirent Düzenegi.....	30
Şekil 13: T- labirentteki bazal süre değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	38
Şekil 14: T- labirentteki sakınma 1 değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	38
Şekil 15: T- labirentteki sakınma 2 değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	39
Şekil 16: Grupların T- labirentteki şartsız korku değerlerinin karşılaştırılması.....	39

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 1: İntraselüler antioksidanlar ve reaksiyonları.....	24
Tablo 2: Membran antioksidanları ve etkileri.....	25
Tablo 3: Ekstraselüler antioksidanlar ve özellikleri.....	26
Tablo 4: Deney protokolü uygulanmadan önce T-labirent testinde grup içindeki bazal süre, sakınma 1, sakınma 2, şartsız korku değerleri.....	35
Tablo 5: 6.günden (% 2,4'lük alkol uygulamasın ) sonra T-labirent testinde grup içindeki bazal süre, sakınma 1, sakınma 2, şartsız korku değerleri .....	35
Tablo 6: 11.günden (% 4,8'lik alkol uygulamasın ) sonra T-labirent testinde grup içindeki bazal süre, sakınma 1, sakınma 2, şartsız korku değerleri .....	36
Tablo 7: 30.günden (deney sonu, % 7,2'lik alkol uygulamasın ) sonra T-labirent testinde grup içindeki bazal süre, sakınma 1, sakınma 2, şartsız korku değerleri .....	36
Tablo 8: Gruplarda vücut ağırlık kaybı ve hipokampus dokusunda enzim değerleri ile MDA ve NO miktarları .....	40
Tablo 9: Gruplarda korteks dokusunda enzim sonuçları, MDA ve NO miktarları.....	41
Tablo 10: Gruplarda ve serebellum dokusunda enzim sonuçları, MDA ve NO miktarları.....	41

## SİNGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
ACTH	: Adenokortikotropik hormon
AMPA	: $\alpha$ - amino-3-hidroksi-5metil-4 izoksazolpropionat
$\epsilon$ AMP	: Siklik adenozin mono fosfat
CAPE:	: Kafeik asit fenil ester
CAT	: Katalaz
$\text{CH}_2\text{H}_5\text{OH}$	: Etil Alkol
$\text{CH}_3\text{CHO}$	: Asetaldehit
GABA	: $\gamma$ - amino bütirik asit
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GluR1	: Glutamat reseptörleri
HCl	: Hidroklorik asit
HOCl	: Hipokloröz asit
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Hidrojen peroksit
LOO	: Peroksil radikali
LTP	: Uzun erimli potansiyasyon
MEOS	: Mikrozomal etanol okside edici sistem
MDA	: Malon di aldehit
NAD	: Nikotin amid adenin di nükleotit
NBT	: Nitro blue tetrazolium
NMDA	: N- metil D- aspartat
NO	: Nitrik oksit
OH	: Hidroksil
$\text{ONOO}^-$	: Peroksi nitrit anyonu



## 1. GİRİŞ

Davranışların deneyimlere göre değiştirilebilmesi için bilgiyi kazanabilme yeteneğine öğrenme, bu bilgiyi depolama ve korumaya ise bellek denir. Belleğin oluşumu sırasında frontal lop, parietal lop, oksipital lop, temporal lop, hipokampus ve limbik sistem gibi beynin birçok bölgesi aktive olur (1). Öğrenme; nöronal sistemlerin adapte olabilmeleri, sinaptik değişim ve gelişmeleri içeren plastisitelerin bir sonucu olarak şekillenir (2).

Alkolün öğrenme ve bellekteki hasarlayıcı etkisinin hipokampus ve hipokampus ile ilgili yapılardaki hücrel aktiviteyi değiştirmesinden kaynaklandığı ayrıca hipokampal nöronlar ve afferentleri etkilemesinin de direkt olarak hasara yol açtığı düşünülmüştür (3). Alkol tüketimine bağlı olarak oluşan serbest radikallerin karaciğer, beyin gibi dokularda oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (4,5).

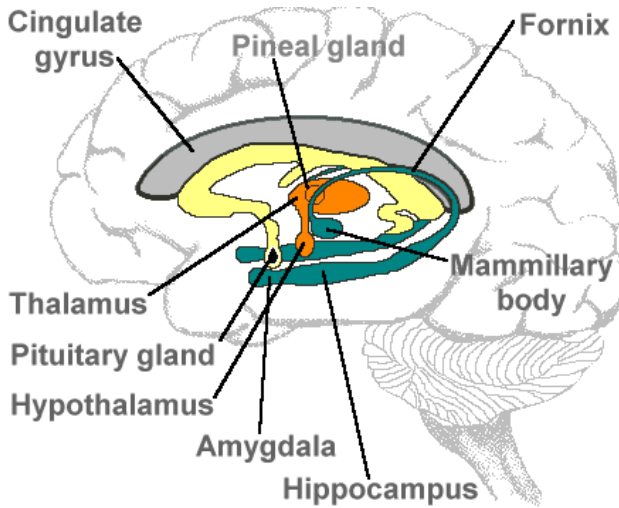
Propolis, arıların bitkilerin çiçek ve tomurcuklarından topladıkları reçinemsî maddeleri biyokimyasal değişikliklere uğratarak oluşturdukları bir madde olup antibakteriyal, antiviral, antioksidan, antifungal gibi bir çok özelliğe sahip olmasından dolayı da ilaç ve kozmetik sanayinde geniş çaplı kullanılmaktadır (6-13). Yapılan çalışmalarda propolisin aktif bileşeni olan CAPE (cafeic acid phenethyl ester) ve flavonoidlerin (galangin, quercetin vb.) reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan özelliklerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır (11).

Çalışmanın amacı; alkolün öğrenme ve bellek oluşmasında büyük öneme sahip hipokampusta oluşturacağı oksidatif hasarın tespit edilmesi, oluşan oksidatif hasara ve serbest radikallere karşı propolisin koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

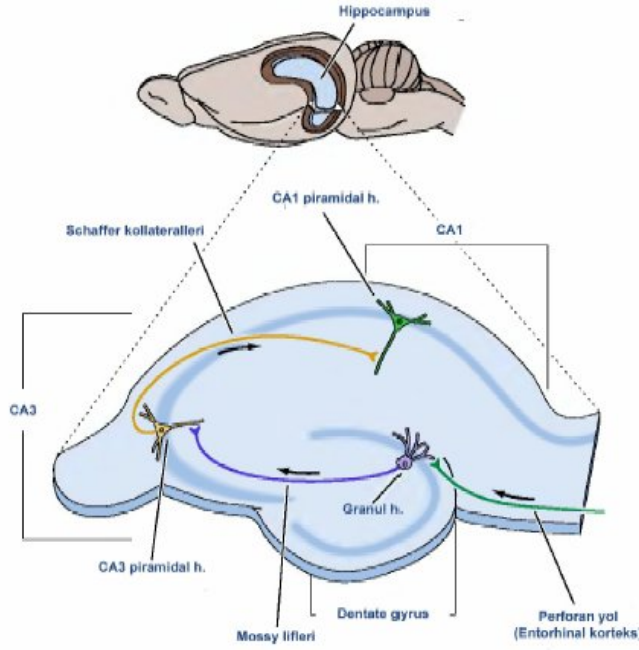
### 2.1 HİPOKAMPUS

**2.1.1 Hipokampusun Anatomisi:** Temporal lobun bir parçası olup, kısa süreli belleğin şekillenmesinde gereklidir (14). Koronal kesitlerde C harfi şeklinde görülen hipokampus filogenetik olarak beyinin en eski bölümlerinden biridir. Ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü konkav şekilli olup deniz atına benzerliğinden ötürü hipokampus adını almış olmakla birlikte dış yüzü koç boynuzuna benzediğinden dolayı da bir zamanlar Cornu Ammonis adı ile de anılmıştır (15). Korteks kısmı ventrikulus lateralis'in *cornu inferius*' unun tabanında yer alır, alt mediale doğru *subiculum* ve *gyrus parahippocampalis* ile devam eder (16).



**Şekil1:** İnsan beyninde hipokampusun yerleşimi (17).

Hipokampus bütünüyle yapısal olarak adını verdiği formasyonun sınırları içinde bulunmaktadır. Hipokampal formasyon terimi; birbirinden farklı altı ayrı anatomik bölgeyi kapsamaktadır. Bu bölgeler ; gyrus dentatus, cornu ammonis 1, 2, 3. alanları (CA1,CA2,CA3) ile asıl hipokampus (hippocampus proper), subiculum, presubiculum, parasubiculum ve entorhinal korteksten oluşur. Entorhinal korteks, gyrus dentatus' a giden liflerini perforant yol ile tek taraflı verirken, gyrus dentatus mossy lifleri ile CA3 bölgesine projekte olmakta, CA3 lifleri CA1'e; CA1 lifleri de subiculum'a uzanmaktadır (18).



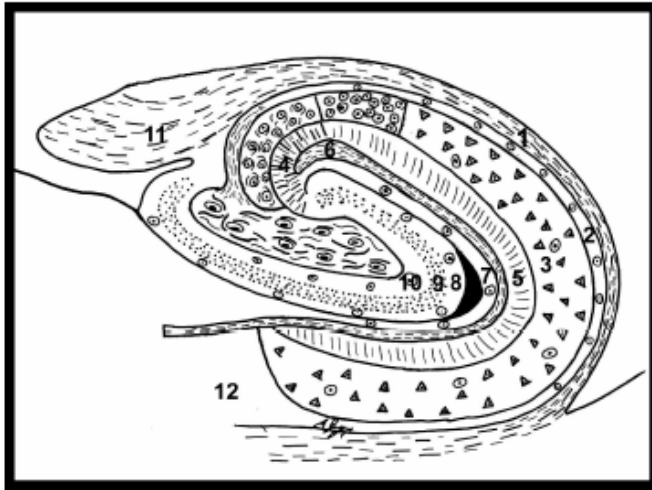
**Şekil 2:** Hipokampal formasyonun bağlantıları. Purves D., (19).

Cornu Ammonis' in baş harflerini temsilen CA olarak ifade edilir, hücre yapısındaki değişikliklerden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 gibi farklı alanlara ayrılmıştır. CA3 ve CA2 alanları geniş hücreli regio inferior' a, CA1 alanı ise regio süperior' a uzanmaktadır. CA2 alanı; CA3 ve CA1 alanları arasına yerleşmiş dar bir bölge olup CA3 alanı gibi büyük gövdeli hücrelere sahip, CA1 alanındaki hücreler gibi mossy lif girdilerinden yoksundur (18). Hipokampusta en belirgin hücre tabakası piramidal hücreler olmakla birlikte tabakalar ventriküler yüzeyden başlayarak derine doğru aşağıdaki gibi gruplandırılır (15) (şekil3).

1. *Alveus*: Subikulum ve hipokampusa ait hücre aksonlarını içerir.
2. *Sratum Oriens*: Piramidal hücrelerin bazal dendritleri ile internöronların yerleştiği tabakadır. Buradaki nöron aksonlarının çoğu alveus liflerine katılır, diğer hücre aksonları ise en derinde yer alan moleküler tabakaya kadar uzanır.
3. *Sratum Pyramidalis*: Hipokampusa asıl şeklini veren buradaki hücrelerin dizilişidir. Büyük piramidal hücreler ve Golgi tip II hücreleri çoğunluktadır. Piramidal hücrelerin tabanı hipokampusun ventriküler yüzeyine dönük olup bazal – apikal dendritleri komşu tabakalara kadar uzanır.
4. *Sratum Lucidum*: CA3 alanındaki piramidal hücreler ile bağlantı sağlayan yosunsu lifleri içerir, insanlarda diğer primatlara göre daha belirgin olup CA1 ve CA2 alanlarında bulunmaz.

5. *Stratum Radiatum*
6. *Stratum Lacunosum*
7. *Stratum Moleculare*

İnce sinir lifleri ve çok az sayıda nöron içeren 5., 6. ve 7. tabakalar bazı yazarlar tarafından stratum moleculare adıyla tek bir tabaka olarak kabul edilirken, bazı kaynaklarda ise 6. ve 7. tabakalar stratum lacunosum – moleculare ismiyle incelenmektedir (15).



**Şekil 3:** Koronal kesitte hipokampusun yapısı. Hipokampus: 1- alveus, 2- stratum oriens, 3- stratum pyramidalis, 4- stratum lucidum, 5- stratum radiatum, 6- stratum lacunosum, 7- stratum moleculare. Gyrus dentatus: 8- stratum moleculare, 9- stratum granulosum, 10- stratum polimorfica. 11- fimbria hippocampi, 12- subiculum. Songur A., (15).

**2.1.2 Hipokampal Yollar:** Aferent yollar ve efferent yollar olmak üzere iki kısımda incelenir. Hipokampus dolaylı da olsa tüm duyuşsal uyarıları içeren afferentlere sahiptir.

**2.1.2.1 Aferent Yollar:** Entorinal alandan gelen uyarılar dört yolla hipokampusa iletilir.

1. *Prefrontal Yollar:* CA4 alanı hariç tüm hipokampusa dağılır. Entorinal korteksten gelen aksonları subikulum boyunca gyrus dentatusa ilerler.

2. *Yosunsu ( mossy) lifler:* Gyrus dentatus' dan CA3 alanına giderler.

3. *Sthaffer Kollateralleri:* CA3 ve CA2 den CA1 alanına uzanan piramidal hücre uzantılarıdır.

4. *Alvear Lifler:* Subkortikal alanlardan gelen bu lifler alveus'tan geçerek hipokampusun CA1 kısmı ile subikulumun iç kısmına dağılır (20,15).

**2.1.2.2 Eferent Yollar:** Hipokampusun en büyük eferent yolu fornikstir (15,21).

### **2.1.3 Hipokampusun Fonksiyonları:**

Hipokampus, öğrenme ve bellekle ilgili geniş bir limbik yapıdır (22). Hipokampus diğer beyin bölgelerinden bilgiyi alır, yeni otobiyografik belleği şekillendirir, bu prosesler gerçekleştiikten sonra piramidal CA1 hücreleri ile neokortekse geri gönderir (23). Piramidal hücreler olarak bilinen nöronları içeren hipokampusun CA1 hücreleri aracılığı ile beynin diğer kısımlarıyla haberleşmeyi sağlar (23). Limbik sistemin bir parçası olan hipokampusun yeni bilgilerin depolanma kapasitesini ifade eden kısa süreli bellek ile ilgili olduğu bilinmektedir (15,24). Yapılan son çalışmalarda hipokampusun bilgilerin kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe aktarılması aşamasında da oldukça önemli olduğunu göstermiştir (16). Sağ hipokampus görsel, sol hipokampus ise sözel bellek ile ilgili fonksiyonlarda daha fazla aktivite göstermektedir (16). Son yıllarda yapılan çalışmalarda hipokampusun spesifik bellek kategorilerinin oluşmasıyla ilişkili olduğu ve uzamsal belleğin gelişmesinin hipokampusun bütünlüğüne bağlı olduğu gösterilmiştir (25).

Hipokampusun; serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimcikler ile indirekt bağlantılarının tümü hipokampal formasyon adını alır. Görme, işitme, koku, dokunma, iç organ duyuları gibi her türlü duyuşal uyarı küçük bir alanda dahi olsa, hipokampusu aktive eder. Hipokampus özellikle en büyük çıkış yolu olan forniks ile ön talamus, hipotalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller göndererek gelen duyuşal sinyalleri farklı amaçlar için uygun davranış reaksiyonları içerisinde geçiren ek bir kanal ödevi görür (25).

Öğrenme sırasında meydana gelen uzun erimli potansiyasyon (LTP) hipokampal döngüdeki değişikliklerin bir modeli olup, öğrenme değildir (25). LTP iki sinir hücresi arasındaki bağların uzun süreli olarak güçlendirilmesidir. Yaşayan hücrelerde LTP doğal olarak meydana gelir ve protein kinazlar, fosfotazlar, gen ekspirasyonu ve yüksek sinaptik plastisitede büyük ölçüde rol oynar (28,27).

Moleküler bir yol olan LTP sinaptik olayların gelişmesi için biyokimyasal mekanizmaları başlatır. LTP'ın anahtarı olan NMDA reseptörleri post sinaptik hücre membranlarında oluşup glutamat nörotransmitterlerini bağlar. NMDA reseptörleri hücre membranında ki küçük

kanallar olup Ca iyonlarının nöron içerisine girişini kontrol ederler. NMDA reseptörleri iki olayın birbirinden ayrılmasında beyine yardımcı olur (23,27).

Hipokampusun ön bölgesinde östradiolü konsantre eden nöronların saptanması, sıçan beyinde hipokampusun uyarılması sonucunda ovulasyonda inhibisyonun oluşması, forniks kesildiğinde ACTH salımının bozulması; hipokampusun endokrin fonksiyonlarının da üzerinde durulmasına neden olmuştur. (15).

## **2. 2 ÖĞRENME VE BELLEK**

Öğrenme; davranışın deneyimlere göre değiştirilebilmesi için bilgi kazanabilme yeteneği, bellek ise bu bilgiyi depolama ve korumadır.

Öğrenme yeteneği nöronal sistemlerin adapte olabilmelerini, sinaptik değişim ve gelişimleri içeren plastisitelerini gerektirir. Bu plastisite ve sinaptik değişiklikler; onların anatomik bağlarına, elektrofizyolojik ateşleme paternlerine, protein sentezindeki değişimlere ve nörotransmitter sistemlerine bağlı olarak ortaya çıkar (26). cAMP, cAMP - bağımlı protein kinaz gibi ikincil haberci sistemlerin aktivasyonu da öğrenmede önemli rol oynar (28). Sinaptik plastisitenin büyük bir kısmı hipokampusta oluşmakla birlikte çeşitli kortikal inputlar arasındaki bağların kurulmasına yardım eden NMDA reseptörlerinin bulunduğu serebral korteks ve amigdalada da meydana gelir (26). Kısa süreli bellekte nöronal plastisitenin oluşması, NMDA reseptörleri ve L- tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalları ile düzenlenir (3).

Öğrenmeyi Nonassosiyatif öğrenme ve assosiyatif öğrenme olarak sınıflandırabiliriz.

**2.2.1 Nonassosiyatif Öğrenme;** öğrenilen olay ve bilgiler birbirleriyle ilişkili olmak zorunda değildir, Habitüasyon (alışkanlık) ve sensitizasyon (duyarlılık) olarak iki şekilde incelenir. Alışkanlıkta uyaran önem taşımazken, duyarlılıkta uyaran önemlidir.

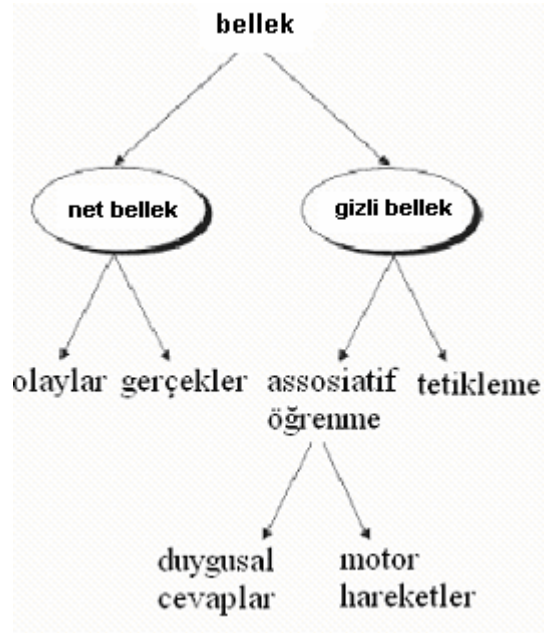
**2.2.2 Assosiyatif Öğrenme;** Assosiyasyon kortekslerin görev aldığı, iki farklı uyaran arasındaki ilişki öğrenilir. Klasik koşullanma ve enstrümental koşullanma olmak üzere iki tiptedir. Klasik koşullanma; koşullu refleklere dayanır. İlk kez Pavlov tarafından fizyolojik bir uyarana verilen basit bir refleks yanıtının giderek fizyolojik olmayan bir uyarana değiştirilebileceğinin gösterilmesiyle ortaya konulmuştur. Enstrümental koşullanma; operant

koşullanma olarak da ifade edilip, ödül ve ceza öğeleri kullanılarak öğretilir. Yapılan çalışmalarda limbik sistemde ödül ve ceza merkezlerinin bulunduğu gösterilmiştir (1,2).

**2.2.3 Bellek (Hafıza):** Hipokampus (özellikle piramidal hücreler olarak bilinen nöronları içeren CA1 hücreleri) beynin diğer bölgeleriyle haberleşmeyi sağlar, özellikle neokortekste lokalize olan bilgileri alır, yeni otobiyografik belleği şekillendirir, neokorteksse geri gönderir (23).

NMDA, AMPA ve metabotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu, NMDA1 seviyesinin kısa süreli artışı ve GluR1 seviyesinin uzun süreli artışı gibi hipokampusta meydana gelen biyokimyasal olaylar belleğin şekillenmesinde oldukça önemlidir (29). Belleğin oluşturulmasında hipokampusta LTP'nin kodlanması da etkilidir (26). Belleğin yapılması sırasında beynin birçok bölgesi (frontal, parietal, oksipital ve temporal loblara, hipokampus ve limbik sistemin diğer yapıları arasındaki nöronal ağlar) kendiliğinden aktive olur ve bu süreç milisaniyeler içerisinde gerçekleşir (1).

Fizyolojik bakış açısından belleği net bellek ve gizli bellek olarak iki genel tipe ayırabiliriz:



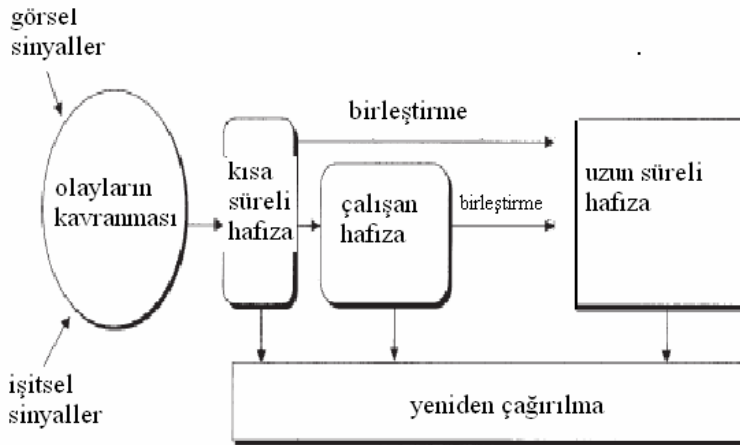
**Şekil 4:** Fizyolojik Çarıdan Belleğin sınıflandırılması. Robertson L., (1).

**2.2.3.1 Net Bellek (Eksplisit Hafıza):** Açıkça belli olan bellek olarak ta adlandırılır, bir kişinin yaşamış olduğu deneyimleri bilinçli olarak hatırlamasıdır. Hipokampus ile beynin

medial temporal loblarının diğer bölümlerinde depolanma sonucunda gelişir. Eksplisit belleği kısa süreli ve uzun süreli bellek olarak ayırabiliriz (1,2).

**2.2.3.1.1 Kısa süreli bellek (hafıza);** Öğrenmeden hemen sonraki saniyeler içerisinde gelişir. Telefon rehberine bakıldıktan sonra numarayı sadece çevirene kadar hatırlama buna örnek verilebilir (1). Kısa süreli bellekteki bilgiler yeni bilgiler tarafından maskelendiği için kısa sürede silinerek kaybolur veya hipokampusta bir süre saklandıktan sonra uzun süreli belleğe aktarılır. Kısa süreli bellek oluşumunda nöron grupları arasındaki uyarı devreleri iş görür (2).

**2.2.3.1.2 Uzun süreli bellek (hafıza);** Bilgilerin uzun süreli bellekte depolanması uzun zaman alır, bunun için çok tekrar gerekir. Uzun süreli bellek hiçbir zaman dolmaz sınırsız kapasitesi vardır. Uzun süreli bellek sinir sisteminde nöronal bağlantıların kalıcı fonksiyonel, biyokimyasal ve yapısal değişikliklerini gerektirir (1,2).



**Şekil 5:** Beyinde net belleğin oluşumu. Robertson L., (1).

**2.2.3.2 Gizli Bellek (İmplicit Hafıza):** Bir kez kazanıldıktan sonra bilinçsiz ve kendiliğinden gerçekleşen beceri ve alışkanlıkları kapsar, bilinçli hatırlama yoktur, hipokampusta işlenmez, koşullu refleksleri ve nonassosiyatif öğrenmeyi kapsar (1,2).

## **2.3 ALKOLÜN ÖĞRENME VE BELLEK MEKANİZMALARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Alkoller; alkanlardan bir veya birkaç hidrojenin çıkarılarak yerine hidroksil ( -OH) grubunun geçmesiyle türeyen bileşikler olup alkanların sonlarındaki -an ekinin kaldırılıp

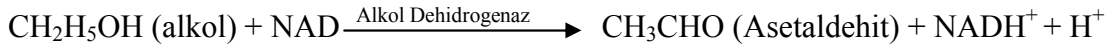


yerine –anol ekinin getirilmesiyle ya da türedikleri alkil grubundan sonra alkol sözcüğü kullanılarak adlandırılır (30).

Alkoller; meyve suları, yaş ve kurutulmuş meyveler ve tahıl tanelerinin içinde bulunan şeker ve polisakkaritlerin maya mantarları tarafından anaerobik fermantasyonuyla elde edilirler, fermantasyon ortamındaki alkol konsantrasyonu ortalama %12-14'e ulaştığında ya da ortamdaki karbonhidratlar tükendiği zaman fermantasyon durur (31).

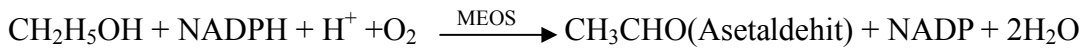
Alkolün büyük bir kısmı karaciğerde (%90) metabolize edilirken geri kalanın bir kısmı akciğerlerden, bir kısmı böbreklerden idrar yoluyla kalan kısmı da ter bezlerinden salgı yoluyla dışarı atılır. Alkolün karaciğerdeki metabolizasyonunda üç farklı enzim sistemi görev almaktadır: Sitozolda alkol dehidrogenaz, endoplazmik retikulumda mikrozomal etanol okside edici sistem ve peroksidazlarda katalaz (31,32,33).

*Alkol Dehidrogenaz*; Stoplazma içerisinde bulunan, çinko ihtiva eden bir enzim olup alkolün metabolize edilmesinde büyük öneme sahiptir.85.000 kilodalton moleküler ağırlığında dimerik bir molekül olan alkol dehidrogenaz; hidrojen atomlarının alkolden (etanol) bir kofaktör olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'e transferini sağlayarak, alkolü (etanol) asetaldehite dönüştürür (32,33).



Bu sistemde alkolün oksidasyonu nikotin amid adenin dinükleotid kofaktörünün (NAD) NADH' e indirgenmesine bağlı olmakla birlikte kronik alkol kullananlarda NADH/NAD oranı artarak karaciğerde laktat, yağ asidi ürik asit oluşumunun artmasına neden olur.

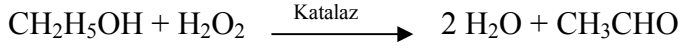
*Mikrozomal Etanol Oksitleyici Sistem (MEOS)*; Lieber ve De Carli tarafından tanımlanan bu sistemde endoplazmik retikuluma yerleşmiş olan karmaşık fonksiyonlu bir oksidaz görev yapar (P- 450), karaciğerde alkolün de dahil olduğu birçok ilacın oksitlenmesini sağlar. Bu enzim sisteminde NADPH kullanılır. NADPH kofaktör olarak NAD yerine oksijene ihtiyaç duyar, oksitlenme NADPH + H'in NADP' ye dönüşmesiyle gerçekleşir (33).



Alkol; sitokrom P- 450 redüktaz enzimine bağlanmada ilaçlar ile yarışır, bu nedenle kronik alkoliklerde alkolün enzimin aktif merkezini işgal etmesi sonucu barbitüratlar gibi bazı

ilaçların dolaşımdaki konsantrasyonunu toksik seviyeye ulaştırabilmesine neden olabilmektedir (33).

*Katalaz*; alkolün oksidasyonunda katalaz ve süperoksit dismutaz gibi peroksizomlarda bulunan enzimler hidrojen peroksit ile birlikte önemli rol oynamaktadırlar (31,33).



### **2.3.1 Alkol ve Beyin Bölgelerinde Oluşturduğu Hasarlar:**

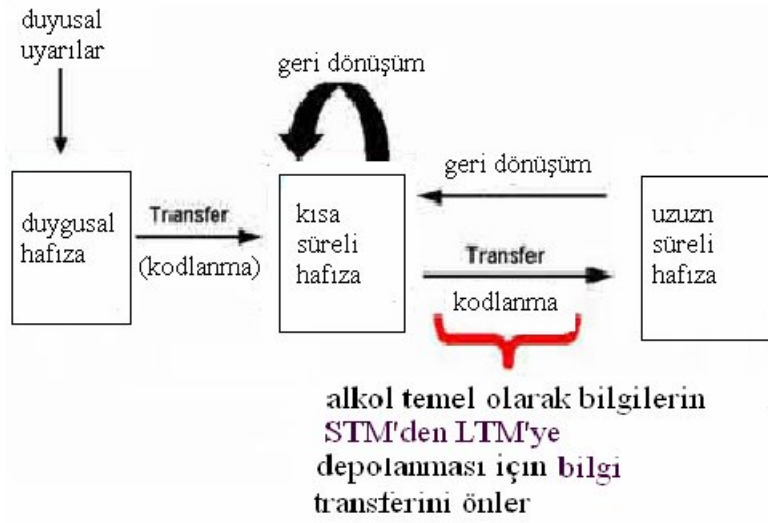
Alkol, kısa süreli bellekte anterograd amnezi ve lateral hipotalamik alanlarda hipotalamusun dentat gyrusu ile bağlantılı olup anjiotensin (nöromediatör) içeren hücreler ile dentat gyrus hücrelerinde inhibisyona neden olarak öğrenme ve belleğihasarlayıcı etkiye sahiptir (34,35).

Yapılan birçok çalışmada alkolün nöronal aktivitedeki baskılayıcı mekanizmasının, hücre membranının yapısında bulunan lipit gibi anahtar rol üstlenen moleküllerin hareketini değiştirmesinden ileri geldiği, böylece nöronal plastisiteyi önlediği görülmüştür. Bu değişikliklerin alkolün; hücre membranındaki negatif ve pozitif yüklü atomların geçişini kontrol etmesi, nöronlar arasındaki haberleşmeyi etkilemesinden kaynaklandığı ayrıca alkolün lipit moleküllerinin hareket alanını ve oranını arttırarak indirekt olarak membrana bağlı proteinlerin fonksiyonlarını bozması ve uyarılmalarını azaltması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (36-38).

Alkolün hipokampusta bulunan hücrelerin aktivitesini değiştirerek direkt ve hipokampal piramidal hücrelerin ateşlemesini baskılayarak lokal olarak hipokampal fonksiyonlara zarar vermesi muhtemeldir (23,39,40). Alkolün hasarlayıcı etkisinin hipokampus ve hipokampus ile ilgili yapılardaki hücresel aktiviteyi değiştirmesinin yanı sıra hipokampal nöronlar ve afferentleri etkilemesinin de direkt olarak hasarlara yol açtığı ileri sürülmüştür (23,37).

Alkol, önceden depolanmış bilgiye zarar vermezken, yeni uzun süreli bellek oluşumunu sağlayacak olan bilgilerin belli bir süreliğine depolandığı kısa süreli belleği (Short term memory) bloklayarak bilgilerin öğrenilmesini zorlaştırır (23). Acheson ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarda; alkol toksikasyonuna maruz kalan kişilere bir kelime listesi verildiği anda kelimelerin hatırlanmasında sorun olmazken 20 dk. sonra, bilgilerin tekrar hatırlanmasının güçleştiği gözlenmiştir. Bu sorun, kısa süreli bellekteki bilgilerin uzun süreli

bellek depolarına transferinde alkolün engelleyici bir etkiye sahip olmasından ileri gelmektedir (23).



**Şekil 6:** Alkolün bellek üzerindeki hasarlayıcı etkisi. Aaron M., (23).

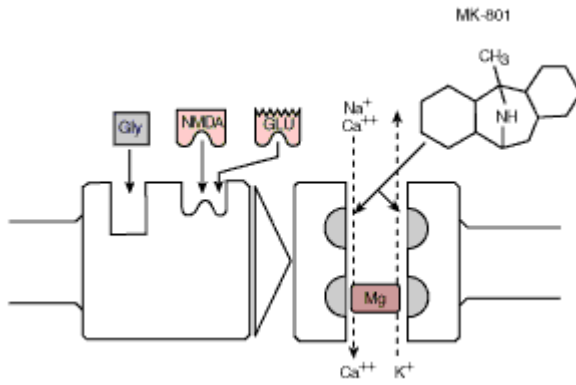
Alkol; beyin-sinir-hücre haberleşme sisteminde seçici özelliğe sahiptir. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda; alkolün, beyinin bazı bölgelerindeki hücrel aktiviteyi değiştirirken bazı bölgelerde değişiklik yapmadığı rapor edilmiştir. Alkol, medial septumda hücrel aktiviteyi baskılarken, lateral septumda hücrel aktiviteyi değiştirmedığı, ventral segmental alanda ise hücrel aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir (3).

Alkol afferent beyin bölgesindeki hücrel aktiviteyi değiştirerek, hipokampal sinapslardaki ligant kapılı iyon kanallarıyla etkileşerek çok farklı yollardan hipokampal fonksiyonları hasarlar (37). Membrana bağlı proteinlerin major iki tipi de (ligant kapılı iyon kanalları, voltaj kapılı iyon kanalları) alkolün farmakolojik olarak ilişkili dozlarından direkt olarak etkilenir (37). Yapılmış olan bir çalışmada, alkolün membrana bağlı proteinlerle etkileşerek (ligant kapılı iyon kanalları da dahildir) hücrel aktiviteyi etkilediği belirtilmiştir. Fakat bir başka çalışmada alkolün etkileşimde olduğu hedeflerin reseptör-iyonofor komplekslerinin sadece belirli alt tipleri olduğu bildirilmiştir (3).

Araştırmacılar, alkolün Glutamat reseptörlerinde de seçicilik gösterdiği ve GABA' nın ( $\gamma$ -aminobütrik asit) GABA<sub>A</sub> gibi bazı alt tiplerinde inhibitör etki yaparken diğer tipleri üzerine etkili olmadığını rapor etmişlerdir. Alkolün öğrenme ve bellek üzerindeki etkilerini araştıran bilim adamları; alkolün, NMDA reseptörlerinin bazı alt tiplerinin aktivitelerine karşı

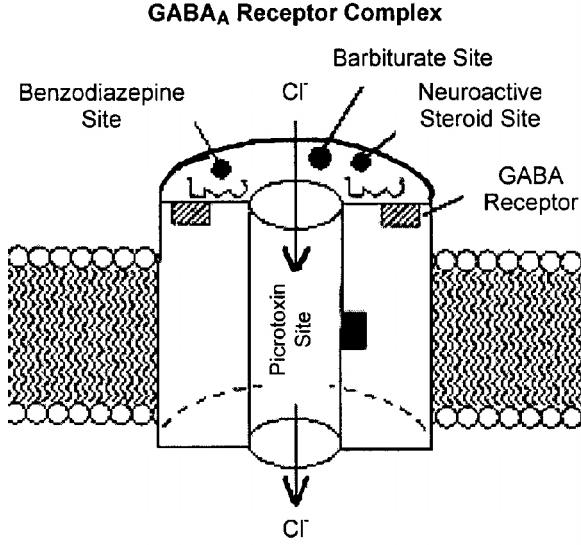
kuvvetli bir antagonistlik gösterirken, diğer glutamat reseptörlerinin aktivitelerindeki hasarlayıcı özelliğinin daha az olduğunu savunmuşlardır (3).

**2.3.1.1 Alkolün NMDA Reseptörleri Üzerine Olan Etkileri;** Alkol hipokampusta yaygın olan NMDA reseptörlerinin antogonisti olarak etki eder (40). LTP uzun süreli belleğin oluşumunda oldukça önemli role sahip olup NMDA reseptörleri LTP oluşmasında anahtar rol üstlenirler. (23,25). Kronik alkol tüketimi reseptör sıklığında artma (up regülasyon) yapar. Bunun sonucu olarak NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması, reseptör kanalı içinden nörona aşırı  $Ca^{2+}$  girişine ve nöron ölümlerine neden olur (25,31). Tüm bunların sonucunda NMDA reseptör antagonisti olan alkol; LTP'nin indüklenmesini inhibe eder, medial septal nöronlardan hipokampusa gelen sinyallerin çıkışını baskılayarak teta ritmini bozar ve uzaysal öğrenmede hasarlar meydana getirir, hem kazanılan hem de temsil edilen uzaysal olayları hasarlar (23,25).



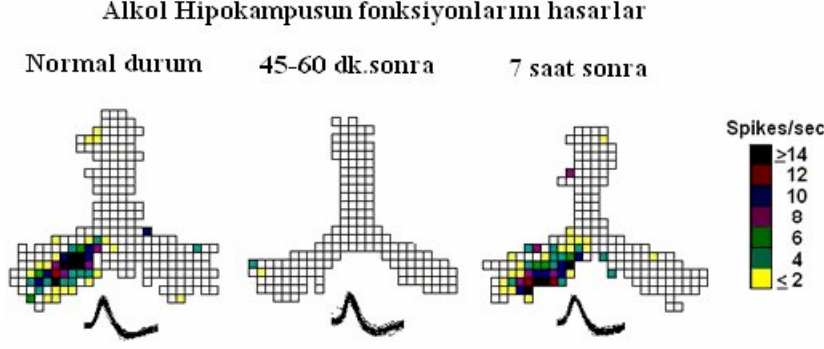
**Şekil 7:** Alkolün NMDA reseptörleri üzerine olan etkisi (41).

**2.3.1.2 Alkolün GABA Reseptörleri Üzerine Olan Etkileri;** Alkol, temel olarak beyinde ana inhibitör nöromediyatör olan GABA( $\gamma$ - aminobütirik asit)'nın GABA<sub>A</sub> tipi reseptörlerini indirekt olarak aktive eder, klorür kanallarının açılmasını kolaylaştırır böylece nöronlarda hiperpolarizasyon oluşur. Hücrede aksiyon potansiyelinin oluşması için gerekli olan eşik enerjisi değeri artar. Alkol beyinin nöronal hücre iletişim sisteminde seçici etkilere sahiptir. Nöronların bazı bölgelerinde GABA ile düzenlenen inhibisyon olaylarını arttırırken aynı hücrenin diğer bölgelerinde azalttığı belirtilmiştir (37,42). Alkol temel olarak GABAerjik internöronların uyarılmasını arttırarak, bellek ve öğrenmede gerekli temel hücrelerin aktivitesi üzerine etki ettiği düşünülmektedir (23).



**Şekil 8:** Alkolün GABA<sub>A</sub> üzerine olan indirekt etkisi, (43).

Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda; hipokampusun piramidal CA1 hücreleri, gerçekleşen olay ve davranışların düzenlenmesinde, belleğin oluşumunda kritik olarak önemli olan hücrelerdir ki bundan dolayı bu hücrelerde yapılan çalışmalarla zarar görmemiş hipokampal çıkışlarda alkolün oluşturduğu etkileri değerlendirmek mümkündür. Yapılmış olan bir çalışmada; 15dk. için Y şeklindeki labirente simetrik olarak yiyecek aramalarına izin verilen hayvanların beyinlerine mikroelektrotlar yerleştirip, hipokampal aktiviteyi ölçmüşler ve hipokampustaki nöronal aktivitenin alkol alındıktan 45 -60 dk. sonra yapılan kayıtların, alkol alınmadan önce kayıt edilen aktiviteye oranla oldukça azalma gösterdiğini, aktivitenin alkol alınımından 7 saat sonra ise eski haline döndüğünü istatistiksel olarak ortaya koymuşlardır (23,25). Yapılan bir diğer çalışmada araştırmacılar alınan alkol dozunun piramidal hücrelerdeki baskılama derecesini etkilediğini bulmuşlardır. 0,5 g/kg olan alkol dozunun hipokampal aktiviteyi belirgin bir oranda değiştirmezken 1,0 -1,5 g/ kg'lık bir dozun bir saat içerisinde aktiviteyi belirgin bir oranda baskıladığı gözlemlenmiştir (23,25).



**Şekil 9:** Alkolün hipokampal hücre aktivitesine olan etkisinin zamana bağlı değişimleri, Aaron M., (23,25).

Sonuç olarak yapılan çalışmalar göz önüne alındığında; öğrenme ve belleğin oluşmasında önemli rol üstlenen hipokampusun alkolün etkilerine karşı duyarlı olduğu görülmüştür. İnsanlarda yapılan çalışmalarda toksikasyona neden olacak düzeyde alkol tüketiminin kelime listelerinin öğrenilmesi, resimlerin tanınması gibi kısa süreli bellek oluşumlarını olumsuz yönde etkilediği, öğrenme ve belleği özellikle kısa süreli bilgilerin uzun süreli bilgilere gönderilme aşamasında etki ettiği bundan dolayı da önceden öğrenilen bilgilere zarar vermezken yeni bilgilerin hatırlanmasını zorlaştırdığı görülmüştür.

## 2.4 OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN ENZİMLER

Hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşan serbest radikaller, atomik veya moleküler yapıda çiftleşmemiş en az bir elektron bulunduran yapılar olup yüksek reaktiviteye sahiptirler. Somatik hücreler ve bağışıklık sisteminde hasarlara neden olurlar. Serbest radikallerin etkilerini nötralize eden, kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonlarını engelleyen moleküllere ise antioksidanlar denir ( 44-46 ).

**2.4.1 Oksidatif Stres;** Canlı organizmada normal metabolizma sırasında ortaya çıkabileceği gibi patolojik yollarla da oluşabilen serbest radikaller ve bunlara karşı koruyucu sistem olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması 'oksidatif' stres olarak bilinir (47,48).

Oksidatif stresin temel olarak iki nedeni olabilir (45,47);

1). Beslenme bozukluklarına bağlı olarak gerçekleşen antioksidanların yetersizliği ( $\alpha$ - tokoferol, askorbik asit, GSH sentezi için gerekli sülfür içeren aminoasitler veya riboflavin yetersizliği v.b. )

2). Serbest radikal üretiminin artması (aşırı oksijene maruz kalma, toksinler veya romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar olaylarda fagositlerin aşırı uyarılması)

**2.4.2 Serbest Radikaller;** bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, moleköl ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjili olup eşleşmiş elektronları ayırarak işlerine engel olurlar bu da serbest radikalleri hem tehlikeli hem de kullanışlı yapar (44,45,47,49,50).

Serbest radikaller; elektron transferi, enerji üretimi ve diğer pek çok metabolik işlevde temel oluşturdıklarından dolayı yaşam için gereklidirler (46). Bunun yanı sıra zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasara neden olur, 1954 yılından bu yana bir çok bilim adamı serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğunu bildirmiş bulunmaktadır (44,45,47).

Serbest radikalleri nötralize edilememesi durumunda ;

- Hücre membranı proteinlerini yıkararak hücreleri öldürme,
- Membran lipit ve proteinlerini yok edip, hücre membranının yapısını bozarak hücre fonksiyonunu engelleme,
- Çekirdek membranını yararak çekirdekdeki genetik materyale etki edip DNA' da kırılma ve mutasyona açık hale getirme,
- Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ettikten sonra, bağışıklık sistemini zayıflatma gibi vücutta ciddi hasarlar oluşturabilir (45,51).

#### **2.4.2.1 Serbest Oksijen Radikal Kaynakları:**

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı vardır;

##### **2.4.1.1 Eksojen Kaynaklar;**

- Radyasyon Etkisi,
- Alkol ve uyuşturucu gibi alışkanlık yapan maddeler,

- *Ksenobiyotikler*; hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; hiperoksi, pestisidler, sigara dumanı, solventler, anestezipler, aromatik hidrokarbonlar,

- *Antineoplastik ajanlar*; nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin,

- *Stres*; strese artan katekolaminlerin oksidasyonu serbest radikal kaynağıdır.

#### **2.4.2.1.2 Endojen Kaynaklar;**

- Mitokondrial elektron transportu ; en büyük endojen kaynaktır.

- Peroksizomlar; oksidazlar, flavoproteinler,

- Enzimler ve proteinler; ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin,

- Küçük moleküllerin oksidasyonu; tioller, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler,

- Endoplazmik retikulum ve nükleer elektron transport sistemleri; sitokrom P-450, sitokrom b<sub>5</sub>, vs.

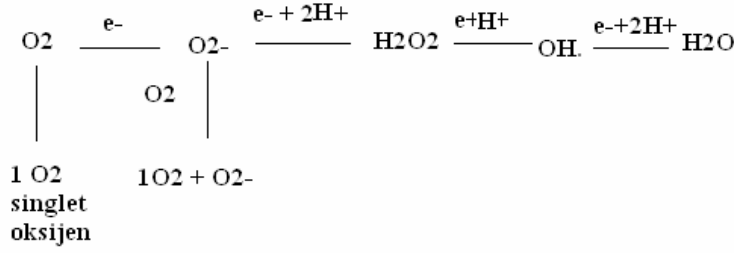
- Plazma membranı enzimleri; lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu,

- Oksidatif stres yapıcı durumlar; iskemi, travma, intoksikasyon,

- Aktive olmuş fagositler ( solunumsal patlama), (44,47,52,53).

**2.4.2.2 Serbest Oksijen Radikal Türleri;** Mitokondrilerdeki elektron transport zincir reaksiyonları sonucu normalde suya dönüşen moleküler oksijenin % 1-3'ü 1 elektron alarak O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 2 elektron alarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 3 elektron alarak ·OH oluştururlar (47). Moleküler oksijenin hidroksitle tepkimesi veya elektromanyetik radyasyonun absorpsiyonu, singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) üretimine yol açabilir (52).

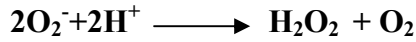




**Şekil 10:** Mitokondriyal elektron transportu sırasında serbest oksijen radikallerinin oluşması, Buchter D.D., (47).

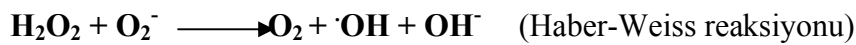
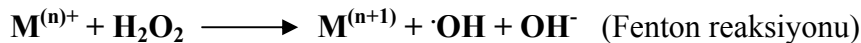
**2.4.2.2.1 Süperoksit Radikalleri ( $\text{O}_2^-$ );** Süperoksit dismutaz adı verilen bir enzimle inaktive edilirler, hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında veya oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşurlar (45). Biyolojik sistemlerde üretilen çok sayıdaki diğer radikallere göre fazla reaktif olmamakla birlikte asıl önemi;  $\text{H}_2\text{O}_2$  kaynağı olması ve geçiş metalleri varlığında çok reaktif olan OH radikaline dönüşmesidir (52).

**2.4.2.2.2 Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):**  $\text{O}_2^-$  anyonunun spontan veya SOD enzimiyle dismutasyonu veya direkt olarak oksijenin indirgenmesiyle meydana gelir (47).

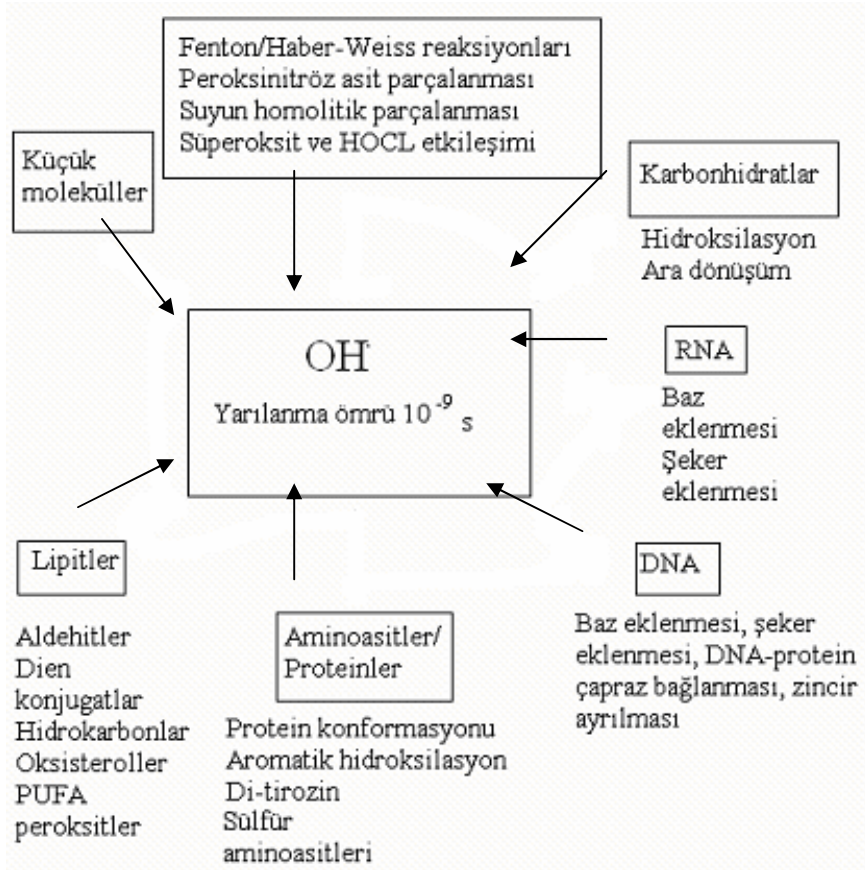


Kimyasal olarak radikal özelliği göstermese de reaktif oksijen türevi olarak kabul edilmekte, serbest radikal hasarında önemli rol oynamakla birlikte oluştuktan sonra ya direkt olarak oksidatif hasar yapar ya da Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonuna girerek daha reaktif olan hidroksil radikaline dönüşür (47,54).

**2.4.4.4.3 Hidroksil Radikali( $\text{OH} \cdot$ ):** Biyolojik sistemlerde bulunan en reaktif ve hasar verici serbest oksijen radikali olup demir veya bakır gibi geçiş metallerinin (M) varlığında  $\text{O}_2^-$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den (Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları) veya  $\text{ONOO}^-$ 'den oluşur (47,50,53).



Hidroksil Radikali (OH<sup>·</sup>) başlıca lipitler, proteinler, karbonhidratlar, sitokromlar ve nükleik asitler olmak üzere hemen hemen tüm hücrel makro moleküllerle reaksiyona girebilir, DNA yapısındaki baz ve şekerlere ciddi zararlar verir ki bunun yanı sıra DNA zincir kırılmasını da indükler. Hasar çok kapsamlı olursa hücrel koruyucu sistemler tarafından onarılamayabilir ve hücre ölümleri gerçekleşir. 'OH<sup>·</sup>'ın reaktivitesi o kadar yüksektir ki; canlı hücrede meydana geldiği anda hemen ikincil radikaller oluşturarak yanındaki her biyolojik moleküle reaksiyon verir (47,53).



**Şekil 11:** Hidroksil radikali ve hücredeki çeşitli moleküllere etkileri, Allegra M., (47).

**2.4.2.2.4 Singlet Oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>):** Serbest radikal olmamasına rağmen çeşitli moleküller için potent oksidandır. Biyolojik olarak önemli proteinler ve metiyonin, triptofan, histidin veya sistein gibi aminoasitlerle reaksiyon vererek önemli hasarlar oluşturur (47,53).

**2.4.2.2.5 Hipokloröz asit (HOCl):** Yabancı organizmalar tarafından uyarılan tüm makrofaj sistemleri O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretir. Oluşan O<sub>2</sub><sup>-</sup> fagozomdaki SOD enzimi tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' e dönüştürülür. Bu molekül de miyeloperoksidaz enzimi tarafından ortamda bulunan klor

iyonlarıyla reaksiyona girerek HOCl oluştururken çoğunluğu geçiş metalleri varlığında  $\cdot\text{OH}$ 'ne dönüşür. Sonuçta ortaya çıkan her iki ürün yabancı organizmaları öldürmesi yanında çevredeki normal hücrelere de zarar verir. Özellikle hücre yüzeyinde bulunan moleküllerin sülfür (-SH) gruplarını okside ederek membran geçirgenliğini değiştirir (47).

#### **2.4.2.3 Reaktif Nitrojen Türleri:**

**2.4.2.3.1 Nitrik Oksit (NO):** Bir azot ve bir oksijen atomunun paylaşılmamış elektronlarıyla birleşmesinden oluşmuştur. Hücresel membranları kolayca geçen, hidrofobik ve yüksüz bir molekül olan  $\text{NO}$ , farklı genler tarafından kodlanan 3 izoformu bulunan NOS enzimi tarafından L- arginin'in guanidino grubundan sentezlenir (47, 55).

Kan basıncının düzenlenmesi, immün hücreler tarafından patojenlerin yıkımı, sinirsel iletim gibi birçok görev üstlenir. Fizyolojik konsantrasyonlarda Guanilaz siklaz ve protein kinazlar gibi hücre içi habercileri uyararak damar düz kasının gevşemesine neden olmasının yanı sıra lipit peroksidasyonun ilerlemesini inhibe eden serbest radikal hasarını azaltan yararlı yönleri de vardır. Buna karşın yüksek düzeylere ulaştığında demir-sülfür proteinleri ve diğer proteinlere hasar verebilir, Proteinlerin ADP-ribozilasyonunu artırır ve direkt olarak DNA hasarı yapar (47).

**2.4.2.3.2 Peroksinitrit anyonu (ONOO<sup>-</sup>):**  $\text{NO}$ 'in  $\text{O}_2^-$  radikallerinin tek başlarına sahip olduklarından çok daha fazla toksik özelliklere sahip, nitratlayıcı ve güçlü bir oksidan ajandır. Non-protein ve protein sülfhidriller gibi; önemli biyolojik maddeler, deoksiriboz ve çoklu doymamış yağ asitlerine saldırımları yüksek oranda toksik olmalarından ileri gelmektedir. Kısmen stabil olan  $\text{ONOO}^-$ , sonuçta çok reaktif olan peroksinitröz asit ( $\text{ONOOH}$ ) ve  $\cdot\text{OH}$ 'ne parçalanır.  $\text{ONOOH}$  stabil olmayan bir molekül olup, her zaman olmamakla birlikte  $\cdot\text{OH}$  radikaline dönüşür (47, 55).

**2.4.2.3.3 Peroksil Radikali (LOO<sup>•</sup>):**  $\text{LOO}^\cdot$  Oldukça reaktif olup zincir reaksiyonlarının ilerlemesini sağlar ve böylece yağ asitlerinin yoğun olarak parçalanmasına yol açar (54).

**2.4.3 Serbest Radikallerin Hücresel Yapılara Etkileri;** Serbest radikaller; hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler.

**2.4.3.1 Membran Lipitlerine Etkileri;** Biyomoleküllerin bir çoğu özellikle de lipitler serbest radikallerden etkilenir. Membrandaki kolestrol ve yağ asitlerinin doymamış bağları

serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Peroksidasyona en duyarlı olanlar doymamış yağ asitleridir. Radikal, yağ asidi yan zincirindeki karbon atomlarından bir hidrojen koparır, karbon merkezli bir radikal oluşur. Oluşan bu radikal oksijen ile birleşerek peroksi veya peroksil radikali oluşturur, bunlar da başka yağ asidi yan zincirleriyle reaksiyona girip lipid hidroperoksitleri oluştururlar. (46,47)

Lipit peroksitleri yıkıldığında, çoğu biyolojik olarak aktif aldehitler oluşur. Bu bileşikler hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrelerin diğer bölümlerine hasarı yayarlar, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitürik asitle ölçülebilen malondialdehid (MDA) oluşur ki bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Hidrofobik yapıda olduklarından, çoğu membrana bağlı moleküllerle reaksiyona girip membran geçirgenliğini ve mikroviskozitesini ciddi şekilde değiştirirler. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir (47,56).

**2.4.3.2 Proteinler Üzerine Olan Etkileri;** Serbest radikaller etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonuna bağlı olmakla birlikte proteinleri de önemli ölçüde etkiler. Doymamış ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı çok fazla iken sistin, sistein, histidin, metiyonin, triptofan ve trozin içeren proteinler oksidanlara en duyarlı olanlarıdır (46,47).

‘Serbest radikaller aminoasitlerin oksidasyonu yanında, peptid bağlarının hidroliz, disülfid bağları oluşumu ve çapraz bağlanmalara neden olduğundan dolayı enzimler fonksiyonlarını kaybedebilir’ (49).

**2.4.3.3 Nükleik Asit ve DNA’ya Etkileri;** Hidroksil radikali başta olmak üzere serbest radikaller nükleik asit bazlarının modifikasyonu ve DNA şeridi kırılmalarına neden olur, DNA polimerazı inhibe eder, karsinogenezis, hücre yaşlanması ve hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatıp ilerletebilir (45,46,51).

Tüm bunlara ek olarak serbest radikaller, hücrede enerji sistemini etkileyerek ATP seviyelerinde azalmaya neden olur. Oksidanlara maruz kalan hücrelerde hem glikolitik, hem de mitokondrial yol bloke olmaktadır. Glikolitik yolla ATP sentezinin blokajı GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) inhibisyonu, NAD azalması sonucu olmaktadır. Mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP sentezi de ATP sentetaz aktivitesinin azalması sonucunda etkilenir (51).

**2.4.4 Alkolün Oluşturduğu Oksidatif Stres:** Alkol tüketiminin karaciğer ve karaciğer dışı dokularda oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonuna neden olduğu, bu durumun ise kompleks ve interaktif bir süreç olduğu düşünülmektedir (36,47). Genellikle karaciğerde meydana gelen alkol metabolizmasının en erken fazında tam oksidasyon ile açığa çıkan oksijen ve NO radikalleri, asetaldehit artışı ile hücre içi redoks durumunu belirgin olarak değiştirmektedir (5). Ayrıca; alkol ve en önemli metaboliti asetaldehitin metabolize edilemediği dokularda serbest radikal türlerinin oluşumuna neden olduğu ve bu dokularda pro-oksidan etkisi sonucu alkolle ilişkili toksisite ve hasardan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (5,6).

Alkol metabolizması sırasında karaciğerde aktivitesi oldukça artan ksantin oksidaz, serbest radikal oluşumuna yol açmasının yanı sıra asetaldehit metabolizmasının da ksantin oksidaz veya aldehit oksidaz aracılığıyla serbest radikaller üretebilir. Kronik alkol tüketiminde daha aktif hale geçen hepatik mikrozomal P450 2E1 enzim sistemi ve katalaz yolunun da süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest radikallerin üretimiyle ilişkili olduğu ve serbest radikal üretimini artırdıkları bilinmektedir (5).

Alkol metabolizmasının çeşitli basamaklarında serbest radikal üretimine bağlı olarak alkolle indüklenen pro-oksidan stres oluşmaktadır. Gastrointestinal yoldan hızla emilen alkolün %90'ı karaciğer hücrelerinde metabolize edilmekte; alkoldehidrogenaz, mikrozomal alkol okside edici sistem ve katalaz tarafından asetaldehite oksitlenmektedir. Alkoldehidrogenaz tarafından NAD'nin NADH'a indirgendiği ve tekrar kullanılmak üzere aldehit oksidaz tarafından NAD'ye yükseltildiği basamakta reaktif oksijen türleride üretilmektedir. Organizmada alkol metabolizması sırasında oluşan artmış lipid peroksidasyonu, ya karaciğerde oluşan peroksidatif sürece bağlı olarak indirekt, ya da alkolün dolaşan lipitler ve hücre membranları üzerine olan direkt etkisinden ileri gelmektedir (4,46).

## 2.5 ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR

Normal fizyolojik koşullarda bile oksijen radikallerine maruz kalan hücre ve dokular radikal ürünleri ve reaksiyonları inhibe eden bir sisteme sahiptir, radikallerle oldukça ivedi reaksiyonlara girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler antioksidan olarak tanımlanmaktadır (52).

Antioksidanlar dört şekilde etki ederler:

1). *Süpürücü etki (scavengig)*; antioksidan enzimler tarafından serbest oksijen radikalleri tutar veya daha zayıf bir moleküle dönüştürür.

2). *Bastırıcı etki (quencher)*; vitaminler ve flavonoidlerin serbest oksijen radikallerine bir  $H^+$  ekleyip aktivitelerini azaltır veya tamamen inaktif şekle dönüştürür.

3). *Onarıcı etki (repair)*; DNA'da oluşan hasarları azaltır.

4). *Zincir kırıcı etki (chain breaking)*; hemoglobin seruloplazmin ve minerallerin serbest oksijen radikallerini bağlar (47).

**2.5.1 Hücresel Antioksidan Komponentler:** Reaktif oksijen metabolitleri SOD, GSH-Px, Katalaz gibi hücresel antioksidan enzimlerce indirgenir.

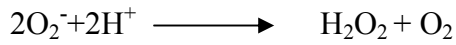
**Tablo 1:** İntraselüler antioksidanlar ve reaksiyonları

ANTİOKSİDAN	REAKSİYONU
Süperoksid dismutaz	Süperoksidin giderilmesi reaksiyonlarında katalizler
Katalaz	$H_2O_2$ 'nin yüksek konsantrasyonlarının giderilmesini katalizler
Gulutasyon Peroksidaz	$H_2O_2$ 'nin düşük konsantrasyonlarının

	giderilmesinde kullanılır
--	---------------------------

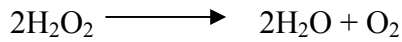
Dündar Y., 51.

*Süperoksid dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)*; Süperoksitin hidrojen perokside dismutasyonunu katalize eden bir metalo enzim olup memeli hücrelerinde bakır-çinko ve manganez içeren iki tipi vardır. Cu-Zn SOD enzimi sitozolde ve Mn SOD mitokondri intermembranöz kısmında bulunur. Her iki izomeride aynı reaksiyonu katalizleyen SOD, oksijen kullanan hücrelerde  $O_2^{\cdot -}$ 'nin  $H_2O_2$  'ye dönüşümünü sağlayarak üretilen  $O_2^{\cdot -}$  in zararlı etkilerini önler (46,47, 49).



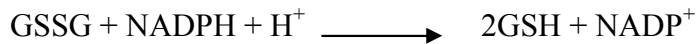
Cu-Zn SOD enzimleri; çok stabil enzimler olup kolaylıkla izole edilebilirler, ısıya karşı oldukça dirençlidirler. Cu-Zn SOD enzimleri; biri  $Cu^{+2}$  diğeri  $Zn^{+2}$  iki aktif kısımdan oluşan protein alt ünitesi içerir. 21 nolu kromozomda lokalizedir. Mn SOD ise dört protein alt ünitesi içerir, 6 nolu kromozomda lokalizedir (52).

*Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)*; konsantrasyonu değişmekle birlikte bütün hücre tiplerinde bulunan, dört adet hem grubu içeren bir enzim olup  $H_2O_2$ 'nin oksijen ve suya dönüşümünü katalizleyerek  $OH^{\cdot}$  oluşumunu önler (49,51)



Katalaz, tüm vücut organlarında bulunur ancak özellikle karaciğer ve eritrositlerde yoğunlaşmıştır. Beyin, kalp ve iskelet kasında az miktarda bulunmaktadır, kaslar arasında da farklı aktivitede olmaktadır (52).

*Glutatyon peroksidaz (GSH-Px; EC 1.11.1.9)*;  $H_2O_2$ 'nin suya dönüşümünü katalizleyen GSH-Px substrat olarak GSH'ı kullanır. Bu enzim aktivitesindeki azalma,  $H_2O_2$ 'nin artmasına ve buna bağlı olarak şiddetli hücre hasarına yol açar (47,51).



**2.5.2 Membran Antioksidanları**; Membranın hidrofobik lipid yüzünde intraselüler ortamdan farklı olarak lipitlerde çözünen ve hücresel enzimlerle yok edilemeyen radikaller

üretir. Başta  $\alpha$ -tokoferol (vit E) olmak üzere,  $\beta$ -karoten, ubiquinal bileşikleri ve koenzim Q temel membran antioksidanlarıdır (6,49,52).

Düşük dansiteli lipoproteinlerde mikro düzeylerde bulunan ve onların oksidasyonunu önleyen Ubiquinol'un kaliteli bir antioksidan olduğu gösterilmiştir.  $\beta$ -karoten oldukça aktif bir radikal toplayıcı olup, ortamdaki oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak aktive olur. Yağda çözülen bir vitamin olan  $\alpha$ -tokoferol membranlar dışında ki ortamlarda oldukça zayıf bir antioksidan iken, membran lipit tabakaları arasında oldukça etkilidir (51).

**Tablo 2:** Membran antioksidanları ve etkileri

ANTIOKSİDAN	ETKİLERİ
Vitamin E	Membran lipitlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar
Koenzim Q	Mitokondriyal enerji metabolizmasında rol alır.
$\beta$ -karoten	Radikal türleri toplar, ayrıca singlet oksijen oluşumunu inhibe eder

Dündar Y., 51.

**2.5.3 Ekstrasellüler Antioksidanlar;** Vücut sıvıları ve organik ürünler antioksidan enzimlerin hiçbirini içermediklerinden dolayı glikozillenmiş serum proteinleri olarak tanımlanan SOD ve GSH-Px'in ekstrasellüler ortam ve organik materyallerde antioksidan olarak bir önemi yoktur; bunun yerine transferin, laktoferin, haptoglobulinler, albumin, seruloplazmin, bilirubin, ürik asit, glikoz gibi proteinler temel ekstrasellüler antioksidanlardır (51).

**Tablo 3:** Ekstrasellüler antioksidanlar ve özellikleri Membran antioksidanları ve etkileri .

ANTIOKSİDAN	ETKİLERİ
Askorbik Asit	Hidroksil radikal giderici ve tokoferolü indirger



Transferin	Serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonunu inhibe eder
Laktoferrin	Düşük pH'lı ortamlardaki demir iyonlarını bağlar
Haptoglobulinler	Hemoglobin bağlayarak 'hem' in salınmasını önlerler
Hemopeksin	Ortamdaki serbest hem proteinlerini bağlayarak oksidasyonu inhibe eder
Albumin	HOCl radikallerini toplar, hem proteinlerini ve bakır metal iyonlarını bağlar
Seruloplazmin	Süperoksit radikallerini nötralize eder, bakır iyonlarını bağlar
Bilirubin	Önemli bir peroksit radikali toplayıcısıdır
Mukus	Hidroksil radikali toplar
Ürik asit	Genelde metal bağlayıcı olarak çalışan değişik radikalleride toplar
Glukoz	Hidroksil radikali giderici antioksidan moleküldür

Dündar Y.

## 2.6 PROPOLİS VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

Propolis işçi arıların arka ayaklarında bulunan polen sepetlerine, bitkilerin filiz ve tomurcuklarından topladıkları, reçinemsı maddeleri ve bitki salgılarını başlarında bulunan guddeler tarafından salgılanan enzimlerle biyokimyasal değişikliğe uğratarak oluşturdukları kırı sarıdan, koyu kahverengine değişen renkte ve oda sıcaklığında yarı katı halde olan bir maddedir ( 6,7).

Yapılan çalışmalar sonucunda propolisin anti-bakteriyal, anti-viral, anti-fungal, anti-inflamatuar, anti-oksidan, immuno-sitümülator etkilerinin olduğu belirtilmiştir (8-13). Bu özelliklerinden dolayı arılar propolisi kovani güçlendirmenin yanı sıra kovani bakteri ve

virüs enfeksiyonlarına karşı da korumak için kullanırken, insanlar propolisi bu özelliklerinden dolayı ilaç ve kozmetik sanayinde sıklıkla kullanmaktadır (6,7).

Ham propolisin yapısında kaynağına göre değişmekle birlikte; %50-55 reçine ve balsam (flavonoidler, fenolik asitler, esterler), % 20-35 bitkisel kaynaklı mumlar, %10-15 eterik yağlar, %2-5 polen (proteinler) ve az miktarda organik ve inorganik bileşikler bulunur (6,7).

Yapılan çalışmalarda propolisin içerdiği bileşenlerinden dolayı; anti-mikrobiyal , anti-bakterial, anti-fungal, anti- enflamatuar, anti-oksidan, anti-hemorajik, anti-tümoral aktivite, ateş düşürücü, kılcal damarların genişliğini azaltıcı etki, kılcal damarları güçlendirici etki, gastrik ülseri iyileştirici etki, akut kalp yetmezliğini önleyici ve kalp yetmezliğini iyileştirici etki gösterdiği ayrıca kollejen ve elastinin yapımını arttırdığı, mitozu stimüle ederek protein biyosentezini arttırdığı, memeli doku rejenerasyonunu, hücresel solunumu, vücut immünesini, interferon üretimini, epitelyum, endotelyum ve hücre membranının rejenerasyonunu stimüle ettiği belirtilmiştir (8-13,59).

*Propolisin Antioksidan Etkileri;* Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlara karşı propolisin koruyucu etkisinin içerdiği flavonoidlerin serbest radikalleri süpürücü etkisinden ileri geldiği düşünülmektedir (7,10,11). Flavonoidler sadece tepkimelerin artmasını önlemekle kalmayıp aynı zamanda serbest radikallerin oluşumunu da önler (56).

Kanser ve alkol intoksikasyonuna bağlı olarak oluşan reaktif oksijen türleri; membran lipitlerinin peroksidasyonu sülfhidril enzimlerinin inaktivasyonu, proteinlerin ters bağlanması, DNA kırılmaları ve kodlanma bozukluğu gibi etkileri sonucunda hücrelerde hasara neden olurlar (11,45-48,52).

Yapılan araştırmalarda propolis ekstraktlarının aktif bileşeni olan CAPE ( Cafeic acid phenethyl ester) ve flavonoidlerin (galangin, quercetin vb.) reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve CAPE'nin galangine oranla daha fazla olmakla birlikte her ikisinin de antioksidan özellikte olduğu ve ksantin oksidaz aktivitesini belirgin bir şekilde inhibe ederek serbest radikal oluşumunu önlediği gözlemlenmiştir (11).

Propolisin en önemli antioksidan mekanizması; serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarlarını tamir edici özellikte olmasından ve lipit peroksidasyonuna neden olan polimerize zincir reaksiyonlarını kırıcı özelliği ile ROS'ları dokulardan uzaklaştırıcı etki göstermesinden kaynaklanmaktadır (10).

### 3. MATERYAL METHOD

**3.1 Hipotez:** Alkolün öğrenme üzerinde oluşturduğu hasarlara karşı propolisin koruyucu özelliğini saptama.

**3.2 Araştırma Tipi:** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 2005/39 no' lu kararı ile onaylanmış deneysel hayvan çalışmasıdır.

**3.3 Araştırmanın Evreni:** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında ebebeyn sıçanların çiftleştirilmesi ile üretilen ortalama 200 gr ağırlığındaki 32 genç dişi Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar sabit oda sıcaklığında, standart 12:12 aydınlık:karanlık ve havalandırılmalı ortamda, her hayvan ayrı kafeste olacak şekilde yerleştirildi. Deney gruplarının özelliğine uygun hazırlanan besin içecekleri her gün aynı saatte yenilendi. Kafeslerin temizliği günlük yapıldı.

**3.4 Örneklem Büyüklüğü ve Yöntemi:** Rastgele seçilen sıçanlardan her grupta 8 sıçan olacak şekilde ayarlandı.

### 3.4.1 Deney Grupları:

*Grup 1 (Kontrol):* Deney süresince (30gün) kalorisi literatürdeki bilgilere göre belirlenen alkolün, kalorisine eş değer şeker içeren sıvı içecek diyeti uygulandı (60,62,63). Sıvı içecek diyetine başlamadan önce, 6. , 11. günlerde ve deney süresinin bitiminde hayvanlara T-labirent testi uygulandı

*Grup 2 (Propolis):* Deney süresince (30 gün) alkolün kalorisine eşdeğer şeker içeren sıvı diyetine Rodrigo ve arkadaşlarının uyguladıkları yöntemle göre hazırlanan propolis solüsyonundan yine Rodrigo ve arkadaşlarının koruyucu olarak belirledikleri miktar olan 150 mg/kg propolis solüsyonu eklendi (61). Kontrol grubu ile aynı tarihlerde, aynı şekilde T-labirent testi uygulandı.

*Grup 3 (Alkol):* İlk 5 gün boyunca Uzbay ve arkadaşlarının yöntemine göre hazırlanan sıvı içecek diyetinde; %2.4'lük alkolden (etanol) 75 ml eklendi ve alkolün kalorisine eşdeğer şeker diyetten eksiltildi (62-64). T-labirent uygulandıktan sonra 6 - 11. günler arasında %4,8'lik alkolden (etanol) 75 ml eklenerek alkolün kalorisine eşdeğer şeker diyetten eksiltildi. 5 gün itibariyle %4.8'lik alkole (etanol) maruz kalan hayvanlara 11. gün sonunda tekrar T-labirent testi uygulandı, 11. gün ile 30. gün arasında %7.2'lik alkolden (etanol) diyet 75ml eklendi ve aynı kaloriye eşdeğer şeker diyetten eksiltildi. Deney süresi tamamlandığında hayvanlara tekrar T-labirent testi uygulandı.

*Grup 4 (Alkol + Propolis):* Alkol grubuna deney boyunca verilen Uzbay ve arkadaşlarının yöntemine göre hazırlanmış olan sıvı içecek diyetine, bu grupta Rodrigo ve arkadaşlarının uyguladığı yöntemle göre hazırlanmış propolis solüsyonundan 150mg/kg olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol grubu ile aynı tarihlerde aynı şekilde T-labirent testi uygulandı. Diğer gruplar ile aynı tarihlerde, aynı şekilde T-labirent testi uygulandı.

### 3.5 T-Labirent Uygulaması:

Yükseltilmiş artı labirentin bir benzeri olarak düzenlenmiştir. Şartlı ve şartsız korkunun ayırt edilmesinde kullanılan anksiyete modelidir (65). Tekrarlanan denemelerle emosyonel öğrenme ve kısa süreli bellek değerlendirilir (66,67). Yerden 50 cm yükseklikte 3 kolu olan bir düzenek olup kollar 50x12 cm. boyutlarındadır. Şekil 12'de görüldüğü gibi kollardan birisi 40 cm. yüksekliğinde bir duvar ile kapatılmış olup, açık kollar 1cm. yüksekliğinde pleksiglas ile çevrilmiştir (68,69).



**Şekil 12:** T-labirent düzeneği.

Deney aletinin kapalı kolunun distal sonuna yüzü açık kola dönük şekilde konulan hayvanın 4 patisi ile bu kolu terk etmesi için geçen toplam süre bazal çıkma süresi olarak değerlendirildi, bu uygulama 30sn. ara ile iki kez daha tekrarlandı ve şartlı korkuyu ya da öğrenilmiş korkuyu yansıtan kapalı koldan çıkma süreleri sakınma 1 ve sakınma 2 süreleri olarak kaydedildi. Sakınma 2 belirlendikten 30 sn sonra deney düzeneğinin sağ açık kolunun distal sonuna konulan deney hayvanının bu kolu 4 patisi ile terk etmesi için geçen toplam süre kaydedildi. Şartsız korkuyu yansıtan açık kolu terk etme süresi kaçma süresi olarak değerlendirildi. Deney hayvanı bu denemeler sırasında kapalı koldan çıkmaz veya açık kolu terketmezse deney 300 sn. sonra sonlandırıldı (70). Yükseltilmiş T- labirent her denemeden sonra %20'lik alkolle silindi.

### **3.6 Cerrahi Uygulama:**

Deney gruplarına uygun olarak sıvı içecek diyeti uygulanıp t- labirent testinden 1 gün sonra gruplar Ketamin/Xylazin (90mg/kg i.p./ 10mg/kg i.p.) anestezisi altında uyutuldu. Kan rnemeleri alınıp, beyin açılarak antioksidan enzim çalışmaları için hipokampus, serebral korteks ve serebellum atlastaki yerleşim bölgelerine göre çıkartıldı (71). Dokular serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra çalışma zamanına kadar -80 C' de derin dondurucuda saklandı.

### **3.7 Analizler:**

NO ve MDA seviyeleri doku homojenatlarında; CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri süpernatanda; SOD aktivitesi etanol/kloroform ekstraktında ölçüldü. Enzim aktivitelerinin ölçüldüğü süpernatant ve ekstraktlarda ayrıca protein miktarı da belirlendi.

#### **3.7.1 Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması:**

Derin dondurucuda muhafaza edilen hipokampus, korteks ve serebellum dokuları çalışma günü çıkarılarak tartıldı. Cam tüplere konulan dokular üzerine 2 ml Tris-HCl (pH=7,4) tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16.000 devir/dk hızda 3 dakika homojenize edilip (IKA,Germany) son hacim Tris- HCl tamponuyla 3 ml'ye tamamlandı. Karıştırıldıktan sonra homojenatın bir kısmı NO ve MDA ölçümü için ependorflara alındıktan sonra, kalanın bir kısmı GSH-Px enzim aktivitesi ölçümü için 4000 rpm'de ve +4 °C sıcaklıkta 50 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Geriye kalanı da CAT enzim aktivitesi ölçümü için 10 sn süreyle 3 kez sonifike edildikten sonra aynı şekilde santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ekstraksiyona tabi tutulup etanol fazında SOD enzim aktivitesi ölçüldü.

#### **3.7.2 Nitrik Oksit (NO) Miktarının Tayini:**

Spesifik olmayan reaksiyonların oluşmasını önlemek için homojenatlar önce deproteinize edilip daha sonra nitrit/nitrat konsantrasyonları Griess reaksiyonu ile belirlendi. pH 9.7 olan Glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granüllerinin deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitratın nitrite indirgenmesi sağlandı. Üretilen nitrit; sülfonilamid ve N-naphthylethylenedaimin (NNDA) reaksiyonu sonucu pembe renk oluşumuna yol açtı. Oluşan renk spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda okundu. Elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlendi (72).

#### **3.7.3 Malondialdehit Miktarının Ölçülmesi:**

Uchiyama ve arkadaşlarının metoduna göre; MDA 'nın 95 °C' de tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli ürünün N-butanol fazından ekstrakte edilen süpernatantın spektrofotometre ile 535 ve 520 nm de ölçülmesiyle belirlendi. Standartlar

1,1,3,3 Tetrametoksipropan ile değişik konsantrasyonlarda hazırlanıp, sonuçlar değerlendirilerek, mol/gr yaşı doku olarak ifade edildi (73).

**3.7.4 SOD Enzim Aktivitesi lümü:** SOD (EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi ölçümü nitroblue tetrazolium (NBT) ile ortaya çıkan O<sub>2</sub><sup>-</sup> 'nin indirgenmesi esasına dayanan Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı. Metod; süperoksit üreticisi olarak ksantin-ksantinoksidaz sisteminin kullanılmasını ve Nitro Blue Tetrazolium'un (NBT) redüksiyonunun inhibe edilmesini içermektedir. Süperoksit radikalleri Nitro Blue Tetrazolium (NBT) gibi boyar maddeleri redklemekte ve böylece formazonlar oluşımaktadır. Bu formazonlar 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. SOD varlığında NBT'nin formazona dönüşümü engellenmektedir. Enzim miktarı ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşımaktadır. Enzimin bulunmadığı ortamda ise bu indirgeme meydana gelmeyip mavi-mor renk oluşımaktadır. Okunan absorbanslar aşığıdaki formül kullanılarak numunelerdeki % inhibisyon değeri bulundu (74).

$$\%inhibisyon = \frac{Ak - An}{Ak}$$

Ak: Absorbans kr

An: Absorbans numune

SOD, NBT redüksiyonu %50 inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

**3.7.5 Katalaz Enzim Aktivitesi Ölçümü:** Katalaz (CAT, Ec 1.11.1.6) aktivitesi Aebi'nin yöntemine göre ölçüldü. 240 nm'de maksimum absorbans veren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çalışma ortamına eklendiğinde katalaz tarafından H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye parçalanır, bu dönüşüm spektrofotometrik ölçümde absorbans azalması olarak görülür. Bu absorbans azalması katalaz enzim aktivitesiyle ilişkilidir. Çalışma prensibi; absorbansı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 0.500'e ayarlanmış pH;7 deki 50 mM fosfat tamponuna, numune eklenmesiyle 240 nm dalga boyunda absorbanlardaki düşüşün 10 sn aralıklarla kayıt edilmesi esasına dayanır. Değerler aşağıdaki formüle göre hesaplanarak, sonuçlar k/g protein olarak ifade edildi(75).

$$k = [ 2.3x \log (OD_1-OD_2) ] / \Delta t (sn)$$

**3.7.6 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi:** Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9) aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre; NADP'ın enzim aktivitesiyle ortamdan uzaklaştırılması sonucu 340 nm 'de absorbansın azalması ölçüldü. GSH-Px, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında redükte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin bulunduğu ortamda GSH-Px 'in oluşturduğu okside glutatyon, gultatyon redüktaz ve NADPH yardımıyla tekrar gultatyona dönüşür. Enzim tarafından ortamdan uzaklaştırılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> başına NADPH'ın NADP'ye yükseltgenme döngüsü gerçekleşir ve oluşan NADP<sup>+</sup> absorbans azalmasına neden olur (76).

$U/L = [ (\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6} ] \times (1/0.02)$  şeklinde hesaplanarak GSH-Px enzim aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

**3.7.7 Potein Ölçümü:** Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak folin-Ciocalteu-Penol reaktifini indirgemesi ve koyu mavi renk oluşumuna bağlı olarak ortamdaki protein konsantrasyonunun ölçüldüğü Modifiye Lowry yöntemi kullanıldı (77,78).

**3.8 İstatistiksel Analiz:** Araştırmamızda kullandığımız deneklere ilişkin ölçülebilir değişkenler Shapiro Wilk normallik testi ile test edildi. Değişkenlerin normal dağılım göstermediği saptandı (P<0,05). Bu nedenle araştırmamızın istatistiksel değerlendirilmesinde parametrik olmayan testler kullanıldı. Deneklerin T-labirentteki sonuçlarının zaman içerisindeki değişimi Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Alkol, propolis, alkol + propolis gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılmaları; Mann – Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Beyinin farklı bölgelerinden alınan dokularda ölçülen enzim aktiviteleri ve oksidan



maddelerin düzeyleri Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlı olanların ikişerli karşılaştırılmaları, Mann – Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

#### 4. BULGULAR

Deneklerin kognitif fonksiyonlarını test etmek için T-labirent testini uyguladık. T-labirentteki hayvanların kapalı kola konulmalarından sonra davranışlarında; yabancı ortama konulmalarından dolayı defakasyonlarında bir artış, buldukları ortamı tanıma hareketleri ve koklama hareketleri gözlemlenmiş olup, açık kola geçtikleri süre içerisinde havayı koklama, taranma, ön ayakları ile burnunu ve yüzünü kaşıma hareketleri gözlemlendi. Grupların T-labirentteki sonuçları her bir grup için ayrı ayrı değerlendirilip tablo halinde verildi (Tablo 4-7).

**Tablo 4:** Deney protokolü uygulanmadan önce T-labirent testinde grup içindeki bazal süre, sakınma 1, sakınma 2, şartsız korku değerleri (Ortalama  $\pm$  Standart Sapma).

	Gruplar (n=8)	Bazal Süre (saniye)	Sakınma 1 (saniye)	Sakınma 2 (saniye)	Şartsız Korku (saniye)
1	Kontrol	7,88 $\pm$ 1,28	75,25 $\pm$ 13,19	273,75 $\pm$ 26,25	73,50 $\pm$ 7,94

2	Propolis	19,25 ± 7,92	95,00 ± 16,00	293,13±6,87	80,38 ±11,65
3	Etanol	13,00 ± 2,81	58,88 ± 5,44	288,75±11,25	90,25 ± 9,09
4	Etanol+ Propolis	15,00 ± 4,38	89,13 ± 16,17	300 ± 0	103,88 ± 13,28

**Tablo 5:** 6.günden (% 2,4'lük alkol uygulamasın ) sonra T-labirent testinde grup içindeki bazal süre, sakınma 1, sakınma 2, şartsız korku değerleri (Ortalama ± Standart Sapma).

	Gruplar (n=8)	Bazal Süre (saniye)	Sakınma 1 (saniye)	Sakınma 2 (saniye)	Şartsız Korku (saniye)
1	Kontrol	59,38 ± 5,29	237,5 ± 30,53	300 ± 0	41,75 ± 5,95
2	Propolis	71,88 ± 9,06	244,38 ± 27,29	285,63 ± 9,7	80,88 ± 7,02
3	Etanol	22,88 ± 7,3	180,38 ± 12,35	282,13±11,72	86,63 ± 8,70
4	Etanol+ Propolis	29,72 ± 5,91 <sup>a</sup>	193,25 ± 25,50	300 ± 0	115,88 ± 13,16

a ; p< 0,05 grup 1 ile karşılaştırıldığında,

**Tablo 6:** 11.günden (% 4,8'lik alkol uygulamasın ) sonra T-labirent testinde grup içindeki bazal süre, sakınma 1, sakınma 2, şartsız korku değerleri (Ortalama ± Standart Sapma).

	Gruplar (n=8)	Bazal Süre (saniye)	Sakınma 1 (saniye)	Sakınma 2 (saniye)	Şartsız Korku (saniye)
1	Kontrol	116,13±11,12	244,75 ± 27,79	290 ± 10	64,50 ± 6,49
2	Propolis	107,0 ± 10,06	189,38 ± 22,01	300 ± 0	55,88 ± 12,11
3	Etanol	30,13 ± 7,47	123 ± 19,36 <sup>a</sup>	270,13±29,87	130,88 ± 10,04
4	Etanol+ Propolis	30,0 ± 8,27	135,13 ± 6,3 <sup>a</sup>	259,38±27,29	114,38 ± 11,11

a ; p< 0,05 grup 1 ile karşılaştırıldığında,

**Tablo 7:** 30.günden (deney sonu, % 7,2'lik alkol uygulaması ) sonra T-labirent testinde grup içindeki bazal süre, sakınma 1, sakınma 2, şartsız korku değerleri (Ortalama ± Standart Sapma).

	Gruplar (n=8)	Bazal Süre (saniye)	Sakinma 1 (saniye)	Sakinma 2 (saniye)	Şartsız Korku (saniye)
1	Kontrol	267,5 ± 22,28	300 ± 0	300 ± 0	37,75 ± 10,7
2	Propolis	263,13±19,36	290 ± 9,37	298,75±1,25	56,75 ± 6,36
3	Etanol	55 ± 18,22 <sup>a</sup>	93,75 ± 27	155,63 ± 31	124,38 ± 12,58
4	Etanol+ Propolis	162,75±28,53 <sup>a,b</sup>	239,38 ± 23,80	300 ± 0	46 ± 4,8

a ;  $p < 0,05$  grup 1 ile karşılaştırıldığında,

b ;  $p < 0,05$  grup 2 ile karşılaştırıldığında,

#### 4.1 T- Labirent Değerlerinin Karşılaştırılması;

Grup içerisinde bazal süre, sakınma 1, sakınma 2, şartsız korku değerleri gruplar arasında farklılık göstermekle birlikte istatistiksel olarak karşılaştırıldıktan sonra anlamlı çıkan grupların karşılaştırılması yapılarak tablo ve grafik halinde verildi (Tablo 4-7, Şekil 13-16 ).

► Başlangıç değerlerine göre;

Tablo 5’te görüldüğü üzere 6. günde bazal süre açısından karşılaştırma yapıldığında grup 1-2 arasında ve grup 1-4 arasında istatistiksel olarak fark yoktur ( $P > 0,05$ ). Her grubun kendi içinde meydana gelen değişimleri gruplar arasında eşit düzeyde olduğundan gruplar arasında fark bulunmamıştır. Gruplar arasında 11. günde bazal süre açısından yapılan karşılaştırma Tablo 6’da verilmiş olup; grup 1- 2 arasındaki değişim aynı doğrultudadır ( $P > 0,05$ ). Tablo 7 incelendiğinde 30. günde bazal süre açısından yapılan karşılaştırmada grup 1-2 arasındaki değişim eşit düzeyde etkili iken grup 1-4 ve grup 2-4 arasında istatistiksel olarak fark olduğu görülmüştür ( $P < 0,05$ ). Grup 4’teki bazal süre değerleri grup 1 ve grup 2’ ye göre daha kısa süreli ölçülmüş olup bu azalma istatistiksel olarak önemlidir.

► Gruplar sakınma 1 sürelerine göre başlangıç değerleriyle karşılaştırıldıklarında;

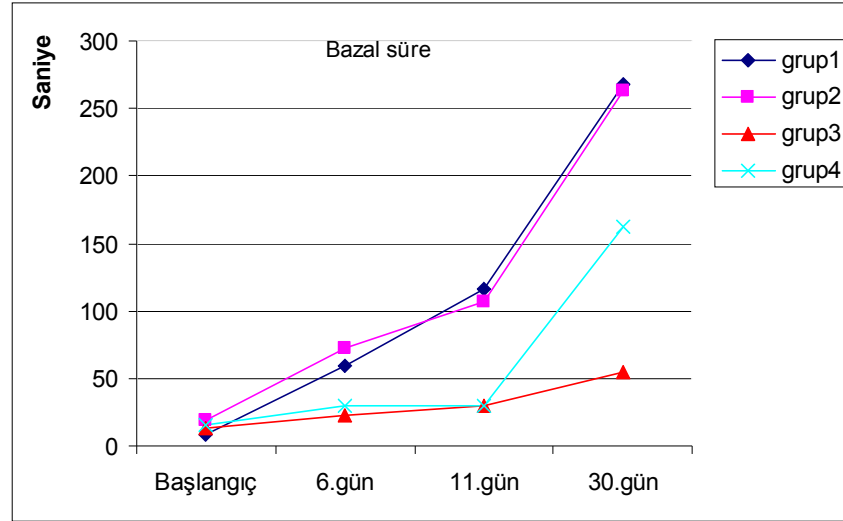
6.günde grup içinde değişimin olduğu (Tablo 5, Şekil 14), bu değişimin gruplar arası karşılaştırması yapıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı yani gruplarda ki değişimin aynı doğrultuda olduğu bulunmuştur. Tablo 6 ve şekil 14 incelendiğinde; 11. günde grup 1- 2, grup 2- 3, grup 2-4, grup 3-4’ün aralarındaki değişimin eşit düzeyde olmasına karşın grup 1-3 ve grup 1-4’ün aralarında anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir ( $P < 0,05$ ). Grup 3’ün (alkol) sakınma 1 değerinin; grup 1 (kontrol) ve grup 2 (propolis)’ ye göre

daha kısa süreli olduğu bulunmuştur (Tablo 6, Şekil14). Buna göre alkol sakınma 1 değerini azaltmış, propolis alkolün bu özelliğine karşı kısmen koruyucu olmuştur. 30. günde ise gruplar aralarında karşılaştırıldığında değişimlerin eşit düzeyli olduğu, istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür (Tablo 7, Şekil 14).

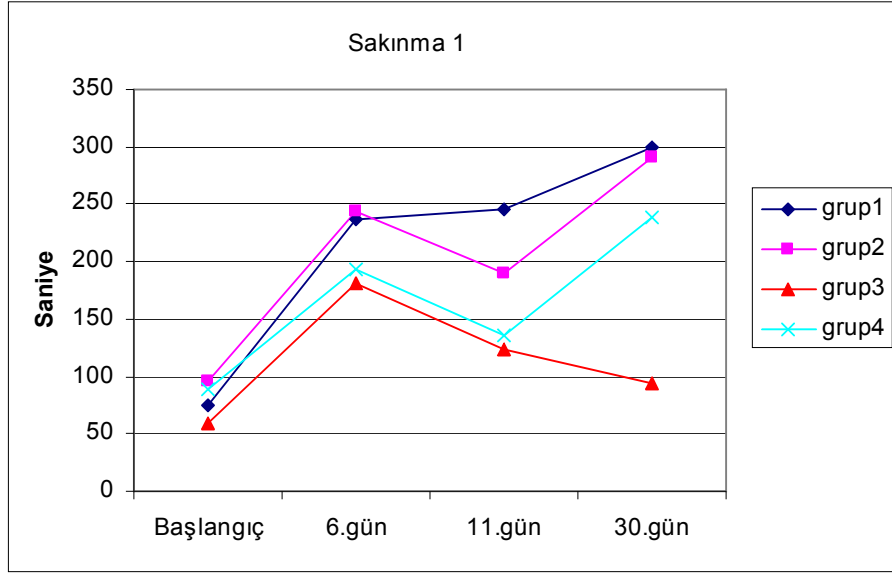
► T- labirentteki sakınma 2 sürelerinin gruplar arası karşılaştırılması sonucunda;

Başlangıç günü gözlenen değerlere göre 6. ve 11. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı, 30. günde ise 3. grubun diğer gruplara oranla farklılık gösterdiği saptanmıştır ( $P < 0,05$ ) (Tablo5-7, Şekil 15).

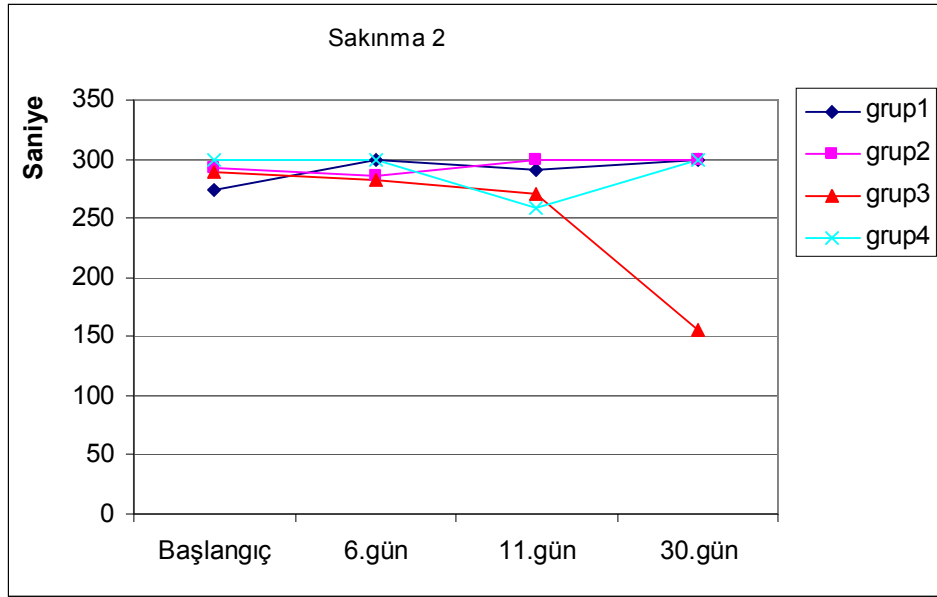
► Şartsız korku değerleri karşılaştırıldığında; 6. günden 11. güne kadar gruplar arasında istatistiksel açıdan fark olmayıp (Tablo5,6), 30. günde grup içerisinde değişim olmasına rağmen bu değişimler gruplar arasında aynı doğrultuda artmaktadır (Tablo 7).



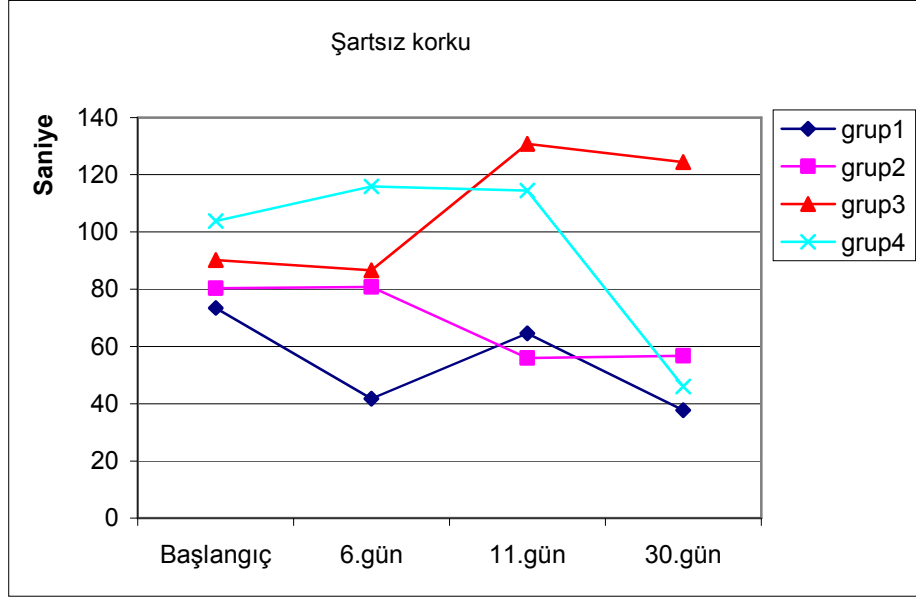
Şekil 13: Grupların T- labirentteki bazal süre değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 14: Grupların T- labirentteki sakınma 1 değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 15: Grupların T- labirentteki sakınma 2 değerlerinin karşılaştırılması.



**Şekil 16:** Grupların T- labirentteki şartsız korku değerlerinin karşılaştırılması.

Bir aylık süre sonunda T- labirentteki ölçümleri tamamlanan deney grupları bir gün süre ile alkollü diyetten yoksun beslendi ve sakrifiye edilmeden önce alkol yoksunluk sendromu davranışları olan; lokomotor hiper aktivite, artmış serotonik aktivite, postür bozukluğu, yürüme bozukluğu, irritabilite ve ajitasyon, ıslak köpek silkinmesi, kuyrukta sertlik, tremor, diş çatırdaması, katatoni gösterip göstermedikleri gözlemlendi:

- Alkol ile beslenen 3. ve 4. grublarda özellikle 3. grupta lokomotor hiper aktivite ve saldırganlığın yanı sıra, diş gıcırdatması ve kuyruklarında sertlik gözlemlendi.

#### 4.2 Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması;

Bir ay boyunca tartılan deneklerin vücut ağırlıklarındaki artış, hipokampus, serebral korteks, serebellum dokularındaki SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri ve NO, MDA değerleri karşılaştırılarak tablolar halinde verildi (Tablo 8-10). Kontrol ( $19,50 \pm 5,57$ ) ve propolis gruplarında ( $6,37 \pm 5,23^a$ ) doku artışı gözlenmişken alkol grubunda doku ağırlığında negatif yönde azalış gözlenmiş olup ( $8,25 \pm 5,1$ ) alkol+propolis grubunda ( $1,62 \pm 2,46$ ) bu azalış alkol grubuna göre daha az olmuştur (Tablo 8).

**Tablo 8:** Grupların vücut ağırlık kaybı ve hipokampus dokusunda enzim değerleri ile MDA ve NO miktarları (Ortalama  $\pm$  Standart Sapma).

	Gruplar (n=8)	VA % gr	SOD U/mg protein	CAT K/g protein	GSH-Px U7Mg protein	MDA nmol/g doku	NO Nmol/g doku
1	Kontrol	19,50±5,57	114,4±3,53	0,15±0,02	3,2±0,2	1,98±0,1	1,08±0,3
2	Propolis	6,37±5,23 <sup>a</sup>	148±9,10 <sup>a</sup>	0,13±0,02	4,5±0,3 <sup>a</sup>	2,03±0,3	1,29±0,3
3	Etanol	8,25±5,1 <sup>a,b</sup>	121,3±4,33 <sup>b</sup>	0,15±0,01	3,9±0,3	2,28±0,1	2,28±0,7
4	Etanol+ Propolis	1,62±2,46	150,6±19,13	0,13±0,01	3,8±0,4 <sup>b</sup>	1,53±0,2 <sup>c</sup>	1,18±0,3

a;  $p < 0,05$  grup 1 ile karşılaştırıldığında,

b;  $p < 0,05$  grup 2 ile karşılaştırıldığında,

c;  $p < 0,05$  grup 3 ile karşılaştırıldığında,

**Tablo 9:** Grupların korteks dokusunda enzim sonuçları, ile NO ve MDA değerleri

(Ortalama ± Standart Sapma).

	Gruplar (n=8)	SOD U/mg protein	CAT K/g protein	GSH-Px U7Mg protein	MDA nmol/g doku	NO Nmol/g doku
1	Kontrol	109,3±3,3	0,15±0,02	2,79±0,2	1,77±0,14	1,18±0,21
2	Propolis	143,3±5,9 <sup>a</sup>	0,18±0,04	2,39±0,1	1,61±0,12	1,15±0,30
3	Etanol	121,7±4,5 <sup>a,b</sup>	0,10±0,01	2,09±0,1 <sup>a</sup>	1,72±0,09	1,59±0,35
4	Etanol+Propolis	115,4±10,8	0,13±0,01	1,67±0,2 <sup>a,b</sup>	1,84±0,13	1,62±0,31

a;  $p < 0,05$  grup 1 ile karşılaştırıldığında,

b;  $p < 0,05$  grup 2 ile karşılaştırıldığında,

c;  $p < 0,05$  grup 3 ile karşılaştırıldığında,

**Tablo 10:** Grupların ve serebellum dokusunda enzim sonuçları, MDA ve NO miktarları

(Ortalama  $\pm$  Standart Sapma).

	Gruplar (n=8)	SOD U/mg protein	CAT K/g protein	GSH-Px U/Mg protein	MDA nmol/g doku	NO Nmol/g doku
1	Kontrol	91,14 $\pm$ 4,4	0,29 $\pm$ 0,02	1,6 $\pm$ 0,09	1,9 $\pm$ 0,07	1,0 $\pm$ 0,1
2	Propolis	104,6 $\pm$ 12,8	0,20 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,32	1,8 $\pm$ 0,15	0,8 $\pm$ 0,1
3	Etanol	89,1 $\pm$ 8,34	0,21 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,18	1,8 $\pm$ 0,14	0,7 $\pm$ 0,2
4	Etanol+Propolis	107,4 $\pm$ 10,8	0,31 $\pm$ 0,03 <sup>b,c</sup>	1,8 $\pm$ 0,25	1,3 $\pm$ 0,17 <sup>a,b,c</sup>	0,9 $\pm$ 0,1

a;  $p < 0,05$  grup 1 ile karşılaştırıldığında,

b;  $p < 0,05$  grup 2 ile karşılaştırıldığında,

c;  $p < 0,05$  grup 3 ile karşılaştırıldığında,

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde keyif verici ve sakinleştirici olarak kullanılan alkolün tüketiminde; stresli şehir hayatı, yoğun mesailer ve psikolojik sebeplere bağlı olarak artış görülmektedir. Bu nedenle alkol birçok araştırma projesine konu olmuş, alkolün canlı organizma üzerine yaptığı hasarlar ve bu hasarlara karşı olası koruyucu maddeler araştırılmıştır. Alkolün merkezi sinir sistemine olan etkisi ise son yıllarda araştırmacıların ilgisini çeken bir konudur. Daha önceden yapılmış olan çalışmalar bu konuda yetersiz kaldığından dolayı son yapılan çalışmalar alkolün, özellikle beyinin öğrenme merkezlerinde oluşturduğu hasarın araştırılmasına yöneliktir.

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılmış olan çalışmalar sonucunda; kognitif proseslerin hipokampusta şekillendiği, alkolün hipokampal formasyonu hasarlayarak öğrenme ve bellek oluşumunu engellediği açığa çıkarılmıştır. Alkolün, öğrenme ve bellekte oluşturduğu bu



hasarların merkezi sinir sisteminin her bölgesinde yaygın bir baskı üretmesinden ileri geldiği bildirilmiştir (3,23,37-39,41).

Alkol; beyin-sinir-hücre haberleşme sisteminde seçici özelliğe sahiptir. Etkileşimde olduğu hedeflerin reseptör-iyonofor komplekslerinin sadece belirli alt tiplerinde etkilidir (16). GABA'nın GABA<sub>A</sub> tipi reseptörlerini indirekt olarak aktive eder, klorür kanallarının açılmasını kolaylaştırır böylece nöronlarda hiperpolarizasyon oluşturarak hücrelerin uyarılabilirliğini zayıflatır (31).

Öğrenme ve belleğin şekillenmesinde bir model olan LTP iki sinir hücresi arasındaki bağların uzun süreli olarak güçlendirilmesidir (13). NMDA reseptörleri LTP'ın anahtarı olup alkol tarafından aşırı decede uyarılırlar. NMDA reseptörlerindeki bu aşırı uyarılma sonucunda içeriye fazla miktarda Ca<sup>++</sup> girer ve nöronlarda ölüme neden olarak kognitif fonksiyonları hasarlar (16,31).

Alkolün öğrenme üzerinde oluşturduğu hasarın nedenlerinden birinde alkol metabolizması sonucunda açığa çıkan serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasardan kaynaklandığı bilinmektedir (4,57). Alkol birçok dokuda lipit peroksidasyonuna neden olmasının yanı sıra, metabolizması sonucu açığa çıkan oksijen ve NO radikalleri, asetaldehit artışı gibi etkileriyle hücre içi redoks durumunu belirgin olarak değiştirmektedir (4,5,49). Bunlara ek olarak asetaldehidin metabolize olamadığı bu nedenle serbest radikallerin oluşmasına sebep olduğu, bütün bunların sonucu olarak alkol toksitesinin ve oluşturduğu hasarın arttığı bilinmektedir (4,57).

Propolis, günlük yaşantımızda sıkça besin maddesi olarak kullandığımız balın hammaddesi olup arıların çeşitli bitkilerden topladıkları polenlerden oluşturdukları bir maddedir. Kanser, tümör oluşumu, ülser gibi birçok hastalığa karşı koruyucu rolü araştırılmış, olumlu sonuçlar elde edilmiştir (8,9). Anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-enflamatuvar, anti-kanserojen, anti-oksidan, immunostümülatör gibi birçok özelliğe sahiptir (8-13).

Propolisin antioksidan özelliği alkolden kaynaklanan serbest radikallerin oluşumunu önleyerek, bu radikalleri süpürücü etki yapabilmektedir. Birçok araştırmaya konu olmuş propolisin antioksidan özelliğinin, içerdiği flavonoidlerden kaynaklandığı belirtilmiştir (7,10,11,79). Flavonoidlerin aktif bir bileşeni olan CAPE'nin lipooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği ve dokularda ROS ile indüklenen lipit peroksidasyonunu baskıladığı

bildirilmiştir (80). Fenolik bileşiklerin bu antioksidan etkilerinin; lipit peroksidasyonu sırasında oluşan lipitlerin polimer zincir reaksiyonlarını kırarak, ROS'un dokulardan uzaklaştırılmasını sağlamasından ileri geldiği belirtilmiştir (81).

Literatürde bizim çalışmamıza benzerlik gösteren tek araştırma; alkolün öğrenme üzerinde oluşturduğu hasarlara karşı propolis polifenolik bir bileşeni olan quercetin uygulandığında sonuçlarının artı labirentte değerlendirildiği bir çalışmadır (82). Yapılan araştırma sonucunda alkolün öğrenme ve bellekte oluşturduğu bozuklukları quercetin tersine çevirebildiği ve kronik olarak uygulanan quercetin kronik alkol uygulamasına bağlı olarak artan oksidatif hasarı önleyebildiği rapor edilmiştir (82). Bizim çalışmamızın sonuçları da literatürdeki bu çalışmayla paralellik göstermektedir.

Araştırmamızda öğrenme ve belleğin değerlendirilebilmesi için literatürde belirtilen T-labirent düzeneğini kullandık (83). Çalışma sonucunda elde edilen; grupların T-labirentteki bazal süreleri, sakınma 1, sakınma 2 ve şartsız korku değerleri tablo 4-7'de verildi. Sakınma 2 ve şartsız korku değerleri gruplar arasında farklı olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.

Grupların T-labirentteki bazal süreleri değerlendirildiğinde 6. günde yapılan testte sadece propolis ve alkol+propolis grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur (Tablo 5). Gruplar arasında 11. günde fark bulunmazken, 30. günde kontrol ile propolis + alkol grupları arasında ve propolis ile propolis + alkol grupları arasında istatistiksel açıdan fark vardır (Tablo 6-7).

Grupların T-labirentteki sakınma 1 değerleri incelendiğinde sadece 11. günde kontrol grubu ile alkol grubu arasında ve kontrol grubu ile alkol + propolis grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Gruplar arasında sakınma 2 ve şartsız korku değerleri arasında fark olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Şekil 13- 16 ve tablo 4-7 incelendiğinde alkolün akut dönemde (0-11 güne kadar ) hasarlayıcı etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı, kronik dönemde (11. günden sonra) gruplar arasında belirgin farklar olduğu bunların bazılarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir (Tablo 4-7). Bu sonuçlar literatürde yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir (82). T- labirent testin sonucunda; bazal süre, sakınma

1, sakınma 2 gibi şartlı korkuyu (öğrenilmiş korkuyu ) ifade eden parametrelerin sürelerinde azalma gözlenmesi, şartsız korku süresinin artması alkolün öğrenme ve kısa süreli bellek üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğunun bir göstergesidir. Bu bilgilere dayanarak alkolün kognitif süreci ilgilendiren beyin bölgelerinde hasarlara yol açtığını söyleyebiliriz. Oluşan bu hasarın moleküler düzeyde hangi mekanizmalardan kaynaklandığı konusunda bir yorum yapabilmek için beyinin farklı bölgelerinde antioksidan sistemleri karşılaştırdık.

Oksidatif stres; metabolik prosesler sonucunda açığa çıkan serbest radikallerin miktarının artmasına bağlı olarak antioksidant sistemlerin yetersiz kalması ile oluşur (47, 50, 82). Alkol doymamış yağ asitleri üzerine etki ederek lipit peroksidasyonunun ilerlemesine neden olur (4,49,82). Daha önceden yapılmış olan çalışmada labirent sonuçları ile beyindeki oksidatif hasar arasında ilişki olduğu bulunmuştur (82). Bu nedenle T- labirentteki sonuçlarımızı antioksidan sistemlerden elde edilecek bilgilerle karşılaştırmak için SOD, CAT, GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitelerini ve NO,MDA gibi antioksidan madde düzeylerini gruplar arasında karşılaştırdık.

Serbest radikallerin doymamış yağ asitlerine saldırısı sırasında üretilen aldehitlerden biri de MDA (malon di aldehid) tir. TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) ile girdiği reaksiyon sonucu verdiği renk ile varlığı saptanır (84). Dokularda oluşan süperoksid radikali ( $O_2^-$ ), SOD (Süperoksid dismutaz) enzimi tarafından hemen  $H_2O_2$  ve oksijene dönüştürülür (47, 84). Diğer antioksidan enzimler olan CAT (katalaz) ve GSH-Px (Glutasyon peroksidaz)  $H_2O_2$ 'nin suya ve oksijene dönüşümünü sağlar (84). Hücrelerde temel strateji SOD, CAT, GSH-Px, kullanılarak  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ 'i detoksifiye etmek ve daha toksik ürünlerin oluşumunu önlemektir (49). Beyinde önemli bir radikal kaynağı da nitrik oksit aracılığı ile açığa çıkmaktadır. NO normalde toksik olmayıp iskemi sırasında nitrik asit, reperfüzfon sırasında hidroksil radikali benzeri reaktif ürünlerin oluşumuna neden olur (46).

Çalışmamızda propolis grubunun hipokampus ve korteks dokusundaki SOD ve GSH-Px düzeyleri kontrol gurubuna göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde artmıştır ( $P<0,05$ ). Sonuçlar literatürde belirtilen propolisin kronik kullanımına bağlı olarak antioksidan özellik gösterdiği sonucuyla örtüşmektedir (79, 80-82). Alkolün kognitif fonksiyonlarda oluşturduğu hasarları tersine çevirmede propolis; oluşan toksik bileşikleri süpürücü etki yapması, DNA da oluşan bozuklukları azaltıcı etkiye sahip olması, lipit peroksidasyonunu önlemesi gibi antioksidan özelliklerinden dolayı etkilidir.

Literatürde yapılmış olan çalışmalarda kronik alkol uygulaması; lipit peroksidasyonunu arttırmış, SOD, CAT, GSH-Px enzim seviyelerini azaltmış olup kronik olarak propolis polifenolik bir bileşeni olan quercetin bunu tersine çevirdiği bildirilmiştir (82). Alkolün beyinde oluşturduğu hasarın incelendiği bir başka çalışmada; kronik alkol uygulamasının hipokampus dokusundaki SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerini değiştirmezken MDA düzeyini attırdığı, serebral korteksin de dahil olduğu diğer beyin bölgelerinde SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerini azaltırken MDA düzeyinde değişime neden olmadığı belirtilmiştir (85).

Hipokampus, serebral korteks ve serebellum dokularındaki SOD, GSH-Px enzim aktiviteleri gruplar arasında karşılaştırıldığında; grup 3'teki (alkol) enzim aktivitesinin grup 1 (kontrol) ve grup 2 (propolis) deki enzim aktivitelerinden daha az olduğu, grup 4'teki (propolis + alkol) enzim aktivitesinin ise grup 3'e oranla arttığı gözlenmiştir (Tablo 8-10). Fakat bunlardan sadece hipokampus ve serebral korteks dokusundaki enzim değişimleri istatistiksel olarak anlamlı iken serebellum dokusundaki enzim değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bu sonuçlar literatürde yapılmış olan çalışmalardaki sonuçlarla paralellik göstermektedir (52,82,85). Bu durum alkolün ve propolisin etkisinin farklı beyin bölgelerinde farklı olduğunun bir kanıtı olabilir. Alkol metabolizasyonu sonucunda açığa çıkan asetaldehit gibi alkol metabolitleri dokular için oldukça toksiktir. Bu metabolitler kognitif fonksiyonların olduğu beyin bölgelerinde oksidatif hasarlara neden olmakta böylece öğrenme ve bellekte bozukluklar oluşmaktadır. Propolis dokularda oluşan toksik metabolitleri süpürücü, lipit peroksidasyonu zincirlerini kırıcı etkiye sahiptir. Bu özelliğindedir ki alkolle indüklenen oksidatif hasarı tersine çevirebilmektedir.

Lipit peroksidasyonun indikatörü olan TBARS kronik alkol kullanımına bağlı olarak artmakta olup bu alkolün oluşturduğu oksidatif stresin bir sonucudur (4,49,82,85). Yaptığımız araştırmada MDA miktarı ölçülmüş olup; hipokampus ve serebellum dokularında alkolle oluşan lipit peroksidasyonundaki artış kronik propolis uygulaması sonucunda azalmış olup bu azalma istatistiki olarak anlamlıdır (Tablo 8-10). Buna karşın gruplar arasında serebral kortekste MDA sonuçları açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışma sonunda lipit peroksidasyonu açısından elde ettiğimiz bilgiler daha önce yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile aynı doğrultudadır (82, 85). Sonuç olarak alkol, beyinin kognitif fonksiyonlarının gerçekleştiği alanlarda lipit peroksidasyonunda bir artışa neden olarak oksidatif hasarlar oluşturur. Propolis ise içerdiği bileşenlerden kaynaklanan antioksidan

özelliğinde olup, lipitlerin polimer zincir reaksiyonlarını kırarak lipit peroksidasyonunu önler. Bu nedenle alkolün oluşturduğu hasarlara karşı bir koruyucu olarak kullanılabilir.

Beyin dokularındaki CAT enzim aktivitesi ölçüldüğünde; hipokampus ve serebral korteks dokusunda anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir. Serebellum dokusunda propolis grubunun CAT aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış, alkol grubunun CAT aktivitesi kontrole göre anlamlı olarak azalmış, propolis + alkol grubunun CAT aktivitesi alkol ve propolis grubuna göre anlamlı ölçüde artmıştır.

Literatürde araştırmamıza benzerlik gösteren sadece iki çalışma olmakla birlikte her ikisinde de NO düzeyleri incelenmemiştir (82, 85). Hipokampus, serebellum, serebral korteks dokularında NO düzeylerinin ölçülmesi sonucunda gruplar arasında istatistiki açıdan fark bulunamamıştır. Bunun nedeninin; normal şartlarda beyin üzerinde toksik bir etki göstermeyen NO'nun (46) uyguladığımız modeldeki alkol konsantrasyonunun beyin dokusunda toksik etki yapacak düzeye ulaşamamış olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Modeldeki alkol konsantrasyonunu ve uygulama süresini arttırılarak yapılacak bir çalışmada NO seviyesinde de anlamlı değişiklikler oluşturacağı kanaatindeyiz.

Bütün bu veriler ışığında, alkolün beyinin farklı bölgelerinde farklı sonuçlar oluşturması ile birlikte beyin dokusunda oksidatif bir hasar oluşturduğunu söylemek mümkündür. Bu hasar, alkol metabolitlerinin beyin dokularında toksik etki yaparak oksidatif hasara yol açması, beyinin kognitif fonksiyonlarının olduğu alanlarda lipit peroksidasyonunu arttırması, kognitif fonksiyonların işleyişinde önemli yere sahip olan glutamat ve GABAerjik reseptörlerde aşırı uyarılmaya neden olması gibi etkilerinden ileri gelmektedir. Propolis oksidatif hasara yol açan metabolitleri süpürücü etkiye sahip olmasının yanı sıra lipit peroksidasyonunu polimer zincir reaksiyonu kırarak önler. Bundan dolayı alkolün beyin bölgelerinde oluşturduğu hasarlara karşı propolisin koruyucu özellik gösterdiğini düşünmekteyiz. Alkolle indüklenen oksidatif stresin beyinin farklı bölgelerinde farklı sonuçlar vermesi; bazı bölgelerin alkolün oluşturduğu hasara daha duyarlı olmasından kaynaklanabileceği gibi alkolün bazı beyin bölgelerinde çok daha fazla değişikliklere neden olmasından da ileri gelmektedir (85).

Araştırma sonuçları bir bütün olarak incelendiğinde; T- labirent testi verilerine göre bazal süre, sakınma 1, sakınma 2 sürelerinin uzaması; şartsız korku süresinin kısalması alkolün, öğrenme ve kısa süreli bellek üzerinde hasarlara neden olduğunun bir göstegesidir. Bu

sonuçlar antioksidan enzim sonuçları ile birleştirildiğinde, alkolün oluşturduğu hasar aşırı  $Ca^{++}$  girişiyle hücre ölümlerine neden olması, hiperpolarizasyonu arttırması, gibi etkilerinin yanı sıra beyin dokularında meydana getirdiği oksidatif hasarla ilişkilidir. T-labirent ve antioksidan sistemlerin karşılaştırıldığı deney sonuçlarına göre alkolün oluşturduğu hasarlara karşı propolis; zincir kırıcı, süpürücü ve bastırıcı etki yapmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Alkolün (etanol) metabolizasyonu sonucunda açığa çıkan asetaldehit ve reaktif oksijen türleri beyin dokularındaki antioksidan mekanizmaları baskılayarak, doymamış yağ asitlerine etki edip lipit peroksidasyonunu arttırarak oksidatif hasara neden olmaktadır. Bunun yanı sıra alkol, GABAerjik sistemin aktivasyonunu arttırarak hücrede hiperpolarizasyonun artmasına neden olur ve glutamat reseptörlerinde aşırı bir uyarılmaya yol açarak hücre içine giren Ca miktarını arttırarak nöronların ölümüne neden olur.

2. Alkol, beyinde öğrenme ve belleğin oluşumunda önemli olan merkezlerde oksidatif hasara yol açmaktadır. Lipit peroksidasyonunu gösteren TBARS düzeyinin artması, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin azalması bunun bir göstergesidir. Oluşan bu oksidatif hasar T-labirent testinin sonuçları ile birleştirildiğinde öğrenme ve kısa süreli bellekte bozukluklar oluşturduğu gözlenmiştir.

3. Propolis içerdiği polifenolik bileşiklerde bulunan flavonoidler nedeniyle antioksidan özellik göstermekte olup lipit peroksidasyonu sırasında oluşan polimer zincir reaksiyonlarını kırarak lipit peroksidasyonunu durdurucu etki yapar. Reaktif oksijen türlerini dokulardan uzaklaştırır (süpürücü etki) ve oluşan radikalleri daha az toksik maddelere çevirerek bastırıcı etki gösterir. Tüm bu özelliklerinden dolayı kuvvetli bir antioksidan olduğu kabul edilir.

4. Propolisin, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerini kontrole göre arttırması TBARS düzeyini azaltması bakımından antioksidan özellik göstermektedir. T-labirent sonuçlarına göre alkolün öğrenme ve kısa süreli bellekte oluşturduğu hasarları nleme ve tamir etmede kullanılabilir.

5. Günümüzde yaygın bir sorun olan alkolizmin tedavisinde ve alkolün oluşturduğu hasarları tersine çevirmesi açısından propolis önemli bir etkiye sahip olabilir. Bu nedenle alkolün oluşturduğu hasarlara karşı propolisin tedavide kullanımına yönelik araştırmalar yapılması önerilmektedir.

## 7. ÖZET

### **ÖĞRENME VE BELLEĞİN ŞEKİLLENDİĞİ BEYİN BÖLGELERİNDE ALKOLÜN OLUŞTURDUĞU HASARLARDA PROPOLİSİN ETKİLERİ**

Alkolün metabolizasyonu sonucunda açığa çıkan asetaldehit ve serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif stres, beyinde öğrenme merkezlerinde oksidatif hasara neden olarak öğrenme ve belleği baskılar. Propolis, içerdiği flavonoidlerden dolayı kuvvetli antioksidan özellik göstermektedir. Çalışmamızda; alkolün öğrenme merkezlerinde oluşturduğu hasarlara karşı propolisin olası koruyucu rolünü araştırmayı amaçladık.

Genç- erişkin Wistar-Albino sıçanlar 4 gruba ayrıldı (n=8). Alkol grupları 30 gün boyunca kademeli olarak artan konsantrasyonlarda (%2,4 - %7,2 V / V) alkollü sıvı içecek diyeti ile beslendi. Propolis gruplarına 150 mg/kg propolis çözeltisi eklendi. Kontrol grubuna ise alkolün kalorisine eşdeğer alkol içermeyen sıvı içecek diyeti uygulandı. Deney süresince deneklerin günlük aldıkları besin miktarları ve kilo değişimleri kayıt edildi.

Kısa süreli bellek ve öğrenmenin test edilebilmesi için deney öncesinde, deney sonrasında ve alkol konsantrasyonunun artırıldığı günlerden önce T-labirent testi uygulandı. Deney sonunda sakrifikeye edilen sıçanların beyinlerinin serebellum, hipokampus, serebral korteks bölgelerinde, antioksidan enzimlerden SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri ile TBARS ve Nitrat /Nitrit düzeyleri karşılaştırıldı.

Grupların T-labirentteki değerleri bazal süre, sakınma 1 ve sakınma 2 süreleri açısından karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile propolis grubu arasında fark görülmezken (P>0,05), alkol grubunun T-labirent değerlerinin kontrol ve propolis grubuna kıyasla azaldığı fakat bu

azalmanın sadece 11. günde yapılan testlerde istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $P<0,05$ ), Propolis + alkol grubu değerleri alkol grubundan yüksek, kontrol ve propolis gruplarından düşük çıkmış olmakla birlikte sadece 11. ve 30. günlerde alınan kayıtlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P<0,05$ ).

Propolis grubunun hipokampus ve korteks dokusundaki SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdi ( $P<0,05$ ). Bu da propolisin antioksidan özelliği olduğunun bir göstergesi olarak kullanılabilir. Hipokampus, serebral korteks ve serebellum dokularındaki SOD, GSH-Px enzim aktiviteleri gruplar arasında karşılaştırıldığında; alkol grubu enzim aktivitesinin kontrol ve propolis grubundaki enzim aktivitelerinden daha az olduğu, propolis + alkol grubundaki enzim aktivitesinin ise alkol grubuna oranla arttığı gözlenmiştir. Fakat bunlarda sadece hipokampus ve serebral korteks dokusundaki enzim değişmeleri istatistiksel olarak anlamlı iken serebellum dokusundaki enzim değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Sonuç olarak; propolisin kuvvetli bir anti oksidan özelliğe sahip olduğu, alkolün artan konsantrasyonlarda oksidatif strese bağlı olarak beyinde öğrenme merkezlerinde hasarlara neden olduğu, propolisin içerdiği antioksidan özellikten dolayı alkolün oluşturduğu hasarları tersine çevirici etkiye sahip olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Alkol, Hipokampus, Propolis, T-labirent, Antioksidan Enzimler.



## **8. SUMMARY**

### **THE EFFECTS OF PROPOLIS ON THE DAMAGE CAUSED BY ALCOHOL IN THE BRAIN AREAS RELATED TO LEARNING AND MEMORY.**

Oxidative stress resulting from free radicals and acetaldehydes emerging from alcohol metabolism suppresses learning and memory, causing oxidative damage in the learning and memory areas of the brain.

Because it includes flavonoids, propolis is a strong antioxidant. In our study, we aimed to investigate the protective roles of propolis on the damage produced by alcohol in the learning and memory areas.

Adult Wistar-albino rats were divided into four groups (n=8). Alcohol groups received liquid diet with alcohol in gradually increasing concentrations (%2,4- %7,2 V/V). In propolis groups, 150 mg/kg of propolis was added to the diet. In control groups, alcohol free but including equal energy with the other groups diet was applied. During the study, the amount of food and weight changes were recorded.

In order to test the short term memory and learning capacity before the study, after the study and the day before changing the alcohol concentration.

T-maze test was applied to the groups. At the end of the study, the rats were sacrificed and SOD, CAT, GSH-Px activities and TBARS and Nitrate/nitrite levels of the rats' cerebellum, hippocampus and cerebral cortex were compared.

When comparing baseline latency, avoidance trials 1, avoidance trials 2 and escape trials periods of the rats we found no difference between the control and propolis group ( $P > 0,05$ );

T-maze values of alcohol groups were decreased after the eleventh day of the study. When compared with control and propolis group ( $P < 0,05$ ); the values of propolis+alcohol groups were higher than the alcohol and lower than the control and propolis groups, but these values were statistically significant on the eleventh and thirtieth days of the study ( $P < 0,05$ ).

The SOD and GSH-Px activities of the hippocampus and cortex of the propolis groups was significantly increased when SOD, GSH-Px activities of hippocampus, cerebral cortex and cerebellum of the groups were compared, the enzyme activity of the alcohol group was lower than the propolis and the control groups but lower than the propolis+alcohol groups. While the enzyme activities of the hippocampus and cerebral cortex were statistically significant, the changes in the enzyme activities of the cerebellum was meaningless.

As a result, we concluded that propolis has a strong antioxidant property, alcohol with increasing concentration has a damaging effect on learning due to oxidative stress and the antioxidant properties of propolis improve the negative effects of alcohol.

**Key Words:** Alcohol, Hippocampus, Propolis, T-maze, Antioxidant enzymes.

## 9.KAYNAKLAR

- 1). Robertson L. T. Ph.D., Memory and Brain, Journal of Dental Education January.66,(1), 2002.
- 2). Kontrol Sistemleri ve Boşaltım Fizyolojisi İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları, :Nobel tıp Kitapevleri, 293-300, Mart 2001.
- 3). White A. M., Matthews Douglas B. and Best Philip J. , Ethanol, Memory and Hippocampal Function: A Review of Recent Findings. Hippocampus 10: 88-93, 2000.
- 4). Şentürk H., Serbest Radikal Hasarın Hepato–Biliyer Sistem Hastalıklarındaki Rolü. Kocatepe Tıp Dergisi, 5 Ek sayı 1-8,2004.
- 5). Armutçu F., Gürel A., Söğüt S., Aksu N., Ünalacak M., Alkol alışkanlığı olanlarda eritrosit oksidan ve antioksidan parametre düzeyleri, Fırat Tıp Dergisi, 9(2): 50-53,2004.
- 6). Şahinler N. Arı Ürünleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi, MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi 5 (1 -2): 139 -148, 2000
- 7). [http://propolis-sana.com/anglais/uk\\_propolis.htm](http://propolis-sana.com/anglais/uk_propolis.htm) - Son erişim tarihi 15/03/2006.
- 8). Liu C, Lin C, Lin C, Lin Y, Chen C, Lin C, Lin S. Antioksidative natural product protect aganist econazole-induced liver injuries. Toxicology, 196 87-93,2004.
- 9). Bazo A, Rodrigues M, Sforcin J, Camargo J, Ribeiro L, Saldori D. Protective Action of Propolis on the Rat Colon Carcinogenesis, Teratogenesis, Carcinogenesis and mutagenesis. 22, 183-194,2002.

- 10). El-khawaga O, Salem T, Elshal M. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clinica Chimica Acta* 338 11-16, 2003.
- 11). Russo A, Longo R, Vanella A. antioksidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73 Suppl. 1, s21-29, 2002
- 12). [http://www.propomed.com/index\\_dosyalar/Page2102.htm](http://www.propomed.com/index_dosyalar/Page2102.htm) - Sonerişim tarihi 29/01/2006.
- 13). [http://www.lifetimeheath.com/article-propolis-clinical\\_review.asp](http://www.lifetimeheath.com/article-propolis-clinical_review.asp). Sonerişim tarihi 29/01/2006.
- 14). <http://www.undergrad.ahs.uwaterloo.ca/~vmucci/hippocampus.html> - Son erişim tarihi 29/01/2006.
- 15). Songur A, Özen O. A, Sarsılmaz M, *Hipokampus, Tıp Bilimleri Dergisi*. 21:427-43, 2001
- 16). Taner D, Mefu press, *Fonksiyonel Nöroanatomi*; 226-22, 1998
- 17). <http://www.vankuyen.net/brain/structures/hippocampus.htm> - Son erişim tarihi 29/01/2006.
- 18). Dr. İlker Mutafa Kara, *Uzmanlık Tezi, Fekal Peritonite Bağlı Sepsiste Hipokampustaki Morfolojik Değişikliklerin Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi*, Bursa 2005
- 19). Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D (eds). *Neuroscience*. Third edition. USA: Sinauer Associates; 2004
- 20). Barry M., Bannister L.H., Standring S.M. *Nervous System*. In: Williams PL, editor. *Gray's Anatomy*. (38th Edition). London: Churchill Livingstone, 1121 -5, 1995.
- 21). Witter M.P., Van Hoesen G.W., Amaral D.G. Topographical organisation of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci* 9: 216-28, 1989.
- 22). Uzbay T., *Psikofarmakolojinin temelleri ve Deneysel Araştırma Teknikleri, Çizgi Tıp Yayınevi*, 1. basım Ankara, 2004.

- 23). Aaron M.,White Ph.D. What happened? Alcohol, Memory Blackouts, and the Brain.,Alcohol Research & Health,vol.27,No.2,2003.
- 24). Textbook of Medical Physiology(Türkçe 1. baskı), Guyton Arthur C. Yüce Yayıncılık & Nobel Tıp Kitapevi, 756-759,1996.
- 25). <http://www.duke.edu/~amwhite/Blackouts/blackouts2.html> - Son erişim tarihi 29/01/2006.
- 26). Long-term potentiation, [http://en.wikipedia.org/wiki/Long-term\\_potentiation](http://en.wikipedia.org/wiki/Long-term_potentiation) - Son erişim tarihi 29/01/2006.
- 27). Jensen O. and John E. Hippocampal sequence-encoding driven by a cortical multi-item working memory buffer. Lisman, Trends in Neurosciences Vol.28 No.2 February 2005
- 28). Müler U. Learning in honeybees: fom molecules to behaviour, Zoology 105313-320,2002.
- 29). Izquierdo I. and Jorge H,. Memory Formation: The Secuence of Biochemical events in the Hippocampus and Its Connection to activity in Other Brain Structures, Medina, Neurobiology of Learning And Memory 68, 285-316, 1997.
- 30). Gedik E,. Sarıkaya E., Temel üniversite Kimyası Gazi Kitapevi,1999.
- 31). Kayaalp O., Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe Taş. Ankara, s.921-930,1994.
- 32). Vardı N., Alkolik ratların pankreasları üzerinde ışık ve elektron mikroskopik araştırmaları, Doktora Tezi, İnönü Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2000.
- 33).Charles S. Lieber, Alcohol; Its Metabolism and Interaction With Nutrients;Annual review of Nutrition; 20, Health & Medical Complete pg. 395,2000.
- 34).Charles R. Goodlett and Kristin H.Horn. Mechanizm of Alcohol Induced Damage to the Devoloping nervous System, Alcohol Research and Health; 25,3; Health & Medial Complete pg.175,2001.
- 35). Matthew J. Wayner. Craving for alcohol in the rat Adjunctive behavioor and the lateral hypothalamus, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 7327- 43,2002

- 36). Albano E., Samuel W. French and Magnus Ingelman-Sundberg. Hydroxyethyl Radicals in Ethanol Hepatotoxicity, *Frontiers in Bioscience* 4, d533-540, June 15, 1999
- 37). Davies M., The role of GABA<sub>A</sub> receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system, *J Psychiatry Neurosci*, 28 (4), 2003.
- 38). <http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://www.niaaa.nih.gov/NR/rdonlyres/A23E4535-1672-41BB-B548> – Son erişim tarihi 15/02/2006.
- 39). <http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://www> – Son erişim tarihi 15/02/2006.
- 40). Douglas B. Matthews, Janelle R. Silvers, The use of acute ethanol administration as a tool to investigate multiple memory systems, *Neurobiology of Learning and Memory* 82 299-308, 2004.
- 41). <http://images.google.com.tr/images?q=nmda&hl=tr> - Son erişim tarihi 25/05/2006.
- 42). Cowen M., Chen F., Jarrott B. and Lawrence A. J., Effects of Acute Ethanol on GABA Release and GABA<sub>A</sub> Receptor Density in The Rat Mesolimbic System, *Pharmacology biochemistry and Behavior*, 59, (1), pp. 51-57, 1998
- 43). <http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://wwwhsc.usc.edu/~ddavies> - Son erişim tarihi 25/05/2006
- 44). Mercan U., Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *YYU. Vet. Fak. Derg.* 15 (1-2) : 91-96, 2004,
- 45). Gümrükçüoğlu A., Serbest Radikaller.  
[www.Genetikbilimi.com/gen/serbest\\_radikaller.htm](http://www.Genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm) - Son erişim tarihi 15/02/2006.
- 46). Hücre- II. Oksidan Stres ve Hücre Hasarı. T.T.B Tıpta Temel Bilimler Kolu Kurs notları, Sonbahar Okulu '93- Kızılcıhamam
- 47). Dr. Aladdin Polat, Safra Kanal Ligasyonu Yapılmış Sıçanlarda Aspirinle Oluşturulan Mide Dokusu Hasarında Melatonini Etkileri, Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi. 2004

- 48). Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin – an emerging mystery. *Biochem Pharmacol.* 15;56 (10):1265-72,1998. Review. Erratum in: *Biochem Pharmacol* 1; 57(9):1077,1999.
- 49). Azzi A., Davies K. J. A., Kelly F., Free radical biology- terminology and critical thinking. *FEBS Letters* 558 3-6,2004.
- 50). Cheng FC, Jen JF, Tsai TH. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Dec 5;781 (1-2): 481-96. Review 2002.
- 51). Dündar Y., Aslan R., Hekimlikte oksidan Stres ve Antioksidanlar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, L Basım. pp: (3-19) 2000.
- 52). Aydın A., Sayal A., Işimer A., Serbst Radikal ve Antioksidan Savunma Sistemi, 2001
- 53). Uz E., Deneysel Karaciğer İskemi-Reperfüzyonu Oluşturulan Sıçanlarda Doku Oksidan-Antioksidanlarının Durumu; Doku Hasarına E Vitamini ve Kafeik Asit Fenil ester'in (CAPE) Etkileri, Doktora Tezi, İnönü üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001.
- 54). Russel R., Lei T., Joaquin J.G., Antonio M-H. Pharmacological Actions of Melatonin in Oxygen Radical Pathophysiology, *Life Science* Vol. 60, No.25, pp. 2255-2271, 1997.
- 55). Aktay G., Kadmiyum hepatoksitesine etanol ve E Vitamininin etkisi. Doktora Tez, Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 1993.
- 56). Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* 21, 49-98, 2000.
- 57). Zima T, Lenka F, Metsek O, Janebova M, Crkovska J, Malbohan I, Stipek S, Mikulikova, Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and Alcohol-related diseases. *J Biomed Sci*; 8:59-70, 2001.
- 58). Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French S., W, Morimoto M, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* Vol. 25, No. 2, 1997.

- 59). <http://yunus.hacettepe.edu.tr/ayguns/propolis-t.htm>- son erişim tarihi 18/05/06
- 60). Baysal A,keçecioglu S,Arslan P,Yücecan S, Pekcan G,Güneyli U, Birer S, Sağlam F, Yurttagül M,Çehreli R, Besinlerin Bileşimleri, YeniçağBasım yayın san ve Tic. Ltd. Şti, Ankara, 1991
- 61). Rodrigo O., Alves de Lima, Ana Paula Bazo, Raudea A. Said, Jose Mauricio sforcin, Vassya Bankova, Bruno R. Darros, and dasly M.F. Salvadori. Environmental and Molecular Mutagenesis 45:8-16. 2005
- 62). Çelik T., Çakır E., Kayır H., Bilgi C., Uzbay T., The Effecets Of Chronic Ethanol Consuption And Withdrawal On Passive Avoidance Task And serum Cholinesterase Level İn rats, 20004,
- 63). Sağ C., Yokusoglu M, Cincik M., Ozkan M., Kayır H, Uzun M., Baysal B., Ozogul C., Baysan O., Uzbay T. The prevention of myocardial ultrastructural canges by peridonpril, atenolol and amplodipine in chronic alcohol administered rats. Pharmacological Research 53, 142-148,2006.
- 64). Bilgi C., Tokgöz S., Aydın A., Çelik T., Uzbay T. The effects of chronic ethanol consumption and ethanol withdrawal on serum cholinesterase activity in rats. Alcohol & Alcoholism Vol. 38, No. 4 pp. 316-320, 2003.
- 65). Marcelo C. Jardim, Regina L. Nogueira, Frederico G. Graeff and Ricardo L. Nunes-de-Souza, Evaluation of elevated T- maze as an animal model of anxiety in the Mouse.Brain Research Bulletin, Vol.48, <no.4,pp.407-411,1999.
- 66). Carlos A. C., Victor C., Carlos T., Measuring Emotional Memory in the Elevated T-Maze using a training-to-Criterion Procedure, Pharmacology Biocemistry and Behavior, Vol.63,no. 1,pp. 63-69,1999
- 67). Lucana T. Sanson, Antonio P. Carobrez, Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated t-maze model of anxiety, Behavioural Braibn research 101 59-64,1999.
- 68). Zangrossi H, Graeff FG.Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. Brain Res Bull,44:1-5,1997.



- 69). Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T- maze model of anxiety. *Pharma Bio Behav*,65:571-576,2000.
- 70). Celio Estanislau, Silvio Morato, Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze, *Behavioural Brain research* 163,70-77,2005.
- 71). George Paxinos, Charles Watson. *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*. Plate; 29- 38
- 72). Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*,36:1440-1443,1990.
- 73). Uchiyama M. ,Mihara M. Determination of MDA precursor in tissue by TBA test. *Anal Biochem* 36:271-278,1978.
- 74). Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Che*,34:497-500,1988.
- 75). Aebi H. Catalase. In Bergmeyer HU (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York and London, 673-677,1974.
- 76). Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-170,1967.
- 77). Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL. And Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- 78). Peterson GL, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*,83:346-356, 1977.
- 79). Ahn M, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang K, Nakayama T, Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea, *J. Agric. Food Chem.* 52: 7286-7292, 2004.

80). Ogzuner F, Oktem F, Ayata A, Koyu A, Yilmaz R, A novel antioksidant agent caffeic acid phenethyl ester prevents long-term mobile phone exposure-induced renal impairment in rat. *Molecular Cellular Biochemistry* 277: 73-80, 2000.

81). Marquele F, Di Mambro V, Georgetti S, Casagrande R, Valim Y, Fonseca M, Assessment of the antioksidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39, 2455-462, 2005.

82). Amanpreet S, Pattipati S. N, Shirinivas K., Reversal of aging and chronic ethanol – induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. *Free Radical research*, 37, (11), 1245 -1252, 2003.

83). Erdoğan F., Gölgeci A., Küçük A., Arman F., Karaman Y., Ersoy A., Effects of pentylentetrazole-induced status epilepticus on behavior, emotional memory and learning in immature rats. *Epilepsy&Behavior*, 6, 537-542, 2005.

84). Fadillioğlu E., Erdoğan H., Polat A., Emre H., Renal antioksidant status in rats with hypertension induced by N sup omega Nitro-L-Arginine Methyl Ester. *Kidney Blood press Res.* 25:211-216, 2002.

85). Gönenç S., Uysal N., Açıkgöz O., Kayatekin B. M., Sönmez A., Kıray M., Aksu İ., Gülüçer B., Topçu A., Şemin İ. Effects of melatonin on oxidative stress and spatial memory impairment induced by acute ethanol treatment in rats. *Physiol. Res.* 54:341-348, 2005.

## 11. ÖZGEÇMİŞ

16/05/1980 de Ankara’ da doğdum. İlk öğrenimimi Adıyaman Yavuz Selim İlkokulu ve Gazi Orta Okulu’ nda tamamladıktan sonra Adıyaman Atatürk Lisesi’nin Yabancı Dil Ağırlıklı bölümünden mezun oldum. Lisans eğitimimi Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladıktan sonra İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladım.