

T.C.  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Psikiyatri Anabilim Dalı

**RATLARDA ALKOL BAĞIMLILIĞI MODELİNDE  
AKAMPROSATIN BEYİN GLUTATYON, GLUTATYON  
PEROKSİDAZ, MALONDİALDEHİT, KALSİYUM ATPaz VE  
NMDA RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr. A. Metehan ÇALIŞKAN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ramazan ÖZCANKAYA**

**II. DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU**

**2009-İSPARTA**

T.C.  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Psikiyatri Anabilim Dalı

**RATLARDA ALKOL BAĞIMLILIĞI MODELİNDE  
AKAMPROSATIN BEYİN GLUTATYON, GLUTATYON  
PEROKSİDAZ, MALONDİALDEHİT, KALSİYUM ATPaz VE  
NMDA RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr. A. Metehan ÇALIŞKAN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ramazan ÖZCANKAYA**

**II. DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi  
Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından  
1787-TU-09 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2009-İSPARTA**

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sürecinde bilgilerinden ve klinik tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ramazan ÖZCANKAYA 'ya,

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na,

Asistanlığım süresince bana rehberlik eden, beni hep bir adım öteye taşıyan değerli hocam Doç. Dr. İbrahim EREN'e

Beş yıllık çalışma sürecinde benimle birlikte yürüyen, psikiyatrist olma yolunda aynı çatışmaları ve hazları yaşayan asistan arkadaşlarıma ve kliniğimizin diğer çalışanlarına;

Sevgisi, desteği ve anlayışı ile hep yanımda duran sevgili eşime;

Sonsuz teşekkürler...

Dr. A. Metehan ÇALIŞKAN

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	v
ŞEKİLLER.....	vi
GRAFİKLER DİZİNİ .....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	viii
1.GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1 Oksidatif Stres.....	4
2.1.1 Serbest Radikaller .....	4
2.1.1.1 Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri .....	12
2.1.2 Antioksidanlar .....	13
2.1.2.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	14
2.1.2.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar .....	16
2.1.2.3 Antioksidanların Etki Mekanizmaları .....	18
2.1.3 Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres .....	19
2.1.4 Patolojik Süreçlerde Oksidatif Stres .....	23
2.2 N-Metil-D-Aspartat (NMDA).....	26
2.2.1 Glutamat Reseptörleri .....	26
2.2.2. NMDA Reseptör Tipleri .....	27
2.2.3. NMDA'nın Yapısı.....	28
2.2.4. NMDA'nın Fizyolojisi .....	30
2.2.5. NMDA ve Alkol Bağımlılığı .....	32
2.3. Alkol Bağımlılığı .....	33
2.3.1. Alkol Bağımlılığının Tanımı ve Sınıflandırması .....	33
2.3.1.1. Alkol Bağımlılığı İçin DSM-IV Tanı Ölçütleri .....	34
2.3.1.2. Alkol Bağımlılığı İçin ICD- 10 Tanı Ölçütleri .....	35
2.3.1.3. DSM-IV Sınıflamasına Göre Alkol Kullanım Bozuklukları .....	36
2.3.1.4. ICD- 10 Sınıflamasına Göre Alkol Kullanım Bozuklukları .....	36

2.3.2. Alkol Bağımlılığının Epidemiyolojisi.....	37
2.3.3. Alkol Bağımlılığı Etiyolojisi.....	38
2.3.4. Alkolün Özellikleri ve Metabolizması.....	38
2.3.5. Alkol Bağımlılığının Tedavisi .....	39
3. MATERYAL VE METOT .....	42
3.1. Materyal .....	42
3.1.1. Deney Hayvanları.....	42
3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	42
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	43
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler .....	44
3.2. Metot .....	45
3.2.1. Deneysel Model .....	45
3.2.2. Anestezi ve Doku Örnekleri.....	46
3.2.3. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu.....	46
3.2.4. SDS-PAGE Yöntemi.....	46
3.2.5. Western Blot Yöntemi .....	47
3.2.6. Beyin Homejanat Hazırlanması .....	47
3.2.6.1 Lipit peroksidasyon (MDA) Analizi .....	47
3.2.6.2 GSH ve GSH-Px Analizi.....	48
3.2.6.3. Mikrozomal Ca <sup>+2</sup> -ATPaz Aktivitesinin Ölçümü .....	49
3.2.7. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Korteks MDA Düzeyleri .....	50
4.2. Korteks GSH ve GSH-Px Düzeyleri.....	50
4.3. Spektrofotometri ile Saptanan Mikrozomal Beyin Ca <sup>+2</sup> ATPaz Düzeyleri .	51
4.4. Western Blot Analizi ile Saptanan NR2A, NR2B Reseptör Düzeyleri .....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	55
ÖZET .....	59
SUMMARY .....	60
KAYNAKLAR .....	61

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CCl<sub>3</sub>·</b>	: Triklormetil
<b>CCl<sub>4</sub></b>	: Karbon tetraklorür
<b>cGMP</b>	: Siklik guanozinmonofosfat
<b>Cu<sup>+2</sup></b>	: Bakır iyonu
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DHLA</b>	: Dihidrolipoik asit
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon (indirgenmiş glutasyon)
<b>GSSG</b>	: Okside (yükseltgenmiş) glutasyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>HPA</b>	: Hipotalamik pituiter adrenal
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>LA</b>	: α-Lipoik Asit
<b>LDL</b>	: Düşük dansiteli lipoprotein
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>NAD(P)H</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NF-κB</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>NMDA</b>	: N-Metil-D-Aspartat
<b>NR 2A</b>	: NMDAR 2A subtipi
<b>NR 2B</b>	: NMDAR 2B subtipi
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>O<sub>2</sub></b>	: Moleküler oksijen
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet oksijen
<b>O<sub>2</sub>·-</b>	: Süperoksit anyonu
<b>·OH</b>	: Hidroksil radikali
<b>ONOO·</b>	: Peroksinitrit
<b>PON</b>	: Paraoksonaz
<b>PMNL</b>	: Polimorfonükleer lökosit
<b>PKC</b>	: Protein kinaz C
<b>PUFA</b>	: Çoklu doymamış yağ asidi
<b>ROO·</b>	: Peroksil
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>sGC</b>	: Solubl guanilat siklaz
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik asit
<b>TBARS</b>	: Tiyobarbitürik asit reaktif türleri
<b>TNF-α</b>	: Tümör nekroz faktör-α
<b>TRX</b>	: Tiyoredoksin
<b>VCAM-1</b>	: Vasküler hücre adezyon molekülü
<b>Zn</b>	: Çinko

## ŞEKİLLER

Şekil 1. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması .....	8
Şekil 2. ·OH radikalının biyolojik moleküllerle reaksiyonları .....	8
Şekil 3. Redoks homeostazının mekanizmaları .....	24
Şekil 4. Redoks dengesi .....	25

## GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. NR2A'ya ait Western Blot örneği. ....	53
Grafik 2. NR2B'ye ait Western Blot örneği.....	54



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> ROT, simgeleri ve elektron yapıları.....	6
<b>Tablo 2.</b> Serbest radikallerin oluşumu.....	11
<b>Tablo 3.</b> Ratların korteks MDA düzeyleri.....	50
<b>Tablo 4.</b> Ratların korteks GSH ve GSH-Px düzeyleri.....	51
<b>Tablo 5.</b> Ratların mikrozomal korteks Ca <sup>+2</sup> ATPaz düzeyleri .....	51
<b>Tablo 6.</b> Ratların NR2A, NR2B reseptörlerinin yüzdellik cinsinden yoğunlukları .....	52

# 1.GİRİŞ

Alkolizm; bireyin beden ve ruh sağlığı; aile, toplumsal ve iş uyumunu bozacak derecede sık ve fazla alkol alma; alkol alma isteğini durduramama ile belirli bir bozukluktur (1).

Kaynaklara göre ilk keşfedilen psikofarmakolojik ajan "alkol" dr. Alkol kelimesi Arap dilindeki bir Őeyin z, aslı anlamındaki "al kihl" sözcüğünden gelmektedir (2). Alkol çok eski zamanlardan beri (M.. 2000) var olan, insan beyninin fonksiyonlarını baskılayıcı özelliklere sahip, zehirli etkili, kullanımı oldukça yaygın olan bir maddedir. Alkol ve alkol kullanımına tarih boyunca farklı toplum ve topluluklarda değişik biçimlerde yaklaşılmıştır. M.. 2000 yılında şarap ticareti Hammurabi kanunlarında anlatılmıştır. Diğer yandan milattan önceki yıllarda Eski Yunan'da şarap adına törenler yapılmış hatta adına "tanrı" atfedilmiş (Dionysos, Roma'da Bakhs) oysa aynı ağlarda "Spartanın çocukları" alkol kullananlara "acımasız" gözlerle bakmışlardır (3).

Tarih boyunca Hipokrat'dan başlayarak pek çok hekim alkollü içkilerin insan sağlığına olan zararlı etkilerinden söz etmişlerdir. Ancak diğer ruhsal rahatsızlıklar gibi, alkolizmin de ahlaki ve dinsel açıklamalardan sıyrılarak tıbbi bir sorun olarak kabul edilmesi son 150 yıla dayanmaktadır.

19.Yüzyılda Stockholm niversitesi ğretim yelerinden Magnus Huss (1856), alkolün ruhsal ve bedensel etkilerini göz önüne alarak, ilk defa "alkolizm" sözcüğünü kullanmış ve alkolizmi ayrı bir klinik antite olarak incelemiştir. Huss, olağan sarhoşlukla, delirium tremensi akut form, alkolün geç ve uzak etkilerini ise kronik form adı altında toplamıştır (4,5).

Bağımlılık etiyolojisini açıklamaya yönelik; genetik/ biyolojik, sosyokültürel ve psikolojik modeller olmakla birlikte üzerinde en çok fikir birliğine varılan görüş, bağımlılığın multifaktöriyel bir bozukluk olduğunu savunan bütüncül yaklaşımdır.

Aşırı alkol kullanımı ve alkolle ilişkili sorunlar tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Alkol kullanımı gelişmiş ülkelerde azalırken, gelişmekte olan ülkelerde artmaktadır. Tüm dünyada alkol kullanımı ve yarattığı sorunlar hakkında öğrenilecek daha çok Şey olmasına karşın, alkolün dünya sağlığı için önemli bir tehlike olduğuna dair yeterli kanıt vardır. Alkole ilişkin sorunlar kadınlarda artmasına karşın, her kültürde erkekler arasında önemli ölçüde daha sıktır. Ekonomik gelişme düzeyi ve din ülkelerin alkol

tüketiminde en etkili belirleyicilerdir. Ülkemizde alkol kullanım prevalansı diğer ülkelere göre daha düşüktür. Alkol kullanımının düşük olmasında İslam'ın etkisi, alkol kullanımının günlük yaşamın bir parçası olmaması, genellikle sosyal ortamlarda alkol içilmesi ya da sosyal baskı nedeniyle az bildirim etkili olabilir (6).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, alkol alımının serebral ve kardiyovasküler hasar gelişiminde en önemli risk faktörlerinden biri olduğunu ortaya koymuştur (7). Alkolün organizmadaki başlıca etki yeri santral sinir sistemidir. Akut veya kronik alkol kullanımı sinir sisteminde yapısal, fizyolojik ve nörokimyasal değişikliklere neden olur. Bununla birlikte alkol kullanımına bağlı oluşan beyin hasarının mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (8). Alkol kullanımında, gerek beslenmenin bozulması sonucu gerekse alkolün zararlı etkileri nedeniyle demir, çinko, magnezyum, fosfor, bakır gibi bazı mineraller ile özellikle B grubu vitaminler başta olmak üzere tüm vitamin düzeylerinde bir azalma görülür. Bu eksiklikler sonucu geri dönüşümsüz olabilen bozukluklar ortaya çıkar (9).

Alkolün beyin üzerine akut toksik etkileri davranışlarda ve bilişsel işlevlerde değişiklikler olarak kendini gösterir. Bu akut etkilerin alkolün birçok nörotransmitter, nöropeptid ve nöroendokrin sistemindeki ve voltaj kapılı iyon kanallarındaki etkilerinin sonucunda oluştuğu bilinmektedir.

Alkol direkt toksik özelliklerinin yanısıra, oksidatif strese yol açarak da hücrelerde indirekt etkiler meydana getirmektedir. Alkol metabolizması esnasında meydana gelen oksidatif stres, artmış reaktif oksijen radikal üretimi ve/veya azalmış antioksidan savunma kapasitesinden kaynaklanmaktadır (10).

Son yıllarda sürekli alkol kullanımının insanlarda oluşturduğu bilişsel (kognitif) bozukluklar ve bunun altında yatan biyolojik mekanizmalar da yoğun biçimde araştırılmaktadır. Alkolizmin yol açtığı bu bilişsel gerilemenin de, en azından kısmen, gelişen hipotalamik pituiter adrenal (HPA) eksen bozukluğu ve hiperkortizolemi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (11,12,13). HPA eksen hiperaktivitesi ve hiperkortizoleminin, özellikle açık (explicit ya da declarative) hafızanın merkezi konumunda olan hipokampusta nöron kaybına yol açtığı, bunun örneğin depresyon gibi hastalıklarda görülen bilişsel bozukluğu da açıklayabileceği iddia edilmektedir (13,14).

Özetle, alkol bağımlılarında görülen bilişsel bozukluklar hipokampal nöron kaybı ile ilişkili olabilir. Ayrıca alkol yoksunluklarında hipokampusta N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörlerinde de aşırı aktivite oluştuğu, bunun da hipokampal nöronlardaki eksitotoksiste ve kayıptan sorumlu olabileceği bildirilmiştir (13,15,16).

Alkol bağımlılığının tedavisinde kullanılan ajanlardan biri olan akamprosot homosisteik asitin bir analogudur. Akamprosotun alkolü bırakmış olan alkol bağımlılarında sık gelişen güçlü içme isteğini (craving) azalttığı kontrollü araştırmalarla gösterilmiştir (17). Homosisteik asit NMDA reseptörleri üzerinden aktiftir. Akamprosotun farmakolojik etkileri henüz tam olarak anlaşılammıştır. Her ne kadar alkoliklerdeki etki mekanizması bilinmiyor olsa da, akamprosot, eksitatuvar nörotransmitter olan glutamatın etkileri ile bağlantılı nöronal aşırı aktiviteyi antagonize etmektedir. Bu etkisini, en azından kısmen NMDA reseptörlerine yönelik bir antagonist olarak hareket ederek gösterdiği düşünülmektedir (18).

Oksidatif stresin alkol bağımlılığındaki rolünün belirlenmesi alkol bağımlılığının etyolojisi ve patofizyolojisinin net olarak anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Biz bu araştırmada etanol ile alkol bağımlılığı oluşturduğumuz ratların beyinlerinde oksidatif stresin göstergeleri olan glutatyon, glutatyon peroksidaz, malondialdehit, kalsiyum ATPaz ve NMDA reseptör düzeyleri ve akamprosot tedavisinin bu değerler üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmada,

- 1) Etanol ile alkol bağımlılığı oluşturduğumuz ratların beyinlerinde oksidatif stresin göstergeleri olan glutatyon, glutatyon peroksidaz, malondialdehit, kalsiyum ATPaz ve NMDA reseptör düzeylerinin belirlenmesi,
- 2) Akamprosot tedavisinin bu değerler üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1 Oksidatif Stres

#### 2.1.1 Serbest Radikaller

Atomlarda elektronlar, orbital adı verilen uzaysal bölgede çift olarak bulunurlar. Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıda molekül ise tek yani eksik elektronludur. Eksik elektronlu olan bu moleküller oldukça reaktif özellikte olup kararsızdırlar. Bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girer ve bu molekülden ya bir elektron alır veya ona bir elektron verirler (19).

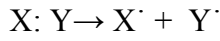
Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilen oldukça aktif atom veya moleküllerdir. Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Her tip kimyasal ve biyokimyasal tepkime her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü artırır, dolayısıyla serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (19). İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan O<sub>2</sub> yapısı gereği radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir anlatımla 'ROT' ifade edilmektedir. ROT ve serbest radikaller organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile oluşurlar. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (20).

Serbest radikaller vücutta 3 yolla meydana gelir:

1. Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik bölünmesi (Kovalent bağların homolitik kırılması):

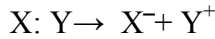
Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı

atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron bulunur. Sonuç olarak, iki adet reaktivite düzeyi yüksek serbest radikal oluşur.



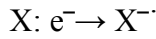
2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi:

Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, GSH ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.



3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla:

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. O<sub>2</sub>in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidin (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·) oluşumuna neden olur.



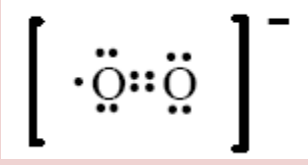
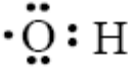

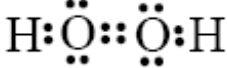
Bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal olmayan türler radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (14, 21).

Oksijen (O<sub>2</sub>) ve nitrojen molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır. O<sub>2</sub>in kısmi indirgenmesinden, ROT olan hidroksil (·OH) radikali ve O<sub>2</sub><sup>-</sup>· oluşmaktadır. Ayrıca singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) molekülleri, radikal olmayan ROT olarak ifade edilirler. Oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit (NO·), peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>·), LPO sırasında oluşan peroksil (ROO·) ve karaciğerdeki karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) metabolizması sırasında oluşan triklorometil (CCl<sub>3</sub>·) radikalidir (21, 22).

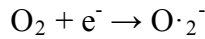
Organizmada oluşan serbest radikallerin en önemlileri ve büyük kısmı O<sub>2</sub> kaynaklı radikallerdir. O<sub>2</sub>in toksik etkisi yoktur, ancak aerobik hücre metabolizması sırasında serbest oksijen radikallerine dönüşür. O<sub>2</sub>in kısmi indirgenmesinden, ROT arasında yer alan ·OH ve

$O_2^{\cdot -}$  oluşmaktadır. Ayrıca  $^1O_2$  ve  $H_2O_2$  molekülleri radikal olmayan reaktif oksijen türevleridir (23, 24) (Tablo 1).

Tablo 1. ROT, simgeleri ve elektron yapıları

ROT	Simgesi	Elektron Yapısı
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot -}$	
Hidroksil radikali	$\cdot OH$	
Singlet oksijen radikali	$^1O_2$	
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	

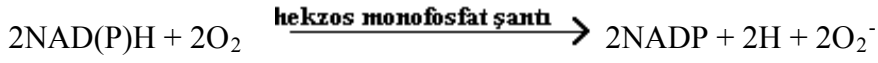
*Süperoksit radikali* ( $O_2^{\cdot -}$ ),  $O_2$ 'in indirgenmesi ile oluşan ilk üründür. En önemli kaynağı, mitokondriyal elektron iletim zinciridir.



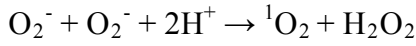
Yarılanma süresi uzun, ancak tepkisi düşük bir radikaldir.  $O_2^{\cdot -}$ ;  $O_2$ 'in oksidatif fosforilasyon esnasında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD(P)H)-oksidaz veya ksantin-oksidaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde bir elektron indirgenmesi sonucunda meydana gelmektedir.  $O_2^{\cdot -}$ 'in yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz (SOD) enziminin varlığına bağlıdır. Ayrıca, indirgeyici moleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken  $O_2^{\cdot -}$  oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler gibi yüzlerce molekül aerobik ortamda oksitlenirken  $O_2^{\cdot -}$  yapımına neden olurlar. Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında  $O_2^{\cdot -}$  bir ürün olarak oluşabilmektedir (19, 25).

Dokularda  $O_2^{\cdot -}$ 'in en önemli kaynağı, polimorfonükleer lökosit (PMNL) fonksiyonları sonucu üretilendir. Daha az miktarda olmakla birlikte eozinofil ve lenfositler de

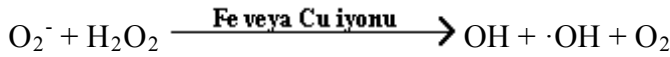
antibakteriyel bir ajan olarak  $O_2^{\cdot-}$  üretirler. PMNLlerde  $O_2^{\cdot-}$  üretimi membran bağlı azalmış NAD(P)H-oksidadaz şantı (veya heksoz monofosfat şantı) yolu ile gerçekleşir (19, 26).



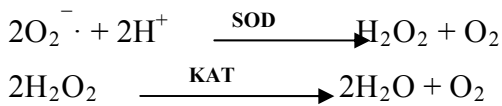
$O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  radikaline göre zayıf reaktif özelliği olan bir moleküldür, yine de biyolojik dokulara zarar verebilir. Hücre hasarına neden olarak, akuöz ortamda spontan bir biçimde  $H_2O_2$  ve  $^1O_2$  radikaline dönüşebilir.  $O_2^{\cdot-}$ -in, osteoklastların kemiğe yakın yüzeylerinde de bulunduğu ve kemik matriks yıkımında da görev aldığı gösterilmiştir (27, 28).



$O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  radikali ile reaksiyona girerek daha etkili  $\cdot OH$  radikaline de dönüşebilir. Bu reaksiyon için metal iyonlarına [demir ( $Fe^{+2}$ ) ve bakır ( $Cu^{+2}$ )] gereksinim vardır.



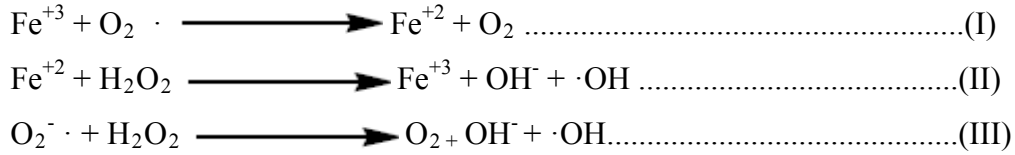
Dokulardan  $O_2^{\cdot-}$ -in uzaklaştırılması,  $H_2O_2$  spontan dismutasyonu yolu ile olur. Bu reaksiyon SOD enzimi tarafından da katalizlenir.  $H_2O_2$ , ikinci bir enzimle [katalaz (KAT)] uzaklaştırılır (19, 27, 29).



*Hidroksil radikali* ( $\cdot OH$ ), bilinen en reaktif radikaldir ve radikallerin radikali olarak da adlandırılır. Bu radikal, DNA sarmallarında kırılmaya sebep olur, hidroksilasyon için temel oluşturur ve gen mutasyonlarına neden olarak malign transformasyonlara veya hücre ölümlerine yol açar.  $\cdot OH$  aynı zamanda klasik serbest radikal reaksiyonunu (LPO) da stimüle etmek yoluyla doku yıkımında rol oynamaktadır.  $\cdot OH$ , membran fosfolipitlerine yakın bölgede oluşursa, lipit zincirlerini etkiler ve peroksil radikalleri,  $H_2O_2$  ve lipit hidroperoksitleri gibi ara radikaller oluşur. Hidroksiperoksitlerin birikimi, membran fonksiyonlarını bozabilir veya hidroksiperoksitler ayrılarak sitotoksik aldehitlere dönüşebilir.  $\cdot OH$ , en aktif ve en toksik oksijen radikali olarak üretildiği her yerde birçok molekül ile



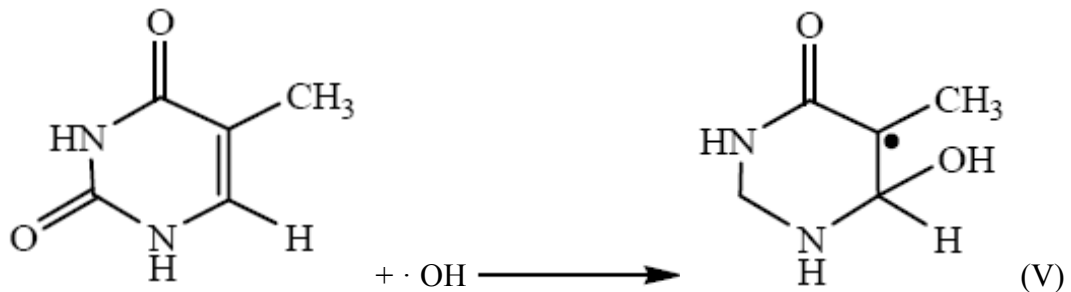
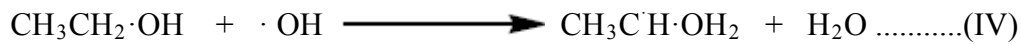
reaksiyon verir.  $\cdot\text{OH}$ , iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi  $\text{H}_2\text{O}_2$  molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir.  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  gibi metal iyonları tarafından katalizlenen bu indirgenme reaksiyonu Haber-Weiss tepkimesi (şekil 1) olarak bilinmektedir.



Şekil 1. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması

IV ve V numaralı reaksiyonlar, III numaralı reaksiyonun ara basamaklarıdır (şekil 2) (30, 31).

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan  $\cdot\text{OH}$ , su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler,  $\cdot\text{OH}$ in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (31, 32).



Şekil 2.  $\cdot\text{OH}$  radikalinin biyolojik moleküllerle reaksiyonları

$\cdot\text{OH}$  radikalinin sebep olduğu en önemli hasar, LPO olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.  $\cdot\text{OH}$  radikalinin başlıca hedefi, hücre zarı su içermediğinden dolayı yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozabilmekte ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilmektedir (19, 30, 31).

*Singlet oksijen radikali* ( $^1\text{O}_2$ ), eşleşmemiş elektron taşımadığı için gerçek bir radikal değildir.  $\text{O}_2$ in yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında, dış yörüngesindeki bir elektronun enerjisinin değişmesi ve stabilitenin bozulmasıyla oluşur.  $\text{O}_2$ in kinetik olarak uyarılan bu formu, membran lipidleri ile

oldukça yüksek reaktivite gösterir ve hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle (PUFA) reaksiyona girmesiyle, lipid peroksidlerin oluşumuna yol açabilmektedir.  $^1\text{O}_2$ in yarılanma ömrü  $10^{-6}$  ile  $10^{-5}$  saniye arasında olup karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir fakat doku hasarındaki rolü ile ilgili net bir bilgi yoktur (19, 33).

*Hidrojen peroksit radikali* ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  $\text{O}_2$ in enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da  $\text{O}_2\cdot^-$  radikallerinin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Güçsüz bir oksidan olmasına rağmen hücre membranlarından kolayca diffüze olabildiği için ve ayrıca geçiş metalleriyle Fenton reaksiyonuna girdiği için hasar oluşturmada yüksek potansiyele sahiptir. Esasen  $\text{H}_2\text{O}_2$ in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  gibi metal iyonlarının varlığında  $\cdot\text{OH}$  radikalinin öncülü olarak davranmasıdır.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan  $\text{Fe}^{+2}$  ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif formlarını oluşturur. Bu formdaki demir molekülleri çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında LPO gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Ayrıca bu radikal birtakım intraselüler olayları da tetikler, örneğin birçok pro-enflamatuvar sitokinin transkripsiyonundan sorumlu nükleer faktör kappa-B (NF- $\kappa\text{B}$ )' nin oksidasyonunda rol oynar. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$ in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan KAT ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (34-36).

$\text{NO}\cdot$ ,  $\text{ONOO}\cdot$ , LPO sırasında oluşan  $\text{ROO}\cdot$  ve karaciğerdeki  $\text{CCl}_4$  metabolizması sırasında oluşan  $\text{CCl}_3$  oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikallerdir ve oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşan bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç mili saniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişmektedir (19, 37).

Vücutta üretilen radikaller doğrudan tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidir. Bu moleküller vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar.  $\text{O}_2$ in biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunludur. Mitokondride aerobik solunumda kullanılan  $\text{O}_2$ in % 2-5'i bu tür tepkimelerde kullanılmak üzere serbest oksijen radikallerine dönüştürülür. Steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur (19).

Fizyolojik olarak serbest radikaller endojen kaynaklı olarak indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nüklear elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında bol miktarda üretilir. Ayrıca bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, x ışınları gibi radyant enerjinin emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç kullanımı (parasetamol, nitrofurantoin gibi), solventler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler (Tablo 2).

Patolojik olarak birçok malignite, diabetes mellitus (DM), ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıkla ilişkili olan serbest radikallerin en zararlı biyolojik etkisi; hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması ve LPO olarak bilinen bir reaksiyon zincirini başlatarak, membran proteinlerine hasar verip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmasıdır (38).

Tablo 2. Serbest radikallerin oluşumu

Serbest Radikal	Oluşumu
Süperoksit ( $O_2 \cdot^-$ )	$O_2$ in, enzimatik veya nonenzimatik yolla bir elektron redüksiyonu
Hidroksil radikali ( $\cdot OH$ )	Suyun radyolizi, $H_2O_2$ in metal-katalizli parçalanması, NO ve $O_2 \cdot^-$ etkileşmesi
Alkoksil ( $RO\cdot$ ) ve peroksil ( $ROO\cdot$ ) radikalleri	Hidroperoksitleri metal-katalizli parçalanması
Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )	$O_2 \cdot^-$ in dismutasyonu, şekerlerin oksidasyonu
Demir-oksijen kompleksi	Hemoglobin, Miyoglobin, vb.
Singlet oksijen ( $^1O_2$ )	Fotosensitizasyon ile oksidasyon, $ROO\cdot$ radikalleri arasındaki biyomoleküler etkileşimler, hipoklorit ve $H_2O_2$ reaksiyonu
Lipit ve protein hidroperoksitler	Lipit ve proteinlerin oksidasyonu
Nitrojen dioksit ( $NO_2$ )	$ROO\cdot$ radikali ve NO reaksiyonu, hava kirliliği ve sigara
Nitrik oksit (NO)	NO sentaz, nitrozotiyol ve hava kirliliği
Tiyil radikalleri	Tiyollerden hidrojen atomu transferi
Protein radikalleri	Proteinlerden hidrojen atomu transferi

### 2.1.1.1 Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Serbest radikaller ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki denge oksidanlar lehine bozulduğunda serbest radikaller; lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır (19, 39, 40):

1) Membran Lipitleri Üzerinde Etkileri: Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadır. Hücre zarı, içerdiği PUFA nedeniyle oksidatif hasara oldukça duyarlıdır. Yağ asidi zincirinden, serbest radikallerin etkisi ile hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin de radikal özelliği kazanmasına neden olur. LPO, PUFA'nın radikaller ile oksidasyonu sonucu başlar, zincir reaksiyonları şeklinde devam eder ve sonucunda MDA, 4-hidroksinoneal (HNA), alkoller, etan ve pentan oluşur. LPO sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar.

Linolenik ve araşidonik asit gibi ikiden daha fazla çift bağ içeren PUFA'nın peroksidasyonu sırasında, tiyobarbitirik asitle ölçülebilen MDA oluşmaktadır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik veya kantitatif bir belirleyicisi değildir, fakat LPO'nun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonunda oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da iyon geçirgenliğinin, enzim aktivitesinin ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerinin değişimiyle sonuçlanır. MDA bu özelliği nedeniyle DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri üzerinde genotoksik ve karsinojen etkilidir. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (38, 41).

2) Proteinler Üzerinde Etkileri: Proteinler serbest radikallerin etkilerine karşı, lipitlerden daha az hassastırlar ve etkilenme dereceleri aminoasit içeriklerine bağlıdır. Serbest radikal atağı sonucu proteinlerde aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Ayrıca bu yapısal değişiklikler, proteinin proteolize daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. Serbest radikaller, membran proteinleri ile de reaksiyona girerek bu proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalara neden olabilirler. Böylece enzim, nörotransmitter ve

reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını bozabilir, immün sistemi uyarabilecek antijenik değişikliklere de yol açabilirler (37, 41, 42).

3) Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri: ROTnin karbonhidratlar üzerine de etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak,  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  radikallerini meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. DM ve komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, göz hastalıkları, kanser, hipertansiyon, romatoid artrit, psöriazis ve yaşlılık gibi pek çok hastalıkta ve durumda serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan mekanizmaların yetersiz olduğu gösterilmiştir (37, 43).

4) DNA Üzerinde Etkileri: Serbest radikaller DNA üzerinde nükleik asit baz modifikasyonlarına, nokta mutasyonlara, DNA çift sarmalının açılmasına, depürinasyona, çapraz bağlanmalara neden olabilir. Bu etkilerin bir veya birden fazlasının meydana gelmesi, kromozomal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır.  $\cdot OH$  radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar; pürin ve pirimidin bazlarında mutasyonlara neden olur.  $^1O_2$  radikalinin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır ancak güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay reaksiyona girer.  $^1O_2$ in, DNA hasarına yol açan  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$ in geçiş metalleriyle reaksiyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (19, 44-47).

## 2.1.2 Antioksidanlar

Serbest radikal reaksiyonları nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (19). ROTnin yarılanma ömürleri kısadır fakat başlattıkları serbest radikal zincir reaksiyonları ile doku hasarına sebep olmaktadır. Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır (19).

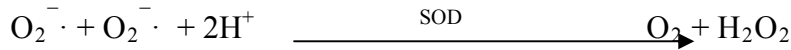
Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere 'antioksidanlar' denir (48). Enzimatik antioksidanlar SOD, KAT ve GSH-Px enzimleridir. SODın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Pxda ise

selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar (25, 27). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β-karoten sorumludur. SOD, GSH-Px ve KAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitamini de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir. Her ikisi de hücre membranlarındaki LPO zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (19, 40, 48).

### 2.1.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Antioksidan enzimlerin başlıcaları SOD, KAT ve GSH-Px'dir (48).

Süperoksit Dismutaz (SOD):  $O_2^-$  radikalinin  $H_2O_2$  ve  $O_2$  moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. Metalloprotein olan SOD, hücrelerdeki  $O_2^-$  düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir  $O_2^-$  radikalini yükseltirken, diğer  $O_2^-$  radikalini  $H_2O_2$ e indirger (49):



Memelilerde üç tip SOD izoenzimi tanımlanmıştır:

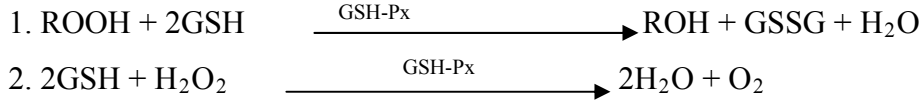
1. *Çinko-Bakır (Cu-Zn) SOD* : Genellikle sitozolde ve lizozomda lokalizedir. Bakır (Cu) ve çinko (Zn) atomları arasındaki köprü histaminle sağlanır. Cu atomları enzimatik aktiviteden sorumluyken, Zn atomları enzimin stabilitesinden sorumludur. Cu-Zn SOD'nin antioksidan savunmada ilk sırada yer aldığı düşünülmektedir (27).

2. *Manganez (Mn) SOD*: Mitokondriyal SOD olarak da ifade edilen Mn-SOD, bakterilerden yüksek yapıları organizmalara kadar birçok kaynaktan izole edilebilmiştir (50).

3. *Ekstraselüler SOD (EC-SOD)*: Ekstraselüler bölümlere salgılanan ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilen EC-SOD, Cu-Zn SOD gibi kofaktör olarak Zn ve Cu kullanır. EC-SOD'un  $ONOO^-$  aktivitesini önlediği düşünülmektedir (49).

SOD aktivitesi, yüksek  $O_2$  kullanımı olan dokularda, özellikle eritrositlerde fazladır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de SOD fazla miktarda bulunmaktadır (27, 49).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Glutasyon yolunun ilk enzimi olan GSH-Px, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (51).



GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldıracak özelliği gösterir (52).

GSH-Pxın selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere, farklı substratlar kullanan iki tipi bulunur. Selenyumdan bağımsız formu organik  $\text{H}_2\text{O}_2$  moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (51, 53).

Majör peroksit uzaklaştırıcı olarak görev gören GSH-Pxın fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Endoplazmik retikulumdan salınan  $\text{H}_2\text{O}_2$ in dekompozisyonunun primer sorumlusu olan GSH-Px aktivitesindeki azalma,  $\text{H}_2\text{O}_2$ in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır (51).

Ayrıca GSH-Px, araşidonik asit metabolizmasının iki temeli olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz yolların aktivasyonunu arttırarak, tümör oluşumunda anahtar rol oynar (51, 52).

Katalaz (KAT): Glikoprotein yapısında, içeriğinde  $\text{Fe}^{+3}$  bulduran dört hem grubuna ayrılmış bir hemoproteindir. SODın oluşturduğu  $\text{H}_2\text{O}_2$ in, peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalanmasında rol alır (49, 54).



KAT, hemen hemen tüm memeli hücrelerinde, ağırlıklı olarak eritrosit, karaciğer ve böbrekte bulunur. Kanserli dokularda, sağlıklı dokulara oranla daha yüksek miktarda bulunan KAT, özellikle  $\text{H}_2\text{O}_2$ in yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda etkilidir. Eritrositler, KAT aktivitesinin %98'inden fazlasını sağlamaktadır (49).



### 2.1.2.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon (GSH): Sistein içeren bir tripeptit olan GSH, in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve eksojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (55).

Ökaryotik hücrelerde GSHun yaklaşık %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride ve çok az bir kısmı da endoplazmik retikulumda bulunur. GSH oksidasyonu, apoptozis sürecinin erken dönemdeki belirtisidir ve metabolik sinyal görevi görebilir (55, 56).

DNA sentezi ve hasarlı parçalarının onarılmasında etkin olan GSH; aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur ve eksikliği hücre ölümüne yol açar (55, 57).

C Vitamini (Askorbik Asit): Suda eriyebilen bir vitamin olan askorbik asit;  $O_2$ , nitrat, sitokrom a ve c bileşiklerinin indirgenmesinde rol oynayabildiği gibi, sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptir. Oksidan ajanlara karşı plazmada ilk antioksidan savunma hattını oluşturur.  $O_2^-$  ve  $\cdot OH$  radikalleriyle reaksiyona girip, onları temizlemesinin yanısıra tokoferol radikalinin tekrar tokoferole dönüşümünü sağlar. Kollajen sentezinde, tirozin yıkımında, epinefrin sentezinde ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda görev alır. Ayrıca düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve kolesterolün oksidasyonunu önleyerek ateroskleroza karşı korumaya katkıda bulunur (58).

C vitamini yetersizliğinde hücredeki GSH miktarı da azalır. Plazma C vitamin düzeyleri özellikle 0.2 mmol/l düzeyinin altına indiğinde oksidan etki de gösterebilir, yine bu şartlarda  $O_2^-$  üretimine katkıda bulunabilir.

C vitamininin iki ana formu vardır:

1. L-askorbik asit: Güçlü indirgeyici ajandır.
2. L-dihidroaskorbik asit(DHAA): Okside formudur (58, 59).

E Vitamini: Alfa, beta, gama, delta gibi çeşitli formları olan E vitaminin  $\alpha$ -tokoferol formu, en geniş doğal dağılıma ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanıdır. Yağda çözünebildiği için hem selüler hem de subselüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur.

Membranlarda oksijen radikallerinin aktif temizleyici olan E vitamini; özellikle en aktif formu olan  $\alpha$ -tokoferol, zincir kırıcı antioksidan olarak işlev görür. Tokoferoller  $^1O_2$  ile reaksiyona girer ve membranı bu radikale karşı korur. Ayrıca A vitamini kullanımı ve

saklanması, diğeri bir antioksidan grup olan karotenoidlerin enzimatik oksidasyona karşı korunmasında da etkilidirler (59).

A Vitamini: A grubu vitaminler görme, üreme, büyüme ve epitel doku sağlamlılığı için esastır.  $\alpha$ -tokoferol ile karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır (58, 59).

Karotenoidler: Doğada 700'ün üzerinde yağda çözünebilen pigmente sahip bir aile olan karotenoidlerin yaklaşık 25 kadarı insanlar tarafından özellikle havuç, domates, greyfurt gibi gıdalarla alınmaktadır (60). Diyetin yağ miktarıyla ilişkili olarak % 5-50 kadarı ince bağırsakta pasif difüzyonla emilen karotenoidler, triplet molekülleri ve  $^1O_2$  radikalini süpürerek antioksidan aktivite gösterir (60, 61).

$\alpha$ -Lipoik Asit (LA): İnsanda normal bir diyetle yeterince alınabilen veya yeni baştan sentezlenebilen LA, antioksidan etki gösteren ve metal şelasyonu yapabilen bir kofaktör moleküldür. Çeşitli doku hücrelerinde redükte formu olan dihidrolipoik aside (DHDLA) çevrilir.

$\cdot OH$  radikalini ve hipokloröz asidi (HOCl) temizleyebilen LA,  $O_2^{\cdot -}$  ve ROO $\cdot$  radikale karşı zayıf etki gösterir ve orta düzey bir antioksidan olarak kabul edilir. İyi bir antioksidan olarak görülen DHDLA, GSHdan daha güçlü bir redüktandır; HOCl,  $\cdot OH$  ve ROO $\cdot$  bileşiklerini temizleyerek LPOnu önler.

LA ve DHDLA,  $Mn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  gibi geçiş metalleriyle stabil kompleksler oluşturup, biyolojik sistemleri tehdit eden ağır metalleri yok ederler. Ayrıca DHDLAın C vitamini, E vitamini, GSH ve ubikinonlar gibi antioksidanlar üzerinde, radikal veya okside formlarını indirgeyerek yenileme etkisi de bulunmaktadır (12, 59, 62).

Ubikinonlar (Redükte Koenzim Q): Yağda eriyen kinon türevleri olan ubikinonlar, ROO $\cdot$  ve lipit radikalleriyle reaksiyon verirler ve LPOnun erken dönemde inhibisyonunu sağlarlar (37, 59).

Ürik Asit: Normal düzeylerinde bulunduğu toksik reaktanlara karşı temizleyici etkinlik gösteren ürik asit, yüksek düzeylerde bulunduğu ise prooksidan nitelik kazanır.

Ürik asit suda çözünebildiği için, radikallerin tetiklediği LDL oksidasyonunu bastırır. Ayrıca biyolojik sıvılarda askorbik asidi stabilize eder (63).

Bilirubin: Yalnızca suda eriyen ve albumine bağlı bulunan bilirubin, LPOnun önlenmesinde rol oynar (58, 63).

Albumin: Önemli bir ekstraselüler antioksidan olan albumin; peroksinitröz asit, HOCl ve  $H_2O_2$  ile reaksiyon verir.  $Cu^{+2}$  bağlama yeteneğinden dolayı, bu iyonla bağlı LPOnu ve  $\cdot OH$  radikali oluşumunu baskılar. Hasara uğradığında hızla dolaşımdan uzaklaştırılır ve yerine yenisi dolaşıma salınır (64).

Transferrin: Demir taşıyıcı protein olan transferrin, plazmada serbest iyonik demiri bağlar. Böylece serbest  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonu varlığında  $O_2^- \cdot$  ve  $H_2O_2$  radikallerinin daha kuvvetli bir oksidan olan  $ROO \cdot$  radikaline dönüşümü baskılanmış olur. Transferrine bağlı kalan  $Fe^{+2}$ , LPOnu gerçekleştirmez (58, 59).

Seruloplazmin: Plazmada hem bakır hem de demir metabolizmasında rol oynayan seruloplazmin, ferooksidaz aktiviteyle demire bağlı LPO sürecini inhibe eder (58).

### **2.1.2.3 Antioksidanların Etki Mekanizmaları**

Antioksidan bileşiklerin etki şekli ve etkinlik düzeyi oldukça farklıdır. Antioksidanlar; ROT ve nitrojen türlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı/yenilenmesi ve metal şelasyonu gibi farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar. İdeal bir antioksidan bilinen bu etki şekillerinden çoğunu yerine getirebilir. Biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir (65).

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Süpürücü etki (Temizleme Etkisi) (Scavenging): ROTni etkileyerek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterir.
2. Bastırıcı etki (Baskılama Etkisi) (Quencher): Vitaminler, flavonoidler ve trimetazidin, radikallere bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya onları inaktif forma dönüştüren bir etkiye sahiptir.
3. Onarıcı etki (Onarma Etkisi) (Repair): Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.
4. Zincir kırıcı etki (Zincir Koparma Etkisi) (Chain breaking): Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller bu tip etki göstermektedir (65-67).

### 2.1.3 Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres

O<sub>2</sub>, bir hücrenin günlük aktivitelerini yerine getirebilmesi için gerekli enerjiyi sağlamakla sorumludur. Besin kaynakları, hücrenin enerji santrali olan mitokondrinin yapısındaki respiratuvar elektron iletim zincirindeki karmaşık enzimatik reaksiyon sürecinde oksidize edilirler, bir başka deyişle elektronlarını kaybederler. Bu süreçte en son elektron alıcısı O<sub>2</sub>dir ve bu elektron transferleri sırasında elde edilen enerji, kimyasal enerji formunda depolanır. Oksidatif fosforilasyon olarak ifade edilen bu reaksiyonlar zinciri sonucunda hücresel enerjinin kaynağı olan adenosin trifosfat (ATP) elde edilir. Bu reaksiyonların moleküler temeli, elektron alışverişidir.

Redoks (redüksiyon-oksidasyon reaksiyonu); atomların elektron konfigürasyonlarının, diğer bir ifadeyle oksidasyon durumlarının değiştiği tüm kimyasal reaksiyonların genel adıdır. Redoks kelimesi, redüksiyon ve oksidasyon terimlerinden köken alır:

Redüksiyon elektronların/hidrojenin kazancını veya oksijen kaybını; molekül, atom veya iyondaki oksidasyon durumunun azalışını ifade eder.

Oksidasyon elektronların/hidrojenin kaybını veya oksijen kazancını; molekül, atom veya iyondaki oksidasyon durumunun artışını ifade eder (37).

Çeşitli reaksiyonlarda hiçbir zaman aktif olarak bir elektron transferi olmaksızın da redoks tepkimesi gerçekleşebilir. Dolayısıyla oksidasyonu ‘oksidasyon sayısında artış’ ve redüksiyonu ‘oksidasyon sayısında azalış’ olarak ifade etmek mümkündür (68).

Her hücrede belli yapılar içinde depolanmış biçimde bir elektron konsantrasyonu bulunur, sıkı şekilde denetim altında olan ve normal hücresel işlevi belirleyen bu denge haline ‘redoks durumu’ denir. Asit-baz dengesinde olduğu gibi (pH), hücrenin redoks durumu normal şartlarda dar bir çerçeve içinde dengede tutulur. Hücre içi redoks homeostazi veya redoks tamponlaması, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarının ürünleri arasındaki dengeye dayalıdır (68).

Hücreler birbirleriyle ‘sinyal iletimi’ denilen biyolojik mekanizmalar aracılığıyla iletişim sağlarlar ve hücre dışı uyarılara cevap verirler. Sinyal iletimi, hücre dışından hücre içindeki birçok işlevsel yapıya bilgi taşınmasını sağlayan bir süreçtir. Hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler gibi hücre dışı sinyaller, sinyal iletimini tetikler. Sinyal iletim süreçleri kas kontraksiyonu, gen ekspresyonu, hücre büyümesi ve sinir iletimi gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri başlatır (69).

Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri ağırlıklı olarak hücre ve doku hasarı ile anılsa da, hücreler arası sinyallerin düzenlenmesi ve iletiminin birçok aşamasında fizyolojik olarak temel rol oynarlar. Hücrelerin, hücre büyümesi ve farklılaşmasında etkin olan sinyal ileti yollarının uyarılması ve devamlılıklarının sağlanmasında rol oynayan ROTni endojen olarak sentezledikleri bilinmektedir (19, 70).

IL-1 $\beta$ , IL-3, TNF- $\alpha$ , anjiyotensin II, platelet kaynaklı büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü, granülosit-makrofaj koloni-stimüle eden faktör ve fibroblast büyüme faktörü gibi sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve hormonların uyarısıyla birçok hücre tipinde düşük konsantrasyonlarda serbest radikal üretildiği belirlenmiştir. Buna göre; birçok sinyal ileti yolunun başlaması ve/veya doğru çalışmasının, bu yolların çeşitli aşamalarında ROTnin etkinliğine dayandığı ve bu moleküllerin ikincil mesaj taşıyıcı olarak fizyolojik olarak önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Oksidatif ürünlerin fizyolojik süreçlerdeki etkinliklerinde redoks homeostazını sağlamaya yönelik olarak, hücre içerisinde artmış olan serbest radikal seviyelerine karşı tiyoredoksin (TRX) ve GSH sistemleri devreye girerek oksidatif stres cevabını oluşturur. Böylece hücre ve dokuda ROT klirensi sağlanır, redoks dengesi korunur. Bu noktada oksidatif ürünlere karşı antioksidan aktivitenin dengeleyici rolü sadece moleküler reaksiyon mekanizmalarıyla sınırlı değildir. Bazı hücre sinyal ileti yollarının oksidanlara ve hücreyel redoks dengesine oldukça duyarlı olması; serbest radikallerin ve antioksidanların, hücrede fonksiyon düzenleyici enzim ve proteinlere yönelik gen ekspresyonunu regüle etmelerini gerektirir. Dolayısıyla antioksidanlar hücre büyümesi, gelişimi, farklılaşması ve fonksiyonunun önemli bileşenleridir (19, 62).

Serbest radikallerin ve antioksidanların üretilmeleri ve fizyolojik cevaplardaki düzenleyici rolleri, redoks homeostazını korumaya yönelik temel mekanizmalara bağlıdır ve birçok fizyolojik fonksiyon, redoks durumuna cevap veren ileti yolları aracılığıyla kontrol altında tutulur.

Redoks regülasyonu; oksidatif strese karşı korunum ve redoks homeostazının devamlılığının sağlanmasıdır. Birçok temel fizyolojik fonksiyon, NO ve ROT üretimlerinin ve sinyal ileti yolları üzerindeki etkilerinin düzenlenmesine dayalıdır. Bu temel fizyolojik fonksiyonlar:

#### A. Serbest radikallerin düzenli üretimleri

1. NOin düzenli üretimi
2. Fagositik NAD(P)H oksidaz ile ROT üretimi: Oksidatif patlama
3. Nonfagositik hücrelerde NAD(P)H oksidazlar ile ROT üretimi

4. Lenfositlerde 5-lipoksijenaz tarafından ROT üretimi

5. Siklooksijenazla ROT üretimi

B. Vasküler tonusun düzenlenmesi

C. O<sub>2</sub> konsantrasyonundaki değişiklikleri algılayan ROT üretimi: Ventilasyon kontrolü

D. Hücre adezyonunda redoks regülasyonu

E. İmmün cevabın redoks regülasyonu/amplifikasyonu

F. Programlı hücre ölümünde ROTnin rolü

1. Apoptozisin indüksiyonu ve gerçekleştirilmesi

2. NO-bağlı apoptozis

3. Tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )'nın indüklediği hücre ölümü

A. Serbest radikallerin düzenli üretimleri:

NO biyolojik dokularda nöronal, indüklenebilir ve endotelial olmak üzere üç izoformu bulunan spesifik nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından üretilir. Nöronal ve endotelial izoformlar daha çok intraselüler kalsiyum konsantrasyonuyla regüle edilirken, indüklenebilir izoformu ise lipopolisakkarit (LPS) , sitokin ve diğer ajanların uyarısına bağlı olarak makrofajlarda eksprese edilir (71).

Oksidatif patlama, enflamatuvar bir ortamda aşırı miktarda antimikrobiyal ve tümorisidal ROT üretimiyle karakterizedir ve çevresel patojenlere karşı savunmanın ilk hattında anahtar bir rol oynar. Enflamatuvar bir ortamda, aktive olmuş nötrofil ve makrofajlar yüksek miktarlarda O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikali ve NAD(P)H oksidazın fagositik izoformu aracılığıyla diğer ROTni üretirler. NAD(P)H oksidazın fizyolojik rolü bir savunma ajanı olarak hareket etmektedir. Stimüle olmuş nötrofil ve makrofajlar, NAD(P)H veya MPOın etkili olduğu reaksiyonlar aracılığıyla <sup>1</sup>O<sub>2</sub> radikalini üretirler (70).

Fibroblast, vasküler düz kas hücresi, kardiyak miyosit ve endotelial hücre gibi çeşitli tipteki nonfagositik hücreler, hücre içi sinyal iletim yollarını regüle etmek için NAD(P)H oksidaz aracılığıyla ROT üretirler. Nonfagositik hücreler, nötrofiller tarafından yapılan ROT üretiminin ancak 1/3'ünü üretebilirler. Nötrofil, endotelial hücre ve fibroblastlardan farklı olarak vasküler düz kas hücreleri O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalini temelde hücre içinde ürettiği için, kardiyak ve vasküler hücre fonksiyonlarında ROT çok önemli rol oynamaktadır (19, 70).

Lipoksijenazlar, spesifik lokasyonlarda PUFA moleküllerini oksidize eden dioksijenazlardır. Lenfositlerde ROT üretiminin indüklenebilir kaynaklarından biri olarak 5-lipoksijenaz enzimi tanımlanmış olsa da, redoks sinyal iletimindeki fizyolojik rolü netlik kazanmamıştır.

Prostanoid grubu enzimlerin formasyonundan sorumlu siklooksijenaz (COX) enziminin COX-1, COX-2 ve COX-3 olmak üzere bilinen üç izoformu vardır. TNF- $\alpha$ , interlökin-1 (IL-1) veya bakteriyel LPS ile stimüle edilmiş hücrelerde ROT üretiminde COX-1 enzimi rol oynamaktadır. Redoks sinyal iletiminde COX enziminin katkısıyla ilgili bulgular net değildir.

#### B. Vasküler tonusun düzenlenmesi:

Vasküler tonusun, protein kinaz yolu ve iyon kanalları gibi fizyolojik hedeflerin regülasyonunda siklik guanozinmonofosfat (cGMP) esas rol oynar. cGMP oluşmasını sağlayan reaksiyonu katalizleyen, solubl guanilat siklaz (sGC)'dır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NO radikalleri sGC aktivasyonunda etkilidir. Dolayısıyla, vasküler tonus regülasyonu ile platelet adezyonunun önlenmesinde bu radikaller anahtar rol oynar (70).

#### C. O<sub>2</sub> konsantrasyonundaki değişiklikleri algılayan ROT üretimi:

Yüksek organizmalarda kırmızı kan hücre kütlesi ile respiratuvar ventilasyonun sıkı regülasyonu neticesinde O<sub>2</sub> homeostazı sağlanır. O<sub>2</sub> konsantrasyonundaki değişikliklerin bağımsız olarak birçok farklı ROT üreten protein tarafından algılandığı düşünülmektedir. Ayrıca, mitokondriyal ROT oranındaki değişimin, arteriyel kan oksijenindeki değişiklikleri algılayan karotid cisimcikleri aracılığıyla, O<sub>2</sub> duyarlılığında rol oynayabileceği öne sürülmüştür (45).

#### D. Hücre adezyonunda redoks regülasyonu:

Hücre adezyonu embriyogenez, hücre büyümesi, farklılaşma, yara tamiri ve daha birçok farklı süreçte önemli rol oynar, dolayısıyla hücrelerin ve dokuların adeziv özellikleri sıkı bir redoks kontrolü altındadır. Bakteriyel LPSe ve TNF- $\alpha$ , IL-1 gibi birçok sitokine cevaben hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu uyarılır. Lökositlerin endotelial hücrelere adezyonun ise ROT tarafından, özellikle hücre içi kaynaklı  $\cdot$ OH radikalince indüklendiği gösterilmiştir (62).

#### E. İmmün cevabın redoks regülasyonu/amplifikasyonu:

Küçük miktarlardaki çevresel patojenler bile antijene duyarlı lenfositleri, kostimülatör sinyaller için reseptörleri ve çeşitli sitokinleri ilgilendirecek düzeyde immün cevaba neden olur. İmmün cevap, redoks regülasyonu altındadır; T lenfosit aktivasyonu, ROTnin etkisine veya hücre içi GSH, redoks durumundaki bir değişikliğe bağlı olarak belirgin bir biçimde artar. IL-2 üretimi gibi T-lenfosit fonksiyonları, fizyolojik olarak ilişkili düzeydeki O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarından indüklenebilir. Hücre içi redoks durumunun, makrofajlardaki immünolojik fonksiyonları da etkileyebildiğine dair kanıtlar vardır. Makrofajlardaki prostaglandin ve IL (IL-6, IL-12 gibi) salımının, hücre içindeki GSH

düzeyine bağılı olarak değişkenlik gösterdiği ve yardımcı T lenfositlerin oransal dengesini etkilediği bulgulanmıştır.

#### F. Programlı hücre ölümünde ROTnin rolü:

Programlı hücre ölümü (apoptozis) hem büyüme-gelişim hem de organizma bütünlüğüne yönelik tehdit içeren hücrelerin yok edilmesi için gereklidir. Bir hücrenin intihar etme kararı; devamlılık için gerekli pozitif sinyallerin (örneğin nöronlar için büyüme faktörleri gibi) geri çekilmesiyle, negatif sinyallerin (hücre içinde oksidan seviyelerinin artması, oksidatif DNA hasarı, radyasyon ve/veya kemoterapilerin zararlı etkileri gibi) alınması arasındaki dengeye dayalıdır. Mitokondriyal yolla yani hücre içerisinden tetiklenen apoptoziste, tetikleyici nedenlerden biri ROT olabilir.

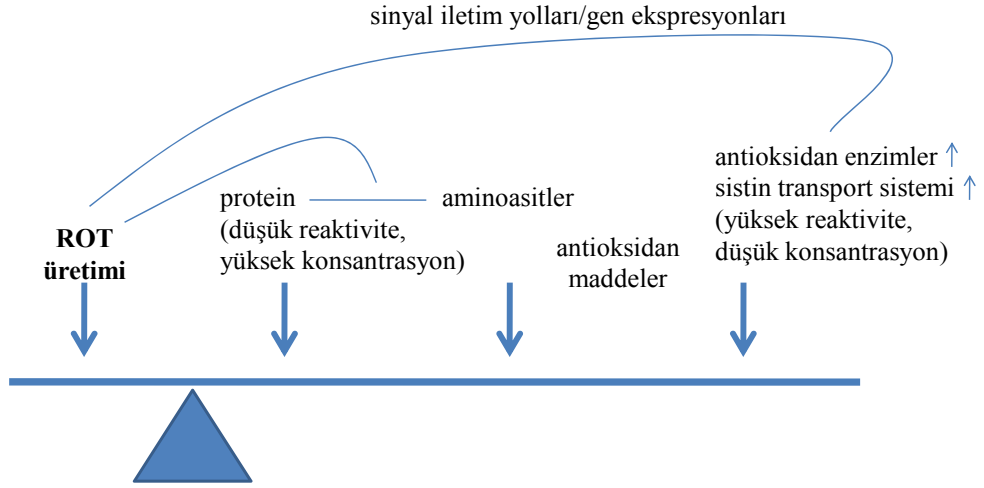
Birçok deneysel modelde ve belli klinik patolojilerde NO aktivitesine bağımlı apoptozis gözlemlenmiştir. Ancak, hücre içi GSH düzeyleri daha yüksek olan bazı tip hücrelerde özellikle NO etkinliğine bağılı ilerleyen apoptozise olan direncin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Lökosit ve fibroblastlarda TNF- $\alpha$  membran-bağılı NAD(P)H oksidazların aktivasyonu ile  $O_2^-$  radikalinin salınımı indükler. Bu süreç, ROT üreten hücrenin durumuna göre proliferasyonu veya hücre ölümünü tetikler (62, 72).

### **2.1.4 Patolojik Süreçlerde Oksidatif Stres**

Canlı hücre ve dokular, geçici olarak artmış serbest radikal konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında, redoks dengesini yeniden oluşturmaya yönelik birçok mekanizmayı çalıştırır. ROT üretim düzeyleri ile antioksidan kapasite sabit ve dengedeysen, hücre ve dokular stabil durumdadır (12) (Şekil 3). ROT seviyelerinin stabilitelerindeki devamlılık, ROT üretim düzeyleri ile temizleyici/süpürücü mekanizmaların etkisi arasındaki dengeye dayalıdır.

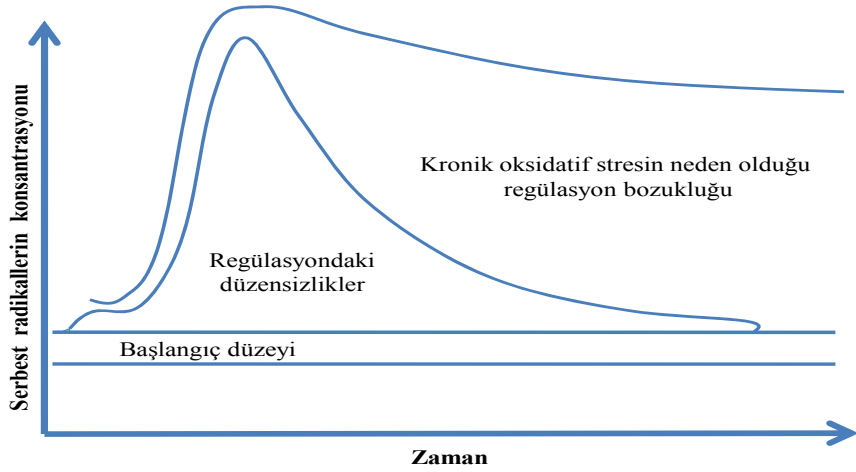




Şekil 3. Redoks homeostazının mekanizmaları

SOD, GSH-Px ve KAT gibi belli antioksidan enzimler etkili ROT temizleyicileridir, ancak hücrelerde sadece göreceli olarak düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Aynı durum, enzimatik olmayan antioksidanlar için de geçerlidir. Aminoasitler ve proteinler de ROT temizleyicisidir. Aminoasitler molarite bazında klasik antioksidanlardan daha az etkin olsalar da, hücre içi konsantrasyonları yüksektir (19).

Redoks sinyal iletiminin çalışması; bu denge durumunun, ROT konsantrasyonlarında artış veya bir veya daha fazla antioksidan sisteminin aktivitesinde azalmaya bağlı bozulmasını gerektirir. Yüksek organizmalarda bu tip oksidatif bir olay, endojen serbest radikal üretimi yapan sistemlerin kontrollü aktivasyonu ile düzenlenebilir. Diğer taraftan, çevresel faktörlerin oluşturduğu oksidatif stres şartları da benzer cevapların oluşmasını sağlayabilir. Eğer ROT düzeylerindeki ilk artış göreceli olarak düşükse, ROT artışını dengelemek için antioksidan cevap yeterli olacaktır. Dolayısıyla, redoks regülasyonunun fizyolojik belirtileri, hücre içinde oksidatif duruma doğru geçici bir artış ve değişiklik şeklindedir (Şekil 4). Uzun dönemde, bu mekanizmalar redoks homeostazı olarak adlandırılan stabil bir durum kazanmaya eğilim gösterir.



Şekil 4. Redoks dengesi

Belli şartlar altında ROT üretimi çok daha güçlüdür, antioksidan cevap ise redoks dengesinin yeniden oluşturulmasını sağlayamayabilir. Bu tip durumlarda sistem şekil 4'teki modele göre bir yarı-denge durumunu yakalayabilir, ancak bu durum daha yüksek ROT konsantrasyonları, farklı düzeylerde serbest aminoasitler ve/veya redoksa duyarlı sinyal ileti yollarına bağlı farklı gen ekspresyon tipleriyle ilişkilidir. Yaşlanma süreci, bu tip bir yarı denge süreci için iyi bir örnektir. Dolayısıyla, oksidatif yöndeki her öncül değişim, kesin bir patolojik süreç ve durumla ilişkilendirilemeyebilir (73).

Patolojik durumlar, çok şiddetli ve yüksek ROT üretim düzeyleri söz konusu olduğunda ortaya çıkabilir. Bu durumların gelişimi, bir homeostaz kaybından çok homeostaz seviyesinde kronik bir değişiklik ile ilgilidir. Buna göre, patolojik durumlar hem ROT üretiminin hasar verici etkilerinden hem de ROT'nin yönlendirdiği gen ekspresyonundaki değişikliklerden kaynaklanabilir. Oksidatif stresin birçok klinik durumda rol oynadığına dair bulgular gittikçe artmaktadır.

## 2.2 N-Metil-D-Aspartat (NMDA)

### 2.2.1 Glutamat Reseptörleri

Aspartat ve glutamat gibi eksitatör aminoasitler memeli santral sinir sisteminin ana nörotransmitterleridir. Beyinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar (glutamat 10 mmol/L ve aspartat 4 mmol/L). Sinir terminallerindeki sinaptik geçişi yönlendirir ve nöron içine iyon geçişini kontrol ederler.

Glutamat ve aspartat postsinaptik hücre yüzeyindeki etkilerini belirli reseptörlerle etkileşime girerek oluştururlar (74). Spinal motor nöronların kortikospinal motor nöronlara yaptığı sinapslarda major nörotransmitter glutamattır. Üst motor nöron eksitasyonu ile glutamat molekülleri sinaptik aralığa düşerler ve spinal motor nöronlardaki (postsinaptik) reseptör yerlerine giderek spinal motor nöronları depolarize ederler.

Memeli sinir sistemindeki eksitatör nörotransmisyonundan sorumlu başlıca reseptörler Glutamat reseptörleridir. Aynı zamanda öğrenme ve hafızanın temelinde yatan sinaptik iletinin verimliliğindeki plastik değişikliklerde ve büyüme esnasında sinir ağının oluşmasında da rol oynarlar. Glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonları ise santral nöronların ölümüyle sonuçlanır. Glutamat nörotoksitesisi değişik nörodejeneratif hastalıkların meydana gelmesinde de rol oynar. Bu yüzden Glutamat reseptörlerinin beyin fonksiyonlarının hem fizyolojisinde hem de patolojisinde yer aldığı söylenebilir.

Glutamat ailesinin amino asit dizilişi, Asetilkolin (Ach), GABA, ve glisin reseptörlerine benzerliği azdır. Glutamat ayrı bir ailenin üyesidir. Glutamat kontrollü kanallar dört alt üniteden oluşurlar. Her kanal alt ünitesi üç transmembran  $\alpha$ -heliksinden oluşmaktadır (75).

Glutamat reseptörleri, temelde postsinaptik membranda lokalizedir. Başlıca 2 tipi vardır.

I- İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluRs): Doğrudan iyon kanallarını kontrol eder.

II- Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluRs): İkinci haberciler üzerinden dolaylı olarak iyon kanallarını kontrol eder.

Presinaptik sinir terminallerinden salınan glutamat molekülleri iGluRs'e bağlandığında bir elektriksel olaya döndürülen kısa bir kimyasal sinyal meydana getirir. Postsinaptik depolarizasyonla sonuçlanan net bir iç akıma izin veren bir integral katyon seçici kanal içeren iGluRs 3 geniş gruba ayrılır :

1.  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozole propionat tercih eden reseptörler (AMPA)
2. Kainat tercih eden reseptörler (KAR)
3. N-metil D-aspartat tercih eden reseptörler (NMDAR)

Glutamat reseptör ailesinin iki üyesi olan AMPAR ve KAR özellikleri bakımından çok yakındırlar. NMDA reseptörü, diğer iki glutamat reseptörüne biraz daha farklıdır.

## II- Metabotropik glutamat reseptörleri

Trans-(1S, 3R) -1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit (ACPD) ile selektif olarak aktive olurlar. Glutamat, iGluRs'i üzerinden eksitasyon yaparken, metabotropik reseptörler üzerinden eksitasyon veya inhibisyon oluşturabilmektedir. İyonotropik glutamat reseptörlerinin çeşitliliği, elektrofizyolojik ve farmakolojik çalışmalarda umulandan daha da geniştir. Bugüne kadar memeli santral sinir sisteminde 16 adet iGluRs cDNA'sı ve 8 adet mGluRs cDNA'sı tanımlanmıştır. Şimdiye kadar izole edilen 16 adet iGluRs cDNA'sının;

- a. 4 tanesi AMPA reseptör altbirimi (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4),
- b. 5 tanesi kainat reseptör altbirimi (GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2)
- c. 7 tanesi NMDA reseptör altbirimidir (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A,

NR3B)

Glutamat reseptör genlerinin ekspresyonunu değiştirici birçok değişik teknik kullanılarak glutamat reseptörlerinin tüm fizyolojisi ve patolojisi son yıllarda geniş bir şekilde araştırılmaktadır (76).

## 2.2.2. NMDA Reseptör Tipleri

NMDAR' lerinin şu ana kadar tanımlanan yedi tane subuniti vardır. Bunlar; NR1, NR2A-B-C-D ve NR3A-B. NMDAR'leri beynin tümünde yaygın olarak bulunmaktadırlar ancak baskın olarak ön beyine lokalize olmuşlardır. En yüksek düzeyde buldukları yer ise hipokampusun CA1 bölgesidir (77).

NR1: Glisin bağlayıcı bölgeyi içerir. 938 aminoasitten'ten meydana gelmiştir. 105,5 kDA ağırlığındadır. NR1 reseptör subunit ekspresyonu MSS'de hemen hemen her yerde bulunmaktadır.

NR2: Glutamat bağlayıcı bölgeyi içerir. 4 grubu bulunur:

NR2A: Beyinde postnatal eksprese edilir. 1464 aminoasitten meydana gelir ve 165,5 kDA ağırlığındadır. Ekspresyonu için yüzeyde NR1 N-terminalinin bulunması gereklidir. NR2A mRNA'sı tüm beyinde yaygın olarak bulunur; fakat serebral korteks, hipokampus ve serebellumda daha yoğun olarak bulunmaktadır.

NR2B: Tüm embriyonik beyinde eksprese edilir. Ayrıca embriyonik ve neonatal kardiyak miyositlerde eksprese edilir. Postnatal olarak yalnız ön beyinde eksprese edilir. 1482 aminoasitten oluşur ve ağırlığı 165,9 kDA'dır. NR2B'nin ekspresyonu önbeyinde, serebral korteks, hipokampus, septum, kaudat ve putamende seçici olarak yüksek düzeyde bulunmaktadır.

NR2C: Postnatal olarak cerebellumda eksprese edilir. 1239 aminoasitten oluşur ve 135,4 kDA ağırlığındadır. NR2C'nin ekspresyonu ise serebellumda dominant olarak bulunurken, talamusda ve olfaktör bulbusda daha az olarak bulunmaktadır.

NR2D: Diencephalon ve beyinsapında embriyonal ve neonatal olarak eksprese edilir. 1323 aminoasitten oluşur, 142,9 kDA ağırlığındadır. NR2D'nin ekspresyonu ortabeyin ve arkabeyinde yüksek iken; düşük düzeyleri talamusda, olfaktör bulbusda ve beyin sapında bulunmaktadır. NR2A ekspresyonunun tamamlayıcıdır.

NR3: Silik fonksiyon gösterir. NR3A ve NR3B olarak iki tiptir.  $Ca^{+2}$  permeabilitesi yavaş ve uzun sürer. NR3A; Serebellum hariç korteks, hipokampus (CA1), ortabeyin, arkabeyin ve spinal kordda eksprese edilir. Neonatal ekspresyonları çok güçlüdür, sonra azalmaya başlamaktadır (78,79).

### **2.2.3. NMDA'nın Yapısı**

İyonotropik glutamat reseptörleri üzerinde en çok çalışılan ve bilgi sahibi olunan reseptör kompleksi NMDA reseptörleridir. Monovalan katyonlara ek olarak,  $Ca^{+2}$  iyonunun

da hücre membranından geçişini sağlar. Diğer İyonotropik reseptörlere kıyasla  $Ca^{+2}$ 'a karşı en az 5 kez daha fazla geçirgen olduğu gösterilmiştir (80).

Santral sinir sistemine yaygın olarak dağılmıştır. Duyusal ileti ve iletinin integrasyonu ile motor fonksiyon ve aktivitenin koordinasyonu ve programlamasında yer alır (81). Bu reseptör başlıca 6 bölge içerir:

1. NMDA ve diğer agonist tanıma bölgesi: NMDA, glutamat ve diğer agonistler ile reaksiyona girer. Reseptör içindeki iyon kanalının açılmasını sağlayarak normal eksitator etkinin oluşmasını sağlar. Stimülasyonun sürmesi halinde ise patolojik eksitotoksik etki ortaya çıkar. Kompetitif eksitator aminoasid antagonistleri buraya yapışmak için glutamatla yarışır (82).

2. Katyon bağlanma bölgesi: Kanal içinde yer alır, buraya  $Mg^{+2}$  bağlanır ve membran boyunca olan iyon akımını bloke eder.  $Mg^{+2}$ 'un etkisi agonist ve voltaj bağımlıdır. Yani iyon kapısı olarak işleyen reseptörü istirahat membran potansiyeli (-70mV) durumunda bloke eder. Reseptörün tekrarlayan, uzun süreli uyarılarda (NMDA tanıma bölgesine sürekli bağlanan agonistlerin varlığında) depolarize edilmeye başladığı ve membran potansiyeli -30 mV düzeylerine ulaştığı zaman  $Mg^{+2}$ 'un etkisi kaybolarak iyon kapısı açılır (82).

3. Glisin bağlanma bölgesi; Santral sinir sisteminde inhibitör nörotransmitter olarak çalışan glisin, paradoksal olarak NMDA reseptörünün etkinliğini, dolayısıyla da eksitator iletiyi güçlendirir (82).

4. Poliamin bağlanma bölgesi; endojen poliaminlerden spermin ve spermidinin bağlanma yeri olan bu bölgenin işlevi, glisin gibi reseptörün aracılık ettiği yanıtı arttırmaktır. Buna karşılık her iki bölge de normal durumlarda tam olarak aktif değildir (82).

5. Çinko bağlanma bölgesi; Bu bölge inhibitör etki gösterir.  $Zn^{+2}$  blokajı da voltaj bağımlıdır (83).

6. Kanal antagonist bağlanma bölgesi; Reseptör kanal kompleksinin alt bölümünde yer alır. Eksitotoksik etkiyi antagonize edebilecek farmakolojik manüplasyonlara açık bir bölgedir. Bu bölgeye bağlanacak antagonistin bağlanma yerine ulaşabilmesi için kanalın açık olması, yani reseptörün NMDA, glutamat veya benzeri agonistlerce uyarılmış ve magnezyumun kanal kapatıcı etkisinin ortadan kaldırılmış olması gerekmektedir. Bu etki agonist bağımlı olmakla birlikte nonkompetitiftir. Yani bağlanma yeri için agonistlerle yarışmaz, aksine onların açtığı kanala girerek kanalın kapanmasını sağlar. Postsinaptik membran reseptörünün uyarılması arttıkça bu bölgeye yapışan non-kompetitif antagonistlerin etkinliği de artar (84). NMDA reseptörleri üzerindeki yoğun çalışmalar yakın zamanda birçok altbirimin de ortaya konulmasını sağlamıştır. Bu altbirimler değişik beyin bölgelerinde daha

yoğun konsantrasyonlarda yer almakta ve canlının gelişim evresine göre de farklılıklar gösterebilmektedir. Birçok olguda iGluRs altbirimleri değişik laboratuvarlar tarafından ayrı ayrı ve de eş zamanlı olarak klonlandığı için benzer altbirimlere her biri farklı isimler vermişler.

#### 2.2.4. NMDA'nın Fizyolojisi

NMDA reseptör kanallarının üç özelliği vardır:

1- Yüksek iletkenliğe sahip iyon kanallarını kontrol ederler (50 pS) ve  $\text{Na}^+$  ile  $\text{K}^+$ 'un yanısıra  $\text{Ca}^{+2}$ 'a da geçirgendirler.

2- Kanalin açılması, ko-faktör olarak glisin ekstrasellüler olarak bulunmasına bağımlıdır. Kanal sadece glisin varlığında çalışır. Normal koşullarda ekstrasellüler glisin yoğunluğu NMDAR kanalının çalışabileceği miktarlarda bulunmaktadır.

3- Açılması kimyasal haberciye bağlı olduğu kadar membran potansiyeline de bağlıdır. Bu, NMDAR'nü diğer voltaj kontrollü kanallardan ayıran bir özelliktir.

Voltaja bağımlılık diğer kanallarda olmayan farklı bir mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Diğer kanallarda membran potansiyelindeki değişiklikler, intrinsek voltaj sensörü sayesinde kanalda konformasyonel değişikliklere neden olurken, NMDA ile aktive olan kanalda ekstrinsek bloker olan  $\text{Mg}^{+2}$  (ekstrasellüler  $\text{Mg}^{+2}$ ) açık olan kanalı kapayan bir tıkaç gibi davranır ve iyon akışına engel olur.  $\text{Mg}^{+2}$  istirahat membran potansiyelinde (-65 mV) de kanala sıkıca bağlanır. Ancak membran depolarize olduğunda (sözelimi, non-NMDA reseptörleri glutamat ile aktive olduğunda),  $\text{Mg}^{+2}$  elektrostatik etkiyle kanaldan uzaklaştırılır ve  $\text{Na}^+$  ile  $\text{Ca}^{+2}$ 'un geçişine izin verir. Bu nedenle NMDA reseptörlerinde en yüksek iyon akımı her iki koşulun da gerçekleştiği zaman ortaya çıkar.

Birçok hücrede hem non-NMDA hem de NMDA reseptörü bulunmaktadır.  $\text{Mg}^{+2}$  istirahat membran potansiyelinde NMDA reseptör kanalını bloke ettiği için eksitator post-sinaptik potansiyelin (EPSP) oluşmasında önemli bir katkısı yoktur.

Bu nedenle istirahat durumunda oluşan EPSP'lerde büyük oranlarda non-NMDA reseptörlerinin katkısı bulunmaktadır. Depolarizasyon arttıkça  $\text{Mg}^{+2}$  NMDA reseptör

kanalından uzaklaşır ve daha çok NMDA reseptörü açılarak bu kanallardan iyon akışı gerçekleşir.

NMDA reseptör kanalının diğer bir farkı, göreceli olarak daha yavaş açılıp daha yavaş kapanması ve bu özelliği nedeniyle EPSP'lerin geç fazına katkıda bulunmalarıdır. EPSP'nin geç fazı,  $Mg^{+2}$  'un kanalı bloke etmesi nedeniyle tek bir presinaptik sinyalden sonra zayıf bir yanıt olarak karşımıza çıkar. Oysa presinaptik nöron ard arda sinyaller gönderirse postsinaptik hücrede EPSP'ler toplanarak 20 mV veya daha fazla bir depolarizasyon oluşturur. Bu durumda NMDA reseptörü büyük ölçüde  $Ca^{+2}$ 'un katkısı ile daha büyük akımlara yol açar. NMDA reseptörünün aktivasyonu sonucu post-sinaptik hücrelerde, kalsiyuma bağımlı enzimler ve bazı ikinci haberciler devreye girer. Bu biyokimyasal reaksiyonlar, sinapta bazı uzun vadeli modifikasyonlara katkıda bulunan sinyal yollarını tetikler. Öğrenme ve bellekte, sinapta gerçekleşen değişikliklerin önemli olduğu düşünülmektedir.

NMDA reseptörünün aktivasyonu presinaptik aktiviteye bağlı olduğu ve uzun süreli sinaptik modifikasyonlar ile ortaya çıktığı için, çoğu kez bu duruma aktiviteye bağımlı sinaptik modifikasyonlar denilmektedir (85).

Bazı koşullar altında glutamat gibi eksitatör transmitterlerin dengesizliği, hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Yüksek miktarlarda glutamat nöronlar için toksiktir. Beyindeki birçok hücrede L-glutamata yanıt veren reseptörler bulunmaktadır. Doku kültürlerinde ortama yüksek düzeyde glutamat eklenmesi birçok nöronu öldürmektedir, buna glutamat eksitotoksitesisi adı verilmektedir. Birçok hücrede bu tür toksisitede, NMDA reseptörlerinden  $Ca^{+2}$ 'un hücre içine girişi sorumlu tutulmaktadır. Yüksek intraselüler  $Ca^{+2}$ , kalsiyuma bağlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücreye toksik olan serbest radikallerin oluşmasına yolaçmaktadır. İnme sonrası hücre hasarından, status epilepsisinde tekrarlayan episodlarda ortaya çıkan hücre ölümünden, Huntington hastalığı gibi dejeneratif hastalıklarda glutamat toksisitesinin payı olduğu düşünülmektedir. Spesifik NMDA reseptör blokerleri, glutamatın toksik etkisini engelleyebilmesi nedeniyle bugün kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır.



### 2.2.5. NMDA ve Alkol Bağımlılığı

Bağımlılıkta, glutamaterjik nörotransmisyon sinaptik plastisitenin oluşumunda önemli bir role sahiptir. Dentritlerde, NMDA reseptörlerindeki kalsiyum akımı da kalsiyuma bağlı sinyal yollarını kullanarak sinaptik plastisiteye önemli katkı sağlamaktadır. İnsanlarda davranışsal etkiler oluşturan konsantrasyonlardaki akut etanolun, NMDA reseptörleri aracılığı ile olan kalsiyum akımını inhibe ettiği ve kalsiyuma bağlı sinyal yollarını değiştirdiği bilinmektedir. Tam tersine, etanole tolerans NMDA reseptörlerindeki aşırı duyarlılıkla ilişkilidir ve etanolun kesilmesi ile artmış kalsiyum akımı gözlenmiştir. Etanolun inhibitör GABAerjik nörotransmisyonu üzerine olan bilinen etkileri ile birlikte, etanol muhtemelen NMDA reseptörleri yolu ile beyinde sinaptik plastisiteyi etkilemektedir. Uzun dönemde etanole bağlı oluşan beyin fonksiyonlarındaki değişimlerin altında NMDA ile ilişkili sinaptik plastisite yatıyor olabilir (86).

Etanol NMDA reseptörlerini ve fosforilizasyon durumunu değiştirmek suretiyle NMDA kanal aktivitesini inhibe etmektedir (87). GABA'nın artan inhibisyonu sonucunda glutamat salınımında azalma olmakta ve etanolun doğrudan inhibe edici etkisi ile birlikte NMDA reseptör fonksiyonlarında önemli bir düşme meydana gelmektedir. NMDA yolu ile oluşan kalsiyum akımındaki azalmanın sinaptik plastisite üzerinde önemli etkileri vardır (86).

Sürekli etanol tüketimi etanole bağımlılığın oluşmasına ve bırakıldığında da yoksunluk sendromunun oluşmasına sebep olmaktadır. Merkezi sinir sisteminin aşırı uyarılmışlığı etanol yoksunluğunun bir özelliğidir ve etanole karşı gelişen toleransın ve fiziksel bağımlılığın uyumsal cevapların altında, kısmen de olsa, glutamaterjik sistemdeki nöroadaptif değişimler bulunmaktadır (88).

## 2.3. Alkol Bağımlılığı

### 2.3.1. Alkol Bağımlılığının Tanımı ve Sınıflandırması

Alkol bağımlılığı; bireyin beden ve ruh sağlığını, ailevi, toplumsal ve mesleki uyumunu bozacak derecede sık ve fazla alkol alma ve alkol alma isteğini durduramaması olarak tanımlanabilir (1).

Alkol bilinen en eski psikoaktif ajanlardan biri olup, alkol kullanımı ile ilgili sorunlar eski çağlara dek uzanmaktadır. Hipokrat'dan başlayarak pek çok hekim alkollü içkilerin insan sağlığına olan zararlı etkilerinden söz etmişlerdir. Ancak alkol bağımlılığının tıbbi bir sorun olarak kabul edilmesi son yüzelli yıla dayanmaktadır (5).

19. yüzyılın başlarında bir grup klinisyen alkol bağımlılığını bir hastalık kavramı içinde ele almaya başlamıştır. Bruhl-Cramer 1819' da alkol arayışı ve dipsomani kavramları üzerinde durmuştur. Esquinol 1845' te sarhoşluk kavramını psikiyatrik terminolojiye kazandırmıştır.

Huss 1849' da ilk kez "alkolizm" terimini kullanmıştır.

19. yüzyılın diğer yarısında ise Carpenter (1850), Crothers (1893) ve Kerr (1888) alkol kullanımı ile ilgili sorunları günümüzdeki bağımlılık kavramına benzer bir bağlamda ele almaya başlamışlardır.

Alkol bağımlılığının hastalık kavramı içinde değerlendirilmesi bu tarihlere dayanırken sınıflandırma sistemlerine dahil edilmesi 20. yüzyılın ilk yarısına tekabül etmektedir.

Kraepelin, kronik alkol kullanımına bağlı organik bozukluklara yer verdiği Psikiyatri Kitabı'nda, (1909–1915) intoksikasyon psikozunu, major bir kategori olarak sınıflayan ilk isimdir (89).

Jellinek 1960 yılında alkolizmi; bireye veya topluma ayrı ayrı ya da her ikisine birden zarar verebilecek derecede alkol kullanma alışkanlığı olarak tanımlamış ve bu tanım içine giren alkolik hastaları 5 gruba ayırmıştır. (Alfa, beta, gama, delta ve epsilon alkolizm )

Jellinek'in tanımlamalarını izleyerek 1969 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), alkol bağımlılığını "Bir kişi tarafından alkolün kendi kültüründeki sınırları aşacak ya da kendi sağlığını ve toplumsal ilişkilerini bozacak kadar kullanılması" olarak tanımlamıştır. (5)

Bağımlılık ile ilişkili bozuklukların ayrı bir sınıflandırma grubu olarak kabul edilmesi DSM-III (1980) ile olmuştur. DSM-III'te “kötüye kullanım” ve “farmakolojik bağımlılık” ayrı tanı grupları olarak kullanılmıştır.

DSM-III-R'de davranışa dayalı bağımlılık özellikleri daha ayrıntılı olarak tanımlanmış, bağımlılık tanısı koymak için fizyolojik bağımlılık koşulu aranmasından vazgeçilmiştir.

DSM-IV' te ise tabloya fizyolojik bağımlılığın eşlik edip etmediğinin belirtilmesi zorunlu kılınmış ve DSM-III' te bağımlılığın tamamen düzelmesi için geçmesi gereken süre 6 ayken DSM-IV'te bu süre 1 yıla uzatılmıştır (5,89).

### **2.3.1.1. Alkol Bağımlılığı İçin DSM-IV Tanı Ölçütleri**

12 aylık bir dönem içinde herhangi bir zaman ortaya çıkan, aşağıdakilerden üçü (ya da daha fazlası) ile kendini gösteren, klinik olarak belirgin bir bozulmaya ya da sıkıntıya yol açan uygunsuz bir alkol kullanımı örüntüsü:

1. Aşağıdakilerden biri ile tanımlandığı üzere tolerans gelişmiş olması:
  - a. Entoksikasyon ya da istenen etkiyi sağlamak için belirgin olarak artmış miktarlarda alkol kullanma gereksinimleri
  - b. Sürekli olarak aynı miktarda alkol kullanılması ile belirgin olarak azalmış etki sağlanması
2. Aşağıdakilerden biri ile tanımlandığı üzere yoksunluk gelişmiş olması:
  - a. Alkole özgü yoksunluk sendromu
  - b. Yoksunluk semptomlarından kurtulmak ya da kaçınmak için aynı madde ( ya da yakın benzeri) alınır
3. Alkol çoğu kez tasarlandığından daha yüksek miktarlarda ya da daha uzun bir dönem süresince alınır
4. Alkol kullanımını bırakmak ya da denetim altına almak için sürekli bir istek ya da boşa çıkan çabalar vardır
5. Alkolü sağlamak, alkol kullanmak ya da alkolün etkilerinden kurtulmak için çok fazla zaman harcama

6. Alkol kullanımı yüzünden önemli toplumsal, mesleki etkinlikler ya da boş zamanları değerlendirme etkinlikleri bırakılır ya da azaltılır

7. Alkolün neden olmuş ya da alevlendirmiş olabileceği, sürekli olarak var olan ya da yineleyici biçimde ortaya çıkan fizik ya da psikolojik bir sorunun olduğu bilinmesine karşın madde kullanımı sürdürülür ( alkol kullanımı ile kötüleştiğini bildiği ülseri olmasına karşın içmeyi sürdürme)

Varsa Belirtiniz:

Fizyolojik Bağımlılık Gösteren: Tolerans ya da yoksunluğun kanıtı vardır (yani ya birinci ya da ikinci madde vardır)

Fizyolojik Bağımlılık Göstermeyen: Tolerans ya da yoksunluğun kanıtı yoktur (yani ne birinci ne de ikinci madde vardır) (90).

### **2.3.1.2. Alkol Bağımlılığı İçin ICD- 10 Tanı Ölçütleri**

Aşağıdaki kriterlerden en az üçünün son bir yıl içinde bulunması:

- Alkol içmek için güçlü bir istek olması
- Alkol arama davranışını denetlemede güçlük (alınan alkol miktarını ayarlayamama, kullanım süresini ayarlayamama ve başarısızlıkla sonlanan bırakma girişimleri)
- Alkol kullanımı azaltıldığında ya da bırakıldığında tipik yoksunluk belirtilerinin ortaya çıkması
- Alkol ile gerekli iyilik halini elde etmek için (rahatlık, sarhoşluk, keyif) gittikçe artan miktarlarda alkole gereksinim duyma (tolerans gelişimi)
- Alkolü elde etmek, kullanmak ve etkilerini gizlemek için harcanan çabanın, diğer ilgi ve uğraşlara yer vermeyecek şekilde giderek artması
- Aşırı alkol kullanımı nedeniyle ruhsal, sosyal, fiziksel zararlar ortaya çıkmış olmasına rağmen alkol kullanımını sürdürme (91).

### **2.3.1.3. DSM-IV Sınıflamasına Göre Alkol Kullanım Bozuklukları**

Alkol Bağımlılığı

Alkol Kötüye Kullanımı

DSM-IV sınıflamasına göre alkol kullanımının yol açtığı bozukluklar:

Alkol İntoksikasyonu

Alkol Yoksunluğu

Alkol Yoksunluğu Deliryumu

Alkol Kullanımına Bağlı Kalıcı Demans

Alkol Kullanımına Bağlı Amnestik Bozukluk

Alkol Kullanımına Bağlı Sanrılarla Giden Bozukluk

Alkol Kullanımına Bağlı Halüsinasyonlarla Giden Psikotik Bozukluk

Alkol Kullanımına Bağlı Duygu Durumu Bozuklukları

Alkol Kullanımına Bağlı Anksiyete Bozuklukları

Alkol Kullanımına Bağlı Seksüel Disfonksiyon

Alkol Kullanımına Bağlı Uyku Bozuklukları

Alkolle İlişkili Başka Türlü Adlandırılmayan Bozukluklar (90).

### **2.3.1.4. ICD- 10 Sınıflamasına Göre Alkol Kullanım Bozuklukları**

Zararlı Kullanım

Bağımlılık Sendromu

Yoksunluk Durumu (Deliryumla birlikte)

Psikotik Bozukluk

Amnezik Sendrom

Kalıntı ve Geç Başlayan Psikotik Bozukluk

Başka Ruhsal ve Davranışsal Bozukluk

Belirlenmemiş Ruhsal ve Davranışsal Bozukluk (91).

### 2.3.2. Alkol Bağımlılığının Epidemiyolojisi

Aşırı alkol kullanımı ve alkolle ilişkili sorunlar tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Alkol bağımlılığı önemli morbidite ve mortalite nedenleri arasındadır (6).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünyada 2 milyar kişinin alkol kullandığını, 76,3 milyon kişide alkol kullanım bozukluğu olduğunu öngörmektedir (92). Halk sağlığı açısından dünyanın birçok yerinde alkol tüketimi ile ilişkili global yük (mortalite ve morbidite bağlamında) önemli boyutlardadır. Global olarak alkol tüketimi ölümlerin %3,2'sine (1,8 milyon), kaybedilen DALY'lerin (Disability-Adjusted Life Years; yetersizliğe göre düzeltilmiş yaşam yılları) %4,0'üne (58,3 milyon) neden olmaktadır. Alkolden kaynaklanan yük tütünden daha fazladır, çünkü alkol sorunları yaşamın daha erken dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. Alkol tüketimi ile 60'dan fazla hastalık ve yaralanmalar arasında nedensel ilişki bilinmektedir. Alkol tüketimi 1999 yılında sadece Avrupa'da 15–29 yaşlar arasındaki gençlerde 55 000'in üzerinde ölüme neden olmuştur. Uzun süreli alkol kullanımının olumsuz sağlık sonuçları yaşamın geç dönemlerine dek ölüm ya da yetersizliğe neden olmasa da, alkol kullanımına bağlı amaçlı ya da amaçsız yaralanmaları içeren akut sonuçlar gençler arasında daha yaygındır. Birçok akut ve kronik sağlık etkilerinin yanı sıra, alkol tüketimi geniş sosyal, mental ve emosyonel sorunlara neden olmaktadır. Bu sorunlar iş yerinde devamsızlık, ilişkilerde istismar şeklinde de görülmektedir (6).

Ekonomik gelişme düzeyi ve din alkol tüketiminde en etkili belirleyicilerdir (93). Büyük oranda müslüman olan Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki içme miktarının düşük olması alkol tüketim düzeyi ve biçiminde dinin rolünü göstermektedir. Alkol kullanımının dinle ilişkisi çalışmalarda gösterilmiştir (6).

Ülkemizde 2000 yılından sonra lise ve üniversite öğrencilerinde yapılan çalışmalarda yaşam boyu alkol kullanım oranı %46,1-%71,2 arasında bildirilmiştir. Ülkemizde alkol kullanımını prevalansının %31,4-%90,0 arasında bildirilen diğer ülkelere göre daha düşük olduğu görülmektedir. Alkol kullanımının düşük olmasında İslam'ın etkisinin, alkol kullanımının günlük yaşamın bir parçası olmamasının, genellikle sosyal ortamlarda alkol içilmesinin ya da sosyal baskı nedeniyle az bildirim etkili olabileceği düşünülmüştür. Ülkemizde erkekler kadınlara göre daha fazla içme, daha fazla oranda ağır içici olma ve alkolle ilişkili sorunlar yaşama eğilimindedirler (6,94).

### **2.3.3. Alkol Bağımlılığı Etiyolojisi**

Aşırı alkol kullanımına hangi nedenlerin yol açtığı sorusu, eski yıllardan beri kuramcıların ilgisini çekmiştir. Bugüne kadar bu konuda, biyolojik, davranışsal ve sosyal bilim alanlarında birçok kuram ve görüş ortaya atılmış, zengin bir literatür ortaya çıkmıştır. Buna rağmen, bugün üzerinde en çok anlaşma sağlanmış olan yaklaşım, alkolizmi etiyojisinde çok etkenin rol oynadığı bir bozukluk olarak gören yaklaşımdır (95).

### **2.3.4. Alkolün Özellikleri ve Metabolizması**

Alkollü içkilerde etil alkol (etanol) bulunmaktadır. Alkol, meyve ve tahıllardaki karbonhidratların fermantasyonu sonucu oluşmaktadır; moleküler ağırlığı küçüktür ve bu yüzden hücre zarından kolayca geçebilir. Midenin boş veya dolu olmasına bağlı olarak alınan alkolün %10'u mideden, geri kalanı ise ince barsaktan emilir. Kandaki pik konsantrasyonuna 30–90 dakikada ulaşır. Pik kan konsantrasyonuna ulaşma zamanını etkileyen bir etken de alkolün alınma süresidir.

Emilen alkolün %90'ı karaciğerde oksidasyonla metabolize edilir, %10'u ise böbrek ve akciğerler yoluyla atılır. Karaciğerdeki oksidasyon hızı sabit olup bedenin enerji gereksinmelerinden bağımsızdır. Sağlıklı bir organizma, saatte 15 mg/dlt alkolü metabolize edebilir. Alkol, iki enzimle metabolize edilir. Bunlar alkol dehidrogenaz ve aldehit dehidrogenazdır. Alkol dehidrogenaz enzimi, alkolün toksik bir bileşik olan asetaldehite dönüşümünü katalize eder. Aldehit dehidrogenaz ise asetaldehitin, asetik asite dönüşümünü katalizler (95).

### 2.3.5. Alkol Bağımlılığının Tedavisi

Alkol bağımlılığında tedavi seçimi bireyin genel tıbbi ve psikolojik değerlendirmesine göre yapılır. Alkol yoksunluğunda detoksifikasyon yapılmalı ve klinik açıdan yakından izlenmelidir. Detoksifikasyon sonrasında kişi tedavisine ayaktan devam edebilir.

Yoksunluk nöbetleri veya delirium tremens öyküsü olan, çok fazla miktarda alkol kullanan ve ayaktan tedaviden fayda görmeyen hastalar; komplike bir yoksunluk sendromu, diğer madde kötüye kullanımları, komorbid tıbbi/psikiyatrik hastalıklar açısından risk altında olduklarından yatarak tedavi edilmelidir.

Yatarak detoksifikasyon tedavisi için belirlenmiş optimal gün sayısı olmamasına karşın genellikle 28 günlük tedavi süresi tercih edilir. Bununla birlikte kronik hastalık öyküsü olanlarda 28 gün kısadır.

1)İntoksikasyon Tedavisi: Akut intoksikasyon durumlarında kişinin kendini güvende hissedeceği, dış uyarandan uzak, sakin bir ortam sağlanmalı ve hasta monitörize edilmelidir. Bol hidrasyon ve beslenme esansiyeldir. Genel tıbbi ve mental durumunun, madde kullanım öyküsünün ve ilişkili sosyal problemlerin sorgulanması önemlidir. Ek madde kullanımlarında klinik gidiş daha komplike hale gelir. Uzun süreli ve fazla miktarda alkol kullananlar veya yoksunluk semptomu öyküsü olanlar hospitalize edilmelidir.

2)Yoksunluk Semptomları Tedavisi: Alkol yoksunluğu tedavisindeki iki ana hedef detoksifikasyonu sağlamak ve hastanın motivasyonunu arttırmaktır. DSM-IV TR'ye göre hafif-orta düzey alkol yoksunluğu sendromu yoğun alkol alımını azaltmayı/bırakmayı takiben birkaç saat içinde başlar.

Benzodiazepinlerle detoksifikasyon konusunda spesifik bir protokol yoktur. Bazı yazarlar 200–400 mg klordiazepoksid veya 20–40 mg diazepamın tek doz oral kullanımını önerirler. Sıklıkla kullanılanlar; klordiazepoksid ( her 2-4 saatte 50 mg), diazepam ( her 2-4 saatte 10 mg), oksazepam (60 mg her 2 saatte), ve lorazepam (1 mg her 2 saatte) dir. Şiddetli yoksunluk semptomları olan hastalarda benzodiazepin tedavisi 10 güne kadar uzatılabilir. Yaşlılarda, deliryum, demans, diğer kognitif bozuklukları ve karaciğer hastalığı olanlarda lorazepam ve oksazepam gibi kısa etkili benzodiazepinler tercih edilir.

Otonom sinir sistemi hiperaktivitesine bağlı semptomlarda (tremor, taşikardi, kan basıncı artışı, diaforez) beta-adrenerjik antagonistler kullanılır. Atenolol sıklıkla benzodiazepinlerle kombine edilir, böylelikle kullanılan benzodiazepin dozu azalmış ve benzodiazepin kullanımına bağlı sedasyon ve kognitif bozulma önlenmiş olur. Klonidin;



tremor, nabız ve kan basıncında azalmaya sebep olan bir alfa-adrenerjik agonisttir. Bununla birlikte beta-bloker veya klonidinin alkol yoksunluğunda tek başına kullanımı önerilmez çünkü etkinlikleri yoksunlukta görülen nöbeti önlemede yetersizdir.

Alkol yoksunluğunda antikonvülzanların profilaktik kullanımı genellikle önerilmez (önceden nöbet öyküsü olan ve alkol kullanımı sırasında antikonvülzanlarını kesen kişiler hariç).

Yoksunluk semptomlarını azaltmada etkin olmamalarına karşın deliryum, hezeyan ve halüsinasyonlarda haloperidol 0.5-2.0 mg İM. 2 saatte bir kullanılabilir.

Etkinliğini doğrulayan net kanıtlar olmamasına karşın bazı merkezlerde oral ve IV etanol (yoksunluk sendromunda) tedavisi kullanılmaktadır.

### 3)Alkol Bağımlılığı ve Kötüye Kullanım Tedavisi: Naltrekson, disülfram, akamprosate

Naltrekson opiat reseptör antagonistidir. Opiat reseptör ilişkili öfori ve ödüllendirici etkileri ve alkolün indüklediği dopamin salınımını azaltarak etki gösterir. Opiat kullanan hastalarda yoksunluk semptomları görülebileceğinden; eroin gibi kısa etkili opiat alımından en az 5 gün, metadon gibi uzun etkili opiat alımından en az 7 gün sonra tedaviye başlanmalıdır. Tedaviye başlamadan önce idrarda opiat taraması yapılabilir. Non-opiat kötüye kullanımı olan hastalarda 50 mg dozunda naltrekson kullanımının SSS ( başağrısı, disfori) ve GİS ( bulantı kusma, karın ağrısı) üzerinde hafif ve geçici etkileri olabilir. Uzun etkili enjekteable naltreksonda da benzer yan etkiler mevcuttur. Morbid obezlerde ve yüksek doz (100 mg/gün den fazla) kullanımda hepatotoksisite bildirilmesine rağmen nadir görülür. Yüksek doz naltreksonun NSAID ile etkileşimi sonucunda hepatotoksisite oluşabilir. Ek olarak opiat analjezik kullanan hastalarda naltrekson kullanımı uygun değildir.

Disülfram etil alkolün yıkılmasındaki anahtar enzim olan aldehit dehidrogenazı inhibe eder ve kanda asetaldehit birikimine sebep olur. Asetaldehit; başağrısı, flushing, bulantı, kusma, hipotansiyon ve anksiyeteye sebep olur. Göğüs ağrısı, nöbet, karaciğer disfonksiyonu, solunum depresyonu, kardiak aritmi, MI ve ölüm de bildirilmiştir (96). Kontrollü çalışmalarda disülfram ve plasebo grupları arasında alkolden kaçınma, relapsları önleme ve sosyal stabilite açısından anlamlı fark bulunmamıştır (97). Disülfram sürdürüm dozu çoğunlukla 250 mg/gün (125–500 mg/gün)'dür. Toksik ve ölümcül etkileri olmasından dolayı hasta bilgilendirilmeden kullanılmamalıdır. Tedavi süresince etanolün tüm formlarından kaçınılmalıdır (özellikle bazı öksürük şuruplarının içinde mevcuttur). Karaciğerde metabolize olur, metaboliti CYP 3A4'ü inhibe ederek bu enzimle metabolize olan pek çok ilaçla etkileşir. Alkol alımı sonrasında nadir ancak şiddetli yan etkiler gözlemlenebilir (nöropati, hepatotoksisite gibi).

Akamprosot alkol bağımlılığı tedavisinde kullanımında 2004 yılında FDA onayı almıştır. Nörofarmakolojik etkisi tam bilinmemesine rağmen araştırmalar taurinin aminoasit derivativesi olduğunu ve beyinde glutamat reseptörleri üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda ayıklık süresini uzattığı, relaps sayısını ve alkol alınan gün sayısını azalttığı bildirilmiştir (98).

Hayvan çalışmaları uzamış yoksunluk belirtilerinin santral sinir sisteminde eksitator amino asit olan glutamat ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Akamprosot bir NMDA antagonisti olup kalsiyum iyon akışını azaltır. Eksitator aminoasit glutamat reseptörlerini antagonize ederek NMDA reseptörleri üzerinde etkisini gösterir ve postsinaptik etkinliğini azaltır. Sonuçta nöronal eksitabilite azalır. Ayrıca eksitator aminoasitlerin uyarıcı etkisini antagonize eder ve NMDA reseptörleri aracılığı ile nörotransmisyonu artırır. Yapılan çalışmalar nöroprotektif etkileri olduğunu göstermiştir. Akamprosot alkol yoksunluğunda glutamat azalması ile oluşan nöronal hipereksitabiliteyi azaltmakta ve bilhassa nukleus accumbensteki santral dopamin düzeyleri üzerine de etki etmektedir. Yapılan çalışmalar alkol bağımlılığında relapsı geciktirdiği lehinedir (96).

Akamprosotun 333 mg'lık tabletleri (Campral tb) mevcuttur. Önerilen doz 1-2 gr/gün (3x1 - 3x2 tb.) şeklindedir. Karaciğerde metabolize olmaz ve böbrek yoluyla atılır. Böbrek yetmezliği olanlarda dikkatli kullanılmalıdır (97).

### **3. MATERİYAL VE METOT**

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı, Biyofizik ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Deney Hayvanları**

Bu çalışmada sekiz haftalık Wistar Albino cinsi toplam 40 adet 250±20 gr ağırlığında erkek sıçan kullanıldı. Tıp Fakültemizde üretilmiş olan sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (25° C) koşullara maruz bırakıldı. Plastik kafeslerde 10'arlı gruplar halinde tutuldu. Yeterli miktarda yiyecek ve içecek sağlandı. Bu çalışma SDÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı (HADYEK) tarafından etik olarak uygun bulunmuştur (Protokol No:2009-25).

##### **3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler**

- 1- Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
- 2- Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)
- 3- Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
- 4- Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
- 5- Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
- 6- Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
- 7- Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
- 8- Cam-Teflon homojenizatör: Çalışkan Cam A.Ş.(Türkiye)
- 9- pH metre : Hanna Instruments (Portekiz)

- 10- Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
- 11- Elektroforez cihazı: EC Apparatus Corporation 250–90 (ABD)
- 12- Biyokimya analizörü: Roche/Hitachi Modular P800(Almanya)
- 13- Kodak İmage Station 2000 MM: USA

### **3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

#### **SDS-PAGE ve Western Blot İçin Kullanılanlar:**

- 1-Akrilamid: bisakrilamid % 30 T, % 2.6 C; Sigma (Almanya)
- 2-Tris, Merck (Almanya)
- 3-Glisin, Merck (Almanya)
- 4-SDS, Merck (Almanya)
- 5-APS, Merck (Almanya)
- 6-TEMED, Merck (Almanya)
- 7-2-Merkaptoetanol, Merck (Almanya)
- 8-Brom Fenol Blue, Merck (Almanya)
- 9-Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
- 10-Tween 20, Merck (Almanya)
- 11-Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
- 12-EDTA, Merck (Almanya)
- 13-EGTA, Merck (Almanya)
- 14-Leupeptin, Sigma (Almanya)
- 15-Aprotinin, Sigma (Almanya)
- 16-Benzamidin, Sigma (Almanya)
- 17-Triton X-100, Sigma (Almanya)
- 18-Immobilon-P, Sigma (Almanya)
- 19-Kromotografi filtre kağıdı, Whatman (İngiltere)
- 20-Metanol, Merck (Almanya)
- 21-Hidroklorik Asit, Merck (Almanya)
- 22-Anti NR2A, Millipore (Avustralya)

23-Anti NR2B, Millipore (Avustralya)

24- BCIP/NBT Phosphatase Substrate, Sigma (Almanya)

### 3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

#### SDS-PAGE ve Western-Blot İçin Kullanılanlar:

1- 4 x Lower Buffer: 1.5 M Tris HCl, pH: 8.8

36.3 g Tris 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH'ı 8.8'e ayarlandı. Soğutulup pH'ı tekrar 8.8'e ayarlandı. 200 ml'ye distile suyla tamamlandı.

2- 4 x Upper Buffer: 0.5 M Tris HCl, pH: 6.8

12.1 g Tris, 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH'ı 6.8'e ayarlandı. Soğutulup pH'ı yeniden 6.8'e ayarlandı. 200 ml'ye distile suyla tamamlandı.

Lower jel: (% 7.5'lük)

Distile su	4450 µl
Acril: bisacril % 30 T, % 2.6 C	2500 µl
4 × lower buffer (tris HCl, pH: 8.8)	2500 µl
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	450 µl
TEMED	10 µl

Upper jel: (% 4'lük)

Distile su	2920 µl
Acril: bisacril % 30 T, % 2.6 C	670 µl
4 × lower buffer (tris HCl, pH: 8.8)	1250 µl
% 10 SDS	50 µl
% 10 APS	200 µl
TEMED	10 µl

3- Homojenizasyon buffer: 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 µg/ml Leupeptin, 25 µg/ml Aprotinin, 10 µM benzamidin ve % 1'lik Triton X-100 bulunacak şekilde total hacim 30 ml'ye tamamlandı.

#### 4- Sample buffer:

Upper buffer (0.5 M Tris-HCl, Ph: 6.8)	2.0 ml
Gliserol	1.6 ml
% 10 SDS	3.2 ml
2-Merkaptoetanol	0.8 ml
% 0.1(w/v) Brom fenol blue	0.4 ml

5- Running buffer: 15 gr Tris, 72 gr Glisin, 5 gr SDS, pH 8.3'e ayarlanıp distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. 5 kat sulandırılarak kullanıldı.

6- Transfer buffer: 0.606 gr Tris, 2.882 gr Glisin ve 1 ml % 10 SDS, distile su ile 160 ml'ye pH: 8.2-8.4 olacak şekilde tamamlandı. 40 ml metanol eklendi.

7- TTBS (Tris-Tween-Buffer Saline): 12.1 gr Tris, 17.5 gr NaCl, 2 ml Tween 20 (pipetle yavaşça çekilir, yoğun bir madde olduğu için) pH: 7.5 olarak ayarlanıp 2 litreye distile suyla tamamlandı.

8- Primer antikorlar: NR2A 1/1000 ve NR2B 1/2000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

9- Sekonder antikor: Antirabbit IgG (Alkalen fosfataz konjuge) 1:10.000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Deneysel Model

Sıçanlara;

Grup1 (G1) : Kontrol. Dört hafta boyunca serum fizyolojik (SF) verildi. (n=10)

Grup2 (G2) : Ethanol 10,0 g/kg/gün dozunda 21 gün boyunca verildi. (n=10)

Grup3 (G3) : Akamprosate 200 mg/kg/gün dozunda 21 gün boyunca verildi. (n=10)

Grup4 (G4) : Ethanol 10,0 g/kg/gün ve akamprosate 200 mg/kg/gün dozunda 21 gün boyunca verildi. (n=10)

### **3.2.2. Anestezi ve Doku Örnekleri**

Bir gece önceden beslenmesi kesilen hayvanlara ketamin hidroklorür (50 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) karışımı i.p. olarak uygulandı. Daha sonra bütün ratlar sakrifiye edilerek beyin korteksi ve hipokampuslar çıkarıldı.

### **3.2.3. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu**

Aynı gruptaki farklı sıçanlara ait hipokampus örnekleri tartılıp yeterli protein konsantrasyonunu sağlamak amacıyla 3 hipokampus 1 örnek oluşturacak şekilde birleştirilmiş ve ardından 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. İlk adımda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20 darbeye homojenizasyon yapılmıştır. İkinci adımda 30 sn. buz üzerinde sonike edilerek homojenizasyon tamamlanmıştır. Homojenize edilen örnekler 10000 g'de +4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatantlarında Lowry yöntemi kullanılarak protein tayini yapılarak SDS-PAGE ve Western Blot çalışıldı.

### **3.2.4. SDS-PAGE Yöntemi**

Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışılmıştır (99). % 7.5'lik lower jel ve % 4'lük upper jel hazırlanıp, kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µgr protein olacak şekilde, doku homojenatı sample buffer'la 1/1 oranında karıştırılarak uygulanmıştır.

### **3.2.5. Western Blot Yöntemi**

SDS-PAGE prosedürü ile örnekler jel üzerinde proteinlerine ayrıldı ve daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. Transfer prosedürü sonrası anti NR2A ve anti NR2B içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra sekonder antikorla 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar, taze hazırlanan BCIP/NBT solüsyonunda yeterli boyanma sağlanana kadar bekletildi. Oluşan bantlar Kodak Image Station 2000 MM cihazı kullanılarak tarandı. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör subüniti için kendi arasında karşılaştırıldı (100).

### **3.2.6. Beyin Homejanat Hazırlanması**

#### **3.2.6.1 Lipit peroksidasyon (MDA) Analizi**

Beyin homejanatlarında LPO düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve ark. (101) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: 0.25 ml beyin hemolizati 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C'lik kaynar suda, su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1 cm ışık geçişine sahip 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/ gram protein olarak verildi.



### 3.2.6.2 GSH ve GSH-Px Analizi

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in (102) bildirdikleri yönteme göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

%10 triklorikasetik asit (TCA) solüsyonu

Tris tamponu (0.4 M pH:8.9): 48.46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH 8.9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlanır.

Deneyin yapılışı: 0.1 ml kan homejenatı 0.4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi, 0.1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0.9 ml distile su, 2.0 ml Tris tamponu ve 0.1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (103) tarafından bildirilen yönteme göre spektrofotometrede belirlendi.

Kullanılan kimyasallar

- 1- Tris HCl tamponu (50 mM) pH:7.6
- 2- GSH solüsyonu
- 3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu
- 4- %10 TCA solüsyonu
- 5- Tris tampon 0.4 M pH: 8.9
- 6- DTNB solüsyonu

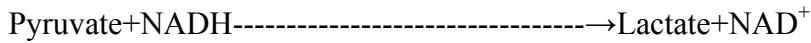
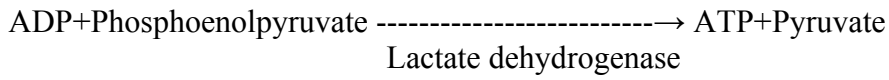
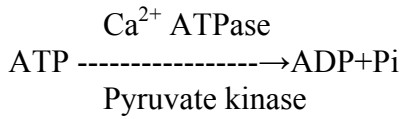
Deneyin şeması:

<b>Kimyasallar</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Örnek</b>
Doku homejenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi.	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi.	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi.		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı.		
Üzerine Tris Tampon eklendi.	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi.	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

### 3.2.6.3. Mikrozomal Ca<sup>2+</sup>-ATPaz Aktivitesinin Ölçümü

Ca<sup>2+</sup>-ATPaz aktivitesi Niggli ve arkadaşlarının spektrofotometrik metoduna göre belirlendi (104).



Medium içeriği : 120 mmole l / l KCl, 60 mmole l / l HEPES pH 7 (at 37 °C), 1 mmole l / l MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmole l / l K<sub>2</sub>-ATP, 0.2 mmole l / l NADH, 0.5 mmole l / l PEPA, 1 IU pürivat kinase, 1 IU ml / l LDH and 500 µmole l / l EGTA..Dört dak 37°C inkübasyon ortamında bekletildi. (toplam hacim 1 ml) ve hazırladığımız mikrozomlardan 50 µg ilave edildi. 2 dak. Sonrasında 600 mmol l / l CaCl<sub>2</sub>. İlavesinden sonra reaksiyon başladı. ATPaz aktivitesi 365 nm dalga boyunda okundu.

### 3.2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 9.05 for Windows” paket programı kullanılarak yapıldı. Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analiziyle değerlendirildi. Grupların birbiriyle karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. NR2A, NR2B, MDA, GSH, GSH-Px ve Ca<sup>2+</sup>-ATPaz sonuçları ortalama ± standart sapma (SD) olarak belirlendi. P değerinin 0.05’den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Korteks MDA Düzeyleri

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm gruplarda MDA değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Tablo 3).

Alkol verilen grupta kontrol grubuna göre korteks MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış ( $p < 0.05$ ) bulunmuştur. Akamprosot verilen grupta kontrol grubuna göre korteks MDA düzeylerinde artış ( $p < 0.01$ ) daha belirgindir. Akamprosot alan grupla alkol alan grup karşılaştırıldığında; akamprosot alan gruptaki korteks MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artış ( $p < 0.01$ ) bulunmuştur. Alkol ve akomprosotı birlikte alan grupta kontrol grubuna göre korteks MDA düzeylerindeki artış diğer gruplarla kıyaslandığında belirgin olarak artış ( $p < 0.001$ ) saptanmıştır.

Tablo 3. Ratların korteks MDA düzeyleri (Ort±SD)

<i>Parametre</i>	Kontrol (n=10)	Alkol (n=10)	Akamprosot (n=10)	Alkol + Akamprosot (n=10)
MDA ( $\mu\text{mol/g protein}$ )	883 ± 169	1047 ± 247 <sup>a</sup>	1336 ± 204 <sup>b,d</sup>	1772 ± 349 <sup>c,d,g</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$  ve <sup>c</sup>  $P < 0.001$  kontrol grubuna kıyasla.

<sup>d</sup>  $P < 0.01$  alkol grubuna kıyasla.

<sup>g</sup>  $P < 0.05$  akamprosot grubuna kıyasla.

### 4.2. Korteks GSH ve GSH-Px Düzeyleri

Korteks GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre hiçbir grupta anlamlı düzeyde değişme olmamıştır. Korteks GSH-Px düzeylerinde ise her üç grupta kontrol grubuna oranla

istatistiksel olarak anlamlı azalma ( $p < 0.05$ ) saptanmıştır. Kontrol grubu haricindeki üç grupta istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeylerde farklar mevcuttur (Tablo 4).

Tablo 4. Ratların korteks GSH ve GSH-Px düzeyleri (Ort±SD)

<i>Parametre</i>	Kontrol (n=10)	Alkol (n=10)	Akamprosot (n=10)	Alkol + Akamprosot (n=10)
GSH ( $\mu\text{mol/g protein}$ )	23.65 ± 2.82	22.91 ± 2.48	22.68 ± 1.64	24.01 ± 2.30
GSH-Px (IU/g protein)	27.95 ± 4.92	23.95 ± 3.11 <sup>a</sup>	20.47 ± 3.11 <sup>a</sup>	19.81 ± 4.14 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla.

#### 4.3. Spektrofotometri ile Saptanan Mikrozomal Beyin $\text{Ca}^{+2}$ ATPaz Düzeyleri

Mikrozomal beyin  $\text{Ca}^{+2}$ ATPaz düzeyleri analizinde kontrol grubuyla kıyaslandığında her üç grupta istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır. Alkol verilen grupta azalma ( $P < 0.001$ ) en belirgindir. Alkol+akamprosot verilen grup, sadece akamprosot verilen grupla karşılaştırıldığında mikrozomal beyin  $\text{Ca}^{+2}$ ATPaz düzeylerinde anlamlı ölçüde azalma olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Tablo 5).

Tablo 5. Ratların mikrozomal korteks  $\text{Ca}^{+2}$ ATPaz düzeyleri (Ort±SD)

<i>Parametre</i>	Kontrol (n=10)	Alkol (n=10)	Akamprosot (n=10)	Alkol + Akamprosot (n=10)
Brain Microsomal $\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz (IU/mg prot)	2.06 ± 0.08	0.67 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.15 <sup>b,c</sup>	1.01 ± 0.17 <sup>b,d</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0.001$  ve <sup>b</sup>  $P < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla.

<sup>c</sup>  $P < 0.01$  alkol grubuna kıyasla.

<sup>d</sup>  $P < 0.05$  akamprosot grubuna kıyasla.

#### 4.4. Western Blot Analizi ile Saptanan NR2A, NR2B Reseptör Düzeyleri

NR2A ve NR2B reseptör yoğunlukları analizinde, kontrol grubuyla diğer bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Grafik 1-2). Hem NR2A hem de NR2B reseptörlerinde alkol verilen grupta kontrol grubuna göre reseptör düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma ( $p < 0.01$ ) bulunmuştur. Sadece akamprosot alan grupla kontrol grubu arasında her iki reseptör düzeylerinde de istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. Alkol ve akomprasatı birlikte alan grupta ise NR2A ve NR2B reseptör yoğunluklarında hem kontrol grubuna göre artış ( $p < 0.05$ ); hem de alkol alan gruba göre artış ( $p < 0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 6).

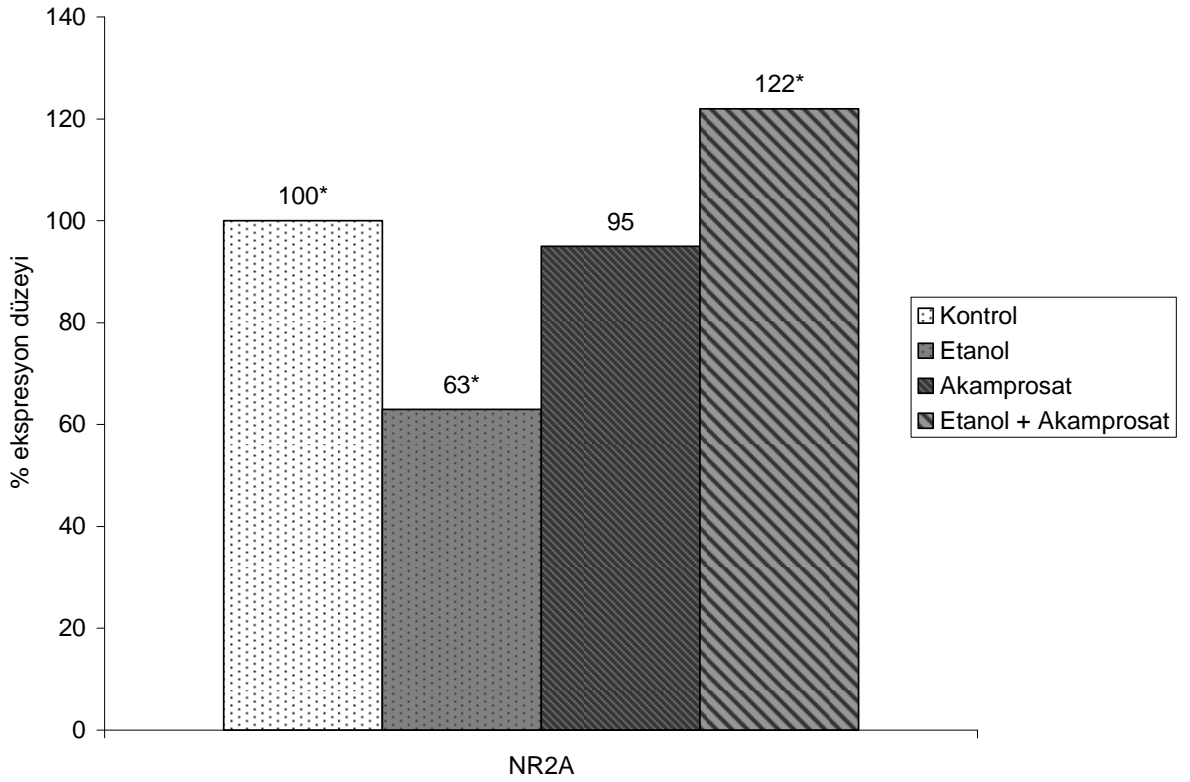
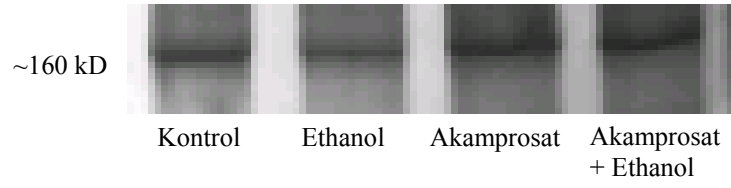
Tablo 6. Ratların NR2A, NR2B reseptörlerinin yüzdelik cinsinden yoğunlukları (Ort±SD)

<i>Parametre</i>	Kontrol (n=10)	Alkol (n=10)	Akamprosot (n=10)	Alkol + Akamprosot (n=10)
NR2A	100	63.10±6,81 <sup>a</sup>	95.48±21,19 <sup>c</sup>	122.52±36.94 <sup>b,d</sup>
NR2B	100	59.20±11,25 <sup>a</sup>	85.33±19,79 <sup>c</sup>	114.60±23.66 <sup>b,d</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0.01$ , <sup>b</sup>  $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla.

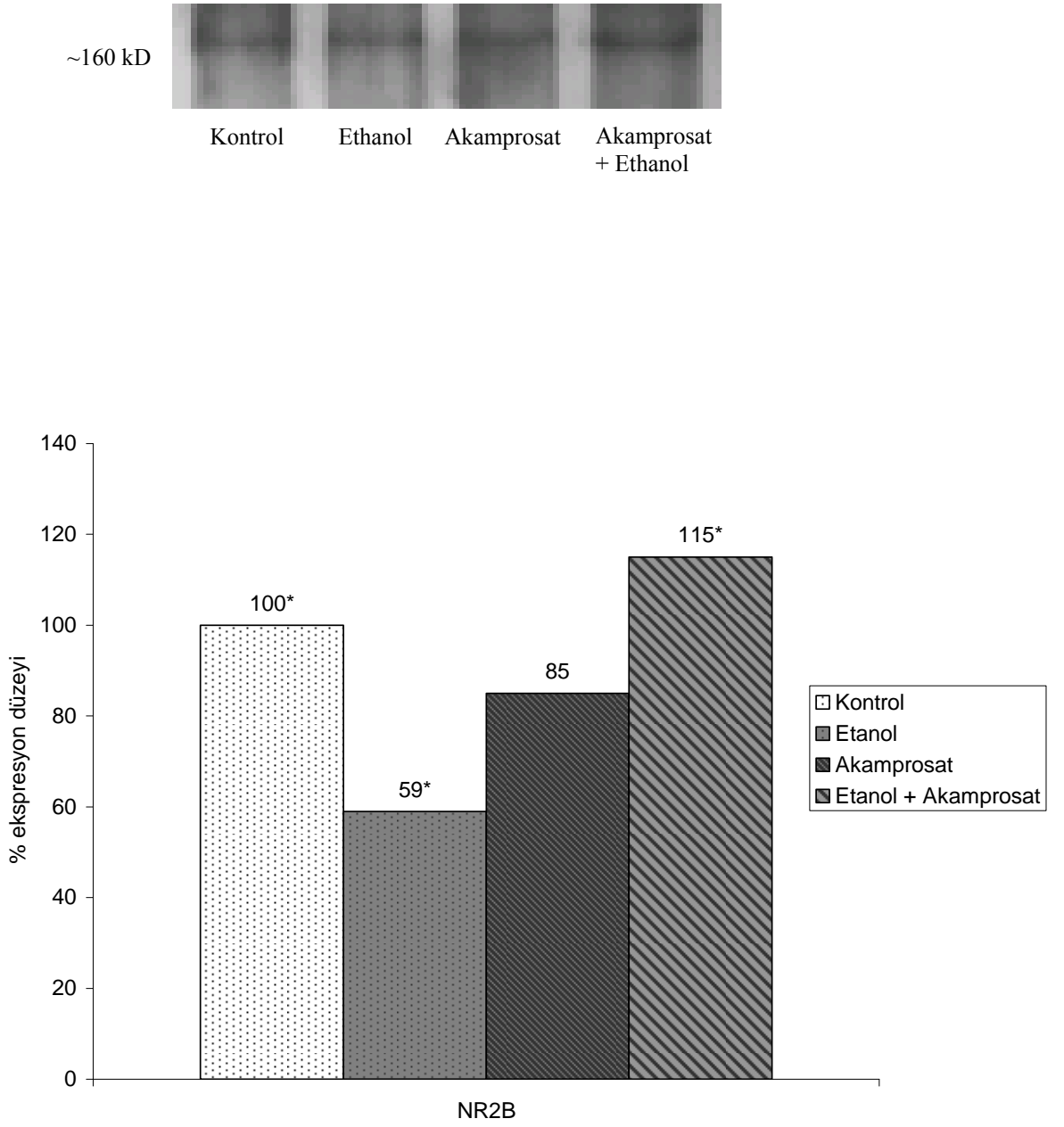
<sup>c</sup>  $p < 0.05$ , <sup>d</sup>  $p < 0.01$  alkol grubuna kıyasla.

## NR2A



Grafik 1. NR2A'ya ait Western Blot örneği. Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir.

## NR2B



Grafik 2. NR2B'ye ait Western Blot örneği. Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alkolizm; bireyin beden ve ruh sağlığı; aile, toplumsal ve iş uyumunu bozacak derecede sık ve fazla alkol alma; alkol alma isteğini durduramama ile belirli bir bozukluktur (1). Kaynaklara göre ilk keşfedilen psikofarmakolojik ajan "alkol" dür (2). Tarih boyunca Hipokrat'dan başlayarak pek çok hekim alkollü içkilerin insan sağlığına olan zararlı etkilerinden söz etmişlerdir.

Aşırı alkol kullanımı ve alkolle ilişkili sorunlar tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Tüm dünyada alkol kullanımı ve yarattığı sorunlar hakkında öğrenilecek daha çok şey olmasına karşın, alkolün dünya sağlığı için önemli bir tehlike olduğuna dair yeterli kanıt vardır.

Alkolün organizmadaki başlıca etki yeri santral sinir sistemidir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, alkol alımının serebral ve kardiyovasküler hasar gelişiminde en önemli risk faktörlerinden biri olduğunu ortaya koymuştur (7).

Alkolün çoğu nörokimyasal sistem üzerine doza bağlı olarak majör etkileri vardır. Alkol ile santral GABA-erjik, glutamaterjik, kolinerjik, monoaminerjik (noradrenerjik, dopaminerjik ve serotonerjik), opiyaterjik ve nitrerjik sistemler arasında nörohümorale düzeyde önemli etkileşimler söz konusudur (105).

Alkol direkt toksik özelliklerinin yanı sıra, oksidatif strese yol açarak hücrelerde indirekt etkiler meydana getirmektedir. Alkol metabolizması esnasında meydana gelen oksidatif stres, artmış reaktif oksijen radikal üretimi ve/veya azalmış antioksidan savunma kapasitesinden kaynaklanmaktadır (10).

ROT, organizmada metabolik aktivite ve enerji elde edilmesi sürecinde üretilmektedir. Hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimi ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, reseptörlerin ve nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda, hücre bileşenlerinin oksidatif hasara uğratılmasında, immün sistem hücrelerinin antimikrobiyal ve sitotoksik etki göstermesinde ön planda olan ROT, aynı zamanda yaşlanma ve yaş ile ilişkili dejeneratif hastalık süreçlerinde de rol oynamaktadır. Hücreler ROTnin neden olduğu oksidatif hasardan korunmak için antioksidan mekanizmalar bulundurlar. Oksidatif stres, 'oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik' olarak tanımlanmaktadır (106).



Gerek alkol kullanımı sonucu gelişen serebral atrofiye yanıt olarak eksitator iletimin artması, gerekse lipid peroksidasyonunun artması beyinde oksidatif strese neden olmaktadır (107,108). Yapılan araştırmalar, kronik alkol alımında ortamda redükte oksijen birikiminin alkolün beyin üzerindeki hasarına aracı olabileceğini ortaya koymuştur (108,109).

Bu çalışmada; ratlarda etanolla oluşturulan alkol bağımlılığı modelinde akamprosatin beyin oksidatif hasarın belirleyicisi kabul edilen LPO ürünü MDA'in ve antioksidan parametreler olan GSH-Px'in, GSH'un ve kalsiyum ATPazın aktivitelerinin belirlenmesi ve akamprosatin NMDAR subtiplerinden NR2A ve NR2B subtipi konsantrasyonlarını nasıl etkilediğini incelemeyi amaçladık. Ek olarak, NR2A ve NR2B subtipi konsantrasyonlarını ile MDA ve antioksidan parametrelerin düzeyleri arasındaki olası ilişkiler değerlendirildi.

ROT, en kolay okside edilebilen substratın lipit olmasından dolayı, hücre membran ve lipoproteinlerindeki PUFA ile etkileşime girer ve LPO sürecini başlatır. LPO reaksiyon zincirinin sonucunda, hücre bütünlüğüne hasar veren oksidatif stres gelişir. Oksidatif stres oluşumu ile PUFA peroksidasyonunun temel ürünü olan MDA yüksek seviyelere ulaşır (110).

MDA, LPO ve prostaglandin biyosentezinin doğal bir ürünü olan, mutajenik ve karsinojenik bir alkoksil radikalidir ve peroksidasyon düzeyinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılır (111). Genel olarak LPO ürünleri yüksek moleküler aktivitelerinden dolayı immün cevabın artmasına, fibrozis veya enflamasyona, tiyol içerikli enzimlerin etkisiz hale gelmesine, gen transkripsiyonuna veya apoptozisin tetiklenmesine yol açabilirler. MDA patofizyolojik olarak, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, GSH S-transferaz ve GSH redüktaz gibi enzimleri inaktive edebilmesinin yanısıra protein sentezini inhibe edebilir (112).

Glutasyonun GSH ve GSSG formları, tüm memeli hücrelerinde bulunur. Aminoasit transportu, proteinlerin sülfidril gruplarının indirgenmiş formda kalması ve oksidan moleküllere karşı koruma gibi birçok hücresel fonksiyonda yer alırlar. GSH, doğrudan ROTne karşı temizleyici etkisinin yanısıra, GSH-Px aktivitesi için bir ko-substrat ve birçok enzim için bir kofaktör olarak görev yapar (113). İntraselüler olarak redoks dengesinin sürdürülmesinde temel rol oynayan GSH, dokularda GSSG ile dengede bulunur (106).

GSH-Px, temel biyolojik rolü organizmayı oksidatif hasardan korumak olan, peroksidaz aktiviteye sahip bir enzim ailesinin genel adıdır (114). Biyokimyasal olarak lipit hidroperoksitleri alkollere indirgeyen GSH-Px, GSH molekülünü kofaktör olarak kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikalini suya metabolize eder ve SOD ile paralel etkinlik gösterir (114). GSH-Px, GSH/GSSG dengesinin sağlanması ve LPO karşıtı dengenin korunmasında rol aldığı gibi,

prostaglandin sentezinde ve prostasiklin oluşumunun regülasyonunda da fonksiyon görür (114).

Alkol bağımlılığında oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğu ve alkol bağımlısı hastaların plazmalarında ROTnin arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (115,116,117). Buna karşın yapılan bazı çalışmalarda kırmızı şarabın alkolle indüklenen oksidatif strese karşı koruyucu olduğuda gösterilmiştir (118).

Çalışmamızın sonuçlarına göre, kontrol grubuyla kıyaslandığında korteks MDA düzeyleri hem alkol hemde akomprasat verilen gruplarda daha yüksekti. Ek olarak alkol ve akamprosatin birlikte verildiği grupta artış en fazlaydı. Kan GSH düzeylerindeki karşılaştırmalarda hiçbir grup arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir farklılık, sayısal farklılıklara rağmen tespit edilemedi. GSH-Px düzeyleri açısından ise kontrol grubuna kıyasla her üç grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tesbit edildi. Sonuçlarımıza göre hem alkolün hemde akamprosatin oksidatif stres üzerine olumsuz etkileri olduğu saptanmıştır.

Yapısında selenyumun kofaktör olarak yer aldığı GSH-Px enzimi, SOD enzimi vasıtası ile süperoksit radikalinden sentezlenen hidrojen peroksiti suya kadar parçalayarak serbest radikalleri inhibe etmektedir. Ayrıca, hidroperoksitler üzerinde de inhibe edici etkisi vardır. Şayet, lipid peroksidasyon artar ise antioksidanların kullanılmasına bağlı olarak azaldıkları çok iyi bilinmektedir. Beyin, lipit peroksidasyon oluşumunu artıran PUFA bakımından zengin olmasına rağmen antioksidan düzeyleri bakımından karaciğer ve böbrek gibi organlara göre fakirdir (7, 42). Bu çalışmamızda da, beyin korteks örneklerinde serbest radikallerin üretiminin artışına bağlı olarak MDA düzeyinin artışına paralel GSH-Px düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlarımızın Nazıroğlu ve ark.'ın deney hayvanları (rat) beyinlerinde yapılan epilepsi çalışmasındaki sonuçlar ile paralel olduğu anlaşıldı (119).

Serbest radikallerin aşırı üretilmesi iki yolla sitozole kalsiyum iyon akışını uyarmaktadır. Glutamat dekarboksilaz inhibisyonu ile GABA salınışını baskımlarken, glutamin sentetaz enzimini uyararak, glutamat tarafından NMDA reseptörlerinin uyarılmasını baskımlamaktadır. Aşırı serbest oksijen radikallerinin artışı sonucu sitozelde ki bu kalsiyum iyon artışı, mitokondride porların açılması ve depolarizasyon yolları ile serbest radikallerin üretimini daha da artırmaktadır. Bu aşırı serbest radikal üretimi başta voltaja duyarlı kalsiyum kanalları başta olmak üzere birçok kanalı uyararak sitozole kalsiyum akışını daha da uyarmaktadır. Bunun sonucunda, mitokondrinin daha fazla depolarize olması sonucu serbest radikallerin üretimi daha da artmaktadır. Bu olay apoptosise kadar gitmektedir. Hücre zarına bağlı  $Ca^{+2}$ -ATPaz enzimi hücre içerisinden dışına kalsiyum iyonlarını göndermekten

sorumlu olduğu için aşırı serbest radikal artışı durumlarındaki bu kanal aktivasyonlarında aşırı kullanılarak aktiviteleri azalmaktadır (119, 120). Bu çalışmamızda MDA düzeyi artışının gözlemlediğimiz alkol ve akamprosot gruplarında aynı şekilde hücre zarına bağılı  $Ca^{+2}$ -ATPaz enzimi düzeyleri ile NMDA reseptörlerinde azalmalar gözlemlendi. Bu sonucumuzun epilepsi çalışma sonuçları (120, 121) ile benzer olduğu gözlemlendi.

Etanol bir NMDA reseptör antagonistidir özellikle nükleus akumbens (Nacc), VTA ve hipokampusda glutamat üzerine etkilidir. Akut alkol alımı NMDA reseptörlerini inhibe ederek glutamatın etkisini bloke eder. Kronik alkol alımı ise NMDA reseptörlerinde (NR1 ve NR2 altbirimlerinde) kompensasyon amaçlı artışa neden olarak nöroadaptif uyuma aracılık eder. NMDA reseptörleri sinaptik plastisiteden, öğrenme, bellek, nörotoksisite ve epileptik nöbet aktivitesine kadar birçok fonksiyona eşlik eder (5).

Kronik alkol alımının sonucunda gelişen glutamat etkinliğinde artış biçimindeki nöroadaptasyon, alkol yoksunluğundaki belirtilerin yanı sıra, bu yoksunluk dönemlerinin sonucunda gelişen nörodejenerasyondan da sorumlu gibi görünmektedir (122,123).

Yoksunluğa bağılı nörotoksisite için NMDA reseptör işlevinin artmasının olmazsa olmaz bir koşul olduğu ve nörotoksisitenin daha çok yoksunluğun ilk günlerinde olduğu bildirilmektedir.

Bizim çalışmamızda NR2A ve NR2B reseptör yoğunlukları analizinde, kontrol grubuyla diğer bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur. Hem NR2A hem de NR2B reseptörlerinde alkol verilen grupta kontrol grubuna göre reseptör düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma bulunmuştur. Akamprosot verilen grupta NR2B reseptör düzeylerinde azalma saptanmıştır. Alkol ve akamprosotı birlikte alan grupta ise NR2A ve NR2B reseptör yoğunluklarında alkol verilen grubun tersine reseptör yoğunluklarında artış bulunmuştur.

Sonuç olarak NMDA antagonistleri alkol yoksunluğuna bağılı nörodejenerasyonu da engelleyebilir fakat alkol bağımlılığında da diğer birçok psikiyatrik hastalıktaki gibi birçok nörotransmitter sistemine etkili olabilecek çeşitli ilaçların aynı anda verilmesi gerekli gibi görünmektedir. Ayrıca, literatürde ilk defa akamprosotun alkol bağımlılığı deneysel modelinde beyin korteks lipid peroksidasyon düzeyini artırırken, antioksidan düzeyi azalttığı gözlemlendi. Bu nedenle, akamprosotla birlikte destekleyici tedavi olarak antioksidan (örneğin C ve E vitamini) içeren preparatların destekleyici olarak kullanılması gerekli olduğu gözlemlendi.

## ÖZET

### **Ratlarda Alkol Bağımlılığı Modelinde Akamprosatin Beyin Glutasyon, Glutasyon Periksodaz, Malondialdehit, Ca<sup>+2</sup>-ATPaz ve NMDA Reseptörleri Üzerine Etkileri**

Alkol bağımlılığı büyük toplumsal etkileri olan kronik, yineleyici bir hastalıktır. Alkolizmin nasıl bir hastalık olduğu, etyolojisinde hangi faktörlerin rol oynadığı ve tedavisi hakkında bilgilerimiz yeterli değildir. Artan bilgiler alkolün nörotrofik faktörler, glutamaterjik ve serotonerjik sistemler ve hücre içi sinyal yolları üzerinde etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmanın amacı etanol ile alkol bağımlılığı oluşturulmuş ratlarda akamprosatin beyin korteks MDA, GSH-Px, GSH, mikrozomal Ca<sup>+2</sup>-ATPaz aktivitelerini ve hipokampal NMDAR konsantrasyonunu ölçmektir.

Çalışma için 40 erkek Wistar rat alındı ve dört eşit gruba ayrıldı. İlk grup kontrol grubu ve ikinci grup etanol (10 mg/kg/g) verilen gruptu. 3. gruba 200 mg/kg/g den akamprosatin, 4. gruba ise 200 mg/kg/g'den akamprosatin ve 10 mg/kg/g'den etanol intragastrik olarak 21 gün boyunca verildi. 21. günün sonunda tüm ratlar sakrifiye edildi. Beyin dokusu ve hipokampusları alındı.

Sonuçlarımız etanolle oluşturulan alkol bağımlılığı modelinde GSH-Px, Ca<sup>+2</sup>-ATPaz aktivitesinin ve NMDA subünit konsantrasyonlarının azaldığını, MDA düzeyinin arttığını desteklemektedir. Akomprosatin tedavisi GSH-Px, Ca<sup>+2</sup>-ATPaz aktivitesini ve NMDA subünit konsantrasyonlarının azaltıp MDA düzeylerini arttırırken, akamprosatin ve alkolün beraber verilmesi GSH-Px, Ca<sup>+2</sup>-ATPaz enzim aktivitesini azaltıp, MDA düzeylerini ve NMDA subünit konsantrasyonlarını arttırmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler akamprosatin alkol bağımlılığı modelinde NMDA reseptörleri üzerinde bazı olumlu etkilerinin ve antioksidan sistemler üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu göstermiştir.

**Anahtar sözcükler:** Akamprosatin, alkol bağımlılığı, Ca<sup>+2</sup>-ATPaz, GSH, GSH-Px, MDA, NMDA

## SUMMARY

### **Effect of Acamprosate on Alcohol Dependence, Brain Glutathione, Glutathione Peroxydase, Malondialdehyd, Ca<sup>+2</sup>-ATPase and NMDA Receptors of Rats**

Alcohol addiction is a chronic, relapsing disorder with a huge societal impact. We do not have adequate information on the factors taking part in the etiology of alcoholism, what sort of disease it is and on its treatment. Increasing evidences suggest that alcohol interferes with the action of neurotrophic factors, glutamatergic and serotonergic systems, intracellular signaling pathways.

The aim of this study was to investigate the brain cortex MDA, GSH-Px, GSH, microsomes Ca<sup>+2</sup>-ATPase activities of acamprosate and hippocampal NMDAR consantration in rats induced alcohol dependence by ethanol.

40 male Wistar rats were randomly divided into four equal groups. First group was used as control and second group received 10 mg/kg/d ethanol. 200 mg/ kg/d of acamprosate and 200 mg/ kg/d of acamprosate with 10 mg/kg/d ethanol each day were intragastrically administrated to rats constituting third and forth groups for 21 days, respectively. At the end of 21. day, all rats will be sacrificed and brain tissue and hippocampus were taken.

Our results support the that decreased GSH-Px, Ca<sup>+2</sup>-ATPase activities and NMDA subunit concentrations, increased MDA levels following induction of alcohol dependence with ethanol. Acamprosate treatment decreased GSH-Px, Ca<sup>+2</sup>-ATPase activities and NMDA subunit concentrations, increased MDA levels while giving acamprosate together with alcohol caused decrease in the activity of the enzyme GSH-Px, Ca<sup>+2</sup>-ATPaz; increase MDA levels and NMDA subunit concentrations.

In conclusion, the data obtained in this study revealed that in alcohol dependence model acamprosate has some beneficial effects on NMDA receptors although acamprosate induced negative effects on antioxidant defence systems.

**Key Words:** Acamprosate, alcohol dependence, Ca<sup>+2</sup>-ATPaz, GSH, GSH-Px, MDA, NMDA

## KAYNAKLAR

1. Öztürk MO. Ruh Sağlığı ve Bozuklukları. 10. Baskı, Ankara: Feryal Matbaası 2004;520.
2. Coşkunol H, Çelikkol A. Alkol kullanım bozuklukları. Ege Psikiyatri Sürekli Yayınları 1996;1(2):141-55.
3. Kalyoncu A, Mırsal H. Alkol kullanım bozuklukları. Psikiyatri Dünyası 2000;4:22-30.
4. Goodwin FK. From the Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration. JAMA 1989; 262(19):2654.
5. Ceylan ME, Türkcan A. Araştırma ve klinik uygulamada biyolojik psikiyatri. 2. Cilt, 2. Baskı, İstanbul: 2003;1-4.
6. Akvardar Y. Alkol ile İlişkili Bozuklukların Epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2005; 1(47):5-9.
7. Masoero E, Frattini P, Favalli L, Rozza A, Scelsi R, Govoni S. Effect of acute alcohol on ischemia induced glutamate release and brain damage. Alcohol 2000;22:173-7.
8. Bleich S, Degner D, Javaheripour K, Kurth C, Kornhuber J. Homocysteine and alcoholism. J Neural Transm Suppl 2000;(60):187-96.
9. Özbakış G. Akut alkol intoksikasyonu ve tedavisi. Sendrom 1998;6:96-100.
10. Eşel E. Yoksunluğunun nörobiyolojisi: baskılayıcı ve uyarıcı nörotransmitterler. Türk Psikiyatri Dergisi 2006;17(2):129-38.
11. Errico AL, King AC, Lovallo WR, Parsons OA. Cortisol dysregulation and cognitive impairment in abstinent male alcoholics. Alcohol Clin Exp Res 2002;26:1198-204.
12. Herrera DG, Yagüe AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M at al. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of antioxidant. PNAS 2003;100:7919-24.
13. Eşel A, Asdemir A. Alkol Bağımlılığında Stresin Rolü ve Strese Cevap Sistemindeki Değişiklikler. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2005;1(47):35-43.
14. Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Arch Gen Psychiatry 2000;57:925-35.
15. Gibson DA, Harris BR, Prendergast MA, Hart SR, Blanchard JA 2nd, Holley RC at al. Polyamines contribute to ethanol withdrawal-induced neurotoxicity in rat hippocampal slice cultures through interactions with the NMDA receptor. Alcohol Clin Exp Res 2003 Jul;27(7):1099-106.
16. Prendergast MA, Harris BR, Mullholland PJ, Blanchard JA 2nd, Gibson DA, Holley RC at al. Hippocampal CA1 region neurodegeneration produced by ethanol withdrawal requires activation of intrinsic polysynaptic hippocampal pathways and function of N-methyl-D-aspartate receptors. Neuroscience 2004;124:869-77.
17. Öztürk MO, Uluşahin A. Ruh Sağlığı ve Bozuklukları. 11. Baskı, 2. Cilt Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2008.
18. Ceylan ME, Türkcan A. Araştırma ve klinik uygulamada biyolojik psikiyatri. 2. Cilt, 2. Baskı, İstanbul: 2003;114-5.
19. Knight, J.A. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. Ann Clin Lab Sci 2000;30(2):145-58.
20. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem 2007;18(9):567-79.
21. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. J Nutr 2004;134(11):3143-63.
22. Lam MA, Pattison DI, Bottle SE, Keddie DJ, Davies MJ. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. Chem Res Toxicol 2008;21(11):2111-9.
23. Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. J Reconstr Microsurg 1989;5(1):79-84.
24. Van Wijk R, Van Wijk EP, Wiegant FA, Ives J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. Indian J Exp Biol 2008;46(5):273-309.
25. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. Contraception 2002;65(4):305-11.
26. Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. Front Biosci 1996;1:72-90.
27. Peskin AV. Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. Biosci Rep 1997;17(1):85-9.

28. Raha S, Myint AT, Johnstone L, Robinson BH. Control of oxygen free radical formation from mitochondrial complex I: roles for protein kinase A and pyruvate dehydrogenase kinase. *Free Radic Biol Med* 2002;32(5):421-30.
29. Juránek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys* 2005;24(3):263-78.
30. Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J Neurochem* 2003;87(2):386-94.
31. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 2002;7(1):55-7.
32. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149(1):43-50.
33. Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(26):12365-7.
34. Gutteridge JM, Maitt L, Poyer L. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochem J* 1990;269(1):169-74.
35. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988;240(4852):640-2.
36. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995;82-83:969-74.
37. Valko M, Morris H, Cronin MT. Cronin, Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12(10):1161-208.
38. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-28.
39. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119(6):598-620.
40. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.
41. Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, Zackert WE et al. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev* 1999;31(1):117-39.
42. Leutner S, Eckert A, Müller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm* 2001;108(8-9):955-67.
43. Quinlan GJ, Gutteridge JM. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Biol Med* 1988;5(5-6):341-8.
44. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 2002;33(1):1-14.
45. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
46. Mason RP, Stolze K, Flitter WD. Free radical reactions with DNA and its nucleotides. *Basic Life Sci* 1990;52:119-25.
47. Peskin AV. Interaction of reactive oxygen species with DNA. A review. *Biochemistry (Mosc)* 1997;62(12):1341-7.
48. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003;91:179-94.
49. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med* 1990;8(2):201-9.
50. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 2001;34(4):325-36.
51. Bhamre S, Nuzzo RL, Whittin JC, Olshen RA, Cohen HJ. Intracellular reduction of selenite into glutathione peroxidase. Evidence for involvement of NADPH and not glutathione as the reductant. *Mol Cell Biochem* 2000;211(1-2):9-17.
52. Zachara BA, Gromadzińska J, Wasowicz W, Zbróg Z. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol* 2006;53(4):663-77.
53. Cheng W, Fu YX, Porres JM, Ross DA, Lei XG. Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. *FASEB J* 1999;13(11):1467-75.
54. Vaziri ND, Lin CY, Farmand F, Sindhu RK. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney Int* 2003;63(1):186-94.

55. Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest* 1999;29(3):238-45.
56. Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem* 1999;6(4):279-309.
57. Matthews GM, Butler RN. Cellular mucosal defense during *Helicobacter pylori* infection: a review of the role of glutathione and the oxidative pentose pathway. *Helicobacter* 2005;10(4):298-306.
58. Birlouez-Aragon I, Tessier FJ. Antioxidant vitamins and degenerative pathologies. A review of vitamin C. *J Nutr Health Aging* 2003;7(2):103-9.
59. Duarte T, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res* 2005;39(7):671-86.
60. Hinds TS, West WL, Knight EM. Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical, and public health applications. *J Clin Pharmacol* 1997;37(7):551-8.
61. Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as anti-oxidants--a review. *J Photochem Photobiol B* 1997;41(3):189-200.
62. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266(1-2):37-56.
63. Becker BF, Reinholz N, Leipert B, Raschke P, Permanetter B, Gerlach E. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest* 1991;100(3 Suppl):176S-181S.
64. Pirisino R, Di Simplicio P, Ignesti G, Bianchi G, Barbera P. Sulfhydryl groups and peroxidase-like activity of albumin as scavenger of organic peroxides. *Pharmacol Res Commun* 1988;20(7):545-52.
65. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200(2):248-54.
66. Pinchuk I, Lichtenberg D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Prog Lipid Res* 2002;41(4):279-314.
67. Klouche K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud JJ, Cristol JP. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. *Eur J Clin Invest* 2004;34(9):619-25.
68. Comporti M. Introduction-serial review: iron and cellular redox status. *Free Radic Biol Med* 2002;32(7):565-7.
69. Kleinová M, Hewitt M, Brezová V, Madden JC, Cronin MT, Valko M. Antioxidant properties of carotenoids: QSAR prediction of their redox potentials. *Gen Physiol Biophys* 2007;26(2):97-103.
70. Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, Shah AM. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 5):960-4.
71. Guittet O, Roy B, Lepoivre M. Nitric oxide: a radical molecule in quest of free radicals in proteins. *Cell Mol Life Sci* 1999;55(8-9):1054-67.
72. Kasparová S, Brezová V, Valko M, Horecký J, Mlynárik V, Liptaj T, et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem Int* 2005;46(8):601-11.
73. Hengstler JG, Bolt HM. Oxidative stress: from modification of cell-cycle related events, secondary messenger function, dysregulation of small GTPases, protein kinases and phosphatases to redox-sensitive cancer models. *Arch Toxicol* 2008;82(5):271-2.
74. Court JA, Perry EK. CNS Nicotine receptors. *Pharmacol Pathophysiol* 1994;2:216.
75. Barret JE. Interrelationships between behaviour and pharmacology as factors determining the effects of nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;19:1027.
76. Ozawa S, Haruyuki K, Tsuzunki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress Neurobiol* 1987;54:581-618.
77. Ozawa S, Haruyuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 1987;54:581-618.
78. Cull-Candy S, Brickley SG. NMDA receptors. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001.
79. Carroll RC, Zukin RS. NMDA-receptor trafficking and targetting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neuroscience* 2002;25:571-577.
80. Schleggenburger R, Zhou Z, Konnerth A, Neher E. Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. *Neuron* 1993;11:133-43.
81. Coyle IT, Bird SI, Evans RH, Gulley RL, Nadler JV, Nicklas WJ, Olney JW. Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity, and mechanism of action. *Neurosci Res Prog Bull* 1981;19:331-427.
82. Scatton B, Carter C, Benavides J. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: A novel therapeutic perspective for the treatment of ischemic brain injury. *Cerebrovasc Dis* 1999;1:121-4.
83. McMillan M, Pritchard GA, Miller LG. Characterisation of Ca<sup>++</sup>-mobilizing excitatory amino acid receptors in cultured chick cortical cells. *Eur J Pharmacol* 1990;189:253-66.
84. Wong EHF, Kemp JA. Sites for antagonism on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1991;31:401-25.
85. Candy S, Brickley SG. NMDA receptors. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001.



86. Chandler LJ. Ethanol and brain plasticity: Receptors and molecular networks of the postsynaptic density as targets of ethanol. *Pharmacol Ther* 2003;99:311-26.
87. Miyakavva T, Yagi T, Kitazawa H, Yasuda M, Kawai N, Tsuboi K at al. Fyn-kinase as a determinant of ethanol sensitivity: Relation to NMDA receptor function. *Science* 1997;278:698-701.
88. Tsai G, Coyle JT. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu Rev Med* 1998;49:173-84.
89. McCrady S, Epstein E, Addictions. A Comprehensive Guidebook, Oxford University Press, New York, 1999.
90. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision, American Psychiatric Association, Washington D.C. and London, 2000.
91. World Health Organization: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10 th Revision, Geneva, 1992.
92. World Health Organization. Global Status Report: Alcohol Policy. Geneva: World Health Organization; 2004.
93. World Health Organization. A Summary of Global Status Report on Alcohol. Geneva: World Health Organization; 2001.
94. Akvardar Y, Türkcan A, Yazman Ü, Ayaçlar S, Ergör G, Çakmak D. Prevalence of alcohol use in İstanbul. *Psychol Rep* 2003;92:1081-8.
95. Ceylan ME, Türkcan A. Araştırma ve klinik uygulamada biyolojik psikiyatri. 2. Cilt, 2. Baskı, İstanbul: 2003;45-50.
96. Arıkan Z. Alkol bağımlılığında yeni farmakoterapötik yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005;1(47):56-60.
97. American Psychiatric Association Practice Guidelines for the Treatment of Psychiatric Disorders: Compendium American Psychiatric Association 2006.
98. Kenna AG, McGeary JE, Swift RM. Pharmacotherapy, pharmacogenomics, and the future of alcohol dependence treatment, part 1. *Am J health Syst Pharm* 2004; 61(22):2272-79.
99. Delibas N, Doguc DK, Sutcu R, Eroglu E, G kalp O. Effect of Nicotine on hippocampal nicotinic acetyl choline alfa7 receptor and NMDA receptor subunits 2A and 2B expression in young and old rats. *International Journal of Neuroscience* 2005;115 (8):1151-63.
100. Thomas J, Olivia R. Age-related deficits in the retention of memories for cued fear conditioning are reversed by galantamin treatment. *Behavioural Brain Research* 2005; 165:160-71.
101. Placer ZA, C.L. Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. 1966.
102. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25(1):192-205.
103. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71(4):952-8.
104. Niggli V, Adunyah ES, Penniston JT, Carafoli E. Purified (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids *J Biol Chem* 1981 Jan 10;256(1):395-401.
105. Sadock BJ, Kaplan HI. (Çeviri Editörü, Aydın H, Bozkurt A.). Kaplan Sadock, Comprehensive Text Book of Psychiatry. Güneş Tıp Kitabevleri Ankara, 2007.
106. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
107. Tsai GE, Ragan P, Chang R, Chen S, Linnoila VM, Coyle JT. Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal. *Am J Psychiatry* 1998;155:726-32.
108. Calabrese V, Scapagnini G, Latteri S, Colombrita C, Ravagna A, Catalano C, et al. Long-term ethanol administration enhances age-dependent modulation of redox state in different brain regions in the rat: protection by acetyl carnitine. *Int J Tissue React* 2002;24:97-104.
109. Zima T, Fialova L, Mestek O, Janebova M, Crkowska J, Malbohan I, et al. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci* 2001;8:59-70.
110. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15(4):316-28.
111. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999. 424(1-2):83-95.
112. Moore K, Roberts LJ. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998;28(6):659-71.
113. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(1):24-38.
114. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 2007;43(4):477-503.

115. Carrard VC, Pires AS, Mendez M, Mattos F, Moreira JC, Filho MS. Effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment on oxidative stress parameters in rats tongue. *Food Chem Toxicol* 2009 Feb 2.
116. Huang MC, Chen CH, Peng FC, Tang SH, Chen CC. Alterations in oxidative stress status during early alcohol withdrawal in alcoholic patients. *J Formos Med Assoc.* 2009 Jul;108(7):560-9.
117. Wu D, Cederbaum AI. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 2009 May;29(2):141-54. Epub 2009 Apr 22.
118. Assunção M, Santos-Marques MJ, Monteiro R, Azevedo I, Andrade JP, Carvalho F et al. Red wine protects against ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *J Agric Food Chem* 2009 Jul 22;57(14):6066-73.
119. Naziroğlu M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res* 2009.
120. Naziroğlu M, Kutluhan S, Uğuz AC, Celik O, Bal R, Butterworth PJ. Topiramate and vitamin e modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redox system in pentylentetrazol-induced seizure of rats. *J Membr Biol* 2009;229(3):131-40.
121. Naziroğlu M, Kutluhan S, Yilmaz M. Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, and EEG records in pentylentetrazol-induced seizures in rats. *J Membr Biol* 2008;225(1-3):39-49.
122. Wirkner K, Poelchen W, Köles L ve ark. (1999) Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. *Neurochem Int*, 35: 153-62.
123. Dahchour A, De Witte P. Excitatory and inhibitory amino acid changes during repeated episodes of ethanol withdrawal: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 2003;459: 171-8.