



**ALUMİNYUM SÜLFATIN TOKSİK DOZDA SIÇAN
HİPOKAMPUSU HÜCRE POPULASYONLARINA ETKİSİ**

Nilgün ÇABUŞ

**Nisan 2012
DENİZLİ**

**ALUMİNYUM SÜLFATIN TOKSİK DOZDA SIÇAN
HİPOKAMPUSU HÜCRE POPULASYONLARINA ETKİSİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

Nilgün ÇABUŞ

Danışman: Doç. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ

**Yrd. Danışmanlar: Prof. Dr. A. Çevik TUFAN
Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL**

**Nisan, 2012
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Nilgün ÇABUŞ tarafından Doç. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ yönetiminde hazırlanan “Aluminyum Sülfatın Toksik Dozda Sıçan Hipokampusu Hücre Populasyonlarına Etkisi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL
Jüri Başkanı

Prof. Dr. A. Çevik TUFAN
Jüri Üyesi



Doç. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ
(Tez Danışmanı)
Jüri Üyesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 7.16.2012
.....tarih ve 2012/10-3 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı : Nilgün ÇABUŞ

TEŞEKKÜRLER

Tez konumu belirlemede ve tezimin her aşamasında bana yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ'a, Histoloji ve Embriyoloji AD Başkanı Prof. Dr. Recep KUTLUBAY'a, tezimin özellikle TUNEL yöntemi çalışmalarında elinden gelen desteği veren Prof. Dr. A. Çevik TUFAN'a, nöronların stereolojik yöntemlerle sayılması ve hesaplamaların değerlendirilmesi aşamasındaki yardımlarından dolayı Anatomi AD öğretim üyesi Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL, Yrd. Doç. Dr. G. Nilüfer YONGUÇ ve Dr. Hüseyin BAYLAN'a, Biyoistatistik AD öğretim üyesi Doç. Dr. Beyza AKDAĞ KARGI 'ya, eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE, Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Nazan KESKİN'e deney hayvanların beslenmesi, bakımı ve alüminyum sülfatın verilmiş aşamasındaki yardımlarından dolayı Veteriner Hekim Barbaros ŞAHİN, Zuhâl GÜÇLÜ ve Hilmi COŞKUN'a, kesitlerin alınması ve boyanması aşamalarında yardımlarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli teknisyeni Erdiñç KARATAŞ'a, Histoloji ve Embriyoloji AD asistanlarından Dr. Nazlı ÇİL, Dr. M. Serkant ÜNAL'a, Uzm. Bio. Ayşe ÇETİNKAYA, Duygu GÖK, A. Buket ER ve Firdevs USUL'a, kardeşim Uz. Dr. Özlem KABAYEĞİT'e, sevgili eşim Dr. Ümit ÇABUŞ'a, her zaman bana destek olan anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ALUMİNYUM SÜLFATIN TOKSİK DOZDA SIÇAN HİPOKAMPUSU HÜCRE POPULASYONLARINA ETKİSİ

Çabuş, Nilgün
Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji AD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ

Nisan 2012, 64 sayfa

Aluminyumun insan vücudu üzerine toksik etkileri olduğu iyi bilinmektedir. Birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkisi olan aluminyumun çeşitli organlar üzerinde de olumsuz etkileri vardır. Bu çalışmanın amacı aluminyum maruziyeti sonucu sıçanların hipokampus nöron sayısındaki değişiklikleri stereolojik bir yöntem olan optik parçalama yöntemi ile ortaya koymak ve aluminyumun apoptozu indüklediğini TUNEL yöntemi ile göstermektir.

Bu amaçla 24 adet Wistar Albino dişi sıçan kontrol, sham ve deney grubu olarak üç eşit gruba ayrıldı. Bu sıçanlardan deney grubuna günlük olarak 3mg/ml aluminyum sülfat intraperitoneal olarak 2 hafta süre ile verildi. Sham grubuna aluminyum sülfatın çözücüsü olan %0,9 NaCl'den aynı periyod ve aynı hacimde intraperitoneal olarak verildi. Kontrol grubuna herhangi bir madde enjekte edilmedi. Süre bitiminde sıçanların anestezi ve dekapitasyon işlemlerinden sonra beyinleri çıkarıldı. Sol hemisferleri optik parçalama yöntemi ile nöron sayımı için, sağ hemisferleri TUNEL yöntemi ile apoptotik hücreleri göstermek ve apoptotik indeksi belirlemek amacıyla kullanıldı.

Aluminyum sülfat verilen deney grubunda hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayısı kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha az bulundu. Kontrol ve sham grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Deney grubu ile kontrol ve sham grubu karşılaştırıldığında TUNEL yöntemi ile belirlenen apoptotik indeksin deney grubunda daha fazla olduğu görüldü.

Sonuç olarak aluminyum sülfatın sıçanlarda hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayısındaki azalmayı kantitatif olarak gösteren bu çalışmada nöronları ölüme götüren mekanizmalardan birinin apoptoz olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Aluminyum sülfat, toksisite, apoptoz, hipokampus, optik parçalama

ABSTRACT**THE EFFECT OF ALUMINIUM SULPHATE ON RAT HIPPOCAMPAL CELL POPULATIONS AT TOXIC DOSE.**

Çabuş, Nilgün

M.Sc. Thesis in Histology and Embryology Department

Supervisor: Assist. Prof. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ

April 2012, 64 pages

Toxic effects of aluminium on human body is well known. It has deleterious effects on multiple organ systems and is related with many neurodegenerative disease. The purpose of this study is to establish the change of neuron numbers of hippocampus on aluminium exposed rats by using optical fractionator and to show aluminium induced apoptosis by using TUNEL assay.

A total of 24 Wistar albino female rats were divided into three equal groups as control, sham and study group. Rats in study group were injected intraperitoneally with 3 mg/ml aluminium sulphate everyday for two weeks. Rats in sham group were injected with %0.9 NaCl which is the solvent of aluminium within the same period and volume. Rats in control group were not injected. After two weeks, rat brains were removed after anesthesia and decapitation. Left brain hemispheres were used for neuron counting by optical fractionator. Right brain hemispheres were used for showing apoptotic cells by TUNEL assay and calculating apoptotic index.

Total neuron number of hippocampus stratum pyramidale was significantly lower in study group than control and sham group. There was no difference between control and sham group. Apoptotic index was significantly higher in study group than the other two groups.

In conclusion this study has shown the toxic effect of aluminium on rat hippocampus by using quantitative results for the first time. Apoptosis is also shown to be a mechanism of aluminium induced neuronal death with this study.

Keywords: Aluminium sulphate, toxicity, apoptosis, hippocampus, optical fractionator

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
Teşekkürler.....	i
Özet	ii
Abstract	iii
İçindekiler Dizini	iv
Şekiller Dizini	v
Tablolar Dizini	vi
Simge ve Kısaltmalar Dizini	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI	2
2.1. Alüminyumun Toksik Etkileri	3
2.2. Alüminyumun Sinir Sistemindeki Etkileri.....	5
2.2.1 Alüminyum ve Kan Beyin Bariyeri..	6
2.2.2.Alüminyum ve Kalsiyum Hemostazı	7
2.2.3.Alüminyum ve Tau Proteini.....	8
2.2.4. Alüminyum ve Glutamat.....	9
2.3. Oksidatif Hasar.....	9
2.4. Apoptoz	12
2.4.1.Apoptoz Oluşum Mekanizmaları	14
2.4.1.1.Mitokondri Aracılı Apoptoz.....	15
2.4.1.2.Ölüm Reseptörleri Aracılı Apoptoz	15
2.4.1.2.1.Fas/FasL Aracılı Apoptoz	15
2.4.1.2.2.Tümör Nekroz Faktör Alfa.....	15
2.4.1.3.Granzim veya Perforin Sistemi	16
2.4.1.4.Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz.....	17
2.4.2.Apoptoz Belirleme Yöntemleri	19
2.4.2.1.TUNEL Yöntemi.....	21
2.5. Hipokampal Formasyon	21
2.5.1. Dentat Girus	21
2.5.2. Entorinal Korteks	22
2.5.3. Subikular Kompleks.....	22
2.5.4. Hipokampus	23
2.5.4.1. Anatomisi	23
2.5.4.2. Histolojisi	24
2.5.4.3. Embriyolojik Gelişimi.....	26
2.5.4.4. Fizyolojisi.....	26

2.6. Stereoloji	27
2.6.1. Tarafsız Sayım Çerçevesi.....	28
2.6.2. Optik Disektör ve Optik Parçalama Yöntemi	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Deney Hayvanları.....	31
3.2. Sıçanlara Alüminyum Verilişi	31
3.3. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması	31
3.4. Optik Parçalama Yöntemi Kullanarak Toplam Nöron Sayılarının Hesaplanması... 34	
3.4.1. Kesit Örnekleme Oranı	34
3.4.2. Alan Örnekleme Oranı	34
3.4.3. Kesit Kalınlığının Ölçülmesi ve Kalınlık Örnekleme Oranının (KaÖÖ) Hesaplanması	35
3.4.4. Nöronların Sayılması	35
3.4.5. Hata Katsayısının Hesaplanması.....	36
3.5. TUNEL Yöntemi Uygulanması	38
3.6. İstatiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Nöron Sayım Bulguları	40
4.2. TUNEL Yöntem Bulguları.....	44
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇLAR	54
7. KAYNAKLAR	55
8. ÖZGEÇMİŞ	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Apoptoz oluşum mekanizmaları	14
Şekil 2.2 Alüminyum ile indüklenen endoplazmik retikulum aracılı apoptoz	18
Şekil 2.3 Sıçan beyninin makroskopik görünümü	24
Şekil 2.4 Sıçan hipokampusu histolojik olarak tabakaları (x4'lük büyütme) (H&E).....	25
Şekil 2.5 Sıçan hipokampusu histolojik olarak tabakaları (x10'lük büyütme) (H&E).....	25
Şekil 2.6 Şematize tarafsız sayım çerçevesi	29
Şekil 3.1 Kontrol, sham ve deney grubundaki sıçanların sol hipokampus kesitlerinin x4, x10 ve x100 objektif büyütmelerindeki görüntüleri (H&E)	33
Şekil 3.2 Nöron sayımı için kullanılan gereçler	36
Şekil 4.1 Kontrol, sham ve deney grubu sol hipokampus ortalama nöron sayıları	43
Şekil 4.2 Kontrol, sham ve deney grubu ortalama apoptotik indeksleri	47
Şekil 4.3 Kontrol, sham ve deney grubu sağ hipokampus TUNEL yöntemi ile boyanmış apoptotik hücreler (x40 objektif büyütme)	48

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1 Hata katsayısının hesaplanması	37
Tablo 4.1 Kontrol grubu sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayıları ve hesaplamada kullanılan parametreler	40
Tablo 4.2 Sham grubu sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayıları ve hesaplamada kullanılan parametreler	41
Tablo 4.3 Deney grubu sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayıları ve hesaplamada kullanılan parametreler	42
Tablo 4.4 Kontrol, sham ve deney grubundaki sıçanların sol hipokampus ortalama nöron sayıları.....	43
Tablo 4.5 Kontrol grubundan 5 sıçanın sağ hipokampus kesitlerinde 10 farklı alanda belirlenen toplam hücre sayısı/apoptotik hücre sayısı	44
Tablo 4.6 Sham grubundan 5 sıçanın sağ hipokampus kesitlerinde 10 farklı alanda belirlenen toplam hücre sayısı/apoptotik hücre sayısı	45
Tablo 4.7 Deney grubundan 5 sıçanın sağ hipokampus kesitlerinde 10 farklı alanda belirlenen toplam hücre sayısı/apoptotik hücre sayısı	46
Tablo 4.8 Kontrol, sham ve deney grubu sıçanların ortalama apoptotik indeksi (%).....	47

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH	Alzhemier hastalığı
ALA	Aminolevulinik asit
AML	Amyotrofik Lateral Sklerozis
AÖO	Alan örnekleme oranı
AP	Alkalen fosfataz
APAF-1	Apoptoz proteaz aktive edici faktör 1
CA	Cornu ammonis
CAD	Kaspaz ile aktive edilen DNA az
ÇDYA	Çoklu doymamış yağ asitleri
D	Deney grubu
DAB	3, 3'diamino benzidin
DES	Dializ Ensefalopati Sendromu
DISC	Ölümü indükleyen sinyal kompleksi
DIG	Digoksin
DNA	Deoksiribonükleik asit
EATT	Eksitator aminoasit taşıyıcısı
ER	Endoplazmik retikulum
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSSG	Okside glutatyon
GSSGR	Glutatyon redüktaz
H	Disektör yüksekliği
H&E	Hematoksilen-Eosin
HK	Hata katsayısı
ICAD	Kaspaz ile aktive olan DNA az inhibitörü
İp	İntraperitoneal
JAM	Kavşak yapışma molekülü
K	Kontrol grubu
KaÖO	Kalınlık örnekleme oranı
KAT	Katalaz
KBB	Kan beyin bariyeri
KBD	Kortikobazal dejenerasyon
KeÖO	Kesit örnekleme oranı
MAP	Mikrotübül ilişkili protein
MCH	Ortalama korpusküler hemoglobin
MCV	Ortalama korpusküler hacim
MDA	Malondialdehit
MSS	Merkezi sinir sistemi
mtDNA	Mitokondrial DNA
NF-kB	Nükleer faktör kappa B

NFY	Nörofibriller yumak
NK	Doğal öldürücü hüceler
NMDA	N-metil D-aspartik asit
OH ⁻	Hidroksil
POD	Horseradish peroksidaz
PSP	Progresif supranukleer palsi
Q ⁻	Disektör partikül sayısı
ROT	Reaktif oksijen türleri
S	Sham grubu
SH	Standart hata
Sitc	Sitokrom c
SOD	Süperoksit dismutaz
SRÖ	Sistematik rastgele örnekleme
T	Kesit kalınlığı
Tdt	Terminel deoksinükleotidil transferaz
Tfr-ME	Transferrin aracılı endositoz
TNF-a	Tümör nekroz faktör-a
TNFR1	Tümör nekroz faktör reseptör 1
TNFR2	Tümör nekroz faktör reseptör 2
Tort	Ortalama kesit kalınlığı
ZO	Zonula okludin
ΣQ	Toplam disektör partikül sayısı

1.GİRİŞ

Aluminyum (Al) yerkabuğu toplam mineral içeriğinin %8'lik kısmını oluşturur ve üçüncü en fazla bulunan elementtir. Aluminyum ve bileşikleri birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Al'un bilinen bir fizyolojik rolü olmayıp insanlar için oldukça toksik olan esansiyel bir elementtir. Sağlıklı bir bireyde vücuttaki total aluminyum düzeyi 30-50 mg arasında değişmektedir. Bu çok küçük miktarlardaki aluminyum beyin, karaciğer, böbrek, kalp ve kemiklerde bulunmaktadır. Yapılan birçok çalışmada aluminyumun toksisitesi tespit edilmiş ve birçok nörodejeneratif hastalıkta vurgulanmıştır. Aluminyum ve Alzhemier, Parkinson, Amyotrofik Lateral Sklerozis (AML), Dializ Ensefalopati Sendrom (DES) gibi nörodejeneratif hastalıklar arasında ilişki olduğuna dair bulgular vardır.

Aluminyumun toksik etkilerinin reaktif oksijen türleri (ROT)' nin üretimi nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bu reaktif oksijen türleri hücre membran proteinlerini yıkarak, membran lipit ve proteinlerini yok ederek, hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engelleyerek, nükleer membranı geçip nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirerek hasarlara neden olabilir ve hücre ölümüne yol açabilirler.

Aluminyum ile indüklenmiş nöronal hücre ölümü mitokondrial yol ve mitokondrial yol ile ilişkili veya bu yoldan bağımsız olarak endoplazmik retikulum aracılı yol ile olmaktadır. Glutamat, Ca^{2+} (kalsiyum) iyonları, serbest radikaller, hücreler tarafından salınan sitokinler apoptozun oluşumundan sorumludur.

Aluminyum ile oluşturulan hasar literatürde sıçan ve fare beyinlerinin değişik bölgelerinde gösterilmiş olup, sıçan beyni hipokampus bölgesinde ilk kez kantitatif olarak gösterilecektir. Aluminyum sülfat verilen sıçanların hipokampus piramidal hücrelerinde azalma olacağı hipotezi ileri sürülerek bu çalışma planlanmıştır. Buna göre, aluminyum sülfat verilen deney grubu, kontrol ve sham grubunda hipokampusun stratum pyramidale tabakasındaki toplam piramidal hücre sayısı optik parçalama yöntemi ile gösterilmiş ve apoptotik indeks TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) yöntemi kullanılarak gruplar karşılaştırılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

Aluminyum atmosferde genellikle çözünmez aluminyum silikat ve aluminyum oksit olarak bulunur (Wang vd 2002). Periyodik tabloda 13. sırada yer alır ve elektronik konfigürasyonu $Ne3s^23p^1$. Yarı ömrü 7.2×10^5 olan yapay radyoaktif Al^{26} olmasına rağmen Al^{27} doğal olarak oluşan izotoptur. Birçok doğal sistemde aluminyumun çok küçük miktarları, Al^{3+} iyonu olarak bulunur. Böylece aluminyumun toksikokinetiği çeşitli Al^{3+} komplekslerinin fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklerine bağlıdır. Solüsyonların pH'sı aluminyum türlerini ve iyonik form varlığını belirler (Yokel 2000). Fizyolojik pH'da, aluminyum çözünmez aluminyum hidroksit $Al(OH)_3$ oluşturur ve ortamın asiditesinde küçük değişiklikler ile kolayca çözünür.

Aluminyum çok güçlü oksijen kabul edicisi olduğundan sitrat, fosfat, laktik asit, oksalik asit, sitrik asit ve katekolaminler gibi oksijen vericilerine bağlanma eğilimindedir. Canlıda aluminyuma fizyolojik olarak ihtiyaç yoktur. Ancak boyutu (0.051 nm) ve elektrik yükünden dolayı magnezyum (0.066 nm, 2^+), kalsiyum (0.099 nm, 2^+), ve demir (0.064 nm, 3^+) gibi benzer karakterlere sahip olduğu esansiyel elementlerin kompetitif inhibitörü olabilir (Verstraeten vd 2008). Aluminyum her yerde toprak, su ve birçok bitkide bulunur. Yiyeceklerin birçoğu toprakta büyüdüğü için aluminyum içerir. Toprak pH'ı 4,5-5'den daha düşük olduğunda aluminyum toprak suyunda çözünür ve bitki kökleri tarafından absorbe edilir. Yiyecek katkı maddeleri dietteki aluminyumun önemli miktarlarına katkıda bulunur (Kim vd 2001). Aluminyum aynı zamanda içme suyunun arıtılması amacıyla da kullanılır. Aluminyum klorhidrat içeren ter önleyiciler aluminyumun bir başka kaynağıdır. Aşılar, antiasidler, fosfat bağlayıcılar ve parenteral beslenme solüsyonları da aluminyum içerirler. Teneke kutularda saklanmış içecekler aluminyumun küçük miktarlarını absorbe etmektedir. Birçok deodorant ve bazı pudralar aluminyum klorhidrat ve çok sayıda kepek şampuanı magnezyum aluminyum silikat içermektedir. Perdah ve zımpara gibi parlaticı maddeler, seramik, patlayıcılar, mürekkep, çimento bileşiminde bulunur (Becaria vd 2002). Aluminyum kap ve aluminyum folyo ile pişirilen yiyeceklerde aluminyum oranı yükselmektedir. Aluminyumun vücuda alımı oral, intranasal, transdermal ve parenteral

yollarla olmaktadır. Oral olarak alınan alüminyumun diyetdeki asiditesi ve bileşimi bilinmediğinden alınan alüminyumun oranı tam olarak bilinmemektedir. Düşük pH alüminyum türlerinin çözünürlüğünü artırarak alüminyum absorpsiyonunu arttırmaktadır. Sitrat ve laktat gibi küçük organik asitlerin varlığı alüminyumun biyoyararlılığını artırırken fosfor ve silikon alüminyumun absorpsiyonunu azaltmaktadır. Şehirde yaşayan ve ortalama 70 kg ağırlığında olan kişilerde yiyeceklerle birlikte vücuda giren günlük alüminyum miktarı kg başına ortalama 0.01–1.4 mg'dır. Bunun sadece 15µg'ı gastrointestinal sistemin duvarı aracılığıyla absorbe edilmektedir. Nötral pH'da alüminyum çözünmez hidroksi bileşikleri oluşturdukları için diyetdeki alüminyumun önemli miktarları absorbe edilmeden dışkı ile atılmaktadır. Böbrekler yoluyla alüminyumun yaklaşık olarak günde 10-40 µg kadar atılmaktadır. Alınan miktar arttığında böbrek atılım miktarı günde 200-500 µg'a kadar çıkabilmektedir. Böbrekler alüminyum atarken total vücut alüminyumunu muhafaza etmeye çalışırlar. Ayrıca safra yoluyla da alüminyum atılabilmektedir.

Sağlıklı kişilerde alüminyumun total düzeyi 30-50 mg arasında değişmektedir. Genel popülasyonda vücuttaki total alüminyumun yaklaşık yarısı iskelette ve yaklaşık olarak ¼'ü akciğerdedir (Ganrot 1986). Beyinde gri cevherde beyaz cevherin iki katı oranında alüminyum bulunmaktadır. Alüminyum ayrıca deri, aşağı gastrointestinal sistem, lenf nodları, adrenal ve paratiroid bezlerde bulunur (McDermott vd 1978).

Sağlıklı kişilerde alüminyum kan konsantrasyonları ortalama 11µg/100 ml ve doku konsantrasyonları çok düşüktür. Normal insan plazma alüminyum seviyeleri 2.1 ile 42 µg/l arasında değişmesine rağmen yaklaşık olarak 10µg/l olarak kabul edilmektedir (Nayak 2002).

Alüminyum dokulara esas olarak demir bağlayan protein transferrin ile taşınır (Becaria vd 2002). Yaklaşık % 90'lık kısmı bu protein ile bağlı olan total alüminyumun geriye kalan %10'luk kısmı serbest ya da sitrat gibi küçük moleküllerle kompleks oluşturmuş durumdadır (Rahman vd 1985).

2.1. Alüminyumun Toksik Etkileri

İnsanlarda bilinen bir fizyolojik role sahip olmayan alüminyum oldukça toksik olan esansiyel bir elementtir. Alüminyum ve bileşenlerine maruz kalan kişilerde başta nörotoksisite olmak üzere birçok tehlikeli yan etkilerin olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Alüminyum çeşitli mekanizmalar ile hem merkezi sinir sistemi (MSS)

hem de diğer sistemler üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir.

Aluminyum toksisitesi genellikle renal fonksiyonu bozulmuş hastalarda bulunur. Kronik dializ hastalarında aluminyumla kronik zehirlenmelere rastlanabilir. Dializ sıvısı yapmak için kullanılan suda ve hiperfosfatemiye kontrol altına almak için kullanılan aluminyum jellerinde bulunan metal aluminyum, bu kronik zehirlenmeden sorumludur. Aluminyum toksisitesi 1970'li yılların ortalarında İngiltere Newcastle'de dializ hastalarında tanımlanmıştır. Bu hastalarda dialize bağlı oluşan osteomalazik osteodistrofinin dializat suyunun yerine aluminyum içermeyen deiyonize su kullanıldığında geri dönüşümlü olduğu görülmüştür. Berlyne ve arkadaşları renal fonksiyonu bozuk olan sıçanların Al'un toksik etkilerine daha duyarlı olduklarını rapor etmişlerdir (Berlyne vd 1970).

Karaciğer üzerine aluminyumun ters etkileri bildirilmiştir (Stein vd 1987). Sıçanlarda oral olarak girmiş aluminyumun karaciğer ve kanda aminolevulinik asid (ALA) dehidrataz aktivitesini arttırdığı ve paralel olarak idrarda aminolevulinik asitte azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Aluminyum klorid karaciğerde ALA-sentetaz ve hem oksijenazın artışını indükler (Chmielnicka vd 1994). Hepatik fonksiyonda aluminyum ile ilişkili anormallikler serum safra asit konsantrasyonunda ve glukuronil transferaz aktivitesinde artma ve safra akışında azalmayı içerir.

Aluminyum hematopoez üzerine direkt etkiye sahiptir. Fazla aluminyumun mikrositik anemiye indüklediği gösterilmiştir. Aluminyum hem sentezinde azalma, globulin sentezinde azalma ve artmış hemolizis ile anemiye neden olmaktadır. Aluminyum toksisitesinden oluşan anemili hastalıklar sıklıkla yükselmiş retikulosit sayısına, azalmış ortalama korpusküler hacim (MCV) ve ortalama korpusküler hemoglobine (MCH) sahiptir.

Osteomalazi, kemik ağrısı, patolojik kırıklar, proksimal miyopati ve Vit D₃ tedavisine yanıtta başarısızlık aluminyum ile indüklenmiş olan muskuloskeletal toksisitenin sık özelliklerindedir. Fazla kemik aluminyumu, düşük kemik oluşum oranı ve kırıklar için yükselmiş risk ile ilişkili görülmüştür (Kausz vd 1999). Aluminyumun kemik üzerine etkisinin yüksek ve düşük konsantrasyonlarda farklı olduğu gözlenmiştir. Aluminyum yüksek konsantrasyonlarda (1.5×10^{-6} M) osteoklast benzeri hücrelerin asit fosfataz aktivitesini, osteoblast benzeri hücrelerin kollajen sentezi, DNA replikasyonu, ornitin dekarboksilaz ve alkalin fosfataz aktivitelerini inhibe ederken düşük konsantrasyonlarda bu aktiviteleri stimüle ettiği bulunmuştur (Liaberherr vd 1987). Deneysel hayvanlarda aluminyum girişi osteoid birikimi ve azalmış mineralizasyon ile

karakterize osteomalazi ile sonuçlanmıştır. Rodriguez ve arkadaşları 1990'da azalmış osteoblast düzeyi, artmış osteoid birikimi ve kemik oluşumunun durmasını alüminyum girişinin sonucu olarak göstermişlerdir (Rodriguez vd 1990).

Alüminyum sülfatın intratestiküler enjeksiyonundan sonra iki günde fokal nekroz ve yedi gün içinde tüm spermatozoalarda yıkım gözlenmiştir (Kamboj vd 1964). Alüminyum sülfatın farelere kronik subkutanöz girişi azalmış testiküler ağırlığa, tübüllerin daralmasına ve spermatojenik arreste neden olmuştur. Dişi sıçanlarda gonadotoksik etkiler ve gebe sıçanlarda fetal ölüm ile ilişkili maternal ölümün alüminyum klorid maruziyeti ile olduğu bildirilmiştir (Benett vd 1975).

İnhalasyon maruziyetini takiben alüminyumun başlıca etkileri respiratuar sistem üzerinedir. Alüminyum endüstride çalışanlarda astım, öksürük, akciğer fibrozisi ya da pulmoner fonksiyon bozukluğu artmıştır. Ancak bu etkilerin sadece alüminyum yüzünden gerçekleşmesi kuşkuludur. Hayvan çalışmalarında bronko-alveolar lavaj sıvısında ve granulomatoz reaksiyonunda makrofajların proliferasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir.

2.2. Alüminyumun Sinir Sistemindeki Etkileri

Alüminyumun insan nörotoksini olduğu ilk olarak 1886'da Prusyalı orduda ampute edilen bölge kanamayı durdurmak için Al ile tedavi edildiğinde farkına varılmıştır. Al'un nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu hipotezi 1965 yılında Wisniewski, Terry and Klatzo Al tuzlarının girişinin tavşan beyinde Alzheimer hastalığının nörofibriller yumaklarına benzer nörofibriller yumakların oluşumunu indüklediğini göstermesiyle doğmuştur (Terry vd 1969). Beyin hasarı ile Al arasında bağlantıyı gösteren ilk laboratuvar hayvan çalışması 1973'de yayınlanmıştır. İn vivo ve in vitro birçok çalışmada nörotoksik etkileri açığa çıkarılan alüminyumun insanlarda ve deneysel hayvanlarda beyinin prenatal ve postnatal gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir (Yumoto vd 2001). Hafıza kaybı, titreme, irkilme, bozulmuş koordinasyon, yavaş motor hareketler, merak kaybı, ataksi ve myoklonik jerkler gibi çeşitli nörolojik belirtiler alüminyum toksisitesiyle ilişkilendirilmiştir (Zatta vd 1991).

Sistemik sirkulasyondan alüminyum kan beyin bariyeri (KBB), nazal olfaktor yol ve serebrospinal sıvı aracılığıyla beyine girebilmektedir. Alüminyum nazal kavitenin çatısında lokalize olan olfaktör nöronlar yoluyla beyine girme yeteneğindedir. Burundaki koku reseptörlerinin aksonları sinir demetleri oluştururlar ve bu sinir

demetleri etmoid kemiğin kribriiform parçasından geçer ve olfaktor bulbda sinaps yapar. Bu hücreler kompleks nöronal ağlar ile olfaktor korteks, korteks ve hipokampusa bağlanır. Olfaktör sinirden alüminyumun absorpsiyonu alüminyum asetilasetonata maruz bırakılan ratlarda çalışılmıştır. Alüminyum depozitleri alüminyum asetilasetonate ile muamele gören ratların pons, medulla, olfaktor bulb ve hipokampus bölgelerinde bulunmuştur. Başka bir çalışmada, sıçanların alüminyum klorhidrata sadece burun yoluyla maruziyetinden sonra sıçanların beyin köküne alüminyum klorhidratın dağıldığı bulunmuştur. Bu çalışmalar ile alüminyumun olfaktör sinir yolu ile alımı ve transnöronal dağılımının beyin için önemli maruziyet yolu olduğu öne sürülmüştür (Becaria 2002).

Alüminyumun KBB'nden beyine giriş mekanizması transferrin-reseptör aracılı endositozdur (TfR-ME) (Yokel 2000). Transferin reseptörler beyin kapiller endotel hücreleri, koroid pleksus, nöronlar ve glial hücrelerde bulunur. Alüminyumun beyine girişinin bir diğer mekanizması metale bağlı küçük moleküllerin pinositozu veya difüzyonu gibi non- spesifik yollardır.

Alüminyum birçok mekanizma ile nörotoksisite oluşturma yeteneğine sahiptir. Beyin alüminyum nörotoksisitesi için önemli hedef organdır ve hipokampusta maksimum birikim ile beyinin tüm bölgelerinde biriktiği gözlenmiştir (Julka vd 1996). Nöron yenilenmesi olmaması nedeniyle alüminyumun beyinden temizlenmesi diğer organlardan daha yavaştır. İnsan beyninden alüminyumun eliminasyon yarı ömrü yedi yıl olarak hesaplanmıştır.

2.2.1. Alüminyum ve Kan Beyin Bariyeri

Alüminyum birçok mekanizma ile nörotoksisite üretme yeteneğindedir. Sıkı bağlantılara sahip beyin kapiller endotel hücreleri, bu hücreleri çevreleyen bazal lamina ve bazal laminaya sitoplazmik uzantılarıyla tutunmuş astrositlerden oluşan KBB periferel sirkulasyon ve MSS arasında değiş-tokuşu düzenler. Al KBB'nin membran-benzeri fonksiyonlarının bazılarını etkiler. Transmembran difüzyon oranını artırır ve MSS'nin hemodinamiğini değiştirmeden ve membran bütünlüğünü bozmadan doyurulabilir transport sistemlerini değiştirir. Gıdaların, hormonların, toksinlerin, ilaçların beyine ulaşmasında bazı değişimler MSS disfonksiyonun temeli olabilir. Alüminyum membran fonksiyonlarını değiştirme yeteneğindedir. MSS ve ek olarak periferel dokular üzerindeki etkileri Al'un bir membran toksini olarak etkisi ile

açıklanabilir. Alüminyum KBB’i etkiler ve endotelial toksisiteyi indükler. Al endotel hücrelerin canlılığını azaltır, mitokondrial potansiyeli değiştirir, hücrel oksidasyonu artırır ve sıkı bağlantı protein ekspresyonunu azaltır (Chen vd 2008). Alüminyumun nöronlar ve astrositlerin metabolizmasında ve hücre iskelet elementleri üzerinde etkileri Al nörotoksitesinde temel olay olarak dikkate alınabilir. KBB’inde sıkı bağlantılar beyin mikrodamarlar arasında beyin endotelial hücrelerini birbirine bağlar. Beyin kapillerini oluşturan endotel hücreler arasında sıkı bağlantı bölgeleri bulunur. Sıkı bağlantılar düşük geçirgenlikten ve beyin endoteliumunun yüksek elektriksel direncinden sorumludur. Sıkı bağlantılar transmembran proteinleri okludin, klaudin ve kavşak yapışma molekülü (JAM) ile oluşturulur (Nitta vd 2003). Sıkı bağlantılar endotelin bütünlüğünün sürdürülmesinde ve kan yoluyla taşınan maddelerin parasellüler transferini önlemede kritiktir. Zonula okludinler (ZO-1/2/3) okludin ile etkileşim halindeki sitoplazmik proteinlerdir. Sıkı bağlantı bölgeleri için tanıtıcı proteinler olarak görev yaparlar (Haskins vd 1998). Sıkı bağlantı proteinleri hücre iskeleti proteini olan aktine aksesuar proteinler olan zonula okludinler (ZO1/2/3) ile bağlanır. Al’a maruz kalma hem sıkı bağlantı proteinleri hem de sıkı bağlantı aksesuar proteinlerinin bozulması ile sonuçlanır.

2.2.2. Alüminyum ve Kalsiyum Hemostazı

Al girişinin kalsiyum hemostazında bozukluklara neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Gandolfi ve arkadaşları alüminyumun endoplazmik retikulum (ER) ile Ca^{2+} alımını değiştirdiğini, mitokondriden Ca^{2+} salımını arttırdığını ve Ca^{2+} ATPaz inhibisyonu ile hücre içinde yüksek Ca^{2+} düzeylerine neden olduğunu göstermişlerdir (Gandolfi vd 1998). Sıçan sinir sisteminde Ca^{2+} hemostaz mekanizması üzerine yapılan bir çalışmada alüminyumun Ca^{2+} ATPaz’ı inhibe ettiği gösterilmiştir (Jill vd 1996).

Ca^{2+} iyonları ekstrasellüler alanla karşılaştırıldığında intraselüler alanda oldukça düşük seviyelerde tutulur. Bu düşük konsantrasyonun sürdürülmesinde görev alan iki kalsiyum pompası mevcuttur. Bunlardan birisi hücre membranında yer alır ve kalsiyumu hücre dışına pompalar. Diğer ise kalsiyumu ER gibi kalsiyumun önemli depo alanı olan organellere pompalar. Al Ca^{2+} u hücre dışına pompalayan plazma membranı Ca^{2+} ATPaz’ı inhibe eder (Bhagavan 2002). Bu pompa Ca^{2+} ’un hücre içinde çok düşük seviyelerde sürdürülmesinden sorumludur. Nöronal Ca^{2+} artışı, ATPaz, fosfolipazlar, proteazlar, endonükleazlar gibi birçok enzimi aktive edebilirler.

Endonükleazlar DNA zincirini, H1 histon bölgesinden 180-200 baz çifti katları uzunluğunda parçalara ayırır. Proteazlar histonları ve kromatin yapısını stabilize eden proteinleri parçalar. Bu enzimlerin aktivitesindeki artış geri dönüşümsüz nöronal hasara yol açar.

Na^+/K^+ ATPaz beyinin hücresel membranında yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Na^+/K^+ ATPaz sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+)'un intrasellüler ve ekstrasellüler ortamları arasında gradientin devamı için esastır. İn vivo ve in vitro Al maruziyetinin Na^+/K^+ ATPaz üzerindeki inhibitör etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Silva vd 2003). Son yıllardaki çalışmalar ile doku spesifik Na^+/K^+ ATPaz inhibisyonunun apoptozda temel bir rol oynadığı gösterilmiş ve bu enzim inhibisyonunun direkt olarak hücre ölümünü başlatabileceği veya diğer apoptotik hasarların oluşumunda hücrenin yatkınlığını belirgin bir şekilde arttırabileceği belirtilmiştir. Na^+/K^+ ATPaz inhibisyonu mitokondrial Ca^{2+} 'un fazla birikmesine neden olur (Silva vd 2005). İntramitokondrial Ca^{2+} düzeylerinde artış mitokondrial geçiş poru (MTP)'nin açılmasına ve sitokrom c'nin (sit c) salınmasına ve apoptozla sonuçlanan kaspazların aktivasyonuna neden olur.

2.2.3. Alüminyum ve Tau proteini

Tau proteini MSS nöronlarında oldukça fazla ve daha az olarak her yerde bulunur. Tau 17. kromozom tarafından kodlanan mikrotübül ilişkili protein (MAP) ailesinden bir proteindir. Mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta önemli rol alır. Tau proteini dendritlerde bulunmaz (Singer vd 1997). 1965'de Klatzo ve arkadaşları enjekte edilen alüminyum tuzlarının tavşanların beyinde nörofibriller yumak (NFY) oluşumuna neden olduğunu bulmuşlardır (Klatz vd.1965) Nörofibriler yumaklar, özgün nöron popülasyonu içinde bulunan anormal ipliksi yapıların çiftleşmiş helikal filamentler şeklinde birikimleridir ve bunların ana maddesi hiperfosforile olmuş tau proteindir (New vd 1995, Iqbal vd 2005). NFY hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur. Alzheimer hastalığı, ALS/Parkinsonizm-Demens Kompleksi (ALS/PDK), kortikobazal dejenerasyon (KBD), pugilistik demans ve kafa travmaları, Down Sendromu, postensefalitik parkinsonizm, progresif supranükleer palsi (PSP) ve Pick hastalığında bulunurlar (Ishiguro vd 1999). Al tau proteinin fosforilasyonunun arttırmaktadır. Tau proteini hiperfosforile olduğu durumlarda, mikrotübüllere bağlanma yetenekleri azalır

ve çift sarmal iplikçikleri halinde bulunurlar. Hücre içi birikimlerde bulunan hiperfosforile tau proteinin hücrenin temel iskeletini bozarak önce aksonal iletinin bozulmasına sonra da hücrenin ölümüne neden olduğu düşünülmektedir.

2.2.4. Alüminyum ve Glutamat

Beyindeki sinapsların %40'ında bulunan glutamat başlıca eksitatör nörotransmitterdir. Al'a maruz kalmada beyinde artar ve bir nöronun çevresinde kritik bir düzeye ulaştığında nöron apoptozla ortadan kaldırılır. Nöronlarda hücre metabolizmasının bir parçası olarak glikozdan sentezlenir. Sinaps aralığına salıverilmesinin ardından daha çok astrositler tarafından geri alınır. Glial hücrelerde glutamin sentetaz ile glutamat ve amonyağın kombine edilmesiyle glutamin oluşur. Sentezlenen glutamin glutaminerjik nöronlar ile alınır ve mitokondrial glutaminaz enzimiyle glutamata dönüşür (Petroff 2002). Glutamat sinaptik veziküller içine alınır ve sinaptik boşluğa salınır. Glutamat postsinaptik nöronda reseptörüne bağlanır ve glutamat taşıyıcılar olan eksitatör amino-asid taşıyıcıları 1 ve 2 (EAAT1 ve EAAT2) ile sinaptik boşluktan uzaklaştırılır. Glutamat reseptörleri iyonotrofik ve metabotrofik olmak üzere 2 gruba ayrılır (Dingledine vd 1999). İyonotrofik reseptör olan N-metil D-aspartik asit (NMDA) Ca^{2+} , Na^{+} ve K^{+} iyonlarına geçirgendir (Riedel vd 2001). NMDA reseptörleri, MSS'de sinaptik fonksiyonun düzenlenmesinde esas rol oynar (Carroll vd 2002). Hücrenin dinlenme durumunda, NMDA reseptörler magnezyum (Mg^{2+}) iyonları ile kapatıldığından geçirgen değildir. Presinaptik nöronun uyarımının alınması postsinaptik hücreleri depolarize eder ve bu durumda NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna, dolayısıyla da hücre içine kalsiyum akışına izin verir (Evans vd 1977). Sinaptik aralıktaki glutamat miktarında kontrolsüz bir artış NMDA'yı aktive ederek hücre zarları boyunca Na^{+} ve Ca^{2+} iyon iletimini artırır ve nörolojik hasarı alevlendirir (Harkany vd 2000).

2.3. Oksidatif Hasar

Çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik reaksiyonlar ile oluşan reaktif oksijen türleri bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük, yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (Ozdem vd 1994). Hücrede meydana gelen çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin

olumsuz etkilerine karşı hücre antioksidanlar tarafından korunmaktadır. Antioksidan sistem, serbest radikallerin etkilerini farklı basamaklarda önlemeye, sınırlamaya veya kısmen tamir etmeye çalışır (Willcox vd 2004). Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulacak olursa, yani antioksidanların serbest radikalleri nötralize etme hızı daha yavaş gerçekleşirse, serbest radikaller artar. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse hücre membran proteinlerini yıkarak, membran lipit ve proteinlerini yok ederek, hücre membranını sertleştirip membran fonksiyonunu engelleyerek, nükleer membranı geçip nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirerek hasarlara neden olabilirler (Çavdar vd 1997). Bu doku hasarlarını önleyen antioksidan koruyucu sistemlerden bazıları; antioksidan enzimler katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon reduktaz (GSSGR), superoksit dismutaz (SOD), zincir bozan antioksidanlar (vitamin C, vitamin E, vitamin A, β -karoten, albumin, ürik asit) ve flavonoidler (meyve, sebze ve çayda bulunan antioksidanlar) sayılabilir (De Zuwatt 1999, Rosenfeld 1998). Bu dengenin bozulması sonucu artan serbest radikallerin hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye (oksidatif hasara) 'oksidatif stres' denir (Çavdar vd 1997). Moleküler yıkım yeterli şiddette olduğu zaman oksidatif stres nöronları apoptoz veya nekroz ile yıkımına neden olur.

SOD süperoksit serbest radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Glutatyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Glutatyon reduktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder. Katalaz esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Katalaz hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalar.

Serbest radikallerin oluşturduğu hasarların temelinde 3 mekanizma mevcuttur:

1. Membran lipitlerinin peroksidasyonu: Serbest radikaller hücre membranlarına saldırdığında hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırır ve hücrede bozulmalarına neden olurlar. Nöral membranların çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olması nedeniyle serbest radikallerin MSS'de kullandığı mekanizma genellikle lipid peroksidasyonudur.
2. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: Serbest oksijen radikalleri protein çapraz bağlarının oluşmasına, protein yapısında ana zinciri okside ederek proteinlerin

parçalanmasına ve aktivite kaybına neden olur.

3. DNA hasarı: DNA molekülü yeniden sentezlenemeyen ancak kopyalanabilen bir molekül olduğundan DNA modifikasyonları mutasyonlara ve genetik bozukluklara neden olmaktadır. Bu yüzden DNA hasarının ROT ile indüklenen hücresel modifikasyonların en ciddi olduğu düşünülmektedir. Oksidatif DNA modifikasyonları memeli DNA'sında sıktır. Hidroksil radikalının DNA molekülünün tüm bileşenleriyle reaksiyona girdiği bilinmektedir. Pürin, pirimidin bazlarında ve deoksiriboz iskelette hasara yol açmaktadır.

Beyin hücre komponentlerine oksidatif hasar alüminyumun nörotoksitesinde önemli mekanizmalardan biridir. Çeşitli çalışmalarda da alüminyumun nörotoksik etkisinin reaktif oksijen türlerinin üretimine bağlı olduğu vurgulanmıştır (De Marchi vd 2004, Ogasawara vd 2003). Merkezi sinir sistemi, önemli antioksidan enzim düzeylerinin düşüklüğü, nöral membranların çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olması ve metabolizma için önemli miktarlarda oksijene gereksinim duyması nedeniyle oksidatif hasara diğer sistemlerden daha duyarlıdır (Gupta vd 2004).

Beyin membranlarında lipid peroksidasyon oranlarında artış alüminyum nörotoksitesinin etiyojisine katkıda bulunur. Alüminyum reaktif oksijen türlerini üreterek protein, lipid, DNA oksidasyonuna neden olmaktadır. Alüminyum muamelesinin sıçan ve farelerin beyinlerinde oksidatif hasarı arttırdığı ve in vitro asidik koşullar altında serbest demirin varlığında alüminyumun lipid peroksidasyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Ogasawara vd 2003). Özellikle MSS'de ROT membran lipidlerini içeren hemen hemen tüm hücresel komponentlere saldırarak oksidatif stresin bir formu olan lipid peroksidasyonu oluşturur. Lipid peroksidasyonu, bir radikalın membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplardan bir H atomu uzaklaştırması ile başlamaktadır. Biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonu membran akışkanlığının kaybı, membran potansiyelinde değişiklikler, membran geçirgenliğinde artış ve reseptör fonksiyonlarında artış ile sonuçlanır. Beyin hücrelerinde lipid peroksidasyonun oranındaki önemli artış, membran hasarına ve nöronal hücre ölümüne neden olur.

Alüminyumun ferröz demir (Fe^{2+}) aracılığıyla nöronlarda oksidatif hasara neden olduğu gösterilmiştir. Alüminyum Fe^{2+} iyonunu oksidasyon oranını azaltarak stabilize eder. Fe^{2+} oksidatif türlerin oluşumunu Fenton reaksiyonunu aktif olarak katalizleyerek artırır. Alüminyum superoksit dismutaz ve katalazı baskıladığından Fenton reaksiyonu OH^- ve ferrik demir (Fe^{3+}) oluşumuna neden olur (Bondy vd 1996) Superoksit radikali

hemen H_2O_2 'e dönüştürülür. KAT enziminin Al ile aktivitesinin baskılanması nedeniyle H_2O_2 'in H_2O ve O_2 'ye dönüşümü yavaşlar. Fazla biriken H_2O_2 OH⁻ radikallerinin üretimine neden olarak çeşitli proteinlerde, membran lipidlerinde ve DNA'da hasara yol açar.

2.4. Apoptoz

Biyolojik bilimler literatüründe apoptoz terimi, ilk defa 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Curie tarafından kullanılmış ve bu araştırmacılar apoptozu canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlamışlardır (Ustaçelebi vd 1999). Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozu, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (Wyllie 1980). Cohen ve Duke 1984'de apoptozun aktif bir süreç olduğunu protein ve RNA sentezinin kimyasal inhibisyonunun apoptozu engellediğini göstererek ispatlamışlardır. Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz; çok hücreli organizmaların organogenezisi sırasında ya da gelişimini tamamlamış canlılarda, hasar görmüş ya da potansiyel olarak tümöral yatkınlığı olan hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan hem fizyolojik hem de patolojik olarak uyarılabilen bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Cohen vd 1997, Everett vd 1999). Hücre ölümünün bir modeli olan apoptozda hücre kendi ölümüne aktif olarak katılır. Doku homeostazında, embriyogenezis, immun toleransın sürdürülmesinde, sinir sisteminin gelişiminde ve endokrin bağlı doku atrofisinde sıklıkla apoptoz bulunur. Bağırsak epitelinin yenilenmesi, menstruasyon sırasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin uzaklaştırılması, virusle enfekte hücrelerin ortadan kaldırılması apoptozla örnek olarak verilebilir. Apoptozla uğrayan hücre karakteristik morfolojik ve biyokimyasal özellikler gösterir. Apoptoz kromatin kondensasyonu, çekirdek büzülmesi ve nükleer membranın kaybı, morfolojik olarak bozulmamış mitokondri ve kromatin içeren apoptotik cisimleri meydana getiren membran kabarması, DNA'nın nükleozomal parçalara ayrılması, enerji ve protein sentezi gereksinimi ve inflamasyon cevap olmayışı ile karakterizedir (Virginia vd 1995). Bu apoptotik hücreler ve onların membran bağlı apoptotik fragmentleri herhangi bir hücresel içerik sızmadan önce makrofajlar ya da komşu hücrelerle hızlıca fagosite edilir

(Pelengaris vd 2006, Savill vd 1989). Apoptotik hücrelerin uzaklaştırılması için bu etkili mekanizma nedeniyle, inflamatuvar cevap oluşmaz. Hücrenin kromatin materyali, nukleus membranının çevresinde toplanıp, kondanse olur ve apoptotik hücre, küçük cisimciklere parçalanarak yıkıcı immün hücreleri tetiklemeden, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından etrafı sarılarak fagosite edilmektedir.

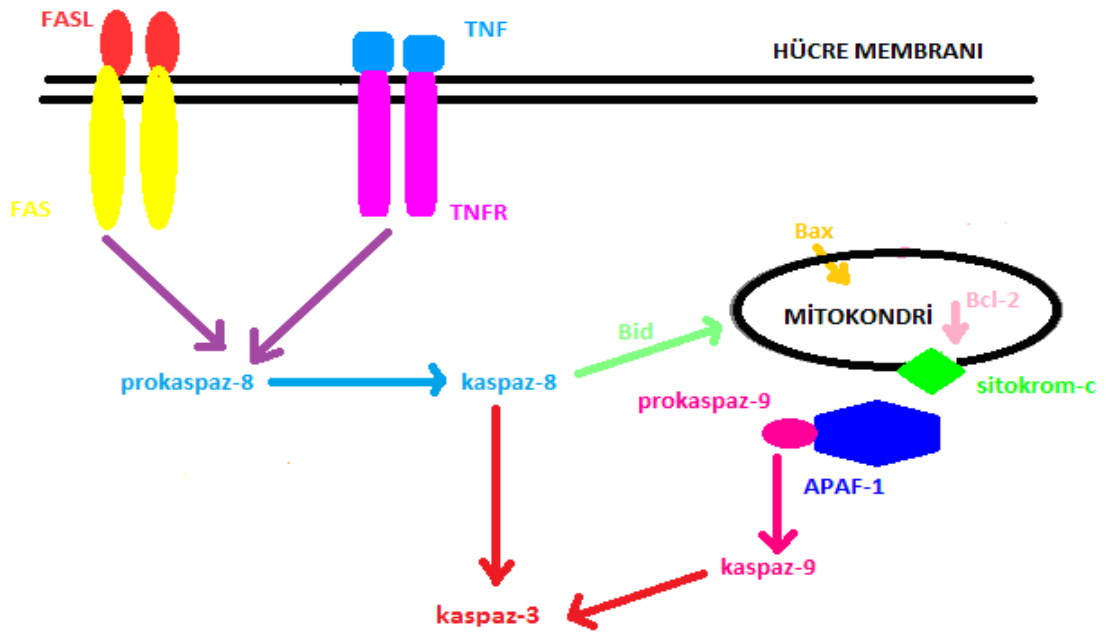
Apoptozun erken fazlarında hücre yüzey ve plazma membranında değişiklikler oluşur. Apoptozun en erken olaylarında, nukleusta saptanabilen olası değişikliklerden önce fosfatidil serin sitoplazmik membranın iç tabakasından dış tabakasına doğru hareket eder ve hücrenin dış yüzeyinde açık hale gelir. Apoptotik hücrelerde gözlenen morfolojik değişikliklerin çoğu hücre ölümünde aktive edilen sistein proteazların bir ailesi olan kaspazlar ile nukleer lamininlerin ve sitoiskelet proteinlerin parçalanmasının sonucudur. Memelilerde bu proteazlar en az kırk üyeden oluşan geniş bir aile oluştururlar. Apoptotik hücre ölümünde oldukça önemli olan kaspazlar yüksek bir özgüllük ve koordine bir davranışla proteinlerin belirli bölgelerinin kırılması işleminde görev alırlar.

Apoptoz geçiren hücrede mitokondrial fizyoloji bozulur. Apoptoz sırasında mitokondrial geçirgenlik değişir ve apoptotik spesifik proteaz aktivatörleri mitokondriden salınır. Özellikle sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınışı Apoptoz proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanma ve böylece kaspaz-9 (Apaf-3) aktivasyonu ile sonraki kaspaz aktivasyonunu uyarır.

Apoptozun son noktalarından biri olan genomik DNA'nın fragmentasyonu apoptozun biyokimyasal belirleyicisidir. Geri dönüşümsüz bir olay olan DNA fragmentasyonu hücreye ölüm için komut verir ve plazma membranında geçirgenlik değişikliklerinden önce oluşur. Birçok sistemde DNA fragmentasyonu Ca^{2+} ve Mg^{2+} bağımlı endonukleaz aktivasyonunun sonucu olarak gösterilir. Kaspaz ile aktive olan DNAaz (CAD) selektif olarak mono ve oligonukleozomal DNA fragmentleri oluşturan nukleozomal birimler arasında lokalize olmuş alanlarda DNA'yı kesip ayırır. CAD inhibitör subunite bağlı inaktif bir kompleks olarak bulunur. CAD'ın aktivasyonu kaspaz-3 aracılı CAD inhibitörünün (ICAD) ayrılmasına bağlıdır. Aktif kaspaz 3 molekülü inhibitör subuniteyi ayırır. İnhibitör subunitin ayrılması enzimin serbest kalması ile sonuçlanır (Alnemri 1997, Cohen vd 1997).

2.4.1. Apoptoz Oluşum Mekanizmaları

Apoptoz mitokondri aracılı intrinsik, ölüm reseptörleri aracılı ekstrinsik veya endoplazmik retikulum aracılı olabilir (Ashkenazi vd 1997). Apoptoz, Fas (CD95) ve Tümör nekroz faktör reseptörü gibi ölüm reseptörlerinin kaspaz-8'i aktive etmesi ile ya da mitokondri aracılı kaspaz-9'un aktivasyonu ile gerçekleşir. İntrinsik ve ekstrinsik yolda, kaspaz-3 aktivasyonu ortaktır (Huppertz vd 1999, Roulston vd 1999).



Şekil 2.1 Apoptoz oluşum mekanizmaları. Apoptoz mitokondri ve ölüm reseptörleri aracılığıyla iki yolla olmaktadır. Her iki yolda ortak olan kaspaz-3 aktivasyonudur.

2.4.1.1. Mitokondri Aracılı Apoptoz

Mitokondri aracılı apoptotik yol, proapoptotik (Bax, Bad) ve anti-apoptotik (Bcl-2) olarak adlandırılan Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığı ile yönlendirilir. Aluminyumun girişi, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteini olan sitc'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını, hem mitokondri hem de endoplazmik retikulumda Bcl-2'de azalmayı, mitokondri içine Bax translokasyonunu, kaspaz-3'ün aktivasyonunu ve DNA kırılmasını indükler (Dewitt vd 2006). Tavşan hipokampusunda Al indüklenmiş apoptoz Bcl-2/Bax oranında karışıklığı neden olmuştur. Sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptoz yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğinin işaretidir. Sit-c mitokondriden salınca sitoplazmada Apaf-1'e bağlanır, oluşan kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif hale gelen kaspaz 9 ölümü indükleyen kaspaz 3'ü indükler. Al ile muamele apoptozun göstergesi olan kaspaz 3 aktivasyonu ve fosfatidil serinin iç membrandan dış membrana hareketi ile sonuçlanır (Johnson vd 2005).

2.4.1.2. Ölüm Reseptörleri Aracılı Apoptoz

2.4.1.2.1. FAS/FAS-L Aracılı Apoptoz

FAS/FAS-L aracılı apoptoz bağışık yanıt sonunda arta kalan lenfositlerin yok edilmesinden, kanser hücreleri ve virusle enfekte hücrelerin öldürülmesinden sorumludur. TNF ailesinin bir üyesi olan ve özellikle sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler (NK) üzerinde bulunan FAS-L'in FAS reseptörüne bağlanmasıyla apoptoz başlar. FAS reseptör ligandın bağlanmasıyla ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşturarak prokaspaz-8'i etkinleştirir. Aktive olan kaspaz-8 diğer kaspazları da aktive ederek hücre ölümü ile sonuçlanacak olan kaspaz kaskadını başlatır (Cooper vd 2006, Medema vd 1997). Aktive olan kaspaz-8 ayrıca Bcl-2 ailesinden apoptotik bir protein olan Bid' i aktive eder. Aktif olan Bid inaktif halde bulunduğu sitozolden mitokondriye geçer ve apoptozun intrinsik yola ilerlemesine neden olur.

2.4.1.2.2. Tümör Nekroz Faktör (TNF- α)

Aktive olmuş makrofajlardan salınan multifonksiyonel bir sitokin olan TNF- α 'nın salınımı endotoksin, inflamatuvar olaylar, immün kompleksler, fiziksel hasar ve toksinler tarafından uyarılmaktadır (Bazzoni vd 1996). TNF- α , endotel aktivasyonuna yol açarak, nitrik oksit salınımını ve inflamasyonu stimüle eder, fibroblastları uyararak kollagen sentezini artırır ve lökositleri aktive ederek inflamatuvar sitokin salınımına yol açar (Ferraz vd 1997). TNF- α iki farklı yüzey reseptörü olan Tümör nekroz faktör reseptörü 1 ve 2 (TNFR1 ve TNFR 2)'e bağlanma ile biyolojik etkilerini başlatır (Monden vd 2007). Reseptöre bağlanma intrasitoplazmik bölgede bulunan reseptöre ait ölüm domainin kaspaz-8'i aktive etmesine neden olur. TNF- α apoptozun ekstrinsik yolağında önemli rol oynadığı gibi, intrinsik apoptoz yolağında da başlangıç kaspazlarını aktifleştirmek suretiyle etkin olduğu gözlenmiştir. Proapoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- α 'nın antagonistleri, antiapoptotik etkinlik göstermektedirler (Fadeel vd 2005).

2.4.1.3. Granzim veya Perforin Sistemi

Bu sistem patojenle enfekte olan hücrelerin ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etklidir. Sitotoksik T lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler hedef aldıkları hücreleri FASL/FAS reseptörü aracılığıyla öldürürler. Bu mekanizma ile hücre ölümü gerçekleşmediği zaman perforin ve granzim B salınımına neden olurlar. Perforinler ve granzim B sitotoksik T lenfositler ve NK hücrelerin sitoplazmik salgı granülleri içinde bulunan proteinlerdir. Sitotoksik T lenfositler hedef hücreye bağlandığında perforinler salgılanır ve salgılanan perforinler hedef hücrenin membranında porlar oluştururlar. Bu perforin poru hücre içine kalsiyum girişinde hızlı bir artışa sebep olur. Hücre içine giren perforin vezikülden granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Granzim B hızlı bir şekilde kaspaz aktivasyonunu başlatır. Bununla birlikte Granzim A da perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız yolda apoptozda rol alır.

2.4.1.4. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz

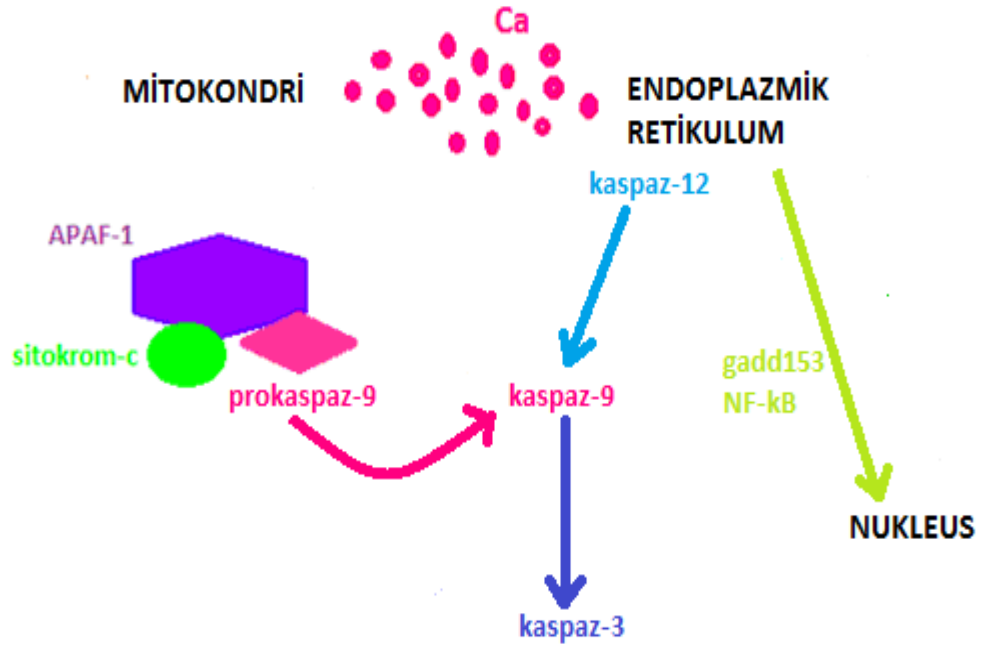
ER, hücre içi kalsiyum dengesi, protein sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir (Nakamura vd 2000). Protein katlanmasında temel bir işlev yapan ER'da bu işlevin bozulması ile katlanmamış proteinlerin neden olduğu bir stres ortaya çıkar. Uzun süreli stres hücre ölümüne katkıda bulunur ve birçok farklı nörodejeneratif hastalığın patojenitesi ile bağlantılıdır. Son yıllarda kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (Keane vd 2001). Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozdan farklı bir yoldur. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptoz için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalarda Ca^{2+} seviyelerinin yükselmesi ile prokaspaz-12'nin aktif olduğu gösterilmiştir. Aktifleşen kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir ve kaspaz-9 ile etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Rao vd 2001).

Mitokondrial değişimler Al ile indüklenmiş nöronal hücre ölümünün altında yatan mekanizmalarda önemli bir basamak olarak gösterilmesine rağmen ER'un da bu hücre ölümünü regüle etmede önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. ER kalsiyum için majör depo alanı olması ve Bcl-2 and Bcl-XL içermesi nedeniyle önemli bir subsellüler alandır. Al ile oluşturulmuş stres apoptozun spesifik bir tipi olan kaspaz-12 aracılı apoptoz ile sonuçlanır.

Al'un ER aracılı apoptozu regüle etmedeki aktif rolü mitokondriden bağımsız bir yol ile ya da mitokondri ile birlikte olabilir. Al endoplazmik retikulumda Ca^{2+} depolarının karışıklığına ve proteinlerin yanlış katlanmaları sonucu sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunda artışa neden olur. Bunun sonucu mitokondrial Ca^{2+} da artar. Mitokondri Ca^{2+} depoları için sınırlı kapasiteye sahip olduğundan bu kapasite aşıldığı zaman Ca^{2+} sitozole geri salınır. Bu da MTP'nin açılışına ve sitokrom c'nin salınmasına neden olur. Ca^{2+} 'un mitokondri ve ER arasındaki geçişlerinin Bcl-2 tarafından düzenlendiği düşünülmektedir.

Al ile indüklenmiş ER stres transkripsiyon faktörleri büyümeyi durduran ve DNA hasarını indükleyen gen-153 (gadd 153) ve nükleer faktör kappa B (NF-kB)'nin aktive olmasına ve nukleusa translokasyonlarına neden olur ve bu transkripsiyon faktörleri apoptozu başlatır. NF-kB ve gadd 153 nöronal homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynarlar. NF-kB sitoplazmada inhibitör subunite (I κ B) bağlı inaktif haldedir. Bu

konformasyonda NF-kB nukleusa transloke olma yeteneğinde değildir. Ancak, ekstrasellüler stres faktörleri fosforilasyona ve inhibitör subunitin salınışına neden olur. NF-kB serbest kaldığında nukleusa girer ve stres cevabında rol oynayan çeşitli genlerin promoter bölgelerine bağlanır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Al ile indüklenen endoplazmik retikulum aracılı apoptoz. Al ile indüklenen ER aracılı apoptoz mitokondri aracılı veya mitokondriden bağımsız olarak iki şekilde gerçekleşmektedir.

Aluminyumun membran yapı ve fonksiyonlarının biofiziksel özelliklerini modifiye ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Zsiroz vd 1998, Weis vd 1989). Aluminyum membran proteinleri ile direkt olarak etkileşimle ya da lipid matrikste değişimleri indükleyerek membran dinlenme potansiyeli, voltaj aktif iyon kanalları, transmitterlerin sekresyonu ve ayrıca transmembran potansiyel farklılıklarında karışıklıklara neden olur (Gupta vd 2005). Al aynı zamanda DNA tamir mekanizmasında da önemli rol oynar. DNA tamiri ile ilişkili enzimlerin etkilerini inhibe ederek DNA tamir sürecini inhibe eder.

2.4.2. Apoptoz Belirleme Yöntemleri

Apoptotik hücreler çok farklı yöntemler kullanılarak saptanabilir. Apoptotik hücrelerdeki morfolojik değişiklikleri saptamak için farklı mikroskoplar kullanılabilir. Işık mikroskobu ile apoptotik hücrelerdeki morfolojik değişiklikleri belirlemek için hematoksilen boyama ve giemsa boyama kullanılır. Hematoksilen boyama hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Bu yöntem kullanılarak yapılan değerlendirmede hematoksilen kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Hematoksilen boyama ile apoptotik hücrelerde gözlenebilen değişiklikler; hücre küçülmesi, sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesidir.

Giemsa ile boyamada da apoptotik hücreler nükleus morfolojisi esas alınarak belirlenir. Giemsa boyama hematoksilen boyama ile karşılaştırıldığında sitoplazma sınırları giemsa boyamada daha iyi seçilebilmektedir (Pınarbaşı 2007).

Floresan mikroskobu kullanılarak hücre kültürü çalışmalarında canlı ve ölü hücreler birbirinden ayırdedilebilir. Bu ayrımı yapabilmek için, canlı ve ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen başka bir boya (örn. Propidium iyodür) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi boyalar ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar.

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptozda en değerli yöntem (altın standart) olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği yöntemdir. ER, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detayları da inceleme olanağı verir

Faz kontrast mikroskobunun temel ilkesi ışığın farklı kırılma indekslerine sahip hücre ve hücre dışı yapılardan geçerken, hızını ve yönünü değiştirme esasına dayanır. Bu değişiklikler birbiriyle bağlantılı olarak yapıların daha açık ya da daha koyu görünmesine sebep olur. Faz kontrast mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları alt tabakadan ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler izlenebilir.

Apoptotik hücreler farklı immunohistokimyasal metodlar ile de gösterilebilir. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan fosfatidilserin molekülleri apoptoza giden hücrede hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (Zahng 1997). TUNEL yöntemi DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya pleytlere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozun varlığı bu metotla saptanabilir. M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspaz etkisiyle kırılmasından sonra ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanmasıyla belirlenir. Sitokeratin 18 (CK18) tek katlı ve glanduler epitelyum hücrelerinde bulunan tip 1 ara filament proteinidir. Bu nedenle M30 yöntemi sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılabilir. Apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 de immunohistokimyasal olarak belirlenebilir.

Agaroz jel elektroforezi kullanılarak DNA kırıkları gösterilebilir. Apoptotik hücrelerdeki Ca^{2+} ve Mg^{2+} bağımlı olan endonükleaz aktivasyonu sonucu DNA'da tipik olarak 180-200 baz çifti ve katları biçiminde bir parçalanma oluşur. Bu parçalanma modeli, agaroz jel elektroforezinde merdiven biçiminde gözlenir ve apoptoz için tipiktir. Western blotlama ile apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadığı belirlenebilir (Temizkan vd 2008). Ayrıca bu yöntem ile sit-c'nin mitokondriden sitoplazmaya geçip geçmediği tespit edilebilir. Flow sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikör kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. DNA fragmentasyonunun tespitinde diğer bir yol da ELISA yöntemi ile, apoptotik süreç sonunda, parçalanmış ve sitoplazmaya sızmış mono ya da oligonükleozomların saptanmasıdır. ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Normal hücrede inaktif olan pro-kaspaz-3, hücrenin apoptoza gitmesi ile aktif kaspaz-3 molekülüne haline dönüşür. Bir hücre lizatında ne kadar kaspaz-3 varsa, o kadar çok apoptoza uğramış hücre var demektir. ELISA plaklarındaki kuyucuklarda kaspaz-3 miktarı tayin edilebilir. ELISA kuyucuklarında spesifik antikoru ile immobilize edilmiş kaspaz-3 moleküllerinin, floresan veren spesifik substratları ile aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır.

2.4.2.1. TUNEL Yöntemi

TUNEL yöntemi ilk olarak 1992'de Gavrieli, Sherman, and Ben-Sasson tarafından tanımlanmıştır (Gavrieli vd 1992). TUNEL yöntemi apoptotik hücrelerde DNA parçalanmasını saptamak amacıyla kullanılır. Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi bir işaretleyici ile işaretli nükleotidlerin çift veya tek zincirli DNA'nın serbest 3'-OH ucuna eklenmesini katalizler. (Bortner vd 1995). Degrede olmuş DNA'lı nukleuslar standart immunohistokimyasal veya immunofloresan teknikler ile kolaylıkla saptanabilir. Eğer DNA'da serbest 3'-OH ucuna bağlanan nükleotidler biotin veya digoksin (DIG) ile işaretlendiyse bu nükleotidler (strept) avidin veya anti-DIG antikoru ile ikinci inkubasyon basamağı ile saptanabilir. (Strept) avidin veya anti-DIG antikoru bir haberci molekül (alkalen fosfataz (AP), horseradish peroksidaz (POD)) ile konjuge edilirse bu immunkompleks kolaylıkla görülebilir (Negoescu vd 1998) DNA zincir kırıklarının floresan-nükleotid kullanılarak işaretlenmesi DNA'nın 3-OH ucuna bağlanan nükleotidlerin floresan mikroskop veya bir flow sitometri ile saptanmasına izin verir (Virginia 1995, Sgonc vd 1994). Direkt olarak işaretleme farklı avantajlar sunar. Direkt olarak işaretleme daha az spesifik olmayan zeminin olmasını sağlar. Eğer bir haberci enzim ile konjuge bir anti-floresan antikor örneğe eklenirse, floresan kolorimetrik bir sinyale dönüştürülebilir. Enzimatik metodlar birçok inkubasyon ve yıkama basamakları ile zaman almasına rağmen, bu metodlar çok duyarlı ve spesifiktir (Darzynkiewicz vd 1994).

2.5. Hipokampal Formasyon

Limbik sistem içerisinde önemli fonksiyonlara sahip olan hipokampal formasyon hipokampus, subikular kompleks (subikulum, presubikulum, parasubikulum), dentat girus ve entorinal korteks'ten (alan 28) oluşmaktadır (Barry vd 1995).

2.5.1. Dentat Girus

Girus parahipokampalis ile hipokampus arasında gri cevher parçası olan dentat girus hipokampus ile anatomik komşuluğuna karşılık histolojik açıdan farklılık

göstermektedir. Dentat girus 3 tabakadan oluşur: Granüler hücre tabakasının üstünde hücre içermeyen moleküler tabaka, granüler hücrelerin bulunduğu granüler tabaka ve çeşitli hücre tiplerinin bulunduğu polimorfik tabaka. Dentat girusun polimorfik tabakası hipokampusun CA4 bölgesine uyar. Hipokampus esas olarak piramidal nöronlardan oluşurken, dentat girus'un asıl yapısını granüler hücreler oluşturur (Barry vd 1995). Birçok kortikal merkezden gelen uyarılar, entorinal korteks yolu ile dentat girus'a gelip, oradan da hipokampusa iletilir (Stephen vd 2002).

2.5.2. Entorinal Korteks

Parahipokampal girusta lokalize olan entorinal korteks anatomik bağlantıları nedeniyle hipokampal formasyonun bir parçasıdır. Rostral olarak amigdalanın anterior sınırına uzanır ve kaudal olarak hipokampusun bir parçasıyla üst üste gelir. Hipokampus, dentat girus ve subikuluma major giriş sağlayan bölgedir. Entorinal korteks histolojik olarak altı tabakaya ayrılır ve diğer neokortikal bölgelerden oldukça farklıdır.

1. Hücresel olmayan pleksiform tabaka
2. Entorinal korteksin ayırt edici bir özelliği olan satellit hücreleri ve büyük piramidal hücre adalarından oluşan dar bir hücresel tabaka. Bu hücresel adalar beynin yüzeyinde küçük yumrular oluştururlar ve entorinal korteksin sınırlarının belirlenmesini sağlarlar.
3. Orta büyüklükteki piramidal hücrelerin bir tabakası
4. Entorinal korteksin bir başka özelliği internal granüler tabaka yerine lamina dissecans olarak adlandırılan yoğun liflerden oluşan hücresel olmayan tabaka
5. Bu tabaka beş veya altı hücre kalınlığında büyük piramidal hücrelerden oluşur
6. Beyaz cevherden sınırı tam olarak ayrılmamış geniş bir tabaka

2.5.3. Subikular Kompleks

Subikulum, presubikulum ve parasubikulum olmak üzere üç ana alt bölümden oluşur. Subikulum'un bir ucu hipokampusun CA1 bölümü ile komşu iken diğer ucu presubiculum ile devam etmektedir (Witter 2004). CA1 ile subikulum arasındaki sınır piramidal hücre tabakasının genişlemesiyle ayırt edilebilir. Subikulum histolojik olarak üç tabakaya bölünebilir: subikular piramidal hücrelerin apikal dendritlerini içeren yüzeysel moleküler tabaka, yaklaşık otuz hücre kalınlıkta bir piramidal hücre tabakası

ve derin polimorfik tabaka (Barry 1995). Presubikulum subikulumun medialinde bulunurken parasubikulum entorinal korteks ile subikular kompleks arasındaki sınırı belirler.

2.5.4. Hipokampus

2.5.4.1. Anatomisi

Temporal korteksin medial bölgesinde, lateral ventrikülün iç kısmının ventral yüzeyini oluşturmak üzere içeri doğru kıvrılmış ve uzamış 5-8 cm uzunluğunda gri cevher kitlesidir. Hipokampus'un bir ucu amigloid çekirdeklere dayanırken bir kenarı parahipokampal girus ile kaynaşmış durumdadır. Filogenetik olarak en eski beyin kısımlarından olan hipokampus deniz atına benzediği için bu isimle anılır. *Pes hippocampi* denilen geniş ön kısmında 3-4 yuvarlak çıkıntı bulunur. Bu çıkıntılara *digitationes hippocampi* denilmektedir. Hipokampus'un ventrikül boşluğundaki konveks yüzü *alveus* denilen ince bir beyaz cevher tabakası ile kaplıdır. *Alveus*u oluşturan miyelinli lifler, hipokampus'da bulunan sinir hücrelerinin aksonlarıdır (Arıncı vd 2001).

Cornu Ammonis'in baş harflerini temsilen CA olarak da ifade edilebilen hipokampus, hücre yapısındaki değişikliklerden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 gibi farklı alanlara bölünmüştür. Bunlardan CA1 subikulum'a, CA4 ise dentat girus'a en yakın olan alandır (Barry vd 1995).

Dentat girus ve hipokampus arasında düzenli yapıda sinaptik bağlantılar bulunur. Hipokampusun CA3 alanındaki tüm piramidal hücre tabakası yaklaşık on hücre kalınlıktadır ve dentat girus granül hücrelerinden uzanan aksonlar (*mossy lifleri*) hipokampusun bu alanındaki piramidal nöronlarda sonlanırlar. Bu piramidal nöronlar da fornikse yayılarak en önemli efferent yolu oluştururlar. Aynı zamanda CA3 nöronlar CA1 bölgesine de yayılıp Schaffer kollaterallerini oluştururlar (Stephen 2002). Hipokampusun en kompakt tabakasına sahip olan CA2 alanı hipokampusun supramamillar bölgesinden major bir input kabul eder. Piramidal hücre tabakasının kalınlığının değişken olduğu CA1 alanı hipokampusun en kompleks alanı olarak tanımlanır. CA1 ve CA2 alanları arasındaki sınır keskin değildir ve diğer ucu bazı kısımlarda subikulum ile üst üste biner.



Şekil 2.3 Sıçan beyninin makroskobik görünümü

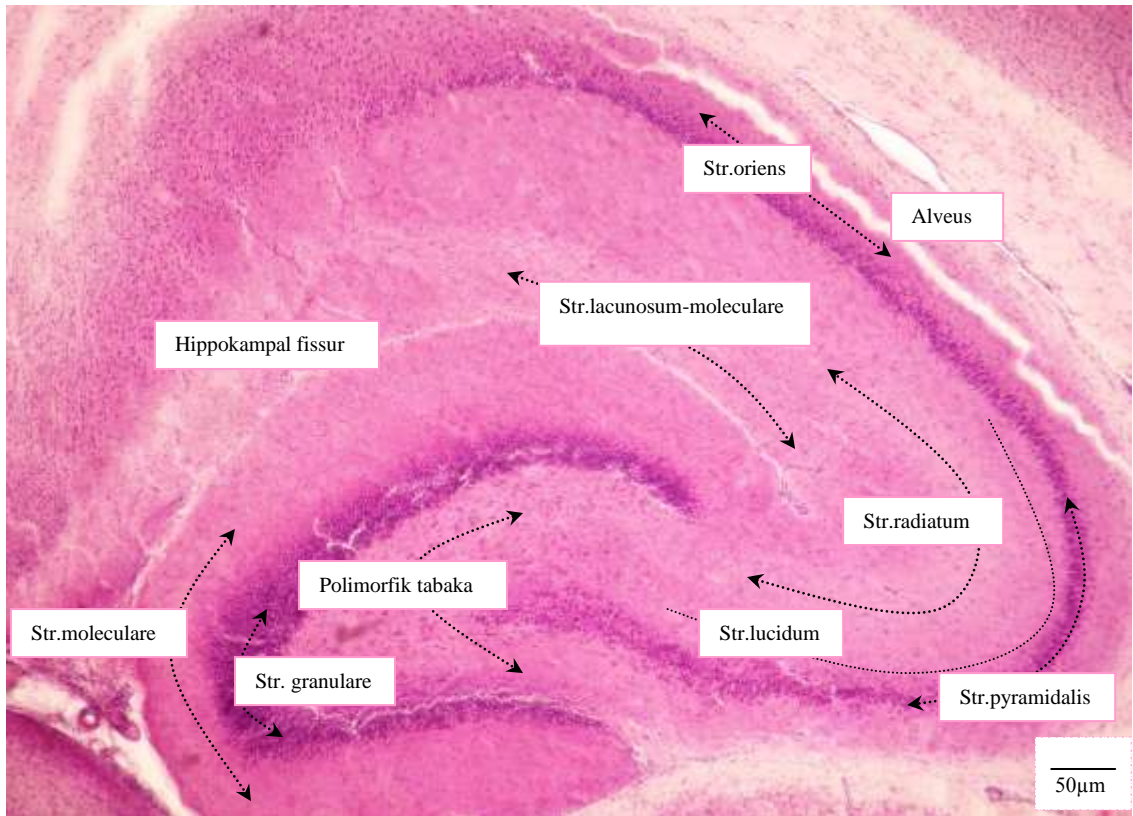
2.5.4.2. Histolojisi

Histolojik olarak; ventriküler yüzeyden başlayarak derine doğru, hipokampusa ait tabakalar şu şekilde sıralanır:

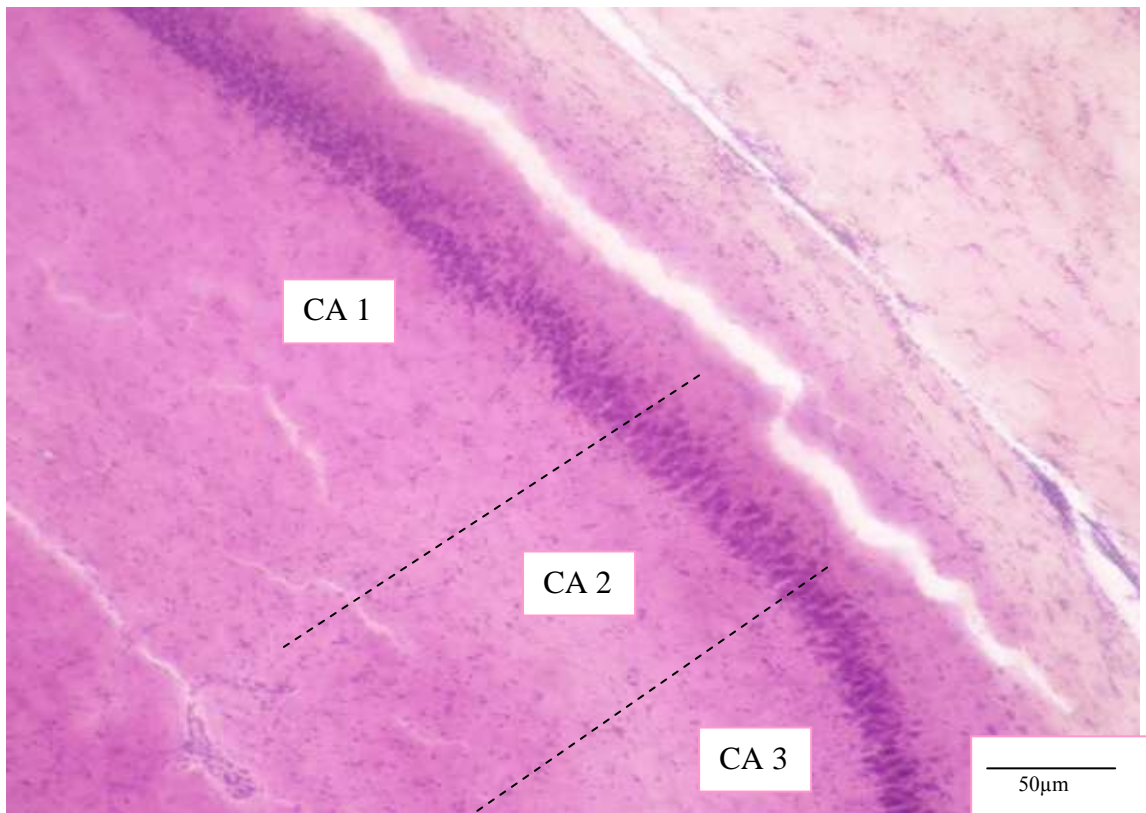
- 1- Alveus: Subikulum ve hipokampusa ait piramidal hücre aksonlarını içeren bir beyaz cevher kitlesidir.
- 2- Stratum oriens: Esas olarak piramidal hücrelerin bazal dendritlerinden ve bazı internöronlardan oluşur. Buradaki çoğu nöron aksonları alveus liflerine katılır. Diğer hücre aksonları ise, en derinde yer alan moleküler tabakaya kadar uzanır (Mayer 1971).
- 3- Stratum pyramidalis: Bu tabakada büyük piramidal hücreler ve basket hücreleri yer alır. Basket hücrelerinin sayısı %1'i geçmez. Hipokampusa asıl şeklini burada bulunan piramidal hücrelerin dizilimi verir. Piramidal hücrelerin tabanı hipokampusun ventriküler yüzeyine dönüktür. Aksonları ise stratum oriens'ten geçerek alveus liflerine katılırlar (Raisman vd 1965). Bazal dendritleri çok kısa olup basket hücreleriyle bağlantı oluşturur. Belirgin olan apikal dendritleri moleküler tabakaya kadar uzanır.
- 4- Stratum lucidum: CA3 alanındaki piramidal hücrelerin proksimal dendritleri ile bağlantı sağlayan yosunsu lifler içerir. Diğer primatlarla karşılaştırıldığında insanlarda belirgin olmayan tabaka CA1 ile CA2 alanlarında bulunmaz (Barry 1995).
- 5- Stratum radiatum
- 6- Stratum lacunosum
- 7- Stratum moleculare

İnce sinir lifleri ve çok az sayıda nöron içeren 6. ve 7. tabakalar bazı kaynaklarda tek bir tabaka olarak kabul edilip stratum lacunosum-moleculare olarak incelenmektedir

(Carpenter vd 1983, Colonnier 1966).



Şekil 2.4. Sıçan hipokampusu histolojik olarak tabakaları (x4'lük büyütme) (H&E)



Şekil 2.5 Sıçan hipokampusu histolojik olarak tabakaları (x10'lük büyütme) (H&E)

2.5.4.3. Embriyolojik gelişimi

Hipokampus, koroid fissür kavsinin dış parçasından gelişir. Hipokampusun gelişimi bölgede yer alan öncü nöronların çoğalması ve göç etmesi ile başlar. Koroid fissür üzerinde bulunan hemisfer duvarı bir yandan kalınlaşırken, diğer yandan ventrikülün medial kenarına doğru bir çıkıntı yapar. Ventrikülün medial kenarına doğru olan bu çıkıntı hipokampusu meydana getirir (Moore vd 1988). Hipokampus fetal hayatın 13. haftasında gelişmeye başlar ve erişkindeki şeklini alması 18-21. haftalarda olur. Lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanan hipokampusun ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır. Hipokampusun bütün ventriküler yüzeyi kendi hücrelerinden gelen aksonların oluşturduğu alveus ile örtülüdür. Alveusu oluşturan bu lifler medialde yassı bir bant şeklinde birbirine yaklaşılarak fimbria hippocampi'yi meydana getirir. Fimbria hippocampi arkada alveus ile birlikte crus fornicis'i oluşturur. İki tarafın crus fornicis'i arasında tarsovers yönde uzanan lifler bulunur. Commissura fornicis denilen bu lifler iki tarafın hipokampusunu bağlar (Nolte 1998).

2.5.4.4. Fizyolojisi

Hipokampus temel limbik sistem bölgeleri serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum ve mamiller cisim ile sayısız dolaylı bağlantılar gösterir. Limbik sistemin önemli bir parçası olan hipokampus; duygulanım, öğrenme ve hafıza fonksiyonları üzerinde önemli role sahiptir. Hipokampus en büyük çıkış yolu olan forniks aracılığıyla ön talamus, hipotalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller gönderir. Hipokampus yeni elde edilen bilgilerin depolanması ve anıların kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçirilmesinde fonksiyon görmektedir. Kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüştürülebilmesi için pekiştirilmesi gerekir. Hipokampus bilginin hafızada pekiştirilmesini sağlar. Hipokampus'u çıkarılmış kişiler, anıları kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe geçirme yeteneklerini kaybederler. Hatta orta süreli bellek depolama fonksiyonları bile kaybolur. Bu kişiler zekanın temelini oluşturacak yeni ve uzun süreli bellekler oluşturamazlar (Guyton vd 2007).

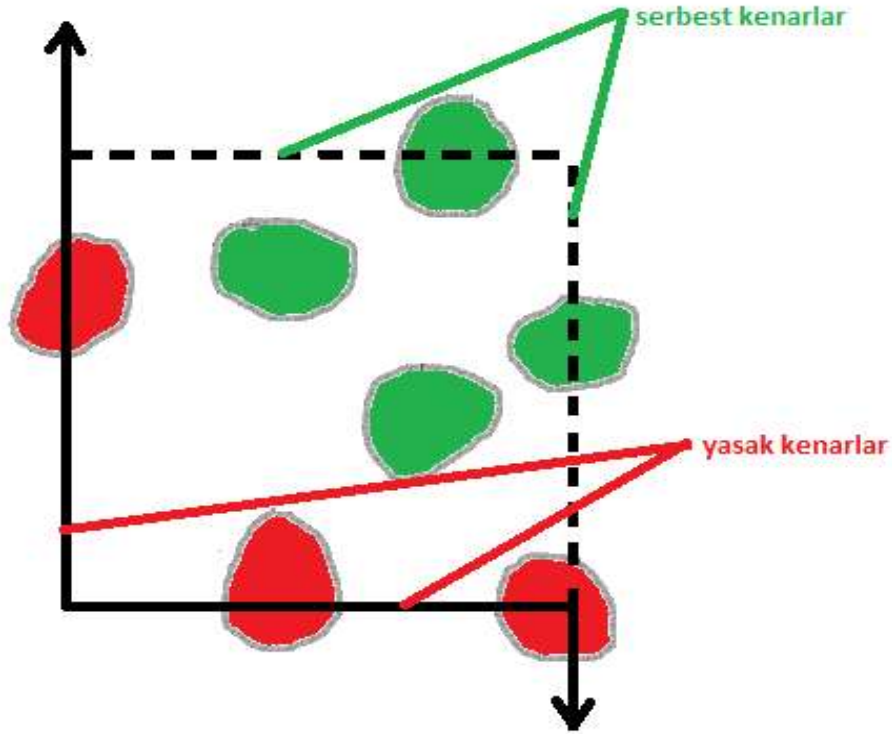
2.6. Stereoloji

Nörobilimciler için oldukça önemli bir bilim dalı olan stereoloji ilk kez 1961 yılında Elias tarafından kullanılmış ve 1984 yılında Sterio tarafından etkin ve tarafsız metodların ortaya çıkışıyla yeni bir anlayış kazanmıştır. İlgilenilen yapıda geometrik özelliklerin sayısal değerlendirilmesiyle ilgilenmektedir. Bu özellikler sayı, uzunluk, yüzey alanı ve hacimdir. Uygun örnek kesitlerinde iki boyutlu ölçümlerden üç boyutlu bilgi sağlamaya izin verir (Evans 2004). Stereoloji, üç boyutlu örneklerin iki boyutlu kesitlerinden elde edilen verilere dayanarak, onların gerçekteki üç boyutlu özellikleri ile ilgili yorumlar yapılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu üç boyutlu kantitatif değerlerin elde edilmesinde uygun geometrik sondalar kullanılmaktadır. Diğer bir deyişle, stereoloji bir objenin geometrik özelliğini belirlemek için yine geometrik özelliği olan sondalardan faydalanır. Bu sondalar nokta, çizgi, düzlem ve hacim sondalarıdır. Nokta sondası ile yapının hacmi, çizgi sondası ile yüzey alanı, düzlem ile uzunluğu ve hacim ile sayı hesaplanabilir (Howard 2005). Stereolojik metodlar tarafsız metodlar olduğundan kurallarına uygun olarak uygulandığında, sistematik hatadan bağımsız sonuçlar elde edilmesini sağlar ve örnekleme sayısı arttırıldığında gerçek değere daha fazla yaklaşılır. Stereolojide “Sistematik Rastgele Örnekleme” (SRÖ) kullanılmaktadır. Bu örnekleme yöntemi ile, yapının her noktası eşit örnekleme şansına sahip olmaktadır. Basit rastgele örneklemeden daha etkili olan bu yöntem ilgilenilen yapının rastgele bir başlangıçtan sonra düzenli aralıklarla örnekleme yapılmasını sağlar (Gundersen vd 1987). Biyolojik yapılar, inceleme konusu olan bileşenlerine göre (hücre, çekirdek, vezikül vb.) çok büyük olduklarından, yapıdan elde edilen tüm kesitlerin çalışmaya dahil edilerek değerlendirilmesi, pratik olarak imkansızdır. Örneğin, insan neokorteksindeki toplam nöron sayısını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, çalışılacak beyinlerden alınacak histolojik kesitleri tek tek incelemek oldukça zordur. Böyle bir durumda alınan kesitlerin arasından belli oranlarda bir seçim yapılması gerekecektir. Bu seçim yapılırken, seçilen kesitlerin, incelenecek yapıyı en iyi biçimde göstermesi için, yapının her bir noktasının eşit örnekleme şansına sahip olması, istatistiksel bir zorunluluktur. SRÖ bu şartı sağlamak üzere ortaya çıkar ve önceden belirlenmiş sabit bir örnekleme aralığı boyunca, ilgilenilen yapının tüm kısımlarının eşit olarak örnekleme yapılmasını sağlar. Önceden belirlenen örnekleme aralığı (örneğin, her onuncu kesiti veya parçayı seçmeye karar verildiğinde ilk on kesitlik seri), yöntemin

sistematik kısmını ortaya koyarken ilk aralık içinde rastgele bir noktadan başlanması (örneğin, ilk on kesit içinden herhangi birinin başlangıç olarak seçilerek, bu kesitten sonra gelen her onuncu kesitin örnek olarak seçilmesi) ise, örneklemenin rastgelelik özelliğini sağlar. İstatistiksel bakış açısıyla, bu tip bir örnekleme, ne kadar çok örnek üzerinde uygulanırsa, yapının her noktasına eşit örnekleme şansı tanıdığı için, homojen ve verimli bir örnekleme elde etme şansı da o kadar artar (Gundersen vd 1987).

2.6.1. Tarafsız Sayım Çerçevesi

Tarafsız sayım çerçevesinin en son hali 1980’li yıllarda Gundersen tarafından getirilmiş ve yapılan hesaplamalarla, kenar etkisini en güvenilir biçimde ortadan kaldırmıştır. Tarafsız sayım çerçevesi kullanılmadan önce tanecik sayısının yanlış hesaplanmasına sebep olan metodlar denenmiştir. Tarafsız sayım çerçevesi, sol ve alt kenarları kalın ve düz, sağ ve üst kenarları ince ve kesikli çizgi ile sembolize edilen dört kenara sahip bir dikdörtgen veya karedir. Temel olarak, ince ve kesikli çizgiler “dahil” kenarlar, kalın ve devamlı çizgiler de “hariç” veya “yasak” kenarlardır. Tarafsız sayım çerçevesi ile sayım yapılırken çerçevenin içinde yer alan ve kesikli çizgilere rastlayan yapılar sayılırken, devamlı çizgilere isabet eden yapılar sayılmazlar (Gundersen vd 1988). Tarafsız sayım çerçevesinin en önemli özelliği, yasak kenarların uzantılarıdır. Bu uzantılar, çerçevenin yerleştirildiği görüntü alanının tamamını kaplayacak şekilde uzantılardır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Şematize tarafsız sayım çerçevesi. Tarafsız sayım çerçevesinde kesik çizgiler serbest kenarlar devamlı çizgi ile gösterilen kenarlar ise yasak kenarlardır. Yeşil ile gösterilen partiküller sayıma dahil edilirken kırmızı ile gösterilen partiküller sayıma dahil edilmezler.

2.6.2. Optik Disektör ve Optik Parçalama

Optik disektör ilk olarak 1986 yılında Gundersen tarafından tarif edilmiştir. Bu yöntemde fiziksel disektör yönteminden farklı olarak tek bir kesitte dikey ekseninde alınan optik kesitlerde tanecik sayımı yapılmaktadır. Optik disektör yönteminde alınacak kesit kalınlığı sayılan en uzun partikülden daha büyük olmalıdır. Kesit kalınlığı genellikle 20 μm ve daha üzeri bir değer alınır (Gundersen 1986). Optik disektör ile partikül sayımı görüntünün ilk netleştiği kesitin üst yüzeyi ile görüntünün kaybolduğu kesitin alt yüzeyi arasında yapılır. Ancak artefaktlardan kurtulmak için üst ve alt güvenlik kuşakları bırakılır ve belirli bir disektör yüksekliğinde sayım yapılır. Optik parçalama yönteminde üç boyutlu sonda optik disektör ve fraksiyonlama ile örnekleme kombine edilmiştir (West vd 1991). Optik parçalama yöntemi stereolojide ilk olarak 1986'da Gundersen tarafından yetişkin memeli beyincığının toplam nöron sayısının

hesaplanmasında kullanılmıştır. Tanecik sayımında, tanecik çapı, yüzey alanı ve hacim hesaplamaları gibi uygulamalarda sıklıkla kullanılan optik parçalama yöntemi uygulama kolaylığı sebebiyle, en sık kullanılan tarafsız stereolojik metodlardan biridir. Parçalama yöntemi, disektör sayım yöntemi ile sistematik rastgele örnekleme planının bir bileşkesidir. İlgili yapıdan belirli bir fraksiyonda yapılan örneklemin sonucunda optik disektör ile sayım yapılır. Optik parçalama kullanılarak yapılan hesaplamalar dokudaki şekil değişikliklerinden, fiksasyon, takip, gömme, kesit alma, boyama gibi uygulanan işlemlerle oluşabilecek büzüşme ve şişme gibi etkilerden etkilenmezler. Bu nedenle frozen, vibratom ve parafin kesitlere uygulanabilmektedir (Howard 2005). Parçalama yönteminin fiziksel ve optik olarak iki değişik türevi bulunmakla beraber, uygulanmalarının temelinde yatan mantık aynıdır. Parçalama yöntemi, bilinen en güçlü toplam tanecik sayısı hesaplama yöntemidir ve elde edilen toplam sayı, o organ veya yapıdaki toplam tanecik sayısının tarafsız bir hesabıdır (Canan vd 2002). Optik parçalama yöntemi, belli adım aralıklarıyla (x ve y) doku kesiti üzerinde ilerleyerek, her adımda belli bir alanın, üç boyutlu optik disektörlerle taranması ile gerçekleştirilir. Optik disektör (veya üç boyutlu sayım kutusu) doku kalınlığı içerisinde belli bir kalınlığın, optik olarak taranması ile elde edilir. Sayım çerçevesinin yasak kenarlarına değen partiküller sayım dışı bırakılırken, diğer kenarları tarafından oluşturulan yüzeylere değen veya tamamen içinde kalan partiküller sayıma dahil edilir. Disektör sondasını oluşturan sayım çerçevesinin veya sayım alanının, x ve y adımlarından oluşan adım alanlarına bölünmesi ile, o sonda tarafından örneklenen alan oranı bulunur. Optik disektör, kesit yüzeyi artefaktlarından korunmak amacıyla, kesitin alt ve üst yüzeylerinden belli bir mesafe uzakta olacak şekilde ayarlanmalıdır. Bu mesafelere alt ve üst güvenlik kuşakları denir. Güvenlik kuşakları arasında kalan disektör yüksekliği boyunca sayım yapılır. Alt ve üst güvenlik kuşakları içerisinde görüntüye giren nukleuslar sayıma dahil edilmezler.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma için gerekli olan hayvanlar etik kurul onayı alınarak Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlandı. Bu deneyde 200-250gr ağırlığında 3 aylık 24 adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele seçilerek kontrol grubu (K grubu), sham grubu (S grubu) ve deney grubu (D) olmak üzere üç eşit gruba ayrıldı. Sıçanlar boyutları 30x35x17 cm, altı plastik üstü tel olan özel kafeslere dağıtılarak yerleştirildi. Sıçanların tamamı çalışma sürecinde oda ısısında (22 ± 2 °C), $\%50\pm 5$ nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan laboratuvar koşullarında takip edildi ve aynı cins yem ile beslendi.

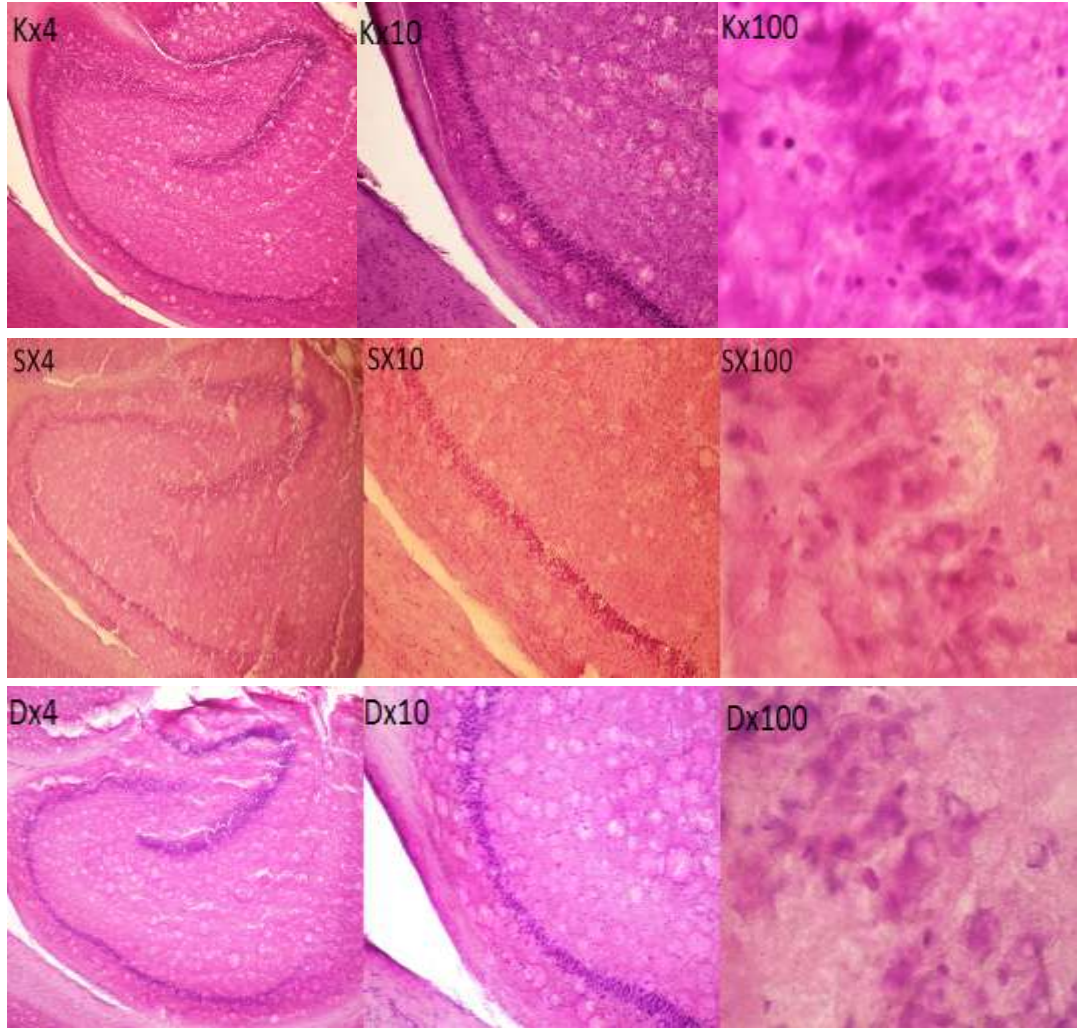
3.2. Sıçanlara Alüminyum Verilişi

Deney grubundaki sıçanlara $\%0.9$ NaCl'de çözülmüş olan alüminyum sülfat 2 hafta süre ile deney grubundaki 8 sıçana günlük 3mg/ml intraperitoneal olarak verildi. Sham grubuna aynı periyod ve aynı hacimde alüminyum sülfatın çözücüsü olan $\%0.9$ NaCl intraperitoneal olarak verildi. Kontrol grubuna herhangi bir madde enjekte edilmedi.

3.3. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması

İki haftalık alüminyum sülfat ve serum fizyolojik enjeksiyonları tamamlandıktan sonraki gün sıçanlar 30mg/kg ketamine hidroklorid ve 6mg/kg $\%2$ 'lik ksilazin hidroklorid kombinasyonun intraperitoneal (ip) olarak uygulanmasıyla genel anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildiler. Dekapitasyon işleminden sonra en kısa zamanda beyin dokuları çıkartıldı. Beynin sol hemisferi stereolojik olarak toplam nöron sayısının hesaplanması için kullanıldı. Beynin sol hemisferi frozen jel damlatılmış olan taşıma tablasına alındı ve -15°C 'de hazır bulunan kriyostat cihazına konuldu. Her üç gruptan sağlanan sıçan beyinlerinin sol hemisferlerinden horizontal

olarak 150 µm kalınlıkta ve sistematik rastgele örnekleme yöntemine uygun olarak kesitler alındı. 1/2 aralıklı kesitler alınması için ilk kesitten itibaren bir kesit atılıp 2. kesit alındı ve bu işlem beyin dokusunun sonuna kadar devam ettirildi. Her sıçandan sistematik rastgele yöntemine uygun olarak yaklaşık 16-18 kesit alındı. Her alınan kesitin grubu ve kesit sayısı lam üzerine yazıldı ve daha sonra boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama işlemi için şu sıra izlendi: Hazırlanan preparatlar hızlı bir şekilde % 100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinde toplam 10 dakika tutuldu. Alkol serilerinden geçen kesitler suda yıkandıktan sonra Hematoksilen'de 3-5 dakika bekletildi. Bu aşamadan sonra kesitler yıkandı ve asit- alkol solüsyonuna batırılıp çıkartıldı. Suda yıkama basamağının tekrarından sonra kesitler amonyak solüsyonuna daldırılıp çıkartıldı ve yıkandı. Eozin solüsyonunda kesitler 10 saniye bekletilip yıkandıktan sonra boyama işleminin başında gerçekleştirilen düşen alkol serilerinin tersi işleme %70, %80, %90, %100 yükselen alkol serilerinde toplam 10 dakika tutulup yıkama yapmadan kurutulduktan sonra 10 dakika ksilen içinde bekletildi. Boyama işlemi sona eren kesitler kuruduktan sonra üzerlerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.1 Kontrol, sham ve deney grubundaki sıçanların sol hipokampus kesitlerinin x4, x10 ve x100 objektif büyütmelerindeki görüntüleri (H&E).

3.4.Optik Parçalama Yöntemi Kullanarak Toplam Nöron Sayılarının Hesaplanması

Optik parçalama yöntemi ile her üç grubun sol hipokampus stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayısını hesaplayabilmek için çeşitli parametreler kullanıldı.

3.4.1. Kesit Örnekleme Oranı

Hipokampus toplam nöron sayısını hesaplamada kullanılan parametrelerden biri olan kesit örnekleme oranı (KeÖO) her sıçandan alınan sol hemisfer beyin dokusunda kesit alınırken ilk kesit atılıp 2.kesit alındığından ve bu sistemle beyin dokusu bitene kadar kesit almaya devam edildiğinden $\frac{1}{2}$ olarak belirlendi.

3.4.2. Alan Örnekleme Oranı

Hesaplamada kullanılan alan örnekleme oranı (AÖO) tarafsız sayım çerçevesi alanının x, y adımlama alanına oranlanmasıyla belirlenir (West vd 1990). Sistematik rastgele örnekleme için uygun olarak alınan beyin kesitlerinde ilgilenilen alan olan hipokampus mikroskopta belli aralıklarla x ve y eksenleri boyunca taranır. Böylece x, y adımlama alanı tanımlanmış olur. Bu çalışmada x, y adımlama alanını belirlemek için Adıgüzel ve arkadaşlarının Thoma lamı kalibrasyon yöntemi kullanıldı (Adıgüzel vd 2003). Thoma lamının bir küçük karesinin kenar uzunluğu $50\mu\text{m}$ 'dir. $x4$ 'lük büyütme kullanılarak thoma lamının $50\mu\text{m}$ 'ye karşılık gelen karesi $1,4\text{cm}$ olarak ölçüldü. $x100$ 'lük büyütme kullanılarak bir kenarı $10\mu\text{m}$ olan bir kenar uzunluğu 7cm olan tarafsız sayım çerçevesi çizildi. Tarafsız sayım çerçevesinin her bir kenarı eşit olup $10\mu\text{m}$ uzunlukta olduğundan kullandığımız tarafsız sayım çerçevesinin alanı $100\mu\text{m}^2$ olarak hesaplandı. Üzerine tarafsız sayım çerçevesinin çizili olduğu $50\mu\text{m}$ 'lik karelere ayrılmış olan asetat monitör üzerine yapıştırıldı ve mikroskop görüntüsü video kamera yardımı ile ekrana yansıtıldı. Kesitler mikroskoba yerleştirilip beyinin hipokampus bölümü belirlendi. $x4$ 'lük objektif kullanılarak x ve y ekseninde $50\mu\text{m}$ aralıklarla 10 adımlama yapıldı. Buna göre adımlama alanı $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} \times 10 = 25000\mu\text{m}^2$ olarak hesaplandı. Tarafsız sayım çerçevesi alanın x,y adımlama alanına oranlanmasıyla AÖO

$100\mu\text{m}^2 / 25000\mu\text{m}^2 = 1/250$ olarak hesaplandı. Tarafsız sayım çerçevesinin sol ve alt kenarları yasak kenarlar olup yapılan çizimde bu kenarlar düz çizgi ile belirtilirken serbest olan sağ ve üst kenarlar serbest kenarlar olup kesikli çizgilerle gösterildi. Tarafsız sayım çerçevesinin yasak kenarlarına isabet eden yapılar sayılmazken serbest kenar ve çerçevenin içine düşen yapılar toplam nöron sayısının belirlemek için sayıldı.

3.4.3. Kesit Kalınlığının Ölçülmesi ve Kalınlık Örnekleme Oranının (KaÖO) Hesaplanması

Çalışmada kesit kalınlığının ölçülmesi için mikrokator kullanıldı. İlk netleşen görüntü ile son netleşen görüntü arasında kalan mesafe mikrokatörden okunarak kesit kalınlığı belirlendi. Tüm kesitlerin kesit kalınlıkları belirlendikten sonra her grupta yer alan her bir sıçan için ortalama kesit kalınlığı (tort) belirlendi. Disektör yüksekliğinin ortalama kesit kalınlığına bölünmesi ile her sıçan için KaÖO hesaplandı.

3.4.4. Nöronların Sayılması

Nöron sayımı için mikroskop (Olympus BX 51), video kamera (Vitec VCC-3277) ve monitör (LG Flatron W194SE) kullanıldı (Şekil 8). Alınan kesitlerde öncelikle mikroskopun x4'lük büyütmesi ile hipokampus belirlendi. Belirlenen x, y adımlama alanında belirlediğimiz herhangi bir alanın monitör görüntüsü tarafsız sayım çerçevesinin içine yerleştirilip görüntü x100'lük büyütmeye getirildi. Kesit kalınlığı ölçüldükten ve belirlenen 10 μm güvenlik kuşağı bırakıldıktan sonra disektör yüksekliği boyunca ilerlenerek tarafsız sayım çerçevesi kurallarına uygun olarak çerçevenin içine ve serbest kenarlara değen nukleuslar sayıldı. Belirlediğimiz alt ve üst güvenlik kuşağında karşılaştığımız nukleuslar sayıma dahil edilmedi. Her sıçan grubu için toplam nöron sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$N(\text{toplam}) = (\sum Q) \times (1/K_e\ddot{O}O) \times (1/A\ddot{O}O) \times (1/K_a\ddot{O}O) \text{ (West vd 1991).}$$



Şekil 3.2 Nöron sayımı için kullanılan gereçler

3.5. Hata Katsayısının Hesaplanması

Yapılan stereolojik çalışmada hata katsayısının hesaplanması için her gruptan elde edilen kesitlerdeki disektör partikül sayıları (Q^-) kullanıldı. Hata katsayısının hesabında kullanılan parametrelere örnek olması açısından alüminyum sülfat verilen sıçanlardan biri üzerinden hata katsayısının hesaplanması ve formüle edilişi Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Hata katsayısının hesaplanması

Kesit	Q^-	$Q^- \times Q^-$	$Q^- \times (Q^- + 1)$	$Q^- \times (Q^- + 2)$
1	17	289	272	238
2	16	256	224	192
3	14	196	168	126
4	12	144	108	96
5	9	81	72	63
6	8	64	56	72
7	7	49	63	77
8	9	81	99	81
	11	121	99	132
10	9	81	108	99
11	12	144	132	108
12	11	121	99	99
13	9	81	81	72
14	9	81	72	72
15	8	64	64	-
16	8	64	-	-
	$\sum Q^- = 169$	1917	1717	1437

Q^- : Kesite ait disektör partikül sayısı, $\sum Q^-$: Toplam disektör partikül sayısı, $Q^- + 1$: Bir sonraki kesite ait disektör partikül sayısı, $Q^- + 2$: İki sonraki kesite ait disektör partikül sayısı, HK: Hata katsayısı

$$\text{Hata Katsayısı} = \sqrt{[(3A+C-4B/12) / \sum Q^-]}$$

Bu formüle göre deney-1 no'lu sıçanın hata katsayısı 0,0088 olarak hesaplanmıştır. Hata katsayısının %10'un altında çıkması çalışmanın örnekleme planının yeterli ve çalışmanın güvenilir olduğunun bir göstergesidir (West vd 1993).

3.5. TUNEL Yöntemi Uygulanması

TUNEL yöntem ile apoptozun belirlenmesi için kontrol, sham ve deney grubundaki sıçanların sağ hemisferi kullanıldı. %10 formaldehit ile fikse edilen beyin dokuları öncelikle doku takibinden geçirildi. Doku takibi için kasetlere alınan dokular düşük alkol seviyesinden yükseğe doğru ve her alkol aşamasında 1 saat kalmak koşulu ile 60 °C'ye ayarlı olan etüvde bekletildi. Alkol aşamasında sonra toplamda 2 saat olmak üzere iki aşamalı olarak ksilende ve toplamda 2 saat olmak üzere iki aşamalı olarak parafinde bekletildi. Son olarak beyin dokuları parafin bloklara gömüldü. Her gruptan 5µm kalınlıktaki kesitler pozitif yüklü lama alındı. Apoptoz için In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche) kullanıldı. Bu yöntem üç basamaktan oluşmaktadır: Dokuların deparafinizasyonu, etiketleme ve sinyal dönüşümü. Alınan kesitler öncelikle 60°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından kesitler ksilen ve düşük alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra metanol ile hazırlanan %3'lük H₂O₂'de 5 dk bekletildi. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra taze olarak hazırlanan %0,1 trisodyum sitrat içinde %0,1 Triton X- 100 ile preparatlar 8 dk inkübe edildi. Kesitler PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra ikinci basamak olan etiketleme basamağına geçildi. Etiketleme için reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı için 450µl işaretleme solusyonuna 50µl enzim solusyonu konularak bileşenlerin iyice karışması için hafifçe karıştırıldı. Bu karışımdan her örneğe 50µl ve negatif kontrol için enzim solüsyonu koymadığımız işaretleme solüsyonundan 50µl preparatlara homojen bir şekilde dağıtıldı. Preparatlar 37 °C'de karanlık ve nemli ortamda 1 saat inkübe edildi. Preparatlar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra iyice kurutuldu. Son basamak olan sinyal dönüşümüne geçildi. Bu basamakta her preparata 50µl anti- flourescein antikor ile konjuge POD enzimi homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra preparatlar 30 dk nemli ortamda 37 °C'de inkübe edildi. Yıkama ve kurutma işlemi tekrarlandıktan sonra DAB substrat her preparata 50µl homojen bir şekilde damlatıldı ve 10 dk 15-25 °C'de inkübasyon basamağı tekrarlandı. Son olarak 3 kez PBS ile yıkandı. Zıt boyama için preparatlar %1'lik metilgreen içerisinde 10 dk bekletildi. Distile su ile yıkadıktan sonra üzerlerine entellan damlatılıp lamel kapatılarak ışık mikroskobunda değerlendirme yapıldı.

3.6. İstatiksel Analiz

Sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki nöron sayılarının karşılaştırılmasında değerler ortalama nöron sayıları \pm standart hata olarak verildi. İstatiksel analiz için Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Sıçanların apoptotik indekslerinin karşılaştırılmasında değerler ortalama apoptotik indeks \pm standart hata olarak verildi. İstatiksel analiz için Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Nöron Sayım Bulguları

Kontrol, sham ve deney gruplarındaki sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayısını hesaplamak için toplam disektör partikül sayısı (ΣQ), $1/Ke\ddot{O}O$, $1/A\ddot{O}O$, $1/Ka\ddot{O}O$, $tort$, h , parametrelerinden faydalanıldı.

Kontrol grubundaki sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayısı Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda bulunan 8 sıçanın sol hipokampus toplam nöron sayıları en yüksek 288.106 en düşük 231.075 olarak hesaplandı.

Tablo 4.1 Kontrol grubu sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayıları ve hesaplamada kullanılan parametreler

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
Q-	252	237	282	277	241	296	268	270
$1/Ke\ddot{O}O$	2	2	2	2	2	2	2	2
$1/A\ddot{O}O$	250	250	250	250	250	250	250	250
$1/Ka\ddot{O}O$	1,87	1,95	1,91	1,95	1,98	1,94	1,86	2,01
Tort	56,2	58,5	57,3	58,7	59,6	58,4	55,8	60,3
H	30	30	30	30	30	30	30	30
HK	0,097	0,0106	0,0099	0,0099	0,0112	0,0102	0,0112	0,0095
N	236040	231075	269310	270998	239393	288106	249240	271350

Q: Disektör partikül sayısı, $1/Ke\ddot{O}O$: 1/Kesit örnekleme oranı, $1/A\ddot{O}O$: 1/Alan örnekleme oranı, $1/Ka\ddot{O}O$: 1/Kalınlık örnekleme oranı, $tort(\mu m)$: Ortalama kesit kalınlığı, $h(\mu m)$: Disektör yüksekliği, HK: Hata katsayısı, N(toplam): Toplam nöron sayısı

Sham grubundaki sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Sham grubunu oluşturan 8 sıçanın sol hipokampus toplam nöron sayıları hesaplandığında en yüksek 255.420 en düşük 205.530 olarak hesaplandı.

Tablo 4.2 Sham grubu sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayıları ve hesaplamada kullanılan parametreler.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Q-	273	226	258	246	242	231	261	221
1/KeÖO	2	2	2	2	2	2	2	2
1/AÖO	250	250	250	250	250	250	250	250
1/KaÖO	1,78	1,87	1,98	1,91	1,95	1,89	1,93	1,86
Tort	53,5	56,2	59,4	57,3	58,6	56,9	58,1	55,8
H	30	30	30	30	30	30	30	30
HK	0,0117	0,0129	0,0105	0,0079	0,0100	0,0101	0,0115	0,0099
N	243424	211686	255420	234930	236353	219064	252734	205530

Q-: Disektör partikül sayısı, 1/KeÖO: 1/Kesit örnekleme oranı, 1/AÖO: 1/Alan örnekleme oranı, 1/KaÖO: 1/Kalınlık örnekleme oranı, tort(μm): Ortalama kesit kalınlığı, h(μm): Disektör yüksekliği, HK: Hata katsayısı, N(toplam): Toplam nöron sayısı

Deney grubundaki 8 sıçanın sol hipokampus stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayısı Tablo 4.3’de gösterilmiştir. Bu 8 sıçanın sol hipokampus toplam nöron sayıları en yüksek 198.103 en düşük 157.170 olarak hesaplandı.

Tablo 4.3 Deney grubu sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayıları ve hesaplamada kullanılan parametreler

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
Q-	169	191	203	179	174	200	187	186
1/KeÖO	2	2	2	2	2	2	2	2
1/AÖO	250	250	250	250	250	250	250	250
1/KaÖO	1,86	1,97	1,89	1,93	1,91	1,82	1,94	1,92
Tort	55,8	59,1	56,9	57,9	57,5	54,7	58,2	57,7
H	30	30	30	30	30	30	30	30
HK	0,0088	0,0126	0,0114	0,095	0,0117	0,0103	0,0113	0,0145
N	157170	188135	192511	172735	166750	182333	181390	198103

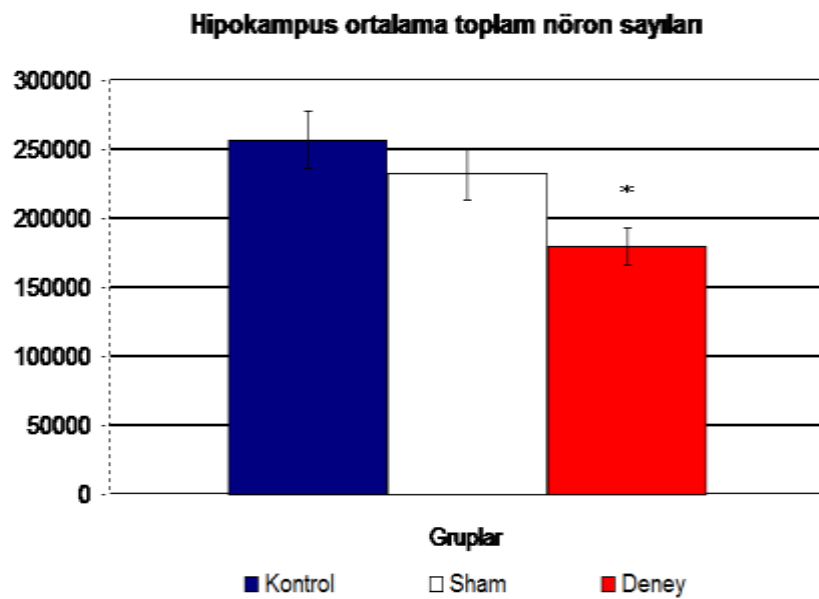
Q: Disektör partikül sayısı, 1/KeÖO: 1/Kesit örnekleme oranı, 1/AÖO: 1/Alan örnekleme oranı, 1/KaÖO: 1/Kalınlık örnekleme oranı, tort(μm): Ortalama kesit kalınlığı, h(μm): Disektör yüksekliği, HK: Hata katsayısı, N(toplam): Toplam nöron sayısı

Kontrol grubu sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakalarındaki ortalama nöron sayısı $256\ 939 \pm 20\ 710,96$ sham grubu sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakalarındaki ortalama nöron sayısı $232\ 392 \pm 18\ 577,49$ deney grubu sıçanların stratum pyramidale tabakalarındaki ortalama nöron sayısı $179\ 890 \pm 13\ 665,67$ olarak hesaplandı (Tablo 4.4). Üç grubun sol hipokampus ortalama nöron sayıları şekil 4.1’de gösterilmiştir. Deney, kontrol ve sham grubu hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki nöronların ortalama sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu. Bu farklılığının deney grubundan kaynaklandığı, deney grubu sol hipokampus ortalama nöron sayılarının kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı derecede azaldığı bulundu ($p= 0,006$). Kontrol ve sham grubu arasında istatistiksel olarak

anlamli bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). İstatiksel analiz için Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.

Tablo 4.4 Kontrol, sham ve deney grubundaki sıçanların sol hipokampus ortalama nöron sayıları

GRUPLAR	ORTALAMA NÖRON SAYILARI \pm STANDART HATA
Kontrol	256 939 \pm 20 710,96
Sham	232 392 \pm 18 577,49
Deney	179 890 \pm 13 665,67



Şekil 4.1 Kontrol, sham ve deney grubu sol hipokampus ortalama nöron sayıları \pm standart hata (bar).* $p < 0,05$; kontrol ve sham grubuna karşı deney grubu. Her grup için $n = 8$.

4.2. TUNEL Yöntem Bulguları

Kontrol, sham ve deney grubunda apoptotik indeks oranının belirlenmesi için her grup için 5 sıçandan alınan sağ hipokampus kesitleri TUNEL yöntemi ile boyandı. Her sıçan için 10 farklı alanda apoptotik hücre sayısı belirlendi. Apoptotik indeks her alanda bulunan apoptotik hücrenin alandaki toplam hücre sayısına bölünmesiyle elde edildi. Apoptotik indeks % olarak hesaplanan bir parametre olduğu için alandaki toplam hücre sayısı yüze oranlanarak alandaki apoptotik hücre sayısına ulaşıldı. Her gruptaki sıçan için sayılan alandaki toplam hücre sayısı ve her alandaki apoptotik hücre sayısı tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4.5 Kontrol grubundan 5 sıçanın sağ hipokampus kesitlerinde 10 farklı alanda belirlenen toplam hücre sayısı/apoptotik hücre sayısı

GRUP ALAN	Kontrol 1	Kontrol 2	Kontrol 3	Kontrol 4	Kontrol 5
1	31/1	33/0	37/1	27/2	29/0
2	35/1	28/1	28/0	23/5	32/2
3	27/1	26/4	35/1	23/1	28/0
4	33/2	24/1	36/4	18/3	21/1
5	27/2	27/3	28/2	31/3	23/3
6	35/3	31/0	27/1	33/2	28/3
7	28/2	28/0	33/3	28/1	34/4
8	29/0	28/2	39/2	19/0	28/2
9	28/1	25/0	23/1	26/1	22/3
10	34/0	24/1	30/2	24/1	31/2

Tablo 4.6 Sham grubundan 5 sıçanın sağ hipokampus kesitlerinde 10 farklı alanda belirlenen toplam hücre sayısı/apoptotik hücre sayısı

GRUP ALAN	Sham 1	Sham 2	Sham 3	Sham 4	Sham 5
1	23/2	24/4	26/3	33/2	31/4
2	31/2	31/5	37/2	27/4	26/3
3	24/4	23/2	27/3	31/0	30/0
4	31/3	30/0	24/1	30/2	29/3
5	28/2	22/3	25/0	24/3	27/2
6	30/0	26/1	36/3	22/0	26/5
7	25/2	19/2	28/0	25/3	25/0
8	20/3	24/3	21/2	19/2	39/3
9	19/0	33/1	24/2	23/4	27/3
10	21/1	20/2	26/1	23/2	22/0

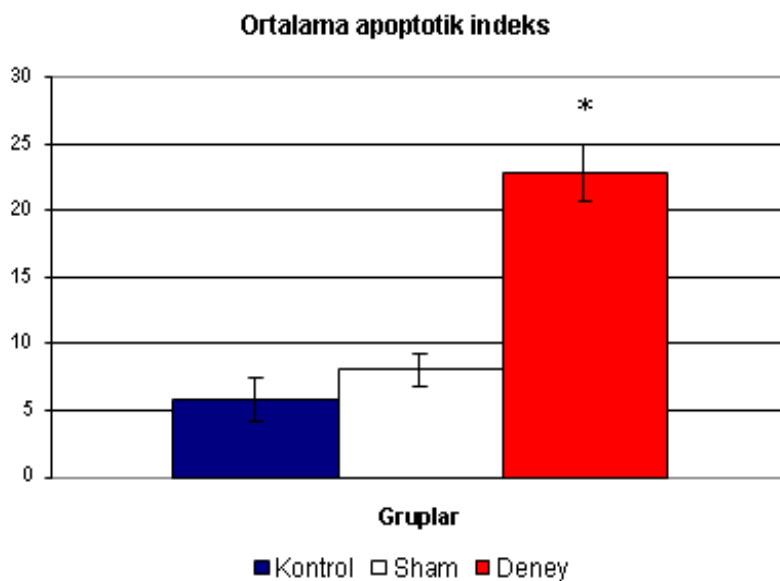
Tablo 4.7 Deney grubundan 5 sıçanın sağ hipokampus kesitlerinde 10 farklı alanda belirlenen toplam hücre sayısı/apoptotik hücre sayısı

GRUP ALAN	Deney 1	Deney 2	Deney 3	Deney 4	Deney 5
1	21/4	18/6	29/6	28/3	25/7
2	37/6	19/5	19/6	32/4	19/4
3	33/5	22/4	25/6	23/7	31/8
4	31/7	26/5	17/7	34/5	26/6
5	23/6	30/6	20/4	30/8	27/7
6	18/5	25/7	35/7	18/6	18/4
7	20/4	27/5	19/6	22/3	32/6
8	26/6	31/2	23/4	19/5	30/5
9	18/4	23/5	25/8	28/6	28/6
10	27/5	17/4	24/6	20/4	17/5

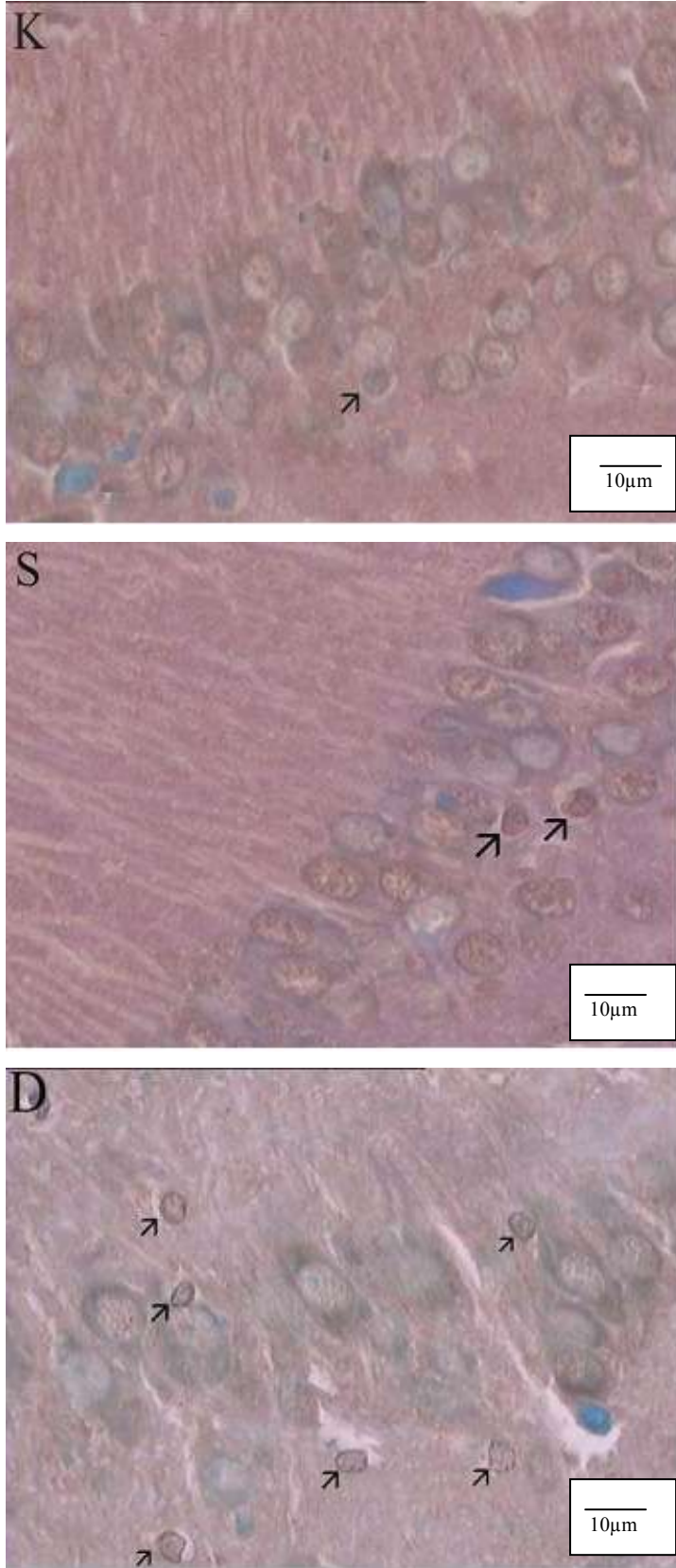
Kontrol grubunun ortalama apoptotik indeksi $5,840 \pm 1,619$, sham grubunun apoptotik indeksi $8,050 \pm 1,252$ ve deney grubunun ortalama apoptotik indeksi $22,748 \pm 2,176$ olarak hesaplandı (Tablo 4.8). Üç grubun ortalama apoptotik indeksleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Kontrol, sham ve deney gruplarının ortalama apoptotik indekslerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulundu. Bu farkın deney grubundan kaynaklandığı, deney grubunun ortalama apoptotik indeksinin kontrol ve sham grubu apoptotik indeksinden anlamlı derecede daha fazla olduğu bulundu ($p=0,0001$). Kontrol ve sham grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). İstatistiksel analiz için Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.

Tablo 4.8 Kontrol, sham ve deney grubu sıçanların ortalama apoptotik indeksi (%)

GRUPLAR	APOPTOTİK İNDEKS \pm STANDART HATA
Kontrol	% 5,840 \pm 1,619
Sham	%8,050 \pm 1,252
Deney	%22,748 \pm 2,176



Şekil 4.2 Kontrol, sham ve deney grubu ortalama apoptotik indeksleri \pm standart hata (bar). * $p < 0,05$; kontrol ve sham grubuna karşı deney grubu. Her grup için $n = 5$



Şekil 4.3 Kontrol, sham ve deney grubu sağ hipokampus TUNEL ile boyanmış apoptotik hücreleri (x40 objektif büyütme). Apoptotik hücreler ok ile gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Doğada oldukça yüksek oranlarda bulunan Al'un bilinen bir fizyolojik rolü olmayıp insanlar için oldukça toksik olan esansiyel bir elementtir. Aluminyumun uzun yıllar boyunca insan sağlığı için zararsız bir element olduğu düşünülüyordu. Ancak yapılan birçok çalışmada aluminyumun toksisitesi tespit edilmiş ve birçok nörodejeneratif hastalıkta vurgulanmıştır. Çeşitli çalışmalarda Al ile indüklenmiş nöronal hücre ölümünün altında yatan mekanizmalarda oksidatif stres, intrasellüler depolardan Ca^{2+} 'un salınışı ve mitokondrial fonksiyonlarda bozulmalar gösterilmiştir (Johnson vd 2005, Savory vd 2003).

Çalışmada aluminyum sülfat verilen sıçanların sol hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayısı stereolojik bir yöntem olan optik parçalama yöntemi ile sayıldı. Yapılan sayım ve hesaplamalar sonucu deney grubunun sol hipokampus ortalama nöron sayısında kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma bulundu. Kontrol, sham ve deney grubundaki sıçanların sağ hipokampusundaki apoptotik hücreler TUNEL yöntemi ile belirlendi. Bu üç grubun apoptotik indeksleri karşılaştırıldığında aluminyum sülfat verilen deney grubunda apoptotik indeksin kontrol ve sham grubuna göre daha yüksek olduğu bulundu.

Stereoloji, üç boyutlu bir cismin hacim, yüzey alanı, sayı, uzunluk gibi geometrik özellikleri hakkında sayısal verileri iki boyutlu kesit düzlemlerini kullanarak elde etmeye çalışan bir yöntemdir. Optik parçalama yöntemi nöron sayısının değerlendirildiği çalışmalarda etkinliği ve tarafsızlığı nedeniyle oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Optik parçalama yöntemi, disektör sayım yöntemi ile sistematik rastgele örnekleme planının bir bileşkesidir. Optik parçalama kullanılarak yapılan hesaplamalar dokudaki şekil değişikliklerinden, fiksasyon, takip, gömme, kesit alma, boyama gibi uygulanan işlemlerle oluşabilecek büzüşme ve şişme gibi etkilerden etkilenmezler. Bu nedenle frozen ve parafin kesitlere uygulanabilmektedir. Optik parçalama yöntemi, bilinen en güçlü toplam tanecik sayısı hesaplama yöntemidir ve elde edilen toplam sayı, o organ veya yapıdaki toplam tanecik sayısının tarafsız bir hesabıdır.

Varner ve arkadaşları 1988'de içme suyu ile aluminyum girişinin sıçanların

nöronlarında farklı morfolojik değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmalarında nöronal yoğunluğun azaldığını, piknozis, vakuolizasyon ve kromatin kondensasyonu gibi dejeneratif değişikliklerin oluştuğunu göstermişlerdir (Varner vd 1998).

Savory ve arkadaşları 1991'de alüminyumun intraserebral girişinin nörofibriller yumakların oluşumunu arttırdığını göstermişlerdir (Savory 1991).

Hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıdır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir. Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar verir. Organizmalar serbest radikallerin üstesinde gelmede hem enzimatik hem de enzimatik olmayan savunma mekanizmalarına sahiptir. Enzimatik parametreler SOD, KAT, GPx enzimlerini içerir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna (O_2^-) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan SOD aracılığıyla H_2O_2 ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Hücre içinde reaktif oksijen ürünlerinin üretimi ile bunları ortadan kaldıracak antioksidan sistemlerin arasındaki dengenin bozulması, oksidatif stresin gelişimine neden olmaktadır (Sinclair vd 1990).

Beyin hücre komponentlerine oksidatif hasar alüminyum aracılı nörotoksisitede önemli mekanizmalardan biri olabilir. Alüminyum farklı nöronal alanlarda oksidatif stresi artırır ve bir pro-oksidant olarak davranır (Esparza vd 2003).

Al'un birçok çalışmada oksidatif strese neden olduğu ve özellikle hipokampus ve frontal kortekste çoklu doymuş yağ asitlerinin fazlalığı nedeniyle oksidatif stresin bir türü olan lipid peroksidasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Nedzvetsky vd 2006). Alüminyum laktata maruz kalan ratlarda lipid peroksidasyon ürünlerinin konsantrasyonunda artış gözlenmiştir (Ogasawara vd 2003). Sharma ve arkadaşları 2007 yılında 10 hafta süre ile günlük 172.5 mg/kg alüminyum kloridi oral olarak alan sıçanlarda SOD, GPx ve KAT gibi antioksidan enzim düzeylerinde azalma ve lipid peroksidasyon oranında nemli artış bulmuşlardır (Sharma vd 2007).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından uyarılan membranlarda çoklu

doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunda rol oynayan bir zincir reaksiyonudur ve oksidatif hücre hasarının bir göstergesidir. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarının son ürünlerinden biri malondialdehit (MDA)'dır ve bu ürün serbest radikal hasarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipid peroksitleri, hidroperoksitleri ve aldehidleri membran yapısına direkt olarak, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek indirekt olarak zarar verir. Bu da pek çok hastalığın ve doku hasarının oluşmasına neden olur.

Al vücutta oksijen serbest radikallerin yıkımında major rol oynayan süperoksit dismutaz ve diğer enzimler peroksidaz ve katalaz aktivitesini etkiler (Serra vd 1991). Julla ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Aluminyum laktat ile 4 hafta muamele gören sıçanların beyinde lipid peroksidasyonunda artış ve antioksidan enzimlerde önemli azalma bulunmuştur (Julla vd 1996). Aluminyum fosfid ile muamele gören sıçanların beyin ve beyinciğinde antioksidan enzimlerde önemli bir azalma ve lipid peroksidasyonunda önemli bir artış gözlenmiştir (Dua vd 2001). Aluminyum kloridi 3 ay boyunca içme suyu ile alan tavşanlarda Al' un lipid peroksidasyon ürünlerinde artışa ve SOD enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Abd-Elghaffar vd 2005). Başka bir çalışmada 10 gün boyunca Aluminyum klorid ile intraperitoneal olarak muamele gören sıçanlarda Al'un hipokampusta oksidatif stresi arttırdığı SOD, GPx, KAT gibi bazı antioksidant enzimlerin düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Sanchez-Iglesias vd 2009).

Apoptoz, gelişim, dokularda hücre popülasyonlarının korunması ve yaşlanma gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak oluşur. Ayrıca zarar görmüş hücrelerin yok edilmesinde koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptoza giden hücre karakteristik morfolojik özelliklere sahiptir. Apoptoza uğrayan hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır (Cohen vd 1993). Sitoplazma laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesi sonucu çekilmeye ve küçülmeye başlar. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte kondensasyon başlar ve çoğu zaman çekirdek, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle at nalı biçiminde görülür. Hücre büzülme ve küçülmeye devam eder ve makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler meydana gelir (Mountz vd 2001). Apoptoz sırasında apoptotik hücrelerin membranlarında

değişimler olur. Bu değişimlerden en belirginini normalde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan fosfolipidlerin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine transloke olmasıdır. Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik membran değişimlerinden biri de hücre içeriklerini içine alan ve membranla çevrili veziküller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu küçük veziküller apoptotik cisim olarak da adlandırılırlar. Bu değişimler apoptotik sürecin sonlarına doğru görülür (Pınarbaşı 2007).

Apoptozu belirlemede en sık kullanılan yöntemler DNA'daki değişikliklere dayalı olan agaroz jel elektroforezi ve TUNEL'dir. Apoptozun en belirgin özelliği endonukleaz aktivitesi sonucu kromozomal DNA'nın nukleozomal birimlere parçalanmasıdır. Bu enzim DNA'da tipik olarak 180-200 baz çifti ve katları biçiminde bir parçalanmaya neden olur. Agaroz jel elektroforezinde bu parçalanma modeli tipik olarak merdiven şeklinde bir görüntü verir (Bortner vd 1995). Agaroz jel elektroforezi kalitatif sonuçlar veren bir analiz yöntemidir. TUNEL yöntemi araştırmalarda ve rutin patolojide elde edilen doku kesitlerinde tek apoptotik hücrelerin saptanmasında, malign hücrelerin kanser araştırma ve klinik onkolojide ilaçla indüklenen apoptoza duyarlılığını belirlemede kullanılır (Sgonc vd 1994). TUNEL yöntemi ile tek tek belirlenebilen apoptotik hücrelerin yaşayabilir hücrelere oranı apoptotik indeksi verir. Apoptotik indeks apoptozun şiddetini ya da oranını belirler.

Aluminyumun apoptoz aracılı nöronal ölümü indüklediğine dair kanıtlar vardır (Savory vd 2001). Al muamelesi apoptoz mekanizmasının karakteristik özellikleri olan hücre büzülmesini, hiperkondense ve düzensiz şekilli kromatin ve DNA fragmentasyonunu indükler (Fu vd 2003).

Aluminyumun hücre depolarizasyonunu takiben nöronlarda biriktiği gösterilmiştir. Bu Na^+ / Ca^{2+} değişimini inhibe eder ve mitokondrial Ca^{2+} 'un fazla birikmesine neden olur. Fazla biriken Ca^{2+} MTP'nin açılmasına sitokrom c'nin salınışına ve apoptoz ile sonlanan kaspaz aktivasyonuna neden olur (Savory vd 2003).

Ghribi ve arkadaşları 2001'de tavşanlarda aluminyum maltolatın intrasisternal girişinin sitokrom c'nin sitoplazmaya salınışına, Bcl-2 down-regülasyonuna, Bax up-regülasyonuna neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma Al'un mitokondriyi hedef aldığını da göstermektedir.

Al ile indüklenmiş nöronal ölümün altında yatan mekanizmalarda mitokondrial değişimler önemli bir basamak olarak gösterilmesine rağmen Dewitt ve arkadaşları 2006'da yapmış oldukları çalışmada ER'un da nöronal hücre ölümde önemli rol

oynadığını göstermişlerdir (Dewitt 2006). ER Ca²⁺ için major depo alanıdır ve Bcl-2 ve Bcl-XL içerir. Mitokondrial hedefli apoptotik sinyallerden bağımsız olarak kaspaz-12 aktivasyonunun içeren farklı bir yol ile nöronal apoptoza neden olmaktadır.

ER aynı zamanda hücrel apoptozu düzenlemede mitokondri ile de ilişkide olabilir. ER'da Al ile oluşturulan stresin gadd153 ve NF-kB gibi çok sayıda proteinin aktivasyonu ile sonuçlandığı alüminyum maltolat'ın intrasisternal olarak verildiği tavşanlarda gösterilmiştir. Birçok çalışmada mitokondrinin yanında ER'un da nöronal apoptoz da kritik bir role sahip olduğu gösterilmiştir. NF-kB sitoplazmada inaktif kompleks halinde bulunurken inhibitör olan subunitinin bu kompleksden ayrılması ile serbest kalır ve nükleusa transloke olarak aktive olur. Al ile muamele görmüş olan tavşanlardan alınan kesitlerde nükleusta bu iki protein için pozitif reaktivite olduğu aynı çalışmada gösterilmiştir (Ghribi vd 2001). Al maltolatın dışı beyaz tavşanlara intrasisternal olarak enjekte edildiğinde TUNEL yöntemi ile hipokampusun CA1 bölgesinde apoptotik olan nöronlar gösterilmiştir (Ghribi vd 2002). Histolojik olarak, apoptotik indeksle apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı bulunmaktadır ve bu indeks apoptozun şiddetini ya da oranını belirtmektedir. Bu çalışmamızdaki hayvan modelinde TUNEL pozitif hücrelerin gösterilmesi ve apoptik indeksin anlamlı olarak deney grubunda kontrol ve sham grubuna göre daha fazla çıkması Al'un nöron ölümünde kullandığı mekanizmalardan birinin apoptoz olduğunu kanıtlamıştır.

Yapılan birçok çalışma ile uyumlu olarak alüminyumun oldukça nörotoksik bir ajan olduğu, nöronal ölüm mekanizmalarından birinin apoptoz olduğu bizim çalışmamızda da vurgulanmıştır. Diğer yapılan çalışmalardan farklı olarak alüminyum sülfat verilen deney grubunda hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki toplam nöron sayısı ile kontrol ve sham grubu arasındaki sayısal farklılık gösterilmiştir. Çalışmamız Al ile yapılan birçok çalışmadan farklı olarak kantitatif değerlerle Al'un hipokampus üzerindeki nörotoksik etkisini göstermesi açısından önem taşıyan bir çalışmadır.

6. SONUÇLAR

Sıçanlarda toksik dozda verilen alüminyum sülfatın hipokampus stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayısının stereolojik bir yöntem olan optik parçalama yöntemi ile incelendiği ve TUNEL yöntemi ile apoptotik indeksin belirlendiği bu çalışmada şu sonuçlar elde edildi:

1. Alüminyum sülfat verilen deney grubunda hipokampusun stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayısı kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı derecede daha az bulunmuştur ($p < 0.05$). Kontrol ve sham grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).
2. Alüminyum sülfat verilen deney grubunda apoptotik indeksin kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir ($p < 0.05$). Kontrol ve sham grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Alüminyum sülfatın hipokampus stratum pyramidale tabakasındaki nöronların sayısında azalmaya neden olduğu ve bu azalmaya neden olan mekanizmalarından birinin apoptoz olduğu sonucuna varılmıştır.

Limbik sistemin önemli bir parçası olan hipokampusun duygulanım, öğrenme ve hafıza üzerindeki önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Hipokampus yeni elde edilen bilgilerin depo edilmesinde, anıların kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçirilmesinde ve yön bulunmasında görev alır. Alüminyumun hipokampus nöron sayılarında azalmaya neden olduğu dikkate alındığında alüminyum ve bileşenlerinin kullanım alanlarının kısıtlanması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Özellikle alüminyum folyo ile yiyeceklerin pişirilmesinden kaçınılmalı, alüminyum içeren kozmetik ürünler kullanılmamalıdır.

Endoplazmik retikulum aracılı apoptozun alüminyum ile oluşan nöronal apoptozu nasıl başlattığı immunohistokimyasal ve moleküler çalışmalarla gösterilmek üzere bir ileri çalışma planlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

- Abd-Elghaffar, S. Kh., El-Sokkary, G. H ., Sharkawy, A. A . (2005) Aluminum-induced neurotoxicity and oxidative damage in rabbits: protective effect of melatonin. *Neuro Endocrinol Lett.*, Oct; 26(5): 609-16.
- Adiguzel, E., Duzcan, S. E., Akdogan, I., Tufan, A. C. (2003) A simple low-cost method for two dimensional microscopic measuring and stepping on the microscopic plate *Neuroanatomy*, Volume 2, Pages 6-8.
- Alnemri, E. S. (1997) Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem.*, 64, 33–42.
- Arıncı, K., Elhan, A. Anatomi 2.cilt (2001). Dolaşım sistemi, Periferik sinir sistemi ve Duyu Organları, *Güneş Kitapevi*, Ankara, 827s.
- Ashkenazi, A., Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305–1308.
- Barry M, Bannister L. H., Standring S. M. (1995) ‘Nervous System’, In: Gray’s Anatomy. 38th Edition, Ed. Williams, P. L. *Churchill Livingstone*, London, 1121-5.
- Becaria, A., Campbell, A., and Bondy, S. C. (2002) Aluminium as a toxicant. *Toxicol Ind Health*, August vol. 18 no.7 309-320.
- Benett, R. W., Pwersand, T. V. N., Moore, K. L. (1975). Experimental studies on the effects of aluminum on pregnancy and fetal development. *Anal. Anz. Bd.*, 138S, 365-378.
- Berlyne, G. M., BenAri, J., Pest, D., Weinberger, J., Stern, M., Gilmore, G. F., Levine, R. (1970) Hyper aluminum aemia from aluminum resinosis in renal failure. *Lancet*, 2; 494.
- Bhagavan, N. V. (2002) Medical Biochemistry (4th edition), *Harcourt/Academic Press*, Canada, 894s.
- Bondy, S. C., Kritein, S. (1996) The promotion of iron induced generation of ROS in nerve tissue by aluminum. *Mol Chem Neuropathol.*, 27: 185–194.
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B., Cidlowski, J. A. (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 5: 21–6.

- Canan, S., Şahin, B., Ünal, B., Aslan, H., Bilgiç, S., Kaplan, S. (2002). Parçacıkların Toplam Sayısının Hesaplanması İçin bir Metot: Parçalama. *Tıp Bilimleri Dergisi*, Cilt: 22 / Sayı: 1.
- Carpenter, M. B., Sutin, J. (1983) Human Neuroanatomy. 8th ed. *Williams & Wilkins Press*, Baltimore, 237s.
- Carroll, R. C., Zukin, R. S. (2002) NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci.*, 25(11): 571-7.
- Chen, L., Yokel, R. A., Hennig, B. and Toborek, M. (2008). Manufactured Aluminum Oxide Nanoparticles Decrease Expression of Tight Junction Proteins in Brain Vasculature. *J Neuroimmune Pharmacol.*, December; 3(4): 286–295 .
- Cohen, G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.*, 326, 1–16.
- Cohen, J. J. (1993) Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract.*, 15: 35-43.
- Cohen, J. J. (1993) Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *American College of Physicians, CHEST*, 103: 99-101.
- Colonnier M. (1966). ‘The Structural Design of the Neocortex’, In: The Brain and Conscious Experience. Ed. Eccles, J. C., *Sprinter Verlag*, Berlin.
- Cooper, M. G., Hausman, E. R. (2006) Hücre Moleküler Yaklaşım 3. Baskı, Ed. Sakızlı, M., Atabey N., *İzmir Kitabevi*, İzmir, 714s.
- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsar, T. (1997) Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association*, 3-4: 92-95.
- Darzynkiewicz, Z. et al. (1994) Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol.*, 41, 15.
- De Marchi, U., Mancon, M., Battaglia, V., Ceccon, S., Cardellini, P., Toninello, A. (2004). Influence of reactive oxygen species production by monoamine oxidase activity on aluminum-induced mitochondrial permeability transition. *Cell Mol Life Sci.*, Oct; 61(19-20): 2664-71.
- Dewitt, D. A., Hurd, J. A., Fox, N., Townsend, B. E., Griffioen, K. J., Ghribi, O. (2006). Peri-nuclear clustering of mitochondria is triggered during aluminum maltolate induced apoptosis. *J Alzheimers Dis.*, 9 : 195-205.
- De Zuwatt, L. L., Meerman, J. N., Commendeur, J. M. (1999). Biomarkers of Free Radical Damage Application in Experimental Animals and Human. *Free Radical Biol. Med.*, 26, 202-26.

- Dua, R., and Gill, K. D. (2001) Aluminium phosphide exposure: Implications on rat brain lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Basic Clint. Pharma.*, 89: 315-319.
- Esparza, J. L., Gomez. M. and Ronieu, M. (2003) Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: Protective role of exogenous melatonin. *J. Pinea Res.*, 35(1): 32.
- Evans, R. H., Francis A. A., and Watkins, J. C. (1977) Selective antagonism by Mg^{2+} of amino acid-induced depolarization of spinal neurons. *Experientia*, Apr., vol. 33, pp. 489-491.
- Evans, S. M., Janson , A. M., Nyengaard, J. R. (2004) Ouantative methods in neuroscience a neuroanatomical approach, *Oxford University Pres*, USA, 332s.
- Fadeel, B., Orrelius, S. (2005) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*, Volume 258, Issue 6, Dec. pages 479–517.
- Ferraz, J. G., Tigley, A. W., Appleyard, C. B., Wallace, J. L. (1997) TNF-alpha contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. *Am J Physiol.*, 272:809-814.
- Fu, H. J., Hu, Q. S., Lin, Z. N., Ren, T. L., Song, H., Cai, C. K., (2003). Aluminum-induced apoptosis in cultured cortical neurons and its effect on SAPK/JNK signal transduction pathway. *Brain Res.*, 980 : 11-23.
- Gandolfi, L., Stella, M. P., Zambenedetti, P. and Zatta, P. (1998). Aluminum alters intracellular calcium homeostasis *in vitro*. *Biochem. Biophys.*, 1406, 315-320.
- Ganrot, P. O. (1986). Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ. Health Perspect.*, 65, 363-341.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation" . *J Cell Biol.*, 119 (3): 493–500.
- Ghribi, O., Herman, M. M., Forbes, M. S., DeWitt, D. A. and Savory, J. (2001) GDNF protects against aluminum-induced apoptosis in rabbits by upregulating Bcl-2 and Bcl XL and inhibiting mitochondrial Bax translocation. *Neurobiol. Dis.*, 8, 764-773.
- Ghribi, O ., Herman, M. M ., Forbes, M. S ., De Witt D. A ., Savory, J . (2001) GDNF protects against aluminum-induced apoptosis in rabbits by upregulating Bcl-2 and Bcl-XL and inhibiting mitochondrial Bax translocation. *Neurobiol Dis.*, Oct;8(5):764-7.
- Ghribi, O ., Herman, M. M ., Spaulding, N. K ., Savory, J . J. (2002) Lithium inhibits aluminum-induced apoptosis in rabbit hippocampus, by preventing cytochrome c translocation, Bcl-2 decrease, Bax elevation and caspase-3 activation. *Neurochem.*, Jul; 82(1):137-45.

- Ghribi, O., Herman, M.M., DeWitt, D.A., Forbes, M. S., Savor.y, J. (2001). Aluminum induce stress in the endoplasmic reticulum in rabbit hippocampus, involving nuclear translocation of gadd 153 and NF-kB. *Molecular Brain Research*, Volume 96, Issues 1-2 , 30 November , Pages 30-38.
- Gundersen, H. J . G., Stereology of arbitrary particles (1986). *Journal of microscopy*,143:3-45
- Gundersen, H. J . G., Bendtsen, T. F ., Korbo, L ., Marcussen, N ., Møller, A ., Nielsen, K ., Nyengaard, J.R ., Pakkenberg, B ., Sørensen, F. B ., Vesterby, A . (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, May; 96(5): 379-94.
- Gundersen, H. J. G., Jensen, E. B. (1987). The efficiency of systematic sampling in sterelogy and its prediction. *Journal of microscopy*,147(3): 229-263.
- Gupta, V. B., Suram, A., Hegde, M. I., Zecca, L., Gamito, R. M., Ravid, R., Shanker, S. K., Stein, R., Shanmngavelu, R., Jaganatha Rao, K. S. (2005) Aluminum in Alzheimer's disease: we still at a cross road ? *CMLS, Cell Mol Life Sci.*, 62: 01–16.
- Guyton, A.C., Hall, J. E. (2007) Tıbbi Fizyoloji, Ed. Çavuşoğlu, H. Baskı, *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 1110s.
- Harkany, T., Abraham, I., Timmerman, W., Laskay, G., Toth, B., Sasvari, M., Konya, C., Sebens, J. B., Kort, J., Nyakas, C., Zarandi,M., Soos, K.,Perke, B., and Luiten, P. G. (2000) Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur. J. Neurosci.*, Aug., vol. 12, pp. 2735-2745.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J., Stevenson, B. R. (1998). ZO- 3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol.*, 141:199-208.
- Howard, C. V., Reed, M. G. (2005) Unbiased Stereology. Three-dimensional Mesurement in Microscopy (Second Edition), *QTP Publications*, Liverpool, 278s.
- Huppertz, B., Frank, H. G., Kaufmann, P. (1999) The apoptosis cascademorphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)*, 200, 1– 18.
- Iqbal, K., Alonso, A. C., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C. X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., Grundke-Iqbal, I. (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1739:198-210.
- Ishiguro, K., Ohno, H., Arai, H., Yamaguchi, H., Urakami, K., Park, J. M., Sato, K., Kohno, H., Imahori, K. (1999).Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.*, 270(2):91-4.
- Julka, D., Gill, K. D. (1996). Altered calcium homeostasis: a possible mechanism of aluminum-induced neurotoxicity. *Biochem. Biophys.*, 135, 47-54.

- Johnson, V. J ., Kim, S. H ., Sharma, R. P . (2005) Aluminum-Maltolate Induces Apoptosis and Necrosis in Neuro-2a Cells: Potential Role for p53 Signaling *Toxicol Sci.*, Feb; 83(2): 329-39.
- Julka, D., Vasishta, R. K ., Gill, K. D . (1996) Distribution of aluminum in different brain regions and body organs of rat. *Biol Trace Elem Res.*, May;52(2):181-92.
- Julka, D., Gill, K. D. (1996) Effect of aluminum on regional brain antioxidant defense status in Wistar rats. *Res. Exp. Med. (Berl.)*, 196: 187-194.
- Kamboj, V. P., and Kar, A. B. (1964). Antitesticular effect of metabolic and rare earth salts. *J. Reprod. Fert.*, 7, 21-28.
- Kausz, A. T., Antonsen, J. E., Hercz, G., Pei, Y., Weiss, N. S., Emerson, S., and Sherrard, D. J. (1999) Screening plasma aluminum levels in relation to aluminum bone disease among asymptomatic dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 34, 688-693.
- Keane, R. W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J. R., Krajewski, S., Reed, J. C., Dietrich, W. D. (2001). Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 60: 422-429.
- Kim, M. S ., Clesceri, L.S . (2001) Aluminum exposure: a study of an effect on cellular growth rate. *Sci Total Environ.* Oct 20;278(1-3):127-35.
- Klatzo, I., Wisniewski, H. M., Streicher, E. (1965). Experimental production of neurofibrillary degeneration *J neuropath & Exp Neurol.*, 24: 187–199
- Liaberherr, M., Grosse, B., Cournot-Witmer, G., Harman-Erlee, M. P., Balan, S. (1987) Aluminum action on Mouse bone cell metabolism and response to PTH and 1,25 (OH)₂D₃. *Kidney Int.*, 31, 736-743.
- Mayer, A. (1971) Historical Aspects of Cerebral Anatomy (2nd ed). *Oxford University Press*, London, 230s.
- McDermott, J. R., Smith, A. I., Ward, M. K., Parkinson, I. S., and Kerr, D. N. (1978) Brain aluminum concentration in dialysis encephalopathy. *Lancet.*, 1, 901-904.
- Medema J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, ME. (1997). FLICE is activated by association with CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.*, 16:2794-2804.
- Monden, Y ., Kubota, T ., Inoue, T ., Tsutsumi, T ., Kawano, S ., Ide, T ., Tsutsui, H ., Sunagawa, K . (2007). Tumor necrosis factor- α is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction *Am J Physiol Heart Circ Physio.*, Jul; 293(1): H743-53.
- Moore, K. L ., Persaud, T. V. N. (1998) The Developing Human. 6th ed. *WB Saunders Company*, Philadelphia, 477.

- Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E., Burns, K., et al. (2000) Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol.*, 150: 731-740.
- Nayak, P. (2002) Aluminum: Impacts and Disease *Environ Res.*, Jun; 89(2):101-15.
- Nedzvetsky, V. S., Tuzcu, M., Yasar, A., Tikhoniurov, A. A. and Baydas, G. (2006) Effects of vitamin E against aluminium neurotoxicity in rats. *Biochemistry*, 71(3) : 305-31.
- New, G. A., and Muma, N. A., (1995) Tau and high molecular weight microtubule associated proteins in aluminum-induced neurofibrillary pathology. In: Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Recent Developments, (eds, I. Hanin, M. Yoshida and A. Fisher), *Plenum Publishing*, New York, pp. 177-188.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., et al. (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.*, 161:653-660.
- Nolte, J. (1998) The Human Brain: An Introduction to Its Functional Anatomy. 2nd ed. *C.V. Mosby Company*, Toronto.
- Ogasawara, Y ., Ohata, E ., Sakamoto, T ., Ishii, K ., Takahashi, H ., Tanabe, S . (2003) A model of aluminium exposure associated with lipid peroxidation in rat brain. *Biol Trace Elem Res.*, Winter; 96(1-3):191-201.
- Ozdem, S. S., Şadan, G. (1994) Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu ve Klinik Acidan Onemi. *Akdeniz Universitesi TıpFak. Derg.*, XI, 1, 63–71
- Pelengaris, S., Khan, M. (2006) The Molecular Biology of Cancer. *Blackwell Publishing*, Australia, 531
- Petroff, O. A. (2002) GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientis*, Dec; 8(6): 562-73
- Pınarbaşı, E. (2007) Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) (in) Moleküler Biyoloji. Ed. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç , *Nobel Yayın*, Ankara, 423-468
- Rahman, H., Channon, S. M ., Skillen, A.W ., Ward, M. K . , Kerr, D. N . (1985) Protein binding of aluminium in normal subjects and in patients with chronic renal failure. *Proc Eur Dial Transplant Assoc Eur Ren Assoc.*, 21:360-5
- Raisman, G., Covan, W. M., Powell, T. P. S. (1965) The extrinsic afferent, commissural and association of the hippocampus. *Brain*, 88: 963-6
- Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., et al. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.*, 276: 869-874.
- Riedel, G., Micheau, J. (2001). Function of the hippocampus in memory formation: Desperatively seeking resolution. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*,

May;vol. 25, pp. 835-853.

- Rodriguez, M., Felsenfeld A. J., Lach, F. (1990). Aluminum administration in rat separately affects the osteoblast and bone mineralization. *J. Bone Miner. Res.*,59-67.
- Roulston, A., Marcellus, R. C., Branton, P. E. (1999). Viruses and apoptosis. *Annu Rev of Microbiol.*, 53, 577–628.
- Sánchez-Iglesias, S., Méndez-Alvarez, E ., Iglesias-González, J., Muñoz-Patiño, A., Sánchez-Sellero, I ., Labandeira-García, J. L ., Soto-Otero, R . (2009). Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. *J Neurochem.*, May; 109(3):879-88.
- Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., henson, P. M., Haslet, C. (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.*, 83, 865
- Savory, J., Herman, M. M., Ghribi, O. (2003). Intracellular mechanisms underlying aluminium-induced apoptosis in rabbit brian. *J Inorg Biochem.*, 97 : 151-4.
- Savory, J., Ghribi, O., Forbes, M. S., Herman, M. M. (2001). Aluminium and neuronal cell injury: inter-relationships between neurofilamentous arrays and apoptosis. *J Inorg Biochem.*, 87 : 15-9.
- Savory, J., Herman, M. M., Katsetos, C. D., Wills, M. R. (1991). Aluminum and neurodegenerative disorders. *In 'Aluminum in Chemistry, Biology and Medicine'* (M. Nicolini, P. F. Zatta, and B. Corain, Eds), pp. 45-52. Cortina Interational, Verona
- Serra, M. A., Barassi, V., Canavese, C., Sabbioni, E. (1991). Aluminium effect on the activity of superoxide disniutase and other antioxygenic enzymes in vitro. *Biol. Trace Elem., Res.*, 31: 79-96.
- Sgonc, R., Gruber. J. (1998) Apoptosis detection: an overview. *Experimental Gerontology*. Volume 33 Issue 6 September; 525-33
- Sharma, P., Ahmad Shah, Z ., Kumar, A ., Islam, F ., Mishra, K. P . (2007) Role of combined administration of Tiron and glutathione against aluminum-induced oxidative stress in rat brain. *J Trace Elem Med Biol.*, 21(1):63-70.
- Silva, V. S., Duarte, A. I ., Rego, A. C ., Oliveira, C. R ., Gonçalves, P. P . (2005) Effect of chronic exposure to aluminium on isoform expression and activity of rat (Na⁺/K⁺) ATPase. *Toxicol Sci.*, Dec; 88(2):485-94.
- Silva, V. S., Gonçalves, P. P. (2003) The inhibitory effect of aluminium on the (Na⁺/K⁺) ATPase activity of rat brain cortex synaptosomes. *J. Inorg. Biochem.*, 97, 143–150.
- Sinclair, A. J., Barnett, A. H., and Junec, J. (1990). Free Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease. *British J. Hospital Medicine*, 43, 334–44

- Singer, S. M., Chambers, C. B., Newfry, G. A., Norlund, M. A., Muma, N. A. (1997). Tau in aluminum-induced neurofibrillary tangles. *Neurotoxicology*, 18(1): 63-76.
- Sgonc, R. et al. (1994). Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet.*, 10, 41-42.
- Stein, G., Laske, V., Muller, A., Braunlich, H., Linss, W., and Fleck, C. (1987). Aluminum induced damage of the lysosomes in the liver, spleen and kidneys of rats. *J. Appl. Toxicol.*, 7, 253-258.
- Stephen, G. Waxman, M. D. (2002) Korrelatif Anatomi, Ed. Prof. Dr. Mehmet Yıldırım, *Nobel Tıp Kitapevi*, İstanbul, 392s
- Sterio D.C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.*, May;134(Pt 2):127-36.
- Temizkan, G., Arda, N. (2008) Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, *Nobel tıp kitabevleri*. İstanbul. 345s.
- Terry, R. D., Pena, C. (1969). Experimental production of neurofibrillary degeneration (2) Electron microscopic, phosphatase histochemistry and electron probe analysis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 24, 200-210.
- Ustaçelebi Ş. (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, *Güneş Kitapevi*, Ankara, 195-196.
- Uysal, H. Ergene, N. B., Baltacı A. K. (1990). Alüminyum ve insan sağlığı. *S.Ü. Tıp fakültesi dergisi*, 6(2); 230-237.
- Varner, J. A., Jensen, K.F., Hovarth, W., and Issacson, R. L. (1998). Chronic administration of aluminium-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: Alterations in neuronal and cererovascular integrity. *Brain Res.*, 784, 284-298.
- Verstraeten, S.V., Aimo. L., Oteiza, P.I. (2008) Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol*. Nov;82(11): 789-802.
- Virginia M. Heatwole Bortner , C. D. et al. (1995) TUNEL Assay for Apoptotic Cells. *Trends Cell Biol.*, 5, 21.
- Wang, M., Ruan, D. Y., Chen, J.T., Xu, Y.Z. (2002) Lacks of effects of vitamin E on aluminium-induced deficit of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vivo. *Food Chem Toxicol.*, Apr;40(4): 471-8.
- Weis, C., Haung, A. (1989) Aluminum altered membrane dynamics in human red blood cell white ghosts. *Thrombosis Res.*, 54: 141-149.
- West. M. J., Gundersen, H. J. (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol.*, Jun 1;296(1): 1-22.

- West, M. J., Slomianka, L., Gundersen, H. J. G. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.*, 231:482-497.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L. (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 275-295.
- Witter, M. P., Amaral, D. G., Paxinos, G. (2004) Hippocampal formation. The Rat Nervous System. San Diego, CA: *Elsevier Academic Press.*, p 635-704.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555- 556.
- Yokel, R. A. (2000). The Toxicology of Aluminium in the Brain: Review. *Neurotoxicology*, Oct;21(5): 813-28.
- Yumoto, S., Nagai, H., Matsuzaki, H., Matsumura, H., Tada, W., Nagatsma, E., and Kobayashi, K. (2001). Aluminum incorporation into the brain of rat fetuses and sucklings. *Brain Res. Bull.*, 55, 229-234.
- Zatta, P. F., Nicolini, M., and Corain, B. (1991). Aluminum (III) toxicity and blood-brain barrier permeability. In *'Aluminum in Chemistry, Biology and Medicine'* (M. Nicolini, P. F. Zatta, and B. Corain, Eds), pp. 97-112. Cortina International, Verona.
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., Yan, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques*, 23: 525–531.
- Zsiros, V., Rojik, I., Kovacs, T., Csoti, T., Erdely, L. (1998). Comparative electrophysiological aspects of aluminum actions on central neurons and neuronal synapses of invertebrates and vertebrate animals. *Neurotoxicology*, 19: 553-556.

8. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İzmir’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İzmir’de tamamladı. 2004 yılında Uludağ Üniversitesi Fen –Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2009 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji- Embriyoloji AD ‘da yüksek lisansa başladı. Katıldığı kongre ve kurslar:

17- 20 Mayıs 2010 X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir

19- 30 Mart 2011 Deney Hayvanları Kullanım Kursu, İzmir

9- 13 Mayıs XV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Kocaeli

10 Mayıs 2011 Flow Sitometri Eğitimi, Kocaeli

30 Mayıs- 3 Haziran Kanser Biyolojisinde Güncel Konular Teorik Kurs; İzmir

8 Temmuz 2011 Course of Stereology, Samsun