

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PRENATAL VE POSTNATAL ALKOL KULLANIMI SONUCUNDA
RAT BEYİNLERİNDE OLUŞAN NÖRODEJENERASYONUN
BETAİN VE/VEYA OMEGA-3 UYGULANMASIYLA
ÖNLENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

KEVSER KUŞAT OL

**DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK**

Mart-2014

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

PRENATAL VE POSTNATAL ALKOL KULLANIMI SONUCUNDA
RAT BEYİNLERİNDE OLUŞAN NÖRODEJENERASYONUN
BETAİN VE/VEYA OMEGA-3 UYGULANMASIYLA
ÖNLENMESİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

KEVSER KUŞAT OL

DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK

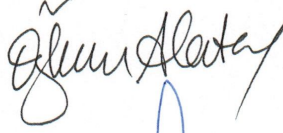
Mart-2014

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kevser Kuşat OL.'un ~~Yüksek Lisans~~/Doktora Tezi olarak hazırladığı "**Prenatal Ve Postnatal Alkol Kullanımı Sonucunda Rat Beyinlerinde Oluşan Nörodejenerasyonun Betain Ve/Veya Omega-3 Uygulanmasıyla Önlenmesinin Araştırılması**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih
27.03.2014

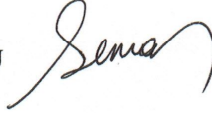
Üye : Prof.Dr.Özkan ALATAŞ



Üye : Prof.Dr.Güngör KANBAK (Danışman)



Üye : Prof.Dr.Sema USLU




Üye : Prof.Dr.Turgay İSBİR



Üye : Yrd.Doç.Dr.Fahrettin AKYÜZ



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03.04/2014 tarih ve 997../4646. sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada modifiye sıvı diyet aracılığıyla prenatal ve postnatal etanol maruziyeti oluşturulan rat yavrularının serebral korteksindeki nörodejenerasyonun etkisini incelemeyi ve betain ve omega-3 takviyesinin koruyucu etkilerini göstermeyi amaçladık. Prenatal ve postnatal periyotta etanole maruz kalındığında yavrularda Fetal Alkol Sendromu (FAS) görülmektedir. Ratlar kontrol, etanol, etanol+omega-3, etanol+betain, etanol+betain+omega-3 şeklinde 5 gruba ayrıldı. Rat yavrularının serebral korteksindeki etanol indüksiyonuna bağlı değişikliklerde betain ve omega-3 ün etkilerini incelemek amacıyla biyokimyasal olarak sitokrom c, kaspaz-3, kalpain, katepsin B ve L, DNA fragmantasyonu seviyeleri incelenmiş histolojik ve morfometrik bulgular elde edilmiştir.

Etanol grubunda kaspaz-3, kalpain, katepsin B, sitokrom c seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin derecede artmıştır. Dahası, kaspaz-3 ve kalpain seviyeleri etanol+omega-3, etanol+betain, etanol+betain+omega-3 gruplarında etanol grubuyla karşılaştırıldığında azalmıştır. Aynı zamanda katepsin B düzeyleri etanol+betain grubunda kontrolden daha yüksektir. Etanol+betain+omega-3 grubunda katepsin B etanol ve etanol+betain gruplarıyla karşılaştırıldığında azalmıştır. Katepsin L ve DNA fragmantasyonunda istatistiksel olarak farklılık bulunamamıştır. Doku hasarı değerlendirmesi histolojik açıdan; kontrol, etanol+omega-3, etanol+betain, etanol+betain+omega-3 gruplarında hemoraji, PMNL, mikroglia etanol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak düşüktür. Aynı zamanda etanol+omega-3 ve kontrol gruplarında konjesyon ve nekroz etanol indüklü hasara göre azalış göstermiştir. Morfometrik analiz sonucu etanol alınımı etanol+omega-3 ve kontrol gruplarına göre nekrotik hücre sayısını artırmıştır.

Sonuç olarak, postnatal etanol maruziyeti rat beyinlerinde nekrotik hücre ölümünü tetiklemektedir, omega-3 ve betain nörodejenerasyonu azaltmaktadır. Omega-3 ve betain özellikle FAS in önlenmesinde, nörodejenerasyon açısından yararlı olabilir.

Anahtar kelimeler: Betain, Fetal Alkol Sendromu (FAS), Kaspaz-3, Omega-3, Sitokrom c.

SUMMARY

We aim to study effect of neurodegeneration on cerebral cortex of rat pups caused by prenatal and postnatal ethanol exposure with modified liquid diet, to illuminate protective effects of betaine and omega-3 supplementation. When ethanol is consumed during prenatal and postnatal periods, it may result in Fetal Alcohol Syndrome (FAS) in the offspring. Rats were divided into control, ethanol, ethanol+betaine, ethanol+omega-3, ethanol+omega-3+betaine groups. The effect of betaine and omega-3 in response to ethanol-induced changes on cerebral cortex, by biochemical analyses cytochrome c, caspase-3, calpain, cathepsin B and L, DNA fragmentation levels, histological and morfometric methods were evaluated.

Caspase-3, calpain, cathepsin B, cytochrome c levels in ethanol group were significantly higher than control group. Caspase-3, calpain levels were decreased in ethanol+betaine, ethanol+omega-3, ethanol+omega-3+betaine groups compared to ethanol group. Also cathepsin B in ethanol+betaine group was found to be significantly higher than control. Cathepsin B in ethanol+omega-3+betaine group was decreased compared to ethanol, ethanol+betaine groups. Cathepsin L, DNA fragmentation were found not statistically significant. As a result of histological examination of tissue damage, hemorrhage, PMNL, microglia in control, ethanol+betaine, ethanol+omega-3, ethanol+omega-3+betaine groups were decreased statistically significant compared to ethanol group. Congestion, necrosis ethanol+omega-3, control groups were decreased ethanol-induced damage. Result of morphometric examination showed that ethanol administration was increased necrotic cell number compared to ethanol+omega-3, control groups.

In conclusion, we found that postnatal ethanol exposure is capable of triggering necrotic cell death in rat brains, omega-3 and betaine reduce neurodegeneration. Omega-3 and betaine may prove beneficial for neurodegeneration, particularly in preventing FAS.

Keywords: Omega-3, Betaine, Caspase-3, Cytochrome c, Fetal Alcohol Syndrome (FAS).

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK	İ
İÇ KAPAK	İİİ
KABUL VE ONAY SAYFASI	İV
ÖZET	V
SUMMARY	VI
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Beyin Gelişimi.....	4
2.1.1. Nörogenez- Nöroplastisite	5
2.2. Etanol Metabolizması	5
2.2.1. Sitozolik alkol dehidrojenaz.....	6
2.2.2. Mikrozomal-etanol okside edici sistem, MEOS.....	7
2.2.3. Etanolün peroksizomal oksidasyonu	8
2.2.4. Nonoksidatif yol	8
2.2.5. Asetaldehit metabolizması	9
2.2.6. Etanolün biyokimyasal etkileri.....	10
2.2.7. Etanol ve İlaçlarla Etkileşim	11
2.2.8. Etanol farmakokinetiği.....	11
2.2.9. Etanolün Nöronal Etki Mekanizmaları	12
2.2.9.1. GABA reseptörleri / Klorür Kanal Sistemi	13
2.3. Fetal Alkol Sendromu.....	14
2.3.1. FASD’da Beyin Hasarı	18
2.4. Hücre Ölümü	19
2.4.1. Hücre ölümü tipleri.....	23

2.4.1.1. Nekroz	24
2.4.1.2. Apoptoz	24
2.4.1.2.1. İntresik kaspaz bağımlı yol.....	27
2.4.1.2.2. Ekstrinsik kaspaz bağımlı yol.....	27
2.4.1.2.3. Kaspazlardan bağımsız yol	27
2.4.1.3. Otofajik hücre ölümü	31
2.4.1.3.1. Mikrootofaji.....	32
2.4.1.3.2. Şaperon aracılı otofaji.....	32
2.4.1.3.3. Makrootofaji.....	33
2.4.1.3.4. Otofajik hücre ölüm mekanizmaları.....	33
2.4.2. Hücre ölümünde rol olan proteazlar	34
2.4.2.1. Kaspazlar	34
2.4.2.1.1. Kaspazların yapısı ve sınıflandırılması.....	35
2.4.2.1.2. Kaspaz-3 ün özellikleri.....	38
2.4.2.2. Katepsinler	40
2.4.2.2.1. Katepsin B.....	41
2.4.2.2.2. Katepsin L.....	42
2.4.2.3. Kalpainler.....	42
2.4.2.3.1. Kalpainlerin aktivasyonu.....	46
2.4.2.4. Endoplazmik retikulum ve kalsiyum.....	47
2.4.2.5. Kalpain-katepsin- kaspazların ilişkisi.....	48
2.5. Betain	50
2.5.1. Homosistein.....	53
2.5.1.1. Homosistein metabolizması.....	53
2.5.1.1.1. Transmetilasyon.....	54
2.5.1.1.2. Remetilasyon.....	54
2.5.1.1.3. Transsülfürasyon.....	55
2.6. Omega-3 Yağ Asidi	56
2.6.1. Omega-3 yağ asidinin beyin için önemi	58
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	63
3.1. Deneysel Hayvanları ve Madde uygulamaları	63

3.1.1. Deney Grupları	66
3.2. Cerrahi işlemler	67
3.3. Biyokimyasal Yöntemler:	68
3.3.1. Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini	68
3.3.2. Sitokrom c Ölçümü	69
3.3.3. Kalpain Aktivasyonu Ölçümü	72
3.3.4. Katepsin B ve Katepsin L Seviyelerinin Tayini	74
3.3.5. DNA Fragmantasyonu	75
3.3.6. Protein ölçümü	78
3.4. Histolojik Teknikler	81
3.4.1. Tunel Yöntemi Analizi	82
3.4.2. Morfometrik Değerlendirme	85
3.5. İstatistiksel Analizler	85
4. BULGULAR	87
4.1. Biyokimyasal Ölçümler	87
4.1.1. Kaspaz-3 Aktivitesi	87
4.1.2. Sitokrom c Düzeyleri	88
4.1.3. Kalpain Aktivitesi	90
4.1.4. Katepsin B Düzeyleri	91
4.1.5. Katepsin L Düzeyleri	93
4.1.6. DNA Fragmantasyonu	94
4.2. Histolojik bulgular	95
4.2.1. H&E Bulguları	95
4.2.2. Histolojik bulguların değerlendirilmesi	103
4.3. Morfometrik Bulgular	104
5. TARTIŞMA	105
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	116
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	119
8. ÖZGEÇMİŞ	139

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Geri dönüşümlü (Reversibl) hasar	22
Tablo 2.2: Geri Dönüşümsüz (İrreversibl) hasar	23
Tablo 2.3: Nekroz ve apoptoz arası farklar	28
Tablo 2.4: Programlı hücre ölümü tipleri arasındaki farklar	30
Tablo 3.1: TUNEL yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri	83
Tablo 4.1: Kaspaz-3 aktivite sonuçları.....	87
Tablo 4.2: Sitokrom c sitozolik/mitokondriyal (S/M) fraksiyon oranı sonuçları	89
Tablo 4.3: Kalpain aktivitesi sonuçları.....	90
Tablo 4.4: Katepsin B (Sitololik/Lizozomal) oranı sonuçları.....	92
Tablo 4.5: Katepsin L (Sitololik/Lizozomal) oranı sonuçları	93
Tablo 4.6: DNA Fragmantasyonu Sonuçları	94
Tablo 4.7: Gruplara göre elde edilen bulguların medyan ve 25.-75. Persantilleri	96
Tablo 4.8: Beyin korteksi morfometrik bulguları	104

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Etanol metabolizması. ADH: Alkol Dehidrogenaz, ALDH: Asetaldehit Dehidrogenaz	7
Şekil 2.2 : Endoplazmik retikulumda MEOS (CYP2E1 dahil) tarafından katalizlenen reaksiyon	8
Şekil 2.3: Etanol metabolizmasının özeti	9
Şekil 2.4: Etanolün yıkım yolları	12
Şekil 2.5: Etanol maruziyetine bağlı, nöronal mekanizmalar	14
Şekil 2.6: Fetal alkol sendromu bozukluklarındaki yüzdeki karakteristik görünüm ..	15
Şekil 2.7: Etanolün beyinde yaptığı değişiklikler	17
Şekil 2.8: Hipoksik iskemik deneysel neonatal beyin hasarında hücre ölüm fenotipleri	20
Şekil 2.9: Apoptozda görülen intrinsik ve ekstrinsik yollar	26
Şekil 2.10: Nekroz ve apoptoz	29
Şekil 2.11: Otofaji tipleri	32
Şekil 2.12: Otofajinin mekanizması	34
Şekil 2.13: Kaspazlar	36
Şekil 2.14: Prokaspaz ve Aktif Kaspazın Yapısı	38
Şekil 2.15: Kaspaz-3 ün üç boyutlu yapısı	39
Şekil 2.16: Kaspaz-3 aktivasyonu	40
Şekil 2.17: Katepsin B nin üç boyutlu yapısı.....	41
Şekil 2.18: Kalpainin yapısı ve kalsiyum ile ilişkisi	43
Şekil 2.19: Kalpainin şematik yapısı	43
Şekil 2.20: Üç boyutlu Ca^{+2} suz insan m-kalpain yapısı	44
Şekil 2.21: İnsan kalpain ailesi üyelerinin domain yapıları.....	45
Şekil 2.22: Kalsiyum tarafından kalsiyumun aktivasyon mekanizması.....	47
Şekil 2.23: Endoplazmik retikulum, kalpain ve kalsiyumun apoptozdaki rolleri.....	48
Şekil 2.24: Hücre ölümünde kalpainin rolü	49
Şekil 2.25: Nekroz aracılı proteolitik kaskat mekanizması	49
Şekil 2.26: Betainin kimyasal formülü	50

Şekil 2.27: Betainin metabolizmadaki rolü	51
Şekil 2.28: Betain metabolizması	52
Şekil 2.29: Metiyonin ve homosisteinin kimyasal yapısı.....	53
Şekil 2.30: Homosistein metabolizması	55
Şekil 2.31: Omega-3 yağ asitleri	57
Şekil 2.32: Omega-3 yağ asitlerinin metabolik yolağı	57
Şekil 2.33: Dokozahekzaenoik asidin (DHA) (22:6) nöron ve astrositlerdeki dağılımı	59
Şekil 2.34: Dokozahekzaenoikasitin sinir sistemindeki biyokimyasal ve biyolojik.....	61
Şekil 2.35: Bir karbon atomu siklusu: folik asit, vitamin B12 and DHA.....	62
Şekil 3.1: Vajinal plak oluşumunun görülmesi.....	64
Şekil 3.2: Yeni doğan yavrular	65
Şekil 3.3: Deneyde uygulanan maddelerin şekil üzerinde gösterilmesi.....	66
Şekil 3.4: Postnatal 21. gündeki yavru ratlar	67
Şekil 3.5: Kaspaz 3 aktivitesi standart grafiğı	69
Şekil 3.6: Standart ile hazırlanan seri dilüsyonlar.....	71
Şekil 3.7: Sitokrom c ölçümü standart grafiğı	72
Şekil 3.8: Kalpain aktivitesi standart grafiğı	73
Şekil 3.9: Katepsin aktivitesi standart grafiğı.....	75
Şekil 3.10: DNA'nın hidrolizi ve 2-deoksi-riboz şekeri oluşumu	76
Şekil 3.11: DNA fragmantasyonu standart grafiğı.....	78
Şekil 3.12: Bradford reaksiyonu	79
Şekil 3.13: Doku protein ölçümü için albumin ile yapılan standart grafiğı	80
Şekil 3.14: Nokta sayım yapılan alan.....	85
Şekil 4.1: Beyin dokusunda kaspaz-3 aktivitesi düzeyleri ($\mu\text{mol PNA/dakika/mg}$ protein).....	88
Şekil 4.2: Beyin dokusunda sitokrom c (S/M) oranı.....	89
Şekil 4.3: Beyin dokusunda kalpain düzeyleri (pmol/dakika/mg protein)	91
Şekil 4.4 : Beyin dokusundaki katepsin B (Sitololik/Lizozomal) oranı.....	92
Şekil 4.5 : Beyin dokusundaki katepsin L (Sitololik/Lizozomal) oranı	94
Şekil 4.6: DNA fragmantasyonu % oranı.....	95
Şekil 4.7: Kontrol grubu (bar: 100 μm , bar: 50.0 μm , HE).....	97

Şekil 4.8: Etanol grubu (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).....	98
Şekil 4.9: Etanol + Betain grubu (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).....	99
Şekil 4.10: Etanol + Omega-3 grubu (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).	100
Şekil 4.11: Etanol + Betain + Omega-3 grubu (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).	101
Şekil 4.12: TUNEL yöntemi uygulanmış beyin korteksinde tüm gruplar.....	102

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

- AA : Araşidonik asit
AC-DEVD-pNA: Asetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilidin
ADH: Alkol dehidrojenaz
ADHD : Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu
AIF: Apoptozu tetikleyici faktör
ALA: Alfa-linolenik asit (18:3)
AMC: A 7-Amino-4-Metil Kumarin
APAF-1: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
ARBD: Alkol ilişkili doğumsal kusurlar
ARND: Alkol ilişkili nörogelişimsel bozukluklar
ATP: Adenozin Trifosfat
BDNF: Beyinden türeyen nörotrofik faktör
BHMT: Betain-homosistein metiltransferaz
BOS: Beyin omurilik sıvısı
CANP: Kalsiyum bağımlı doğal proteaz (calcium-activated neutral protease)
CBS: Sistasyonin- β -sentaz
CK: Kreatin Kinaz
CYP2E1: Sitokrom P450 karma fonksiyonlu oksidaz izoenzimi
DHA: Dokozahekzaenoikasit
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
DTT: Dithiothreitol
EAA: Eksitatör Amino Asit
EDTA: Etilendiamintetraasetik asit
EGTA: Etilenbis(oksonitrilo)]tetra-asetik asit
EPA: Eikozapentaenoik asit (20:5)
ER: Endoplazmik Retikulum
FADD: Bağlanma Fas ile ilgili ölüm bölgeleri (FADD)

FAS: Fetal alkol sendromu
FASD: Fetal alkol spektrum bozukluğu
GABA: Gamma-aminobütirik asit
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HE: Hemotoksilen eosin
ICE : İnterlökin-1 beta dönüştürücü enzim
IP₃: İnositol-1, 4, 5 trifosfat
LAMP2A: Lizozom ilişkili membran protein tip 2A
LDH: Laktat dehidrogenaz
MS: Metiyonin sentaz (5-metiltetrahidrofolat-homosisteinmetiltransferaz)
MSD : Modifiye sıvı diyet
MSS: Merkezi sinir sistemi
MTHFR: Metilentetrahidrofolat redüktaz
NAD⁺: Nikotinamid Dinükleotit
NADPH: Nikotinamid Dinükleotit Fosfat
NCCD: Hücre Ölümü üzerine İsimlendirme Komitesi
NMDA: N-metil D-aspartat
NPD: Nöroprotektin
PARP: Poli-adenozindifosfat riboz polimeraz
PC: Fosfatidilkolin
PEMT: Fosfatidiletanolamin-N- metiltransferaz
PEST : Prolin, glu, ser, threo
PFAS: Parsiyel fetal alkol sendromu
PIDD : p53 uyarıcı protein
PLA₂: Fosfolipaz A₂
PMNL: Polimorf nüveli lökosit
pNA: p-nitroanilin
PUFA: Çoklu Doymamış Yağ asidi (Poly Unsaturated Fatty Acids)
ROS: Serbest oksijen türleri
RyR: Riyanodin reseptör
SAH: S-adenozil homosistein

SAM: S-adenozil metiyonin

SERCA: Sarkoplazmik/Endoplazmik Ca⁺²-ATPaz

THF: Tetrahidrofolat

TICAM: Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labeling

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fetal alkol sendromu (FAS); kısa palpebral fissür, incelmış üst dudak ve düz filtrum gibi karakteristik minör yüz anomalileri, prenatal ve/veya postnatal büyüme geriliği, mental gelişim bozukluğu ile karakterizedir. FAS'da bir çok organda doğuştan defektler görülebilmekle birlikte, zeka performansında gerilik, algılamada zorluk ve bir takım beceri isteyen görevleri tamamlamada gecikme ve hiperaktivite gibi durumlara da yol açmaktadır (120).

Kronik alkol kullanımı basit bir intoksikasyondan, hayatı tehdit eden şiddetli metabolik bozukluklara kadar birçok patolojik durumla ilişkilidir. Alkolün hem kimyasal hem de fiziksel olarak hücre membran hasarına yol açtığı bilinmekte olup, alkol araştırmaları etanol ile uyarılan biyokimyasal mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (43). Alkol, merkezi sinir sistemi (MSS) dahil birçok sistemi etkilediği bilinen önemli bir teratojendir. Gebelik döneminde tüketildiğinde özellikle gelişmekte olan MSS'nin yapısına, nöronal migrasyonuna ve sinaptogenezine zarar vermektedir. Gebeliğin ilk dönemi, özellikle de çoğu annenin gebe olduğunu fark etmediği ilk ayı boyunca aşırı ve düzenli alkol tüketimi, MSS ve orta yüz yapılarının zedelenmesi açısından en büyük riski oluşturur (232). Alkolik anneden fetusa geçen alkol, yeni doğanlarda gerek immünolojik, gerekse genetik etkilerle FAS'a yol açar (203).

Bir hücrenin uyum göstermesi ya da zarara uğraması, zorlayıcı etkenin tipi ve şiddetinin yanısıra, etkene maruz kalan hücrenin tipine, etkenin duyarlılığına, kanlanma ve beslenme durumuna da bağlıdır (125). Nekrotik hücre ölümü durumunda aktive olmuş kalpainlerin lizozomal zarlara zarar verdiği belirlenmiştir. İskemik olaylardan sonra ilk görülen durum kalpainlerin, lizozomların zarına yerleşmesidir. Sonrasında ise katepsinler sitoplazmaya sızar. Bu durum kalpain-katepsin aktivasyonu oluşumuna neden olur. Katepsin ve kalpain'in sınırlı aktivasyonu apoptozu tetiklerken, şiddetli aktivasyonu nekroz gelişimine neden olmaktadır. Aynı zamanda kalpainler, kaspaz-9 gibi prokaspaz-3 ün aktiflenmesini sağlamaktadır (187,216).

Betain; serum metiyonin transmetilasyon oranını, homosistein remetilasyonu ve metiyonin oksidasyonunu arttırmaktadır. Betain bir seri enzim reaksiyonuyla katabolize olur. Bu çoğunlukla böbrek ve karaciğer hücrelerinin mitokondrilerinde gerçekleşir. Transmetilasyon reaksiyonları metil (tek karbon) gruplarının metiyonin döngüsü içerisinde transferini içermektedir. Homosisteinin metiyonine dönüşümü, metiyonin düzeyini korunması, homosisteinini kırmızı kan hücrelerinde protein, kreatin, fosfolipid, hormonlar, poliaminler, karnitin ve adrenalın sentezi ile DNA metilasyonunda direkt metil vericisi olarak görev alan SAM (S-adenozil metiyonin) üretiminde görev alır. Eğer betain katabolize olmazsa organik bir ozmolit olarak iş görür. Hücresel hidrasyon durumunun düzenlenmesi hücre fonksiyonunun devamlılığı açısından önemlidir. Betainin, betain-homosistein-metiltransferaz (BHMT) yoluyla homosisteini remetile ederek hepatik SAM ve glutatyon seviyelerini koruduğu ve bu yolla metiyonin metabolizmasındaki alkol kaynaklı değişimleri azalttığı daha önce gösterilmiştir (53,110). Kolin ve kolin metaboliti olan betaininin maternal kolin eksikliğinde, fetal beyin gelişiminde nöronal progenitor hücre proliferasyonunda azalış, apoptozda artış, DNA ve spesifik hipometilasyon kognitif ve hafıza ile ilgili fonksiyonlarda değişimler söz konusudur (87).

Beyinde omega-3 yağ asitlerinden predominant olan, dokozahekzaenoikasit (DHA) dır. DHA gri maddede yüksek oranda bulunur (215). Hücre membranının yapısı ve içeriği, hücrenin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için çok önemlidir. DHA, özellikle beyin, retina ve diğer nöral dokularda yoğun olarak bulunan ve hücre membranının yapısına katılan bir yağ asididir. Sinir sisteminin gelişimi için önemli rolü olan DHA, serebral korteks yağ içeriğinin %15-20'sini oluşturur. DHA, aksonal yapıyı koruyarak, elektriksel uyarıların düzgün olarak iletilmesine katkıda bulunur (29,138). Hücrenin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için hücre membranının yapısı ve içeriği çok önemlidir. Omega-3 yağ asitleri hücre membranının önemli bileşenlerinden olup; membranın bütünlüğü ve akışkanlığı, hücresel hareketleri, reseptörlerin yerleşimini düzenler. Ayrıca omega-3 yağ asitlerinin antiinflamatuvar, antioksidan, antihipertansif, antihiperlipidemik, antiaterojenik, antiaritmik ve antiagregan özellikleri olduğu tespit edilmiştir (8,138). DHA, infantların beyin gelişimi ve fonksiyonel gelişim

için esansiyeldir. DHA eksikliği, fetal alkol sendromu, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (ADHD), kistik fibrozis, fenilketonüri, unipolar depresyon, adrenolökodistrofi ile ilişkilidir. Omega-3 yağ asidi hem nöronal sağlamlık hem de fonksiyonel açıdan gereklidir ve eksikliği fetal ve neonatal gelişimi etkiler. Spesifik omega-3 yağ asidi eksikliği, öğrenme yeteneğinde eksikliğe yol açar çünkü DHA hücre sinyalinde görev almaktadır. DHA, insan ve diğer memelilerde beyin ve retinal dokularda oldukça fazla miktarda bulunmaktadır. Omega-3 özellikle DHA, beyin gelişimi ve beyin nöronlarının iletişimindeki mekanizmada rol alır. Yapılan hayvan çalışmalarıyla; mental hastalıklar, beyin prosesi ve ruh hali, anksiyete durumu omega-3 desteği verilerek incelenmiştir ve n-3 PUFA eksikliğinin öğrenme ve hafızada belirgin şekilde bozukluğa sebep olduğu gösterilmiştir (135,190). Homosisteinin metiyonine dönüşümü, metiyonin düzeyinin korunması, homosisteinini detoksifiye etmek ve S-adenozilmetiyonini (SAM) üretmek için gereklidir. SAM'dan metil grupları PEMT (fosfatidiletanolamin-N- metittransferaz) ile DHA'ya, oradan da DNA ve histonlara aktarılır. Fosfatidilkolin (PC), PUFAların karaciğerden plazma ve periferel dokulara dağılımında önemli bir rol oynamaktadır (124).

Bu tez çalışmamız prenatal ve postnatal etanol maruziyetine bağlı oluşan fetal alkol sendromlu model oluşturmak ve etanolün beyin dokusunda yaptığı nörodejenerasyonu göstermek, nörodejenerasyonun önlenmesinde betain ve omega-3 ün beyin hasarını önlemedeki etkilerini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla gebe Spraque-Dawley türü ratlara hem prenatal hem de postnatal dönem (p 21.gün) sürecinde etanole maruziyet için modifiye sıvı diyet uygulaması yapılmıştır ve yavru rat beyinlerindeki etkisi araştırılmıştır. Oluşan hücre ölüm sürecini göstermek için biyokimyasal olarak hem nekroz ve hem de apoptoz mekanizması içinde yer alan sitokrom c salınımı, kaspaz-3 aktivasyonu, katepsin B ve L, kalpain ve DNA fragmentasyonu düzeylerine, histolojik ve morfometrik analizlerle ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte betain ve omega-3 ün potansiyel koruyucu ajanlar olup olamayacakları, hücre ölüm yollarındaki koruyucu etkileri; hem biyokimyasal, hem histolojik ve morfometrik analizlerle değerlendirilerek araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin Gelişimi

Beyin gelişimi, gebelik ile başlayıp tüm adolesan dönem boyunca da devam eden, en hızlı olarak yaşamın ilk birkaç yılı içinde olmaktadır. Beyin gelişimi aşamaları, sinir hücrelerinin oluşumu (nörogenez), sinir hücrelerinin göçü (migrasyon), sinir hücrelerinin birbiri ile iletişimlerini sağlayacak akson ve dendritlerinin oluşumu, sinaps oluşumu (sinaptogenez), sinapsların artırılması, olgunlaşması ve sonuç olarak sinir hücrelerinin çevresinde destek dokuların ve etkili iletişimi sağlayacak dokuların oluşmasıdır (gliagenez ve miyelinizasyon) (169).

Beyin gelişimi için kritik periyot, gelişime bağlı olarak bir seri, hızlı kökten değişikliğin olduğu dönemdir. Bu dönem özellikle aksonal büyüme, dendritik olgunlaşma, sinir hücresi ağlarının kurulması, yeni sinapsların oluşması, glia hücrelerinin çoğalması ve miyelinizasyon gibi değişiklikleri kapsamaktadır. Ayrıca, bu dönemde motor ve duygusal yetenekler kazanılmakta, spontan motor davranışlar pik yapmaktadır. Kritik beyin gelişim periyodu, nörotransmitter sistemlerin farklılaştığı, nicel ve nitel değişikliğe uğradığı zaman dilimidir. Örneğin, bu dönemde glutamaterjik sistem değişikliğe uğrar ve NMDA reseptörlerinin sayısı artar. Bir çok davranış özelliklerinin ve bilişsel işlevlerin, kolinerjik ve glutamaterjik transmitter sistemlerle bağlantılı olması nedeniyle, bu dönemdeki değişiklikler büyük önem taşır. Memelilerde beyin kritik gelişim döneminin başlangıcı ve süresi türe göre değişim gösterir. Bu kritik dönem insanda, gebeliğin 3. döneminde (trimester) başlar ve yaşamın ilk 2 yılına kadar devam eder, fare ve rat gibi kemirgenlerde ise yaşamın ilk 3 haftasını kapsar ve doğumdan sonra 10. günde pik yapar (10,224).

2.1.1. Nörogenez- Nöroplastisite

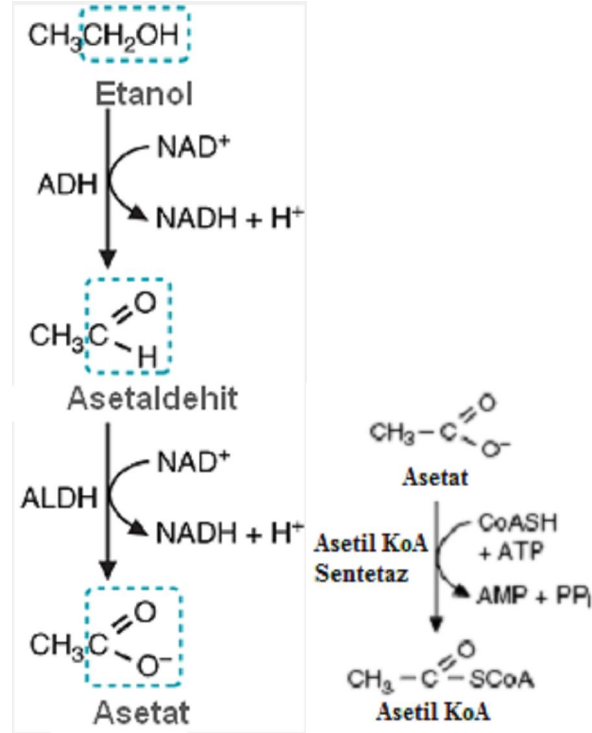
İnsandaki nöronların büyük çoğunluğu prenatal yaşamın ikinci döneminin sonunda oluşur. Nöronal migrasyon gebeliğin ilk haftalarında başlar ve doğum esnasında büyük ölçüde tamamlanmış olur. Doğumu izleyerek 6 yaş civarına kadar, sinaps oluşumu oldukça hızlıdır. On dört yaştan başlayarak sinaps sayılarında giderek bir azalma gözlenir. Ayrıca yeni nöron oluşumu, nöronların kronik şiddetli stres gibi olumsuz etkenlere karşı dirençlerinde değişiklikler ve sinaptik etkinlikte artış veya azalmalar ortaya çıkabilir. Merkezi sinir sisteminde nöroplastik yanıtlarla ilişkili değişiklikler şöyle sıralanabilir:

- a. Dendritlerde dallanmanın azalması veya artması,
- b. Dendritlerde kırılma,
- c. Dendrit boylarında uzama,
- d. Yeni sinaps oluşumu veya mevcut sinapsların ortadan kalkması,
- e. Var olan sinapsların etkinliğinin değişmesi (artması veya azalması),
- f. Yeni nöron oluşumu (Nörogenez),
- g. Nöron ölümü,
- h. Temel beyin metabolitlerinde değişiklikler,
- i. Mevcut nöronların hayatta kalma sürelerinde değişiklikler,
- j. Mevcut nöronların stres altında bozulmaya karşı dirençlerinin artması,
- k. Mevcut nöronların uyarıya karşı sinaps sonrası potansiyellerindeki değişiklikler,
- l. Nörotrofik faktörlerin etkinliklerindeki değişiklikler (209).

2.2. Etanol Metabolizması

Etanol karaciğerde üç enzim sistemi tarafından okside edilmektedir (Şekil 2.3). Üç sistemde de asetaldehit üretilir ve hızlıca asetatata okside olur (131,192).

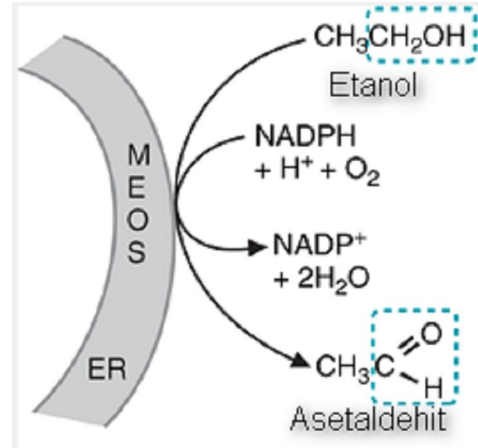
2.2.1. Sitozolik alkol dehidrojenaz: Alkol dehidrojenazın (ADH) 20 farklı izoenzimi olduğu tahmin edilmektedir. Yolak geniş ölçüde NAD^+ oranı ile düzenlenir (192). İnsan ADH enzimi, dimerik çinko bağımlı bir metalloenzimdir. Bu enzim 7. gen üzerinde kodlanmıştır ve ADH1-ADH7 arasında sınıflandırılmıştır (37). ADH enzimi, alkol substratının zincir uzunluğuna özgüllüğü değişen izoenzim ailesine sahiptir. Etanol için en fazla özgüllüğü olan ADH sınıf 1'dir. ADH1 için her biri allellik varyantlar gösteren 3 gen bulunmaktadır. ADH1 karaciğerde bol miktarda bulunmaktadır. Etanol için düşük K_m değerine sahiptir. 0,05-4 mM'lık bu K_m değerine yüksek affiniteyi göstermektedir (131). ADH enziminin alfa (α), beta (β) ve gamma (γ) alt birimleri olmak üzere üç adet alt birimi tanımlanmıştır. Her alt birim farklı bir gen tarafından kodlanmıştır (130). Değişik ırklarda değişik ADH gen polimorfizmi bildirilmiştir. Özellikle ADH2*2 ve ADH3*1 izoenzimlerinde polimorfizm olduğu belirtilmiştir. ADH'nin vücudun farklı bölgelerinde yerleşmiş izoformları olduğu gösterilmiştir (37). Malat / aspartat mekiğinde dönüştürülür. Mitokondride transport edilir, dahası solunum zincirinde $NADH+H^+ \rightarrow NAD^+$ ye okside edilir (192). Karaciğerde etanol metabolizmasının ana yolu nikotinamid adenin dinukleotidi (NAD^+), indirgen nikotinamid adenin dinukleotid ($NADH$)'a indirgeyerek, etanolü asetaldehite yükseltgeyen sitozolik bir enzim olan alkol dehidrojenaz aracılığıyla gerçekleşir. Asetaldehit, metabolize edilerek ortamdaki uzaklaştırılmazsa; karaciğerde toksik etkiler gösterir ve kan yoluyla diğer dokulara geçip onlar üzerinde toksisite gösterebilir (Şekil 2.1) (37,131).



Şekil 2.1: Etanol metabolizması. ADH: Alkol Dehidrogenaz, ALDH: Asetaldehit Dehidrogenaz (131)

2.2.2. Mikrozomal-etanol okside edici sistem, MEOS: Bu sistem düz endoplazmik retikulumda lokalizedir ve sitokrom p 450 enzimlerini içerir. Bunlar ilaç ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunundan sorumlu monoksijenaz ailesindedir (192). Temel ilişkili mikrozomal enzim, elektron vericisi olarak indirgen adenin dinukleotid fosfat (NADPH), elektron alıcısı olarak O_2 'yi kullanan sitokrom P450 karma fonksiyonlu oksidaz izoenzimi (CYP2E1)'dir (131). Akut alkol alımından farklı olarak kronik alkol alımında CYP2E1 denilen özgül bir sitokrom P450 enziminin aktive olduğu gösterilmiştir. Bu enzim sitokrom P450'nin etanolü indükleyen fraksiyonudur. CYP2E1 'in K_m değeri göreceli olarak yüksektir. CYP2E1 göreceli olarak NADP^+ kullanarak yüksek indirgeme potansiyeline sahiptir. Bu durum serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur (118,130). Bu enzim aynı zamanda birçok hepatotoksik bileşiğin metabolize edilmesinde de rol oynamaktadır. Kronik alkol kullanımı sırasında başka

ilaçların alınması durumunda bu enzim nedeniyle diğer ilaçların da metabolizması etkilenmektedir. CYP2E1 etanolle aşırı indüklendiğinde karaciğer hasarına neden olmaktadır (Şekil 2.2) (130,131) .

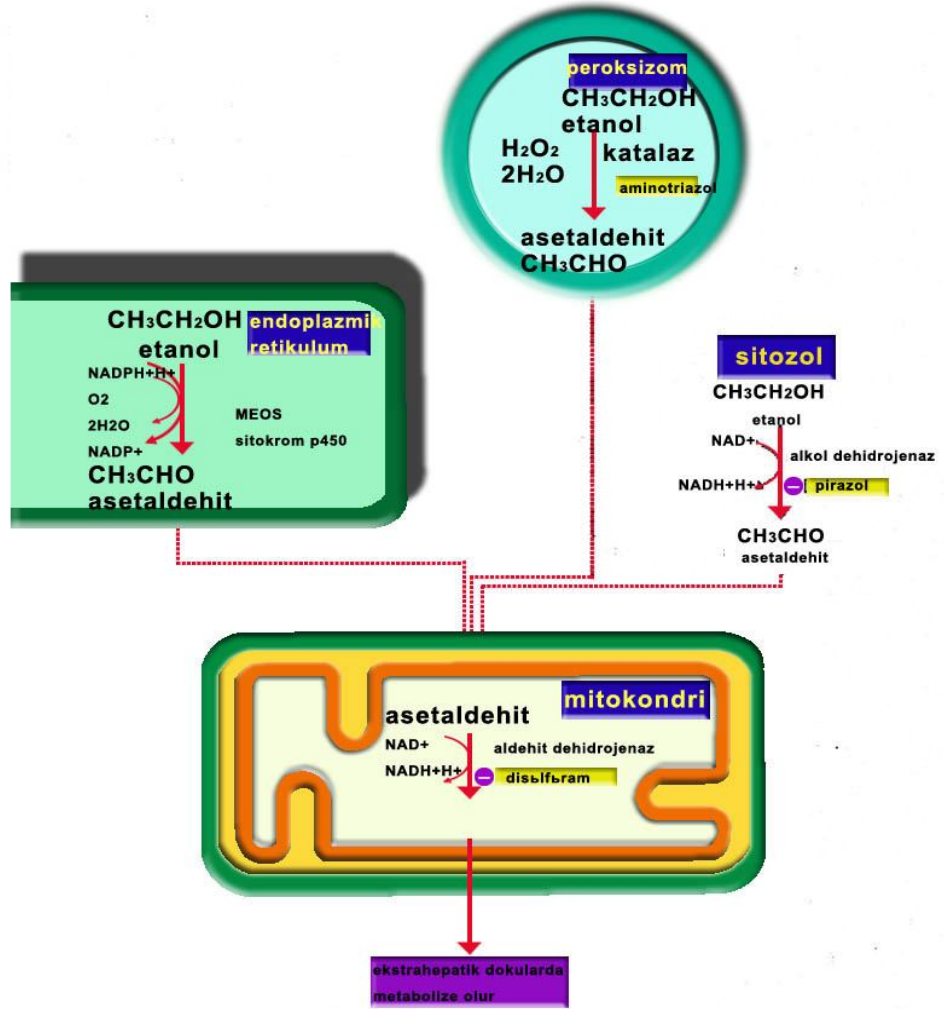


Şekil 2.2 : Endoplazmik retikulumda MEOS (CYP2E1 dahil) tarafından katalizlenen reaksiyon (131).

2.2.3. Etanolün peroksizomal oksidasyonu: Katalazın hidrojen peroksit kullanılarak alkole oksidasyonu ile olur. Örnek olarak, metanol ve etanol ilişkili aldehydler verilebilir (192). Katalaz, peroksizomlarda yağ asitlerinin beta (β) oksidasyonu sırasında oluşan hidrojen peroksit (H₂O₂) varlığında rol oynar. Katalaz yolağı H₂O₂ varlığında *invitro* olarak etanolü okside eder. Fizyolojik koşullarda çok az rol alan bir sistemdir. Alkolün az miktarda alındığı durumlarda NAD⁺'nin kofaktör olarak rol almasına gerek duyulmadan çalışan bir sistemdir. Bu yolun sonunda da asetaldehit oluşur (37).

2.2.4. Nonoksidatif yol: Akut alkol intoksikasyonunda yağ asitlerinin etil esterlerinin pankreas, karaciğer, kalp ve yağ dokusunda yüksek konsantrasyonlarda biriktiği ancak bunun doğrulanmamış bir hipotez olduğu belirtilmektedir (37). Bu metabolik yolda, potansiyel toksik ürünler olan yağ

asidi etil esterlerinin üretimi gerçekleşmektedir. Bu metabolitler yağ asidi etil esteri sentaz tarafından sentezlenirler (24).



Şekil 2.3: Etanol metabolizmasının özeti (192)

2.2.5. Asetaldehit metabolizması

Mitokondride aldehit dehidrojenaz tarafından asetata okside olur. Sonuçta asetat Krebs siklusunda asetil Ko A ya aktive edilir, yine karaciğerde Krebs siklusu asetil ko A yı okside edemez ve $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ oranı mitokondriyal matrikste artar. Sonuçta asetat karaciğerde okside olarak ekstrahepatik dokulara gider. Asetaldehit birikimi

istenmeyen sonuçlara yol açar. Japon ve Çinlilerin %45 inde genetik olarak aldehit dehidrojenaz defekti söz konusudur, disülfüram (antabuse) verilir ve aldehit dehidrojenaz inhibe edilir ve etanol tüketilmesi durumunda asetaldehit akümülyasyonu olur. Diyabetik hastalarda da sık olarak kullanılan sülfonilüre grubu ilaçlardan olan klorpropamid, aldehit dehidrojenaz inhibitörüdür ve aynı zamanda ‘alkolik flushing’ yani alkol alımını takiben gelişebilen yüzde kızarma, çarpıntı, baş ağrısı, bulantı, kusma, terleme, hipotansiyon gibi belirtilerin ortaya çıkmasından da sorumludur (105,192).

2.2.6. Etanolün biyokimyasal etkileri

NADH+H⁺/NAD⁺ oranında artış: Etanolün sindiriminden sonra hem sitozolik alkol dehidrojenaz reaksiyonu hem mitokondriyal aldehit dehidrojenaz reaksiyonu ile NADH+H⁺ üretilir ve NAD⁺ depleasyonu sonucu NADH+H⁺/NAD⁺ belirgin derecede artar. Bu durum sonucu şu değişimler izlenir:

- 1- Glukoneojenez inhibe olur: NADH+H⁺/NAD⁺ oranının sitozolde yükselmesi ile dehidrojenaz reaksiyonları reaktantları azalır. Özellikle piruvattan laktata dönüşüm, okzaloasetattan malata dönüşümü azalır ve böylece glukoneojenez metabolitlerinin akışı önlenir ve hipoglisemiye neden olur.
- 2- Krebs siklusu karaciğerde inhibe edilir: Yüksek NADH+H⁺/NAD⁺ oranı mitokondriyal matrikste izositrattan α -ketoglutarat, α -ketoglutarattan suksinil Ko A ve malattan okzaloasetata oksidasyonu önler. Sonuçta karaciğerde asetat, asetil Ko A metabolizması için aktive edilir ve fazlası ekstrahepatik dokulara dağıtılır (192).

Hiperlaktatemi ve Gut: Laktat akümülyasyonu hiperlaktatemi ile sonuçlanır. Bu hiperürisemiye neden olmaktadır. Laktat ve üratın renal tübüllerden sekresyonu aynı mekanizma ile olmaktadır. Gutta ürik asit plazmada artar ve kristalize olarak parmak ucundan çıkar (192).

2.2.7. Etanol ve İlaçlarla Etkileşim

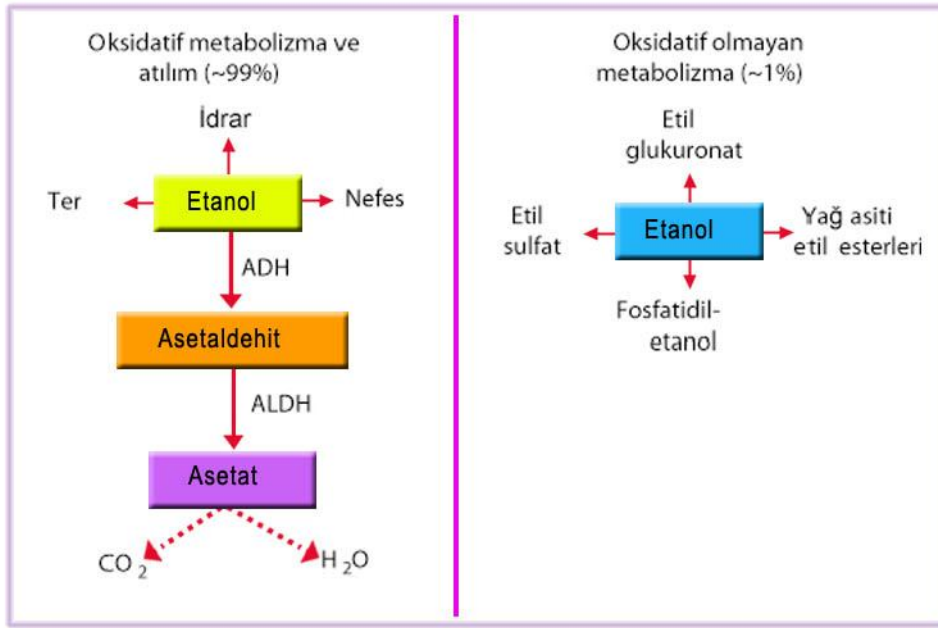
Uzun süreli ilaç tedavilerinde örneğin barbituratlar, düz endoplazmik retikulum proliferasyonuna neden olur ve vücuttan temizlenebilmek için metabolizmalarında görevli olan sitokrom p 450 izoenzimlerinin aktivitelerinde artışa neden olur. Benzer şekilde kronik alkol alımı endoplazmik retikulum proliferasyonunda artış ve bu enzimlerin indüksiyonuna neden olur. Sitokrom p 450 enzimleri bu ilaçlar yerine alkolü tercih eder sonuçta inaktivasyon ve barbiturat klerensi baskılanır ve lethal (ölümcül) doza neden olur. Etanol hızlı bir şekilde hipoglisemiye geçişi indükler (192).

2.2.8. Etanol farmakokinetiği

Ağız yolundan alınan etanol, mide–barsak kanalından pasif difüzyonla hızlı bir şekilde ve tam olarak absorbe edilir. Absorpsiyon hızının yüksekliği, sıvı olmasına, molekül kütesinin küçük olmasına, iyonize olmamasına bağlıdır. Etanol alındıktan beş dakika sonra kanda belirir. Aç karnına alındığında içilen miktarın yaklaşık %20’si mideden, geri kalanı ince barsaktan absorbe edilir. İnce barsaktan olan absorpsiyonun hızı, mideden olana göre daha fazladır. Normal bir kimsede tek bir dozdan sonra maksimum kan konsantrasyonuna 40–60 dakikada eriştiği halde, gastrektomili hastalarda bu süre yaklaşık 20 dakikadır. Mide dolu olduğu takdirde, mideden absorpsiyon yavaşlar; ayrıca bu durumda midenin boşalma süresinin uzaması nedeniyle ince barsağa geçiş gecikir. İnce barsağa gelen etanolün hepsi buradan absorbe edilir ve kolona erişemez (113).

Etanolün, absorpsiyon hızı gradiyentine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Alkollü içkilerdeki etanol oranı çok yüksek seviyede olursa, etanolün ince barsağa geçişi engellendiğinden, absorpsiyon hızında düşme gözlemlenir. Etanol plazma proteinlerine bağlanmaz ve vücuttaki tüm sıvı kompartmanlara kolay bir şekilde difüze olur. Kandaki orana yakın olarak aköz hümmör ve BOS gibi diğer sıvılarda hemen hemen aynı konsantrasyona sahiptir (Şekil 2.4) (231). Alınan etanolün %98’i yaklaşık olarak

elimine edilir. Kalan kısmı ter bezlerinden, akciğerlerden ve böbreklerden atılır. Ekspire edilen havadaki etanol konsantrasyonu, kan konsantrasyonu ile koreledir ve aradaki oran 1:1300 kadardır. Bundan dolayı etanol tayinini havadan yapmak kolaydır ve gerçeği yansıtmaktadır. Sıfır derece kinetiğe göre gerçekleşen etanol metabolizması iki yoldan gerçekleşir (113).



Şekil 2.4: Etanolün yıkım yolları (231).

2.2.9. Etanolün Nöronal Etki Mekanizmaları

Etanol tarafından etkilenen reseptörler içerisinde en fazla incelenenler GABA A ve Eksitör Amino Asit (EAA) reseptörleri yer almaktadır. Etanol glutamat NMDA ve EAA reseptörlerini antogonize eder. Kronik etanol maruziyeti sonucunda bu reseptörlerde "upregülasyon" (reseptör sıklığında artış) gözlemlenir. Kronik etanol maruziyetinin ortadan kalkmasından sonra ise ortaya çıkan etanol yoksunluk sendromuna hipereksitasyon eşlik eder (134).

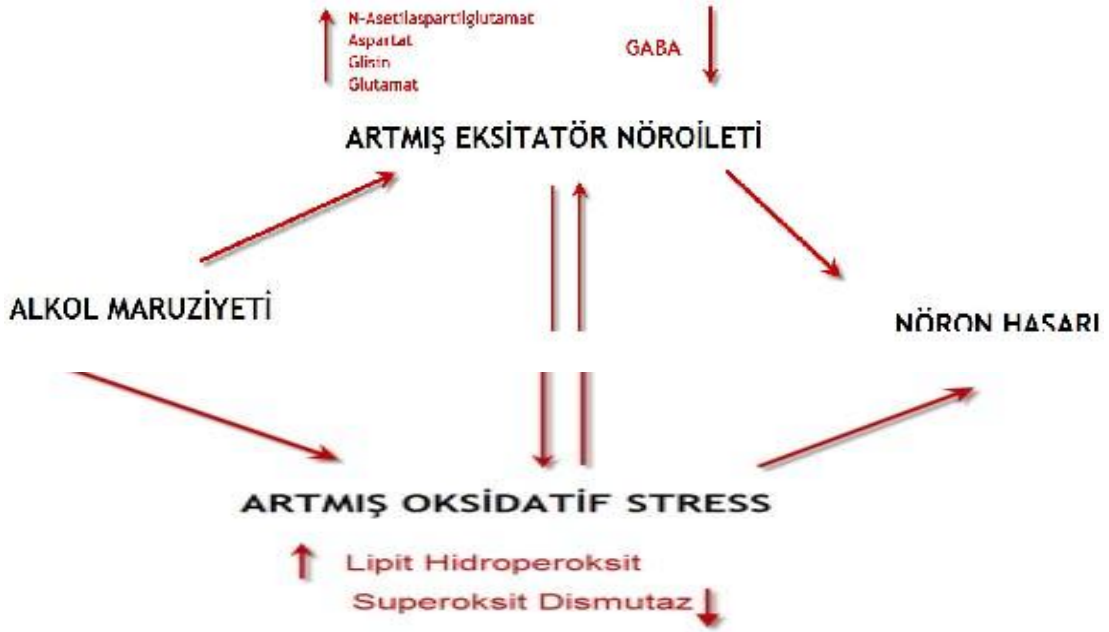
2.2.9.1. GABA reseptörleri / Klorür Kanal Sistemi

Etanol, beyinde ana inhibitör nöromediyatör olan GABA'nın GABA A tipi reseptörlerini indirekt olarak aktive eder. Etanolün GABA sistemi üzerine etkilerinin onun pekiştirici etkisi ile bir şekilde ilişkili olduğu düşünülmekte ve GABA A reseptörlerinin pozitif allosterik modülatörü olarak rol oynamaktadır. Akut etanol yoksunluğunda merkezi GABA etkinliğindeki azalma, ödül eşiğinin yükselmesine bağlı olumsuz duygulanımın en önemli nedenlerinden biridir (121).

GABA A ve GABA B, GABA'nın 2 ana reseptörüdür. GABA'nın baskılayıcı bir reseptör olmasının ana sebebi reseptör kompleksinin klorür kanalına bağlanarak, hücre içine klor iyonu geçişinin düzenlenmesi ile klor kanalının açılarak hücrenin hiperpolarize olmasından dolayıdır. Bu olay nöronların çoğunda GABA A reseptörlerinin uyarılması ile gerçekleşir. GABA B reseptörü ise G proteinine bağlı çalışan reseptör sınıfındadır (38). Etanolün daha çok beyin korteksindeki ve mediyal septal nöronlarda ve hipokampal nöronların bir kısmında GABA A'nın baskılayıcı etkisini artırdığı bilinir (74). Kronik etanol alımı sonucunda GABA A reseptöründe reseptör alt birimlerinin gen ifadesinde azalmaya bağlı olarak zamanla düzenlenmesinde azalış (down regulation) olduğu düşünülmektedir (38).

Etanol ile hasarın oluştuğu diğer sistemler;

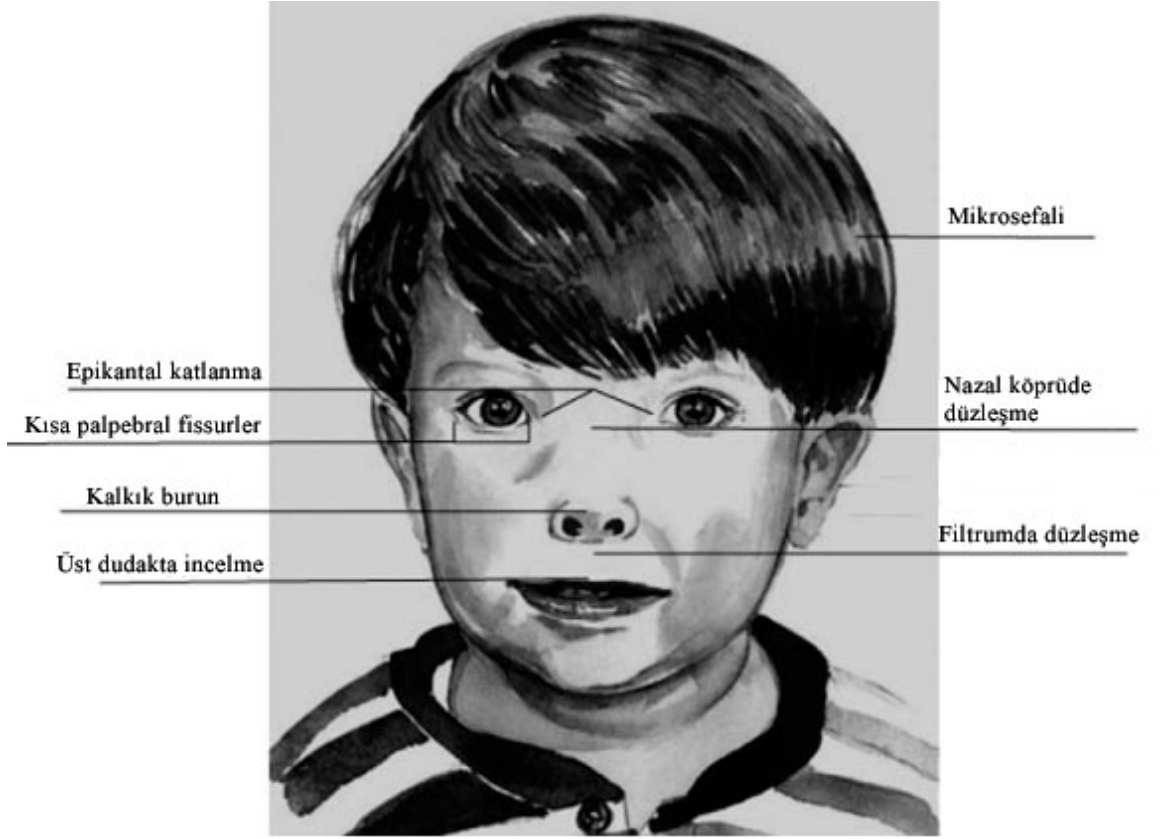
1. Glutamat, NMDA reseptörü, ve kalsiyum kanalları,
2. Mono aminerjik nörotransmitter sistemi ve
3. Nörohormon ve nöropeptit sistemidir (Şekil 2.5) (221).



Şekil 2.5: Etanol maruziyetine bağlı, nöronal mekanizmalar (221).

2.3. Fetal Alkol Sendromu

İntrauterin alkol maruziyetinin fetüs üzerine çok sayıda zararlı etkisi vardır. Bu zararlı etkiler yapısal, nöro-kognitif ve davranışsal bozukluklar olarak ortaya çıkar. Bu durum 'fetal alkol spektrumu bozuklukları' 'fetal alkol spektrum bozukluğu' (FASD) olarak tanımlanmaktadır. Bu spektrumun en ciddi formu; büyüme geriliği, merkezi sinir sistemi gelişim anomalileri, karakteristik yüz özelliklerinin tamamını kapsayan fetal alkol sendromudur. FASD'nin diğer alt kategorileri parsiyel fetal alkol sendromu (PFAS), alkol ilişkili doğumsal kusurlar (ARBD) ve alkol ilişkili nörogelişimsel bozukluklar (ARND) olarak adlandırılır. FASD önemli bir toplumsal sağlık problemi olduğu için, riskli çocukların erken tanınması ve müdahale edilmesi gerekir (Şekil 2.6) (175).



Şekil 2.6: Fetal alkol sendromu bozukluklarındaki yüzdeki karakteristik görünüm (175)

Kronik alkol kullanımı merkezi sinir sisteminde çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere yol açmaktadır (43). Alkolün beyin üzerindeki metabolizması henüz tam olarak netlik kazanmamıştır. Fakat hipotalamus, serebellum ve korteks bölgelerine daha çok etki ettiği belirtilmiştir (73,107,157). Gebelik sırasında alınan alkol fetal alkol sendromu (FAS) olarak bilinen doğum kusurlarına neden olabilmektedir. FAS olarak uzun süre alkol kullanan anneden doğan yavrularda görülen büyüme bozukluğu, yüz bölgesi anormallikleri ve mental gerilik olarak 1968’ de Lemoine ve arkadaşları daha sonra ise 1973’ te Jones ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (167).

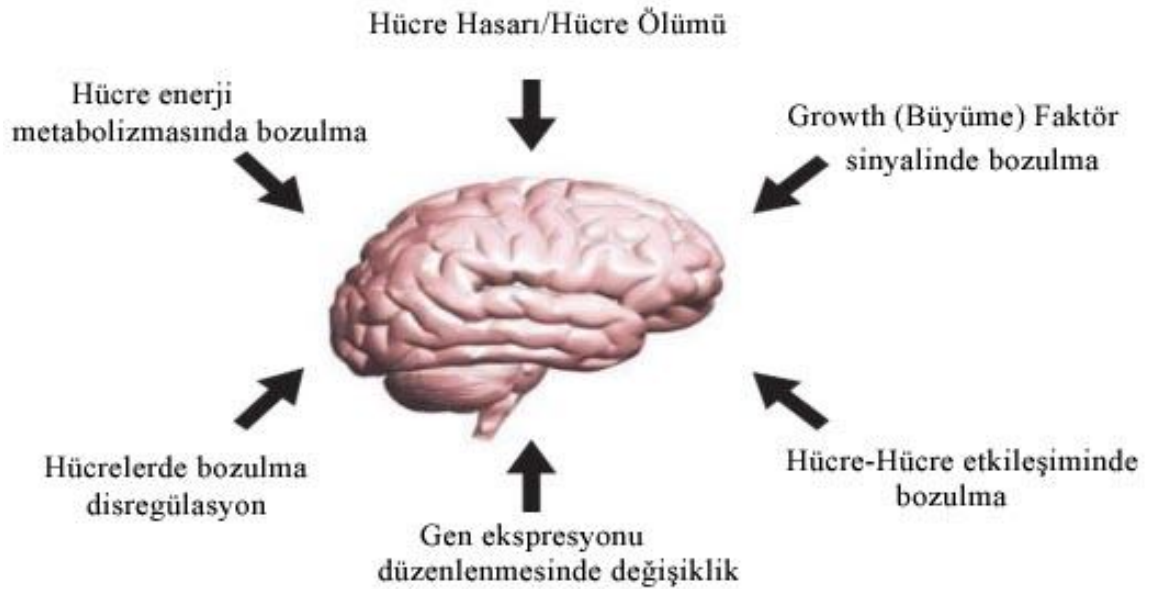
Dünyada her 1000 doğumdan 1–2 tanesine FAS teşhisi konulmaktadır. Fetal alkol sendromuna bağlı olarak oluşan rahatsızlıkların Amerika’daki oranı %1’dir. Sadece

Amerika'da alkol kullanımından kaynaklanan sağlık sorunlarına her yıl 125 milyar dolar harcanmaktadır (58). Yapılan çalışmalarda, prenatal dönemde alkol kullanan kişilerin çocuklarında mikrosefali (beyinin küçülmesi), anensefali (beyinin belli kısımlarının olmaması), myeloşizis ve spina bifida (omuriliğin bozuk gelişimi) morfolojik olarak sıklıkla görülmüştür (60). Bu tür hastalıkları olan bireyler çok sayıda ve çeşitli sağlık sorunları ile ömür boyu mücadele etmek zorunda kalmaktadırlar. Diğer bir belirteç ise gebelik döneminde kan alkol düzeyini ölçmektir. Kan alkol düzeyinin 200 mg/dl olması nörodejenerasyon için toksik sınır olarak belirtilmiştir (103).

Alkol alındığında kan dolaşımına girer, plasentadan geçerek gelişmekte olan fetüse ulaşır. Böylece annenin kan alkol konsantrasyonu ile fetüs ve amniyotik sıvıdaki alkol konsantrasyonu, anne alkol alır almaz dakikalar içinde aynı seviyeye ulaşır. Fetüsün kan dolaşımı, alkol hücrelere yetişkinden çok daha yavaş taşıdığı için, gelişmekte olan bebeğin kanındaki alkol konsantrasyonu annenin vcudundakinden daha yüksektir. Etanolün ortalama vücuttan eliminasyon oranı yaklaşık saatte %0.017g'dır (52). Bununla birlikte alkol dehidrojenaz polimorfizmi yolaktaki metabolik hızı değiştirmektedir (142). Alkol dehidrojenaz 1C varyantı etanol oksidasyon oranını düşürür ve bu da daha yüksek kan alkol konsantrasyonu ile sonuçlanır (35). Etanolun plasental fonksiyonda birçok yan etkisi vardır. Örneğin; etanolün çok düşük seviyeleri bile plasenta ve umbilikal kordun vazokonstriksiyonuna neden olabilmektedir (6,111).

Prenatal ve postnatal alkol maruziyeti merkezi sinir sisteminde bir çok teratojenik etkiye yol açar (şekil 2.7). Alkol, bebeğin gelişen dokuları ve organları için uygun olan beslenmeyi zayıflatıp beyin hücrelerine zarar verebilir. Doğum sonrası yavrularda oluşan fiziksel ve mental hasarların yanı sıra alkol kaynaklı nöral gelişimde de hastalıklar oluşmaktadır. Alkole bağlı nöral, hastalıkların meydana gelme sıklığı fetal alkol sendromundan daha çoktur (79). Anormal olmayan yüz hatları, büyümede yetersizlik ve merkezi sinir sisteminde (MSS) fonksiyon bozukluğu ile karakterize edilebilir. Bu fonksiyon bozuklukları öğrenme, hafıza, dikkat eşiği, iletişim, hayal gücü, zeka geriliği, depresyon ve şizofreni, duyma ve buna benzer hasarlara sebep olmaktadır (108,154,193). Alkole bağlı beyin kortikal anormallikleri birçok kategori içine

alınabilir. Bunlardan bazıları nöron kayıpları, mitoz sonrası nöron gelişimindeki bozukluklar, dentritik daralma ve uzamalar, korteks bölgesindeki tabakalaşmanın belirsizleşmesidir (75,154,181).



Şekil 2.7: Etanolün beyinde yaptığı değişiklikler (174)

Annenin alkol kullanması (gebelik döneminde kronik alkol alımı), bir dizi doğumsal anomalileri de içeren ve en önemli mental retardasyon nedeni olan FAS'a neden olabilmektedir (1).

ABD Alkolizm Araştırma Derneğine göre FAS kriterleri:

1- İntrauterin ve/veya postnatal gelişme geriliği:

Vücut ağırlığı, boy ve baş çevresinin 10 persentilin altında olması.

2- Kraniofasial anomaliler:

Baş çevresinin 3 persentilin altında olması, mikroftalmi veya kısa palpebral fissürler, az gelişmiş filtrum ve maksillanın düzleşmesi.

3- SSS problemleri:

Nörolojik bozukluklar ve gelişmede geriliktir. Ayrıca gebelikte alkol alımına bağlı olarak iskelet, eklem ve kardiak anomaliler (VSD), inmemiş testis, yarık damak yarık dudak gibi anomaliler görülebilmektedir (1).

2.3.1. FASD'da Beyin Hasarı

FASD görülen farklı beyin hasarı profillerinin oluşumuna katılan birbiriyle ilişkili durumlar bulunmaktadır (86). İlk olarak, klinik ve deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular ışığında, alkolle ilişkili doğuştan kusurlar, maternal yaşa, doğum yapmış olmaya, alkol bağımlılığının geçmişine, gebelikteki alkol kullanım şekline (miktar, sıklık, süre ve gelişimin hangi evrelerinde alındığı) bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (2,3,106). Aynı zamanda, diğer birçok potansiyel (sigara kullanımı ve çeşitli kimyasallara maruziyet, beslenme bozuklukları, olumsuz prenatal bakım ve destek, olumsuz postnatal çevresel koşullar) koşullar fetal alkol maruziyeti ile ilişkili olup, FAS oluşumu için oldukça büyük bir risk oluşturmaktadır (4,5).

Maternal, çevresel ve genetik risk faktörlerine ek olarak, prenatal ve postnatal alkol bağımlı mekanizmaların açıklanmasıyla ilgili problem, bir bütünlük teşkil etmektedir, çünkü alkol gelişimsel olarak genetik ve moleküler olarak karşılıklı etkileşimde bulunan hücre ve moleküllerle ilişkide bulunmaktadır. Beyin hasarında birden çok mekanizmanın rol oynadığı kabul edilmektedir (85,90).

Prenatal ve postnatal alkol maruziyeti, MSS üzerinde, mikrosefali, mental gerilik, motor fonksiyon kayıpları ve kognitif eksiklikler gibi gelişimsel kusurlara neden olmaktadır. Prenatal alkol maruziyetini takiben gerçekleşen birçok fonksiyonel eksiklik, hassas süreçlerde gerçekleşen gelişimsel değişimlerin kümülatif sonuçları olarak görülmektedir. Alkole bağlı beyin hasarlarını araştırmak için ratlar başarılı bir model olarak kullanılmaktadır. İnsanlarla ratlar arasındaki farklılıklardan dolayı, ratlardaki (E)1- 10 ve (E)11-20 periyotları, insanlardaki 1. ve 2. dönemlere (trimesterlere) denk gelmektedir (62,64). Bundan dolayı, insanlardaki 2. döneme denk gelen periyot ratların

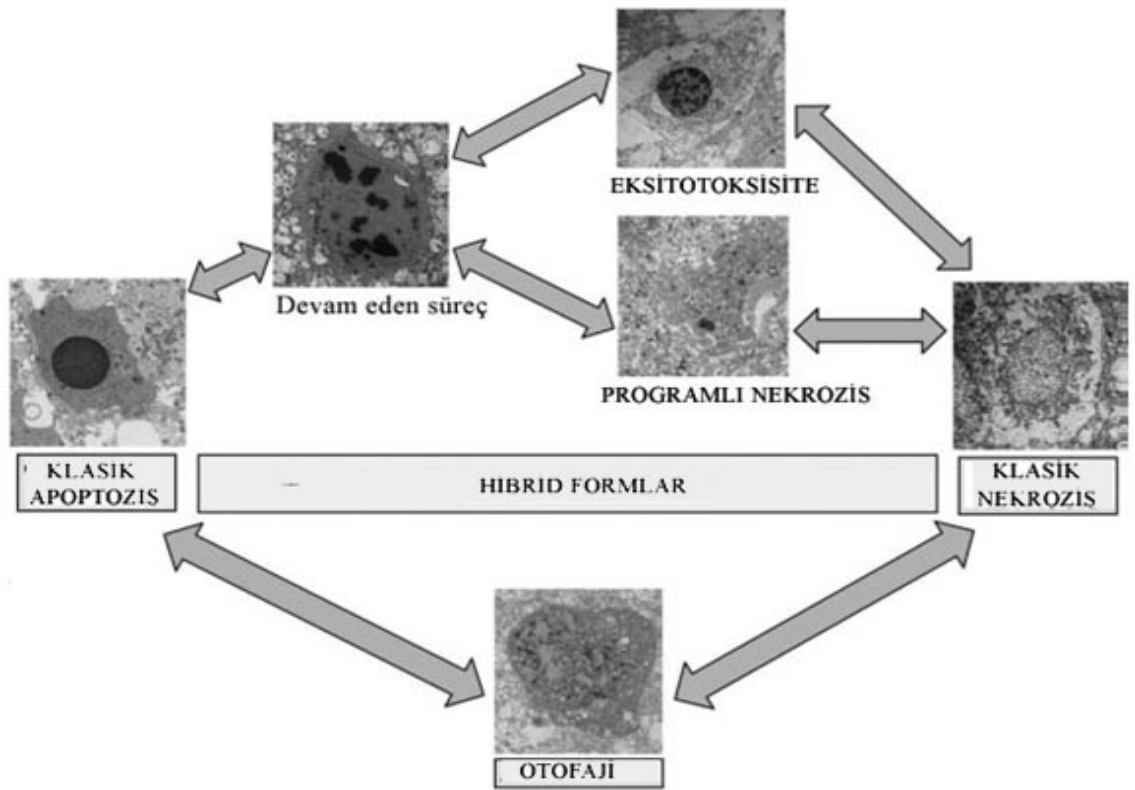
gebelik süresinin yarısını kaplamaktadır. 1. dönem boyunca alkol maruziyetinin yüzde morfolojik bozukluklara yol açtığı bilinmektedir. Kemirgenlerde yapılan çoğu çalışma, insanlardaki 2. dönemine karşılık gelen süre boyunca alkolün, intrauterin büyüme geriliği ve mikrosefaliye yol açtığını göstermektedir. Yine de, gelişmekte olan beyin üzerine alkol uygulama zamanlamasının etkileri henüz çok kesin olarak bilinmemektedir. Çünkü alkole bağlı beyin hasarlarında konu hakkındaki kritik hassasiyeti açıklamak için mevcut klinik ve deneysel çalışmalar yeterli ölçüde bulunmamaktadır (159).

Beyin ağırlığındaki azalma (mikrosefali) bir MSS fonksiyon kaybı olarak görülmektedir. Alkole bağlı beyin ağırlığındaki azalma daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Prenatal periyodun 2. yarısı ve erken postnatal dönemin, alkole bağlı beyin ağırlığının azaldığı görülen yetişkin hayvanlardan elde edilen bulgular ışığında, kritik periyodlar olduğu anlaşılmıştır. Yetişkin kronik alkoliklerin serebral hemisferlerindeki beyaz cevher hacminde azalmalar gözlenmiştir. Fakat, düşük beyin ağırlığı ile kortikal gelişim arasındaki ilişki hala netlik kazanmamıştır. Ratlarda, bütün birincil dendritler postnatal 10. gün (P10) itibari ile oluşur ve dendrit dallanmasının miktarı ve derecesi P20. güne kadar belirgin şekilde artarak yetişkindeki görünümünü almaya başlar. Bu yüzden üçüncü dönem (trimester) dendrit dallanması için oldukça önemli bir periyoddur. Prenatal ve postnatal alkol maruziyeti ayrıca, uzama ve regresyona katılan dendritlerin yeniden biçimlendirme paternlerini de etkiliyor olabilir (181).

2.4. Hücre Ölümü

Programlanmış hücre ölümü ile ilgili ilk açıklamalar 1960' lardan bu yana kadar uzanmaktadır. Hücre ölüm mekanizmaları, bir çok girişimler sonucu hücre ölümü değişmez temelleri morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Bu nedenle, 1973 yılında Schweichel ve Merker çeşitli hücre ölümü modeli sınıflandırmaları 'tip I hücre ölümü' ile ilişkili heterofaji, 'tip II hücre ölümü ' ile ilişkili otofaji ve 'tip III hücre

ölümü', apoptoz ve nekroz ile ilişkili olmayan sindirim tipi de dahil olmak üzere sınıflandırmalar önermişlerdir. Bu moleküler yolların derinlemesine incelenmesine rağmen hücre ölümünü yürütmek ve hücre ölümünü izleme ile ilgili olaylar için biyokimyasal testler laboratuvarında rutin olarak fenomen haline gelse de, bilimsel komite henüz morfolojik sınıflandırmanın yanı sıra; henüz biyokimyasal yöntemlere göre yapılan hücre ölümünün sistematik bir sınıflandırmasını kabul etmemiştir. Hücre Ölümü üzerine İsimlendirme Komitesi (NCCD), 2005 ve 2009 yıllarında Hücre Ölümü ve Farklılaşması ile ilgili sınıflandırma önerisinde bulunmuşlardır. Orada, hücre ölümü morfotipler tanımı için birleşik kriterler hücre ölümü ile ilgili terminoloji konusunda öneriler, kurallar belirlenmiş ve bir terminoloji verilmiştir. NCCD görev olarak daha önceki formüle, hangi isimler ile bir düzen sağlanmalıdır ve hücre ölümünü anlatan farklı yöntemleri kritik olanların tanımı ve kullanımını değerlendirerek, öneriler sunmaktadır. Hücre ölümü için tek tip adlandırma bilim adamları arasında iletişimi kolaylaştırmak açısından uygun olacaktır (Şekil 2.8) (83).



Şekil 2.8: Hipoksik iskemik deneysel neonatal beyin hasarında hücre ölüm fenotipleri (83).

Hücreler buldukları ortamla sıkı ilişkide bulunan ve ortam değişimlerine ya da streslere uyum sağlayarak cevaplar verebilen yapılardır. Bu adaptasyon mekanizmalarının başlıcaları atrofi, hipertrofi, hiperplazi ve metaplazidir. Hücreyi zorlayan çevresel değişiklikler, hücrenin adaptasyon yeteneğini aşar ise hücrede hasar oluşur. Bu hasar bir noktaya kadar geri dönüşümlü (reversibl) dır (Tablo 2.1). Daha şiddetli hasarlar ise geri dönüşümsüz (irreversibl hasar) hücre ölümüne yol açar (Tablo 2. 2). Bir hücrenin uyum göstermesi ya da zarara uğraması, zorlayıcı etkenin tipi ve şiddetinin yanı sıra, etkene maruz kalan hücrenin tipine, etkene duyarlılığına, kanlanma ve beslenme durumuna da bağlıdır. Erişkin organizmaların homeostazı, yeni hücrelerin üretilmesi ve yaşlananların ölmesi arasındaki dengenin düzenlenmesi ile sağlanır. Bazı hücreler ise onarılamayacak hasara yol açacak miktarda hipoksi, ısı, hücre virüs ya da başka bir hücre içi patojenle enfekte olduğunda, ultraviyole radyasyona maruz kaldıklarında ölür. Hücre hasarında bazı kritik biyokimyasal sistemler önemli rol oynarlar;

- ATP azalması veya yokluğu (hem iskemik hem toksik hasarda esas nedendir)
- Oksijen ve oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumu.
- Hücre içi kalsiyum homeostazının bozukluğu: Pek çok hücre zararında ön planda önemlidir. Sitosolik (sitoplazmada) serbest kalsiyum artışı (dışardan gelen ya da mitokondri ve endoplazmik retikulumdan dışarı çıkan) fosfolipazları (membran zararı), proteazları (yapısal ve membranöz protein zararı), ATPaz'ı (ATP azalması) ve endonükleazları (genetik materyelin parçalanması) aktive eder.
- Membran permabilitesinde defekt (ATP sentezinde azalma ve Ca^{+2} nedenli fosfolipaz aktivasyonu sonucu).
- Geri dönüşümsüz mitokondriyal hasar (sitoplazmik kalsiyum artışı, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu): Mitokondri hasarı sonucu mitokondri membranında permabilite artar ve mitokondri elektron transport sisteminin önemli bir solubl proteini olan sitokrom c sitoplazmaya geçer ki bu apoptotik hücre ölümünü aktive eder.

Nekroz daima patolojiktir ve daima iltihap ile takip edilir. İltihabı takiben izlenen onarım süreci **granülasyon dokusu** ve **fibrozis** ile ya da **rejenerasyon** ile gerçekleşir (125).

Tablo 2.1: Geri dönüşümlü (Reversibl) hasar

Geri Dönüşümlü (Reversibl) hasar		
▼		
Mitokondride oksidatif fosforilasyonda azalma		
▼		
ATP üretiminin azalması		
a-Na-K pompasında bozulma	<ul style="list-style-type: none">● Hücre içi Ca^{+2} girişinde artış● Hücre içi Na^{+} ve H_2O artışı● Hücre içi K^{+} azalması	<ul style="list-style-type: none">● Hücrenin şişmesi (Hidropik dejenerasyon)● Mikrovilluslarda kayıp● Sitoplazmik vakuolleşme● Endoplazmik retikulumda şişme● Miyelin figürlerin oluşumu
bGlikolizde artış	<ul style="list-style-type: none">● Hücre içi pH azalması● Hücre içi glikojen düzeyinde azalma	<ul style="list-style-type: none">● Nükleer kromatinin kondanse olması
c-ATP azalması, pH da düşme ve diğer etkiler	<ul style="list-style-type: none">● Ribozomların, endoplazmik retikulumdan ayrılması● Protein sentezinde durma	<ul style="list-style-type: none">● Sitoplazmik lipit birikimi

Tablo 2.2: Geri Dönüşümsüz (İrreversibl) hasar

Geri Dönüşümsüz (İrreversibl) hasar: Hücre içinde glikojen deposu bittiğinde hasar devam ediyor ise hücrede irreversible hasar gelişir.

a- Membran hasarı	<ul style="list-style-type: none">• Hücre membranındaki fosfolipidlerde kayıp• Hücre iskeletinde değişim ve yıkım• Serbest radikallerin oluşumu• Hücre lipidlerinin yıkılması	<ul style="list-style-type: none">• Hüresel enzimlerin kana geçişi (CK, LDH)• Hücre içi aşırı iyon girişi, mitokondride Ca^{+2} artışı, distrofik kalsifikasyon
b- Lizozomal enzimlerin hücre içinde serbestleşmesi	<ul style="list-style-type: none">• Ribonükleoproteinlerin azalması sonucu hücrede bazofilide azalma• Nükleer değişiklikler• Proteinlerin sindirilmesi izlenir.	<ul style="list-style-type: none">• Sitoplazmik eozinofilide artış• Karyopiknoz (büzülme)• Karyoreksis (dağılma)• Karyolizis (erime)

2.4.1. Hücre ölümü tipleri

Hücre ölümünün üç farklı tipi vardır.

Programsız hücre ölümü

- Nekroz

Programlı hücre ölümü

- (Tip1) Apoptoz
- (Tip2) Otofaji.

2.4.1.1. Nekroz

İnsan hücreleri geri dönüşümsüz (irreversibl) hasara girdiklerinde hemotoksilen eosin (HE) boyası ile ışık mikroskopik morfolojik değişim; hücre nükleusunda büzüşme (piknozis), kromatininde dağılma (karyoreksis) ve erime (karyolizis), sitoplazmada hipereozinofilik, vaküoler görünüm ve artmış sitoplazmik kalsiyum birikimidir. Ölen hücre grupları nekrotik dokuyu oluşturur ve dokularda izlenen nekroz enzimatik yıkım veya protein denatürasyonu üzerinden özel morfolojik görünümler oluşturur.

Nekroz tipleri şunlardır:

- Koagülasyon nekrozu (en sık izlenen nekroz)
- Kazeöz nekroz
- Likefaksiyon nekrozu
- Gangrenöz nekroz
- Enzimatik yağ nekrozu
- Travmatik yağ nekrozu
- Fibrinoid nekroz
- Gummatöz nekroz
- Postmortem nekroz (otoliz) (125).

2.4.1.2. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmasından sorumlu olan, özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (115). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü, apoptoz ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (56, 199). Fizyolojik ve patolojik süreçlerde oluşabilen bir hücre ölüm tipidir:

a- Embriyogenez sırasında implantasyon, organogenez ve gelişimsel involüsyon olaylarında izlenen programlanmış hücre ölümü görülür.

b- Erişkinlerde hormonlara bağımlı involüsyonlarda: Endometriumun menstrüel siklusu, memenin süt salgılaması gibi hormona bağılı involüsyon durumlarında görülebilir.

c- Prolifere hücre popülasyonlarından hücre ayıklanması (Barsak kriptleri gibi) durumlarda apoptoz görülür.

d- Tümör hücrelerinin ölümü, sıklıkla tümör regresyonu sürecinde apoptoz görülür.

e- Akut inflamasyon sürecinde nötrofillerin ölümü. İmmün sistem hücrelerinin ölümü, timusta otoreaktif T hücrelerinin ölümü ve foliküllerde B hücrelerinin ölümü meydana gelir.

f- Sitotoksik T hücreleri tarafından uyarılan hücre ölümü, özellikle organ ret reaksiyonlarında apoptoz görülür.

g- Duktal obstrüksiyon sonrası organlarda izlenen, patolojik atrofi durumları; pankreas, parotis ve böbrek gibi dokularda apoptoz gözlenebilir.

h- Bazı viral hastalıklarda saptanan hücre hasarı, akut viral hepatitte izlenen **Councilman cisimcikleri**, CD8(+) T hücresi içinde virüs bulunan parenkimal hücre sitoplazmik membranındaki Fas proteininin uzantısına bağlanır, bu protein üzerinden hücrenin apoptozunu uyarır.

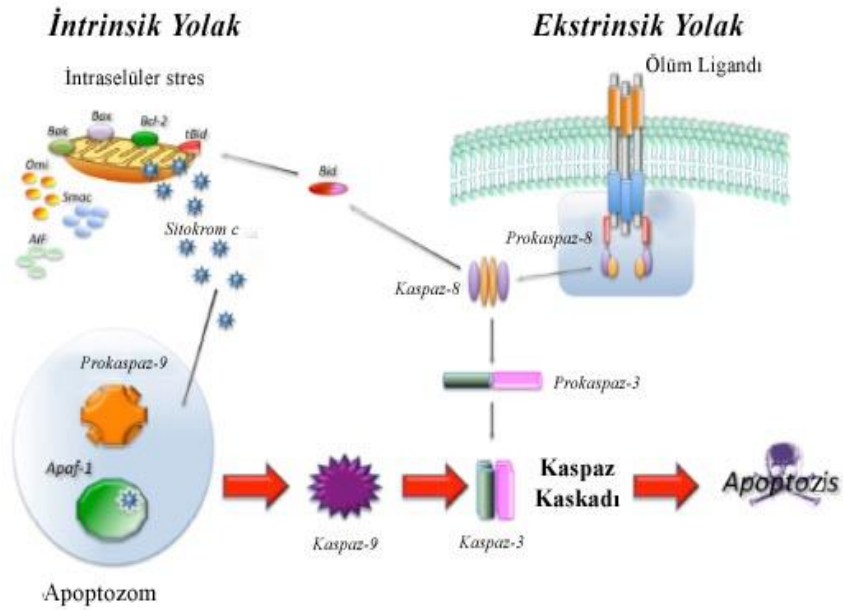
i- Düşük dozda ısı, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçlar ve hipoksi gibi farklı etkenler etkisi ile gerçekleşen hücre ölümü apoptoz ile gerçekleşirken; yüksek dozda hücre ölümü ise nekroz ile gerçekleşir (81,125).

Apoptozda **üç ayrı mekanizma** rol oynar. Bir yandan endonükleazlar ile **kromatin parçalanırken** diğer yandan **sitozolik proteazlar sitoplazmayı bozmakta** ve aynı zamanda hücre **iskeleti yıkılmaktadır**. Hücre apoptozun başlangıcında büzüşür. Çekirdek kromatini koyulaşır, kondanse olur (Apoptozun en karakteristik morfolojik bulgusudur). Takiben nükleus fragmanlara ayrılır. Sitoplazmik tanecikler ve apoptotik cisimler (küçük, bazıları çekirdek parçaları içeren bazıları içermeyen sitoplazmik parçacıklar) oluşur. Oluşan apoptotik cisimcikler inflamasyon oluşturmadan

makrofajlar tarafından fagositoz ile temizlenirler. Apoptozu takiben inflamasyon gelişmez. Apoptozda kromatin yıkımı internükleozomal aralıklarda ve eşit uzunluklarda olur. Bu durum jel elektroforezinde klasik merdiven paterninin görülmesine yol açar. Apoptoz oluşumunda bir takım genler aktif rol oynarlar. **Sitokrom c** serbestleşmesi, erken dönemde apoptoza ait morfolojik değişimlerden sorumludur. **Bax, Bad** ve **p 53** (sentezlenmesi apoptotik süreci başlatır, ana görevi mitozun engellenmesi (mitozu bir CDK blokörü olan p21 üzerinden durdurur)) apoptoza yardımcı genlerdir. **Bcl- 2** ve **Bcl-X_L** ise apoptozu engelleyici etki gösterir. Bcl-2 bir hücrede aktive olursa hücrenin p 53'ün etkisi ile apoptoz ile ölümünü durdurur ve hasarlı genetik materyalini onarmasını sağlar. Bunu başarır ise hücre normale döner; ancak başaramaz ise p 53 tekrar aktive olur ve Bax üzerinden apoptozun gelişmesini sağlar. Apoptoz, nekrozdan farklı olarak aktif ve mutlak enerji kullanılan bir süreçtir (125).

Apoptoz üç yoldan tetiklenmektedir;

- 1- **İntrinsik kaspaz bağımlı yol,**
- 2- **Ekstrinsik kaspaz bağımlı yol,**
- 3- **Kaspazlardan bağımsız yol (Şekil 2.9).**



Şekil 2.9: Apoptozda görülen intrinsik ve ekstrinsik yollar (77).

2.4.1.2.1. İntrensik kaspaz bağımlı yol

Reaktif oksijen türevleri ve DNA hasarı gibi apoptotik sinyallere mitokondri aracılığı ile oluşan etkidir. Mitokondrinin dış zarında Bcl-2 ailesi proteinleri bulunmaktadır. Bunlar apoptozun oluşumunu sağlayan (pro-apoptotik) veya sağlamayan (anti-apoptotik) diye iki kısma ayrılır. Bu proteinler hücrelerin yaşam ile ölüm arasındaki dengesini oluştururlar. Pro-apoptotik proteinler (örn: Bax) mitokondrinin membran geçirgenliğini bozarak sitokrom c salınmasını sağlarlar. Sitokrom c, dATP ve prokaspaz-9 ile apoptozom formunu oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'u aktif hale getirir ve bu da kaspaz-3 ü aktive eder. Kaspaz-3'e yapılan etki sonucunda poli-adenosindifosfat riboz polimeraz (PARP) inaktive olur. Böylece DNA tamir mekanizması durdurulur. Bununla beraber çeşitli enzimler devreye girer (örn: DNA fragmentasyon faktörü 40), en sonunda DNA fragmentasyonu ve hücre ölümü gerçekleşir (77).

2.4.1.2.2. Ekstrinsik kaspaz bağımlı yol

Hücre zarı yüzey reseptörlerine bağlanarak oluşan etkidir. Örnek olarak; Fas ligand, Fas reseptörüne bağlanır. Bağlanma Fas ile ilgili ölüm bölgelerinin (FADD) ve Prokaspaz 8 veya 10'nun reseptör oligomerizasyonuna sebep olur. FADD ile kaspaz-8/10 ölüm sinyalleri kompleksi oluşturarak kaspaz-3 ü aktive edebilirler. Bunun yanında kaspaz-8, Bcl-2 proteinlerinden Bid'i aktive edebilir. Bid membranda Bax proteinlerini artmasına sebep olur. Bunun sonucunda mitokondri membran geçirgenliği bozulur ve intrinsik yol üzerinden kaspaz-3 aktive edilir (77).

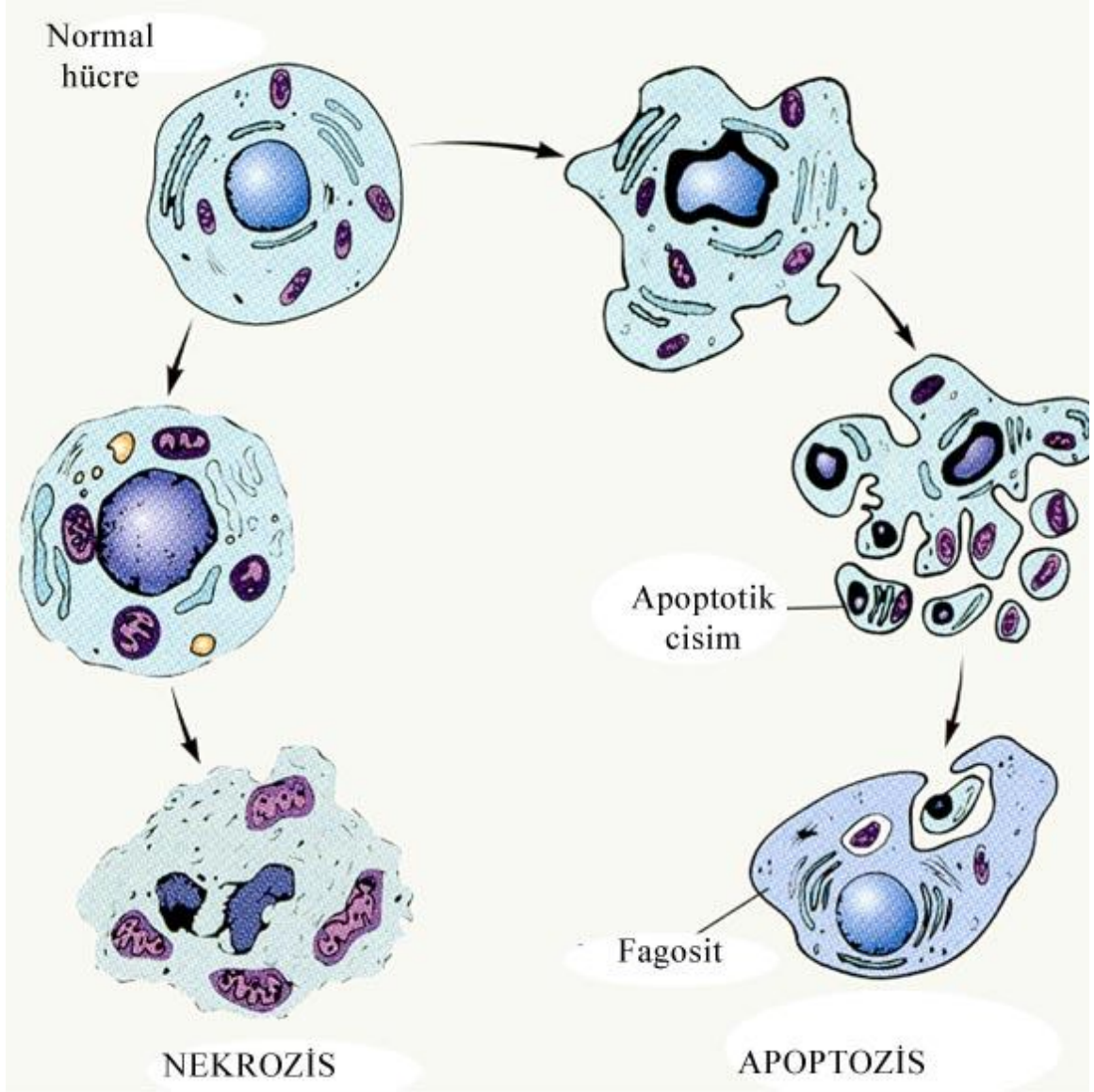
2.4.1.2.3. Kaspazlardan bağımsız yol:

İntrensik yola mitokondri-bağımlı bir yol olduğu için benzemektedir. Apoptozu tetikleyici faktor (AIF), mitokondri iç membran bölgesinde direkt olarak DNaz aktivitesini veya hücre tamir ve hücre bozulmasını önleyen poli-adenosindifosfat riboz

polimerazı (PARP) inaktive eder (77). Tablo 2.3 ve Şekil 2.10 da nekroz ve apoptoz arasındaki farklar özetlenmiştir.

Tablo 2.3: Nekroz ve apoptoz arası farklar

	Nekroz	Apoptoz
Uyaran	Hipoksi ve toksinler (daima patolojik)	Fizyolojik veya patolojik faktörler
Histoloji	Hücre topluluğu etkilenir İlk neden ATP azalmasıdır İlk morfolojik bulgu hidropik dejenerasyondur (hücrenin şişmesi) Organellerde hasar vardır Hücrede lizis ve parçalanma Hücre artıkları makrofajlarca fagosite edilir Daima inflamatuvar cevap gelişir	Tek hücreleri etkiler Değişken İlk morfolojik bulgu hücrenin büzülmesidir Organeller intakttır Nükleus ve sitoplazmada fregmantasyon Apoptotik cisimcikler makrofajlar ile fagosite edilir İnflamatuvar cevap gelişmez
DNA yıkımı	Rastgele	Difüz internükleozomal (DNA elektroforezinde merdiven paterni)
Mekanizmalar	ATP yetersizliği Protein sentezi durur Enerji gerektirmez Membran zararı Serbest radikal hasarı	Gen aktivasyonu Gerçekleşmesi için erken protein sentezi zorunludur Enerji gerektirir Endonükleazlar Proteazlar



Şekil 2.10: Nekroz ve apoptoz (125).

Tablo 2.4'te Programlı hücre ölümü tipleri arasındaki farklar özetlenmiştir.

Tablo 2.4: Programlı hücre ölümü tipleri arasındaki farklar

	TİP1 APOPTOZİS	TİP2 OTOFAJİ
Nükleus	Kromatin kondensasyonu -Piknozis -DNA merdiven paterni -Nükleer fragmantasyon	Kısmi Kromatin kondensasyonu -Bazen Piknozis -Son evreye kadar nükleus intakt halde -DNA merdiven paterni yok
Sitoplazma	Sitoplazmik kondensasyon -Granüllü endoplazmik retikulumda ribozom kaybı -Fragmantasyon sonucu apoptotik cisimcikler -Sitozolda lizozomal proteazların varlığı -Mitokondiyal permabilite geçirgenliğinde kaspazlar aktif halde	-Otofajik vezikül sayısında artış -Otolizozom sayısında artış -Lizozomal aktivitede artış -Golgede genişleme, bazen endoplazmik retikulumda (ER) da görülür. -Kaspaz bağımsız
Temizlenme	Diğer hücreler tarafından heterofaji	Son dönemde diğer hücreler tarafından heterofaji
Saptanması	Elektron mikroskopisi Nükleer/hücrel fragmantasyon tespiti Kaspaz aktivasyon testi Kaspaz-substrat ayrılması ile ilgili test DNA merdiven paterni saptama TUNEL boyama FACS analizi sonucu G1 de artış Anexxin V ile boyama	Elektron mikroskopisi Uzun süreli protein yıkımında artışın tespiti Artmış lizozomal aktivite testi (MDC,akridin oranj...) Sitoplazmik sekestrasyon artışı (LDH,sukroz sek. Testi) LC3 otofajik membran saptama (intraseküler lokalizasyonun değişikliği)

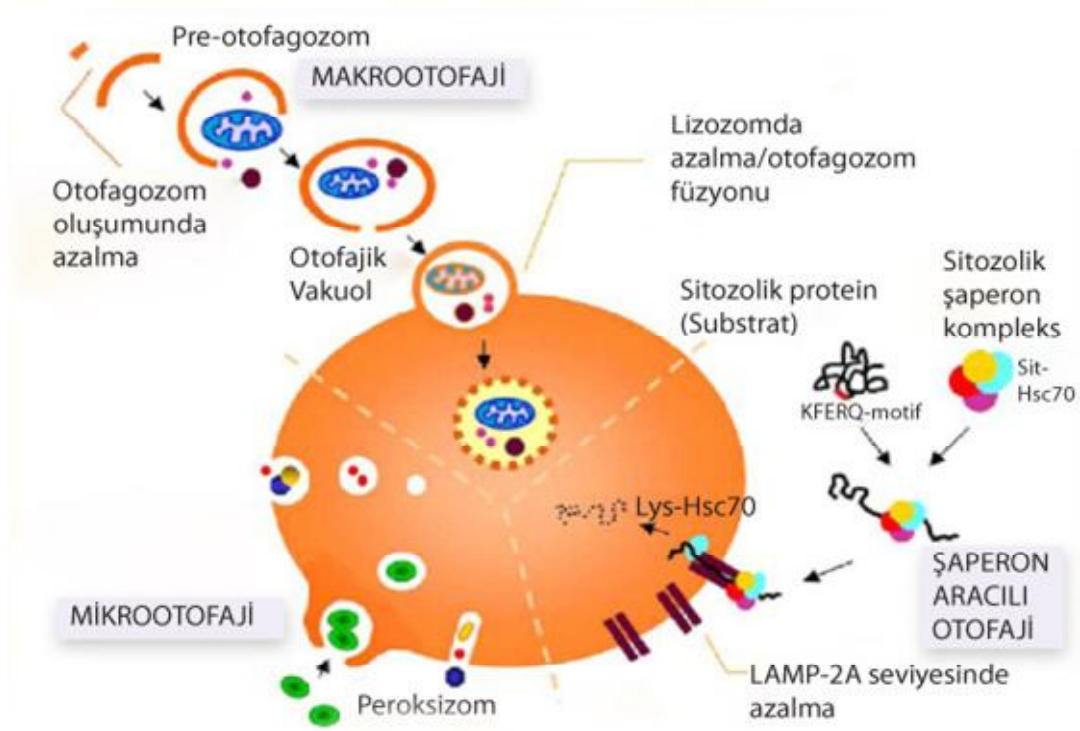
2.4.1.3. Otofajik hücre ölümü

Otofaji yunanca “kendi kendini yeme” anlamına gelmektedir. Yüksek dereceli ökaryotlarda kısa süreli proteinler **ubiquitin proteozom** yolunda yıkılır, çoğu uzun süreli proteinler organellerde **otofajik** proseslerde yıkıma uğrar. Otofaji major hücre içi ve uzun süreli protein ve sitoplazmik organeller için yıkım yoludur. Otofajinin hücrede **protektif** (koruyucu) rolü vardır. Besin yetersizliği boyunca yaşamın sürdürülmesini sağlar. Mizushima ve arkadaşları eğer otofaji gerçekleşmese, besin azlığında anne karnında ölüm oluşabileğini tespit etmişlerdir. Daha sonraki kanıt, besinsel streslere karşı koruyucu etki olarak otofaji artışı olmasıyla hücre ölümünün engellenmesidir. Otofaji bu koşullar altında durduğunda hücre apoptoza gider. Otofajik vakuol oluşumunda; ekstra ve intrasellüler stimülasyon, besin yokluğu, hormonal terapötik tedavi, bakteriyel enfeksiyonlar, yanlış protein katlanması, hasarlı organeller de rol oynar. Defektif (hasarlı) otofaji, patolojik olaylar (vakuolar miyopati, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer hastalığı, bazı kanser formlarında) oluşur. Otofaji, hücrenin kendi parçalarını (organelleri) fagositoz ile yok etmesine verilen addır. Bu süreçte granüllü endoplazmik retikulumdan kaynaklanan bir otofajik vakuol içinde yıkılması gereken organeller ve sitoplazma parçalarını taşır ve primer lizozomlar ile birleşip otofagolizozomları oluşturur. Bu mekanizma özellikle atrofiye giden hücrelerde görülür (54). Memeli hücrelerinde otofajinin 3 major formu bulunmaktadır (Şekil 2.11);

1. Mikrootofaji

2. Şaperon aracılı otofaji

3. Makrootofaji



Şekil 2.11: Otofaji tipleri (137)

2.4.1.3.1. Mikrootofaji

Lizozomal membran invaginasyonu, parmak benzeri yapılar intralizozomal veziküllerde sitozolik bileşenlerin salınımı ile gerçekleşir. Bazal koşullarda oluşur. Lizozomda moleküler düzeyde otofajiden sorumludur (137).

2.4.1.3.2. Şaperon aracılı otofaji

Şaperon aracılı otofaji, sitozolik protein ve şaperonun birleşmesiyle oluşan bir komplesten oluşur. Lizozom içine lizozom membranındaki reseptör aracılığıyla alınır. Çoğu memeli hücrede çözünür haldeki sitozolik proteinler şaperon aracılı otofaji ile yıkılırlar. Substratları biyokimyasal olarak ilişkili pentapeptit KFERQ sekansı içerirler ve lizozoma yönlendirilir. Bu motif ısı şok proteini (hsc70) tarafından tanınır. Substrat / şaperon kompleksi lizozomal membrana yönlendirilir ve orda reseptör protein olan lizozom

ilişkili membran protein tip 2A ile (LAMP2A) ile bağlanır. Bunun sonucunda; lizozomal lümende hsc70 varlığında yanlış katlanmış protein hızlı bir şekilde lizozomlarda yıkıma uğratılır (137).

2.4.1.3.3. Makrotofaji

Stres koşullarında organeller ve uzun süreli proteinlerin yıkımından sorumlu indüklenbilir bir formdur. Besin azlığı makrotofajinin en karakteristik aktivatörüdür. Organellerin dahil olduğu bir kısım, sitozol içeren yeni bir membran oluşumuyla sınırlayıcı çift membran oluşumu gözlenir. Bu oluşum otofajik vakuol otofagozom olarak isimlendirilir (137).

2.4.1.3.4. Otofajik hücre ölüm mekanizmaları

Otofaji genetik temelli, programlı, evrimsel koruma prosesidir ve uzun süreli hücrel protein ve organelleri yıkıma uğratır. Otofajinin gelişimi ve yanıtında çevresel stimülasyon, kanser, bakteriyel, viral enfeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar rol almaktadır. Nükleasyon, ekspansiyon (gelişim), olgunlaşma ve tamamlama basamaklarını içeren otofagozom, primer lizozomlarla birleşir. Otofaji çift membranlı vezikülden oluşur. Sitoplazma ve organellerden kapsüle olur, lizozomla birleşir ve vezikülde yıkıcı içerikler bulundurur. Bu çift membran vezikül oluşumu kompleks bir prosestir ve 16 Atg protein içerir. Otofaji ubuquitin benzeri konjugasyon sistemlerini içerir. Bu sistemler otofaji regülatörleri (Atg8 PE, Atg5-12-16) içeren modifiye kompleksleri içerir ve bu otofagozomun büyüklüğü ve oluşumunu tespit eder (229).

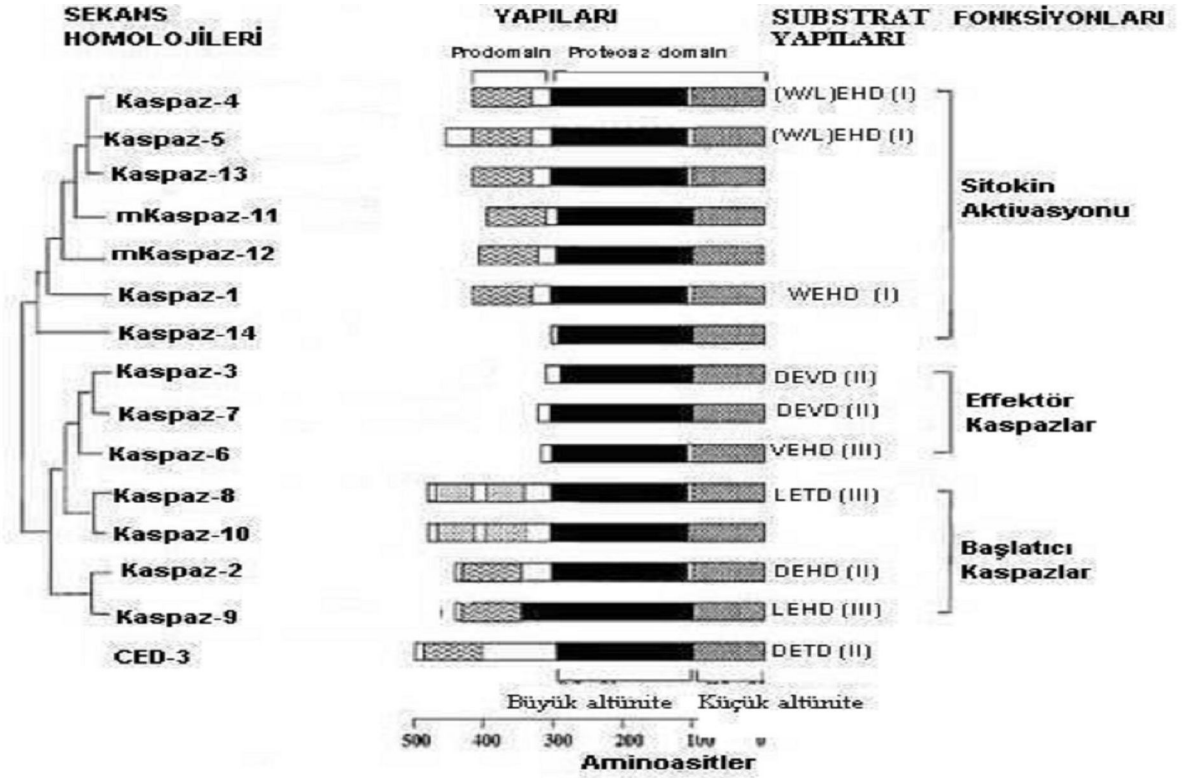
Otofagozom oluşumunda başlama sinyali tam açıklanamamıştır, fakat memelilerde mTOR (rafamisin negatif regülatörü) ve upstream mTOR sinyalinde; PTEN, PDK1, Akt, TSCI/2 yolaklarını içerir. Örneğin; PTEN-TSCI-2 pozitif regülatörleri otofajide rol almaktadır (50). Otofajinin hücrel cevabında çevresel durum değişiklikleri, örneğin besin yetersizliği gibi durumlar etkilidir. Açlıkta, hücrede

aktif olarak rol alırlar (34). Kaspaz aracılı proteazlar nekrozda da rol almaktadırlar. Kalpastatin yıkımı, endojen inhibitör kalpain ve kaspazlar, kalpain proteazlarla aktive olur. Kaspaz aktivasyonunda mitokondriyal hasar oluşur ve sitokrom c serbest kalır (216).

2.4.2.1.1. Kaspazların yapısı ve sınıflandırılması

Kaspazların apoptozla ilk ilişkisi bir nematod olan *Caenorhabditis Elegans'* in genetik analizi sırasında ortaya çıkmıştır. CED-3, CED-4 ve CED-9 genleri *Caenorhabditis Elegans'* daki apoptozu düzenlemekte olup memelilerde de bu genlerin homologlarının bulunduğu anlaşılmıştır. Memelilerdeki karşılığı ise ICE (interleukin-1 beta dönüştürücü enzim) ya da diğer ismiyle kaspaz-1' dir. Her ne kadar kaspaz-1 hücre ölümüyle açık bir ilişkiye sahip olmasa da, ilk önce tanımlanan bu geniş ailenin bir üyesidir. Bcl-2, Apaf-1 ve kaspaz proteaz ailesi, CED-3, CED-4 ve CED-9' un memelilerdeki analogları olarak tanımlanmıştır. Kaspaz ailesi CED-3' ün, Bcl-2 ailesi ise CED-9' un homologudur (34).

Kaspazlar benzer amino asit dizilimine sahiptirler, yapısal ve substrat spesifikliğide benzer özellikleri paylaşırlar. Tüm kaspazlar proenzimler şeklinde üretilirler. Bu durumda kaspazlar üç kısımdan meydana gelir (30-50 kD). Bunlar; NH₂ terminal kısım (sub-2), geniş alt ünite (20 kDa veya p20) ve küçük alt ünite (10 kDa veya p10)' dir. Terminal kısım yüksek değişkenlik gösteren bir dizilime sahiptir ve uzundur, aktivasyonun düzenlenmesini içerir. Diğer iki kısım ise tüm kaspazlarda benzer özellikler gösterir. Proteolitik süreç içinde aktivasyona uğrayan kısımlar arasında, yani geniş ve küçük alt üniteler arasında heterodimer oluşturacak şekilde birleşmeler oluşur. Bazı prokaspazların yapısında iki alt üniteyi birbirinden ayıran 10 amino asitlik bağlayıcı bölgelerin varlığı tespit edilmiştir (219).



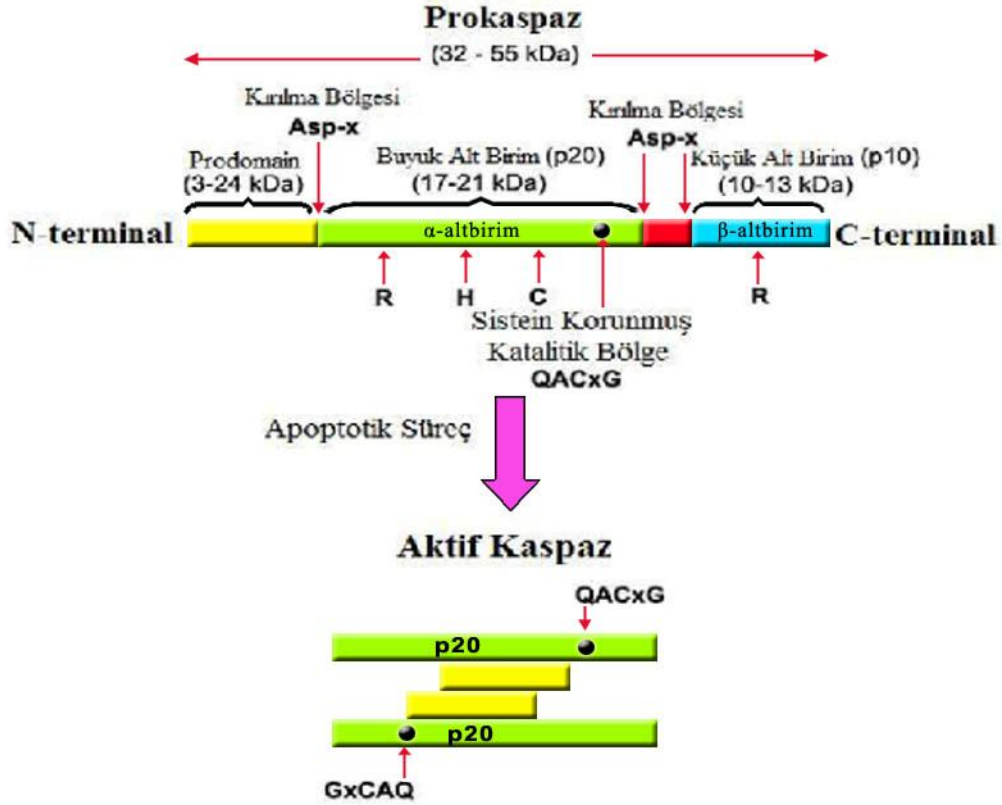
Şekil 2.13: Kaspazlar (219)

1- Başlatıcı kaspazlar (apoptozisi başlatanlar): Kaspaz 2, 8, 9, 10 u içermektedir. Uzun prodomaine sahiptirler. Bu kaspazlar pro-apoptotik sinyalleri alarak, sinyalin alt kısmında kalan diğer kaspaz üyelerinin aktive olmasını sağlarlar. Herbiri 100 amino asitten oluşan başlatıcı kaspazlar, transmembran proteinleri veya sitotoksik etkiye sahip maddeler ile etkileşerek aktif hale geçerler. Bu kaspazlar, adaptör ve düzenleyici proteinlerin farklı kombinasyonları ile etkileşime girerek apoptotik mekanizmanın hücre içerisinde farklı yönlerde devam etmesine neden olurlar. Kaspaz-2 nin aktivasyonu için ölüm bölgesi içeren PIDD (p53 uyarıcı protein) ve adaptör protein olarak RAIDD (RIP ile ilgili protein) olması gerekir (198).

2- Efektör kaspazlar (apoptozisi yürütenler): Kaspaz 3, 6, 7 yi içermektedir. Kısa prodomaine sahiptirler. Bu kaspazlar çeşitli hücre içi proteinleri enzimatik reaksiyonlarla parçalarlar ve apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (217,219).

3- Sitokinleri aktive eden kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 ü içermektedir. Hücre sinyal iletiminde önemli role sahip olan sitokinlerin aktivasyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Kaspaz 1, 4, 5 tetrapeptit olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler. Aktif kaspazların üç boyutlu yapısı tespit edilmiş olup 2 heterodimer, 2 geniş alt ünite tarafından çevrelenmiş 2 komşu küçük alt ünite ile karşı yönde bir tetramer oluşturur. Her bir heterodimer substratın bağlanması ve katalizi için gerekli küçük ve geniş alt üniteler içerir. Kaspaz-1 ve -3 ün kristal yapısı incelendiğinde her ikisinde, iki heterodimer yapının birleşerek tetramer yapıyı oluşturduğu görülmektedir (219).

Kaspazların en az 3 yolla aktive edildiği belirlenmiştir. Bunlar; otoaktivasyon, transaktivasyon ve non-kaspaz proteazları ile proteolizdir (219). Prokaspazlar düşük fakat saptanabilir bir proteolitik aktiviteye ve belli koşullar altında otoaktivasyon potansiyeline sahiptirler. Prokaspazlar hücrede çok fazla sentezlenirler ve yapay olarak çapraz bağlarla aktive olabilirler. Prokaspazların aktivasyonu için özel bir şekilde kesilmeleri gerekmektedir. Aktif hale gelmeleri yine başka bir kaspazın ilgili prokaspazı aspartik asitin bulunduğu özel bölgeden kesmesi ile olur. Aktive olmaları ile bu aktif kaspazlar başka prokaspazları keser ve onları da aktive ederler (Şekil 2.14) (219).



Şekil 2.14: Prokaspaz ve Aktif Kaspazın Yapısı (46)

2.4.2.1.2. Kaspaz-3 ün özellikleri

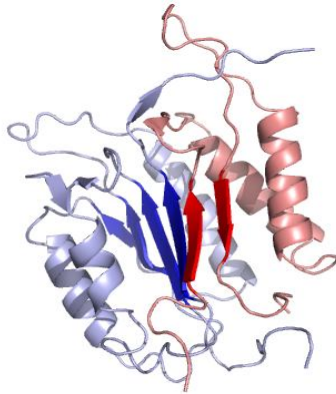
Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşime giren bir kaspaz proteindir. *CASP3* geni olarak kodlanmıştır. Kaspaz-3 ün, insan kromozomunun 4q33-q35.1 bölgesinde bulunan 32 kDa ağırlığında bir sistein proteaz olduğu gösterilmiştir (173,220). Kaspazlar inaktif proenzimler olarak bulunurlar ve proteolitik bir prosesle aspartik asit kısımlarını koruyarak iki alt ünite üretirler, dimerize formu enzimin aktif halidir. Kaspaz-3, kaspaz-6 and 7'yi aktive eder ve ayrılır; kaspaz-8, 9 ve 10 tarafından aktive edilir (Şekil 2.16) (70).

Kaspaz-3, kaspazların tipik karakteristik özelliklerini gösterir. Örneğin, aktif bölgesi sistein kalıntısı (Cys-285) ve histidin kalıntısı (His-237) içerir, aspartik asit

karboksi terminal bölgede stabilizasyonu sağlanır (227,178). Bu özgülük, glutamik asite göre aspartik asit için 20.000 kat tercihi ile, kaspazların seçici olmasını sağlar (210). Hücre içinde kaspazlar zimojen formda prokaspaz olarak bulunurlar. Biyokimyasal değişikliklerle inaktif formdan aktif hale geçerler. Her prokaspazda N-terminal bölgede geniş bir alt ünite yer alır ve bu alt ünite yaklaşık 20 kDa'dur ve onu daha küçük 10 kDa alt ünite izler, ve p20 ve p10 olarak adlandırılır (191).

Substrat özgülüğü: Normal şartlar altında, kaspazlar tetrapeptit sekansları tanır ve aspartik asit kalıntılarından sonraki peptit bağlarını substrat olarak tanıyıp hidroliz ederler. Kaspaz-3 ün spesifik substratı; tetrapeptit motif 'Asp-x-x-Asp' olarak tanınır (7).

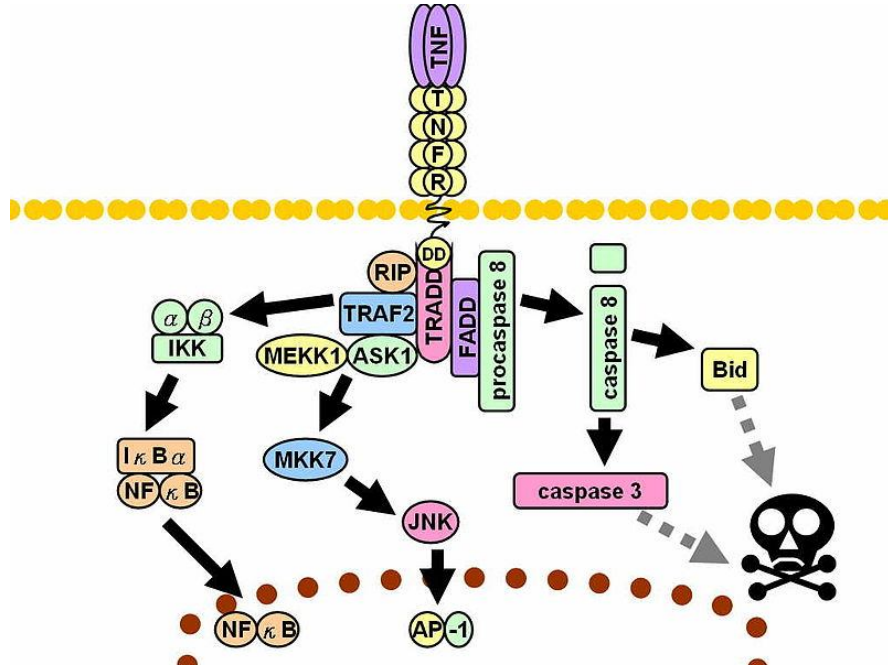
Yapısı: Kaspaz-3, 32 kDa olup, zimojen formda oluşur ve 17 kDa ve 12 kDa alt ünitelere ayrılır. Prokaspaz formu aktif heterotetramer hidrofobik etkileşimlerle oluşur ve dört anti-parallel beta-yaprak yapısı ile p17 ve p12 bir araya gelerek heterodimer, tam olarak 12- beta-yaprak yapı, alfa-heliksle sarılarak tek yapı oluşturur (Şekil 2.15) (128,191).



Şekil 2.15: Kaspaz-3 ün üç boyutlu yapısı (70)

Mekanizma: Kaspaz-3 ün katalitik bölgesi, sülfidril grubuna sahip olan Cys-285 ve imidazol halkasındaki His-237'yi içermektedir. Aspartat kalıntılarındaki karbonil grup His-237 ile stabilize edilir, peptit bağlarının ayrılmasında Cys-285 işlev görür. Cys-Gly-285 ve 238 ayrıca, hidrojen bağları aracılığıyla substrat-enzim kompleksinin

tetrahedral geçiş durumunu stabilize etmek için işlev görür. İn vitro olarak kaspaz-3, DEVDG (Asp-Glu-Val-Asp-Gly) peptit sekansını tercih eder ve karboksi bölgedeki ikinci aspartik asit kalıntısından ayırmayı sağlar (D ve G arası) (128).



Şekil 2.16: Kaspaz-3 aktivasyonu

2.4.2.2. Katepsinler

Lizozomlar asit ortamda hidroliz yapabilen organellerdir. Hücre hasarına yol açan çeşitli etkenler lizozomların da aktive olmasına yol açarlar. Lizozomların hücre hasarındaki asıl rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Lizozomal enzimler olan katepsinler hücre ölümü tiplerinin hepsinde önemli rol oynamaktadırlar (15). Lizozomal proteolitik enzim olan katepsinlerden iki sınıf hücre ölümünde önemli rol oynar. Bunlar aspartil (katepsin D) ve sistein (katepsin B, H, L) proteinazlardır. Katepsin proteinazlar intrasellüler proteolizde ve ekstrasellüler matriksin yeniden oluşmasında görev yaparlar. Düzenleyici fonksiyonlar ve yıkım ile ilgili hücresel proseslerde önemli roller üstlenirler. Bununla birlikte katepsinlerin uygunsuz aktivasyonu hücrenin hayatta

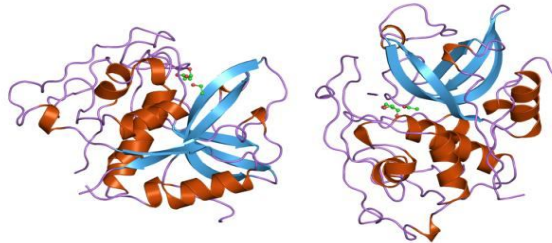
kalabilirliğine zarar verir. Lizozomal katepsinler, hem apoptozda hem de nekrozda rol oynamaktadır (216).

Katepsinler, papain ailesi olarak adlandırılan C1 grubu sistein proteazlardır. Bu proteazlar kaspazlarla karşılaştırıldığında daha az substrat özgüllüğüne sahiptir. İnaktif proenzimler olarak sentezlenir ve posttranslasyonel olarak glikozillenirler. Hücrel mannoz-6-fosfat reseptörlerini kullanarak, lizozomal bölümlere doğru yönlendirilirler. Bazı hücreler önemli miktarda olgun ve prokatepsin salgılayabilir. Buna ek olarak katepsinler lizozomlardan sitoplazmaya salınabilirler ve orada substratlarının bölünmesini katalize edebilirler (48). Sistein katepsinler proapoptotik protein olan Bid'i bölerek aktifleştirirler. Ayrıca katepsinler mitokondri dış zar potansiyelinin korunmasında rol oynayan anti-apoptotik protein Bcl-2'yi parçalarlar (189).

2.4.2.2.1. Katepsin B

Katepsin B, (E.C.3.4.22.1) peptidaz (veya proteaz) ailesine ait enzimatik bir proteindir. İnsanlarda the *CTSB* gen olarak kodlanmaktadır (Şekil 2.17) (39).

Fonksiyon: Bu protein disülfid bağlı ağır ve hafif zincirlerin dimerizasyonu ile lizozomal sistein proteazdan oluşur ve protein prekürsörü (öncülü) olarak üretilir. Peptidaz C1 ailesi üyesidir. Aynı proteinin en az 5 transkript varyantı (çeşidi) tanımlanmıştır (71).



Şekil 2.17: Katepsin B nin üç boyutlu yapısı (71)

2.4.2.2.2. Katepsin L

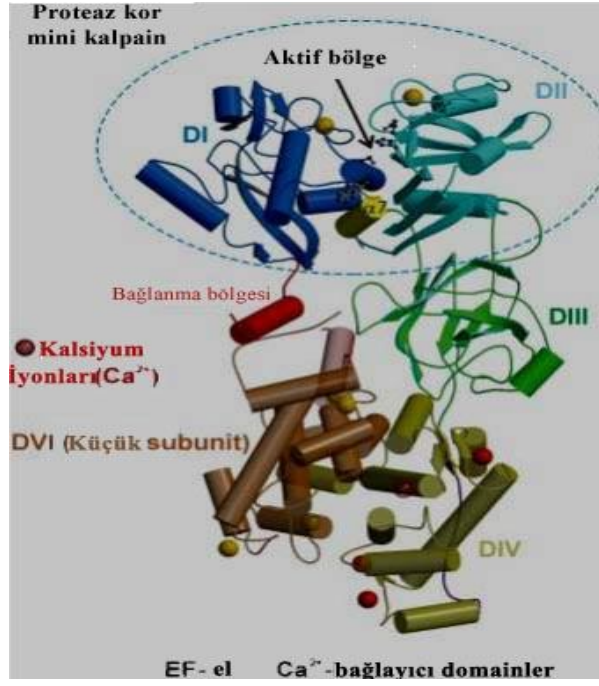
Katepsin L, EC 3.4.22.15 nosu olan *Aldrichina grahmi sistein proteinaz* (*Aldrichina grahmi cysteine proteinase*) dır. Papaine benzer şekilde kimyasal reaksiyonları katalizler. Katepsin B'ye kıyasla katepsin L enzimi protein substratlara daha aktiftir. Bu lizozomal enzim C1 peptidaz (papain ailesi) ailesindedir (19,20).

2.4.2.3. Kalpainler

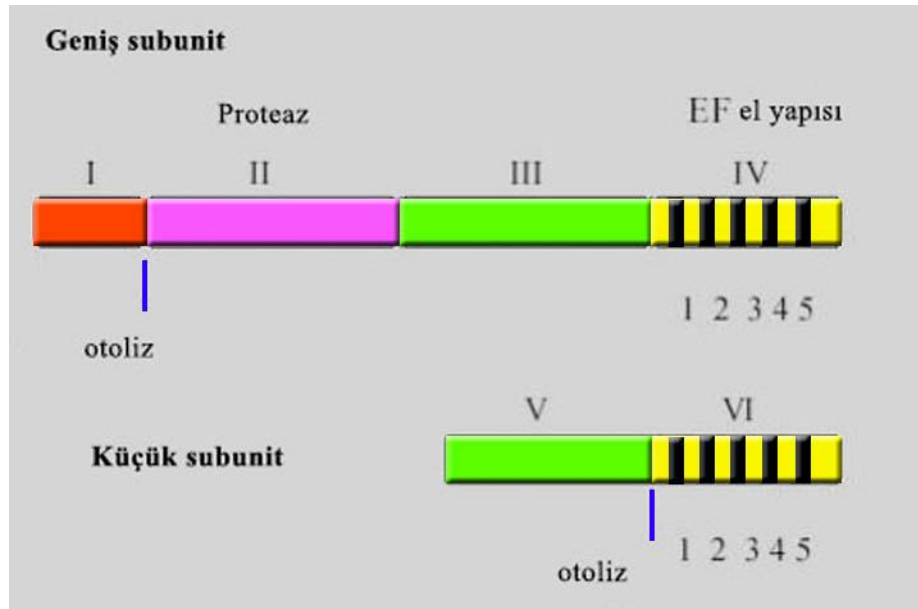
Kalpainler (EC 3.4.22.52, EC 3.4.22.53), kalsiyum bağımlı doğal proteaz (kalsiyum-aktive eden nötral proteaz (CANP)) lardır ve canlı hücrelerde otoliz mekanizması aktivasyonunda görev aldığı düşünölmektedir (65). İntrasellöler proteinlerden olan nötral proteaz kalpain intrasellöler kalsiyum seviyelerine bağılıdır (Şekil 2.18 ve 2.19). İki izoformu tanımlanır:

- 1- kalpain I (μ - kalpain)
- 2- kalpain II (m- kalpain)

Kalpain ailesi üyeleri, memelilerden *Drosophila Melanogaster* ve *Caenorhabditis Elegansa*'ya kadar birçok organizmada bulunur. En iyi bilinenler; m kalpainler ve μ kalpainlerdir. Aktiflenmeleri için m kalpainler milimol seviyelerinde Ca^{+2} konsantrasyonlarına ihtiyaç duyarken, μ kalpainler ise mikromol Ca^{+2} konsantrasyonlarında aktiflenirler (57,188).

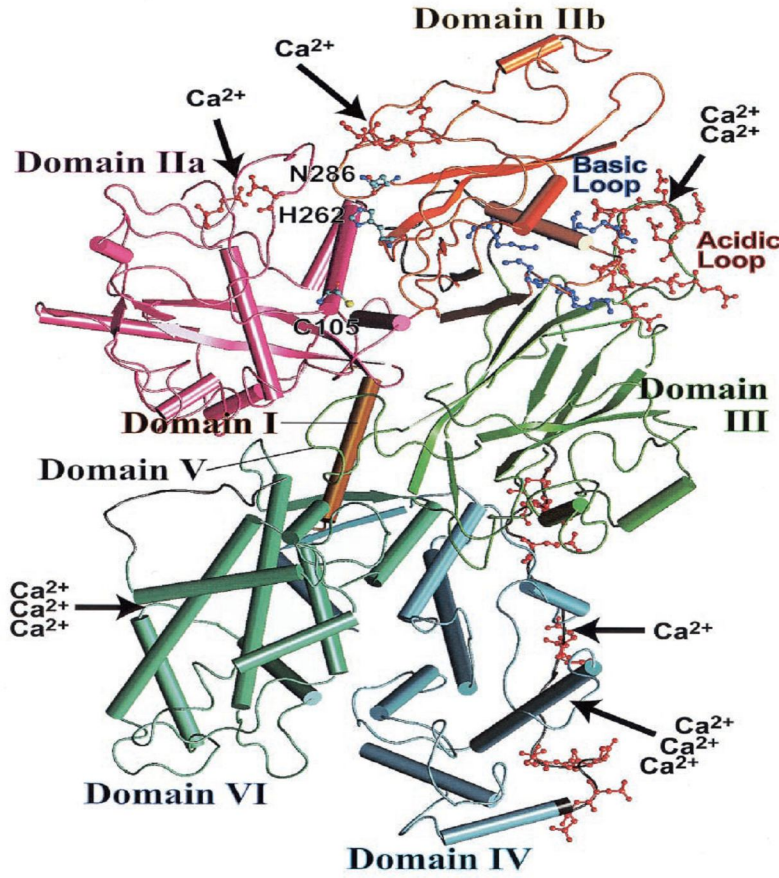


Şekil 2.18: Kalpainin yapısı ve kalsiyum ile ilişkisi

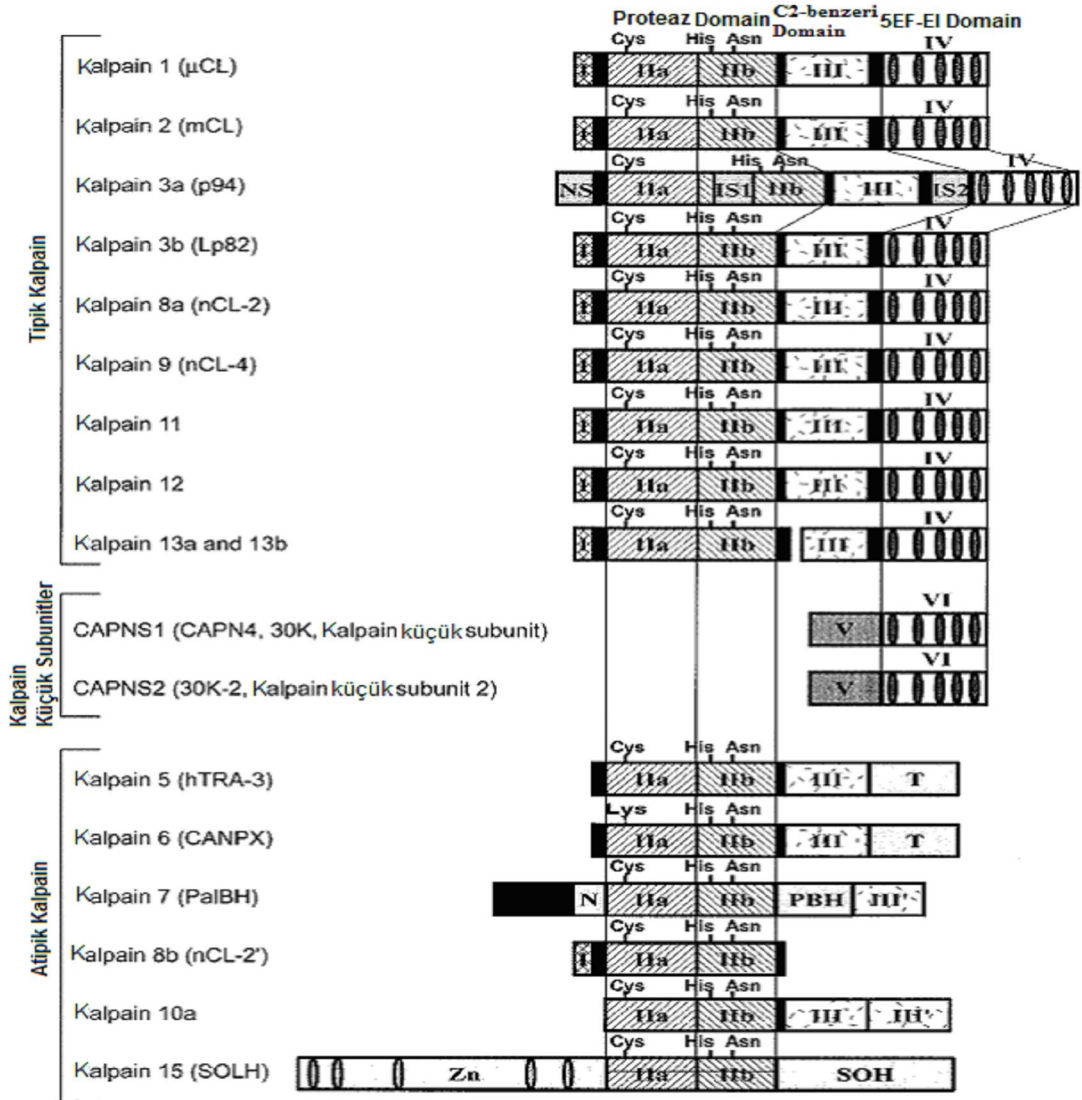


Şekil 2.19: Kalpainin şematik yapısı (112)

En iyi karakterize edilmiş olan μ ve m kalpainler (kalpain I ve II) 80 kDa'luk geniş alt unite ve 30 kDa'luk küçük alt üniteden oluşur (Şekil 2.20 ve 2.21). Amino asit homologlarının yapısında geniş alt unite 4 domain (d1-d4) ve küçük alt unite 2 domain (d5-d6) içerirler. μ kalpainler için 5-50 mikromol, m kalpainler için 200-1000 mikromol kalsiyum konsantrasyonlarında her iki kalpainde aktive olur ve kısmi olarak otolize uğrarlar. *In vivo* olarak her iki kalpaininde fizyolojik kalsiyum konsantrasyonlarında (100-300 mikromol) aktive olduğu görülür. Bununla birlikte fosfolipidler gibi diğer faktörler de aktivasyon için ek bir rol oynayabilirler (112). m Kalpainin yapısal analizi molekülün düz bir oval disk formunda olduğunu gösterir. Üst ve alt kutupları iki katalitik subdomain (d2a ve d2b) ve kalmodulin benzeri domain çifti (d4-d6) ile kaplıdır. Domain d3 ve N-terminal domainler (d1-d5) her iki katalitik subdomainlerle iki kalmodulin benzeri domaini bağlar (112).



Şekil 2.20: Üç boyutlu Ca⁺² suz insan m -kalpain yapısı (214).



Şekil 2.21: İnsan kalpain ailesi üyelerinin domain yapıları.

Tipik kalpainler (80 K) 4 domain(I–IV) içerir, atipik kalpainlerde ise yoktur yada yer değiştirmiştir. Kalpainlerin küçük alt ünitesi (30K) iki domain (V ve VI) içerir (214).

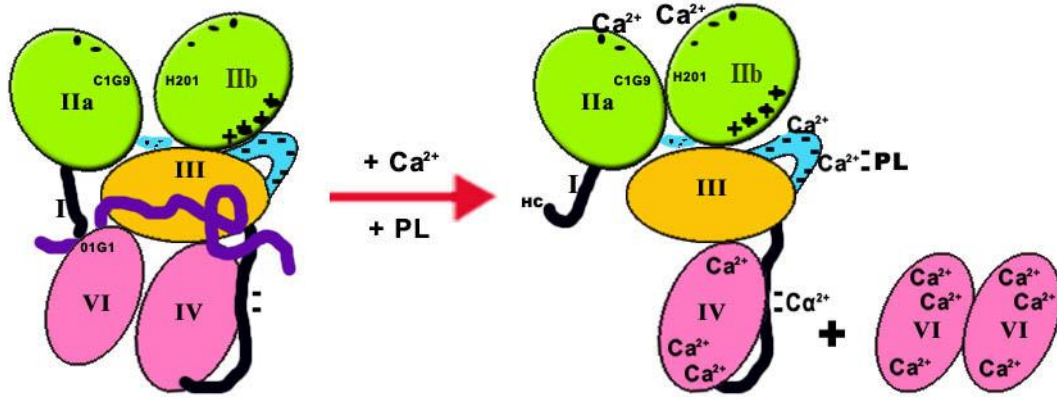
Nöronal hücre ölümü akut ve kronik nörodejenaratif hastalıklarda apoptoz ve nekroz gibi patolojik biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere yol açar. İntrasellüler kalsiyum düzeylerinde bozulma ve mitokondriyal disfonksiyon sorunu oluşur. Kalpainler intrasellüler sistein proteazlardır, kalsiyum ile aktive edilirler. İki formu

vardır. Bcl-2, hücre ölüm regülatörü kalpain prosesidir ve Bid, mitokondriyal permabilite ve kalpte iskemi reperfüzyon izler. Kalpain sekansı PEST (prolin, glu, ser, threo) dizisinden zengindir. AIF proteinlerin karboksi terminalinde, PEST mitokondriyal intermembranda yer alır. AIF, NMDA nöronlarının uyarılması kalsiyum aracılıdır. Kalpain I aktivasyonu olur (179).

2.4.2.3.1. Kalpainlerin aktivasyonu

Kalpain aktivitesi, otoproteolitik salınım, fosforilasyon, Ca^{+2} konsantrasyonu ve endojen inhibitör kalpastatin ile düzenlenir. Kalpastatin (110 kDa), kalpainin endojen inhibitör proteindir. Kalpain haricinde diğer proteazları inhibe etmez. Kalpastatin, kalpain ile beraber sitozolde ve membranda bulunur. Kalpastatin dört adet inhibitör bölge içerir ve 1 molekül kalpastatin 4 molekül kalpain'i inhibe eder (188).

Kalpainler için gerekli olan kalsiyum konsantrasyonları μmol 'den mmol 'e kadar oldukça yüksektir. Bundan dolayı hücrelerde Ca^{+2} gereksinimini düşürecek veya kalsiyuma karşı kalpainlerin hassasiyetini arttıracak mekanizmalar vardır. Hücre içi kalsiyum seviyelerine kalpainlerin hassasiyeti membran fosfolipidleri sayesinde. Kalpainlerin Ca^{+2} ilgisini arttıran aktivatör proteinlerin varlığında kalpain aktivasyonu başlar. Aktif kalpain membranlarda bulunur. Kalpain aktivasyonunda membrandaki lokalizasyonları önemli rol oynar. Kalpainlerin aktivasyonlarında veya inaktivasyonlarında fosforilasyon önemli bir role sahiptir (Şekil 2.22) (112, 214).

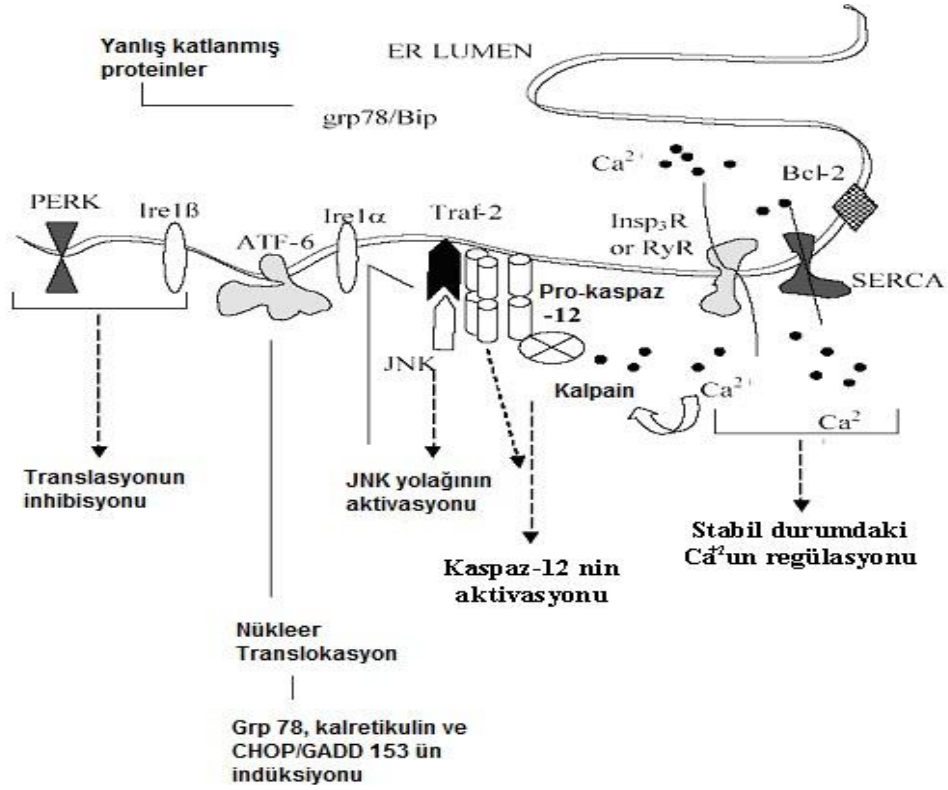


Şekil 2.22: Kalsiyum tarafından kalsiyumun aktivasyon mekanizması.

m-Kalpaine Ca^{+2} ve fosfolipidlerin bağlanması konformasyonel değişikliği indükler ve Domain IIa ve IIb yakınlaşıp bağlanır, böylece fonksiyonel katalitik bir bölge oluştururlar. Bu 30 kDa ve 80 kDa lık bölgelerin ayrışmasına neden olur. Böylece 30 K lık homodimer oluşumu ile sonuçlanır. m-kalpaininin en az birbirinden farklı Ca^{+2} bağlayan üç bölgesi vardır, ikisi kalmodulin benzeri EF –el yapısında domain IV ve VI bir asidik loop içeren domain III ve iki non-EF-el Ca bağlayan bölge IIa ve IIb dir. C105 ve H 262 katalitik kısımlardır. K7 ve D154 kalsiyum iyonları yokken bir tuz köprüsü oluşturur. Ca^{+2} , **kalsiyum atomunun kalpaine bağlanması, NH_2 -terminal kalıntı; - ve +, bazik ve asidik aminoasit kalıntıları kalsiyum iyonları bağlanması için önemlidir** (214).

2.4.2.4. Endoplazmik retikulum ve kalsiyum

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu, kalsiyum kanalları ve kalsiyum bağlayıcı proteinler ile ayarlanarak endoplazmik retikulumda (ER) depolanır. Ca^{+2} depolanmasında ER depo görevi görür (Şekil 2.23). Ca^{+2} , endoplazmik retikulum lümeninde serbest veya kalretikulin ve kalneksin gibi luminal proteinlere bağlı olarak bulunur. Ca^{+2} , sitozolden sarkoplazmik/endoplazmik Ca^{+2} -ATPaz (SERCA) (ATP aracılı Ca^{+2} pompası) aracılığıyla konsantrasyon gradiyentine karşı ER lümenine taşınır. İnozitol-1, 4, 5 trifosfat (IP_3) reseptör/ Ca^{+2} kanalları veya ryanodin reseptör (RyR)/ Ca^{+2} kanalları kalsiyumun ER'dan salınımında önemlidir. Sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış kalpain'in, (Ca^{+2} bağımlı sistein proteazı) aktive olmasına neden olur. Ayrıca sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu artışı kalsinörin ve Bad aktivasyonuna da neden olur (112).



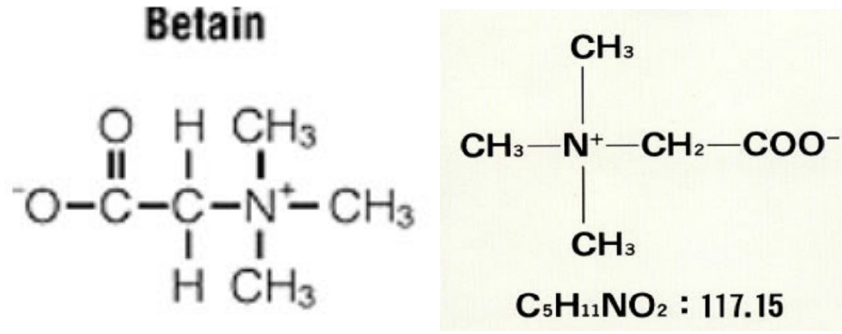
Şekil 2.23: Endoplazmik retikulum, kalpain ve kalsiyumun apoptozdaki rolleri (112)

2.4.2.5. Kalpain-katepsin- kaspazların ilişkisi

Nekrotik hücre ölümünde aktive olmuş kalpainlerin lizozomal zarlara zarar verdiği belirlenmiştir. İskemik olaylardan sonra ilk görülen kalpainlerin, lizozomların zarına yerleşmesidir ve sonrasında da katepsinler sitoplazmaya sızar. Bu durum kalpain-katepsin aktivasyonunun oluşumuna neden olur (Şekil 2.24). Katepsin ve kalpain'in sınırlı aktivasyonu apoptozu tetiklerken şiddetli aktivasyonu nekroz gelişimine neden olmaktadır (Şekil 2.25). Aynı zamanda kalpainler, kaspaz-9 gibi prokaspaz-3 ün aktiflenmesini sağlar ve apoptozu katılır (187,216).

2.5. Betain

Betain mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerde bulunan, buğdayın da dahil olduğu, kabuklu deniz ürünleri, ıspanak ve şeker pancarı gibi birçok gıdanın önemli bir bileşenidir. Bir zwitter iyon kuaterner amonyum bileşiğidir ve trimetilglisin, glisin betain, lizin, ve oksineurin olarak da bilinir. Betain, glisin amino asitinden türemiş metil gruplarına sahip bileşiktir, $(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{COO}$ olarak formülize edilir ve 117.2 molekül ağırlığına sahiptir (Şekil 2.26). Kimyasal olarak reaktif metil grubu taşıdığından metilamin olarak karakterize edilmektedir (53).



Şekil 2.26: Betainin kimyasal formülü (80)

İlk olarak 19.yy da şeker pancarı suyunda (*Beta vulgaris*) keşfedilmiştir. Daha sonra diğer bazı organizmalarda da bulunduğu tespit edilmiştir. Betainin fizyolojik fonksiyonu, hem stres altındaki hücrelerin organik osmaliti olarak koruyucu bir etki göstermek hem de bir çok biyokimyasal yolakta metil gruplarının katabolik kaynağı olarak transmetilasyon için kullanılmaktadır. Bitki ve mikroorganizmalarda betainin temel rolü ozmotik inaktivasyona karşı hücreleri korumaktır. Kuraklık, yüksek tuzluluk veya sıcaklık stresine maruz kalındığında, mitokondri içinde betain sentezi tetiklenir ve bu betain birikimi ile sonuçlanır. Betain osmolit olarak, hücrelerde su tutulmasını artırır, inorganik tuzları değiştirir, ozmotik uyarılma veya sıcaklıkla uyarılan inaktivasyona karşı; intrasellüler enzimleri korur (145). Örneğin, tuzlu toprakta yetişen ıspanakta, taze

ağırlığın % 3'ü kadar bir miktarda birikebilir. Bu yüksek tuz varlığında kloroplastların fotosentezini sağlar (144).

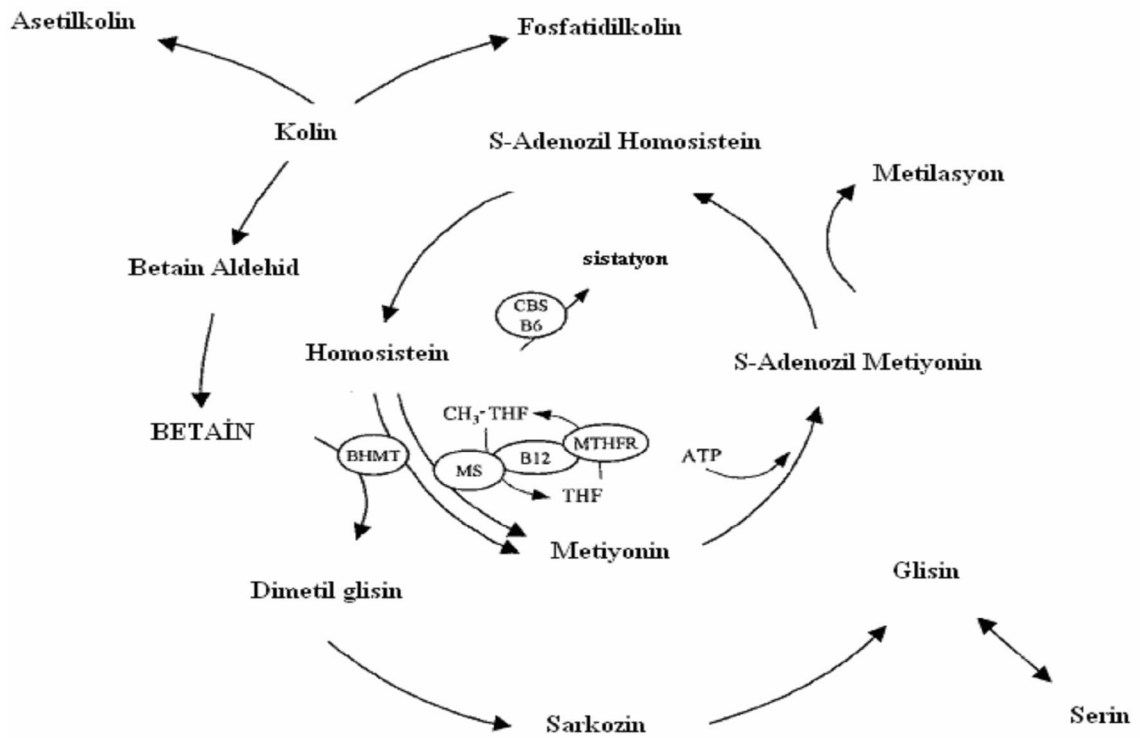
Betain, bir metil donorü olarak, optimum beslenme için gerekli olan metiyonin ve kolinin oluşması için gereken tek karbon birimlerini sağlar (Şekil 2.27). Büyümeyi, besin kullanım verimliliğini artırır ve vücut yağını azaltır. S-adenozilmetiyonin (SAM) sentezi için de gereklidir (17,76).



Şekil 2.27: Betainin metabolizmadaki rolü (226)

Total homosisteinin konsantrasyonlarındaki artış ve düşük SAM konsantrasyonları kronik hastalıklarla ilişkilidir. Betain; serum metiyonin, transmetilasyon oranını, homosistein remetilasyonu ve metiyonin oksidasyonunu arttırmaktadır. Betain enjeksiyon yoluyla veya betain içeren besinler yoluyla hayvanlar tarafından alınır ve bir seri enzim reaksiyonuyla katabolize olur. Bu reaksiyonlar çoğunlukla böbrek ve karaciğer hücrelerinin mitokondrilerinde gerçekleşir. Transmetilasyon reaksiyonları metil (tek karbon) gruplarının metiyonin döngüsü içerisinde transferini içermektedir. Betain, homosisteinin metiyonine dönüşümü, metiyonin düzeyini korumak,

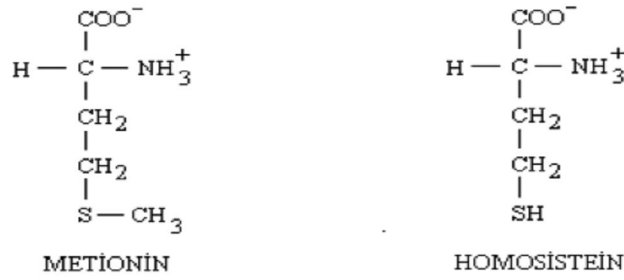
homosisteinin kırmızı kan hücrelerinde protein, kreatin, fosfolipid, hormonlar, poliaminler, karnitin ve adrenalın sentezi ile DNA metilasyonunda direkt metil vericisi olarak görev alan SAM ın üretiminde önemli role sahiptir. Eğer betain katabolize olmazsa organik bir ozmolit olarak iş görür. Hücrel hidrasyon durumunun düzenlenmesi hücre fonksiyonunun devamlılığı açısından önemlidir. Betainin, betain-homosistein-metiltransferaz (BHMT) yoluyla homosisteini remetile ederek hepatic SAM ve glutasyon seviyelerini koruduğu ve bu yolla metiyonin metabolizmasındaki alkol kaynaklı değişimleri azalttığı daha önce gösterilmiştir. Ayrıca, hücre içi S-adenozil homosistein (SAH) seviyesindeki etanol kaynaklı değişimleri ve SAM/SAH oranını düşürür, homosistein salınımındaki artışı engeller (Şekil 2.28) (53,110).



Şekil 2.28: Betain metabolizması (53).

2.5.1. Homosistein

Homosistein, metiyonin amino asitinin metabolizması esnasında bir ara ürün olarak oluşan, sülfür içeren bir moleküldür (91). Metiyoninin demetilasyonu ile oluşmuş bir tiol olan homosisteinin yapısı Şekil 2.29’da gösterilmiştir.



Şekil 2.29: Metiyonin ve homosisteinin kimyasal yapısı (91)

Homosistein metabolizmasında önemli bir yere sahip olan metiyonin; proteinlerin sentezinde, transmetilasyon reaksiyonlarında, poliaminlerin sentezinde, sistatyonin, sistein ve transsülfürasyon, hücre içi folat metabolizması ve kolin katabolizması için gerekli olan homosisteinin sağlanması gibi biyolojik süreçlerde rol oynar ve memelilerin büyüme ve gelişimi için esansiyeldir (158). Homosisteinin klinik önemi, 1962 yılında sistatyonin-β-sentaz (CBS) eksikliğine bağlı olarak oluşan homosistinüri hastalığı dolayısıyla ortaya çıkmıştır. Bu hastalıkta trombotik olaylar, prematür ateroskleroz ve mental gerilik görülür (16,31). Yapılan çalışmalarda, homosisteinin, merkezi sinir sistemi (MSS) gelişim bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklar, depresyon ve şizofreni gibi psikiyatrik bozukluklar ve bazı kanserlerle ilişkili olabileceği gösterilmiştir (139).

2.5.1.1. Homosistein metabolizması

Homosistein, metiyonin metabolizmasının ayrılmaz bir bileşenidir (Şekil 2.30). Metiyonin transmetilasyon yolu ile homosisteine dönüşür. Bir kez homosistein

oluştuktan sonra ya remetilasyon yolu ile tekrar metiyonine dönüşür ya da transsülfürasyon yolu ile sistatyonin ve sisteine metabolize edilir (163).

2.5.1.1.1. Transmetilasyon

Metiyonin metabolizması, metiyonin adenozil transferaz enzimi aracılığı ile kükürt atomuna ATP'den bir adenozil grubunun transferi sonucu S-adenozil-metiyonin (SAM) oluşması ile başlar. SAM metil grubunu kolaylıkla bir alıcıya vererek S-adenozil-homosisteine (SAH) dönüşmektedir. SAH ise geri dönüşümlü bir enzim olan SAH hidrolaz enzimi ile adenozin ve homosisteine metabolize edilir. Bu reaksiyonlar transmetilasyon olarak adlandırılır. Betain ile de üretilen SAM metiyonin metabolizmasında anahtar bir ara üründür (78). SAM sadece bir metil grup vericisi olmayıp siklopropil yağ asit sentezinde metilen grup vericisi, biotin sentezinde amino grup vericisi, poliamin ve etilen sentezinde amino izopropil grup vericisi ve 5'-deoksi adenozil radikal vericisidir. Ayrıca biotin ve lipoik asit sentezinde sülfür kaynağıdır (33, 41).

2.5.1.1.2. Remetilasyon

Homosisteinin remetilasyon ile metiyonine dönüşümü iki enzimden biri aracılığı ile olur:

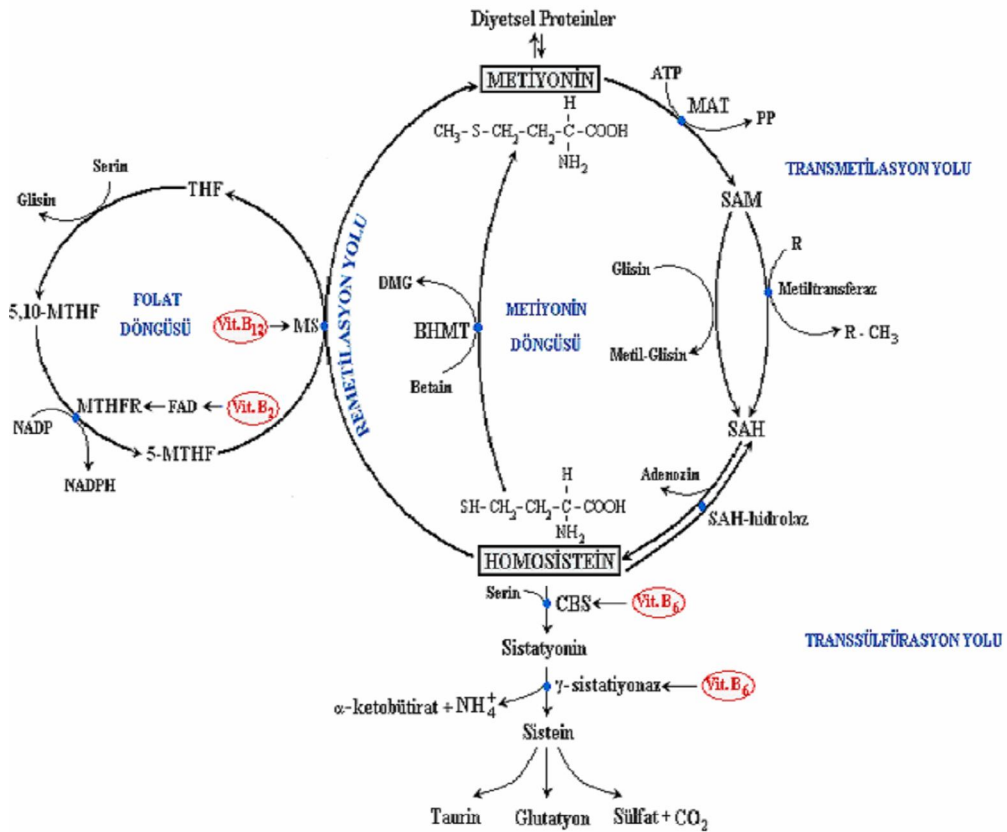
- 1- Metiyonin sentaz (MS; 5-metiltetrahidrofolat-homosisteinmetiltransferaz)
- 2- Betain-homosistein metiltransferaz (BHMT) (127).

Homosisteinin remetilasyonu, 5-metiltetrahidrofolatı metil vericisi ve vitamin B 12'nin bir formu olan metilkobalamini ise kofaktör olarak kullanan metiyonin sentaz (MS) tarafından katalizlenmektedir. 5-metiltetrahidrofolatın oluşumu; tetrahidrofolattan (THF) elde edilen 5,10-metilentetrahidrofolatın redüksiyonunu katalizleyen 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaza (MTHFR) bağımlıdır. MTHFR enzimi ise kofaktör olarak vitamin B 2'yi (riboflavin) kullanmaktadır. Bu remetilasyon yolunda folat hem koenzim hem de kofaktör olarak kullanılmakta ve bu olay döngü şeklinde devam etmektedir (127,200).

Betaini metil vericisi olarak kullanan ikinci bir homosistein metilaz sistemi memelilerin karaciğeri ve primatların böbreklerinde tespit edilmiştir (147). Bu yolu katalize eden BHMT, metil vericisi olarak kolinin oksidasyon ürünü olan betaini kullanarak N,N-dimetilglisin ve metiyonin oluşturmaktadır. Folat ve/veya kobalamin eksikliğinde bu yol SAM sentezi için gerekli metiyoninin doku konsantrasyonunu sürdürmektedir (200).

2.5.1.1.3. Transsülfürasyon

Homosisteini metiyonin siklusundan alıp geri dönüşsüz olarak önce sistatyonine daha sonra sırasıyla sistein ve glutatyona dönüştüren yolağa transsülfürasyon denir. Bu reaksiyonlar sırasında α -ketobütirat, NH_4^+ , taurin, piruvat, sülfat + CO_2 de oluşur (140,165).



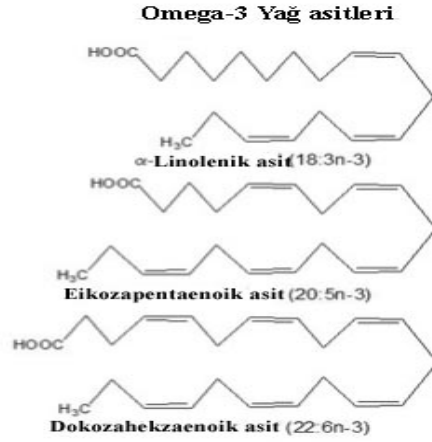
Şekil 2.30: Homosistein metabolizması

Bunun yanısıra, betainin in vivo ortamda etanol kaynaklı hepatik steatozu azalttığı ve tersine çevirdiği gösterilmiştir. Bu nedenle, betain etanole bağlı karaciğer hasarını önler, bunu da metiyonin metabolik yolundaki değişimleri düzelterek ve önemli metilasyon reaksiyonlarını koruyarak yapar (17). Betain, homosisteini remetile etme yeteneği sayesinde SAH seviyelerini düşürmekte ve SAM/SAH oranındaki etanol kaynaklı oluşan sorunu eski haline getirmekte, hücrel metilasyonu uyarmakta, steatozu ve homosistein kaynaklı toksisiteyi engellemektedir. Diğer taraftan SAM, sadece SAM/SAH oranı ile metilasyon kusurları üzerinde etkili olmakta ve uzun süreli kullanımı, homosistein salınımını artırma özelliği yüzünden zararlı olabilmektedir. Bu sebeple betain sadece karaciğer hastalıklarında değil, homosistein artışı ve metilasyon bozukluklarına bağlı diğer hastalıklarda SAM'dan daha etkili bir tedavi edici ajan olarak kullanılabilir (17,53,110).

2.6. Omega-3 Yağ Asidi

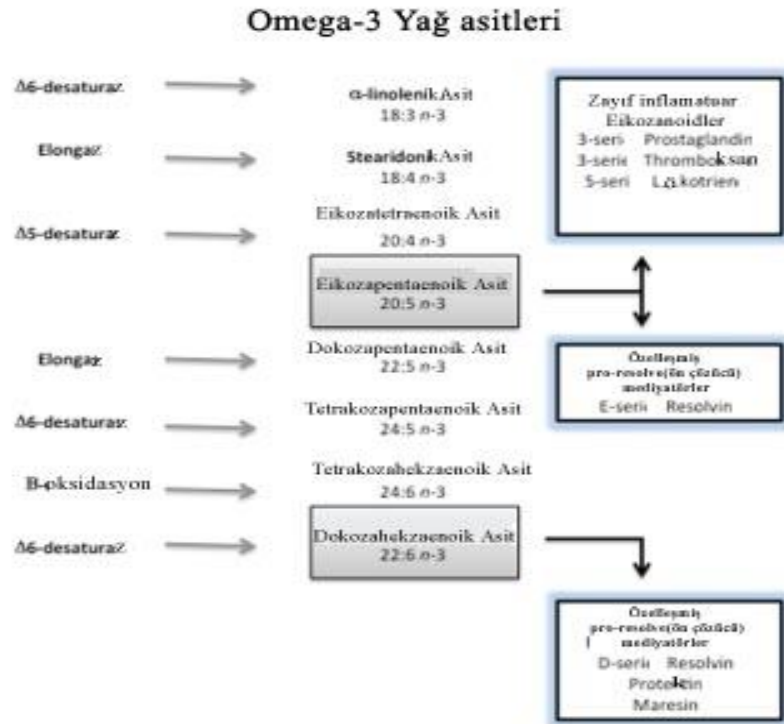
Omega-3 yağ asidi çoklu doymamış yağ asitleri (Poli Unsature Yağ Asitleri – PUFA) ailesinde yer alan esansiyel bir yağ asididir. Bu yağ asidinin kimyasal yapısında metil terminalinin 3. karbonunda çift bağ bulunmaktadır. Metil terminalinin 3. karbonunda çift bağ bulunan yağ asitleri terminolojik olarak omega-3 yağ asitleri diye adlandırılmışlardır (223).

Omega-3 terimi ("n-3", "ω-3" olarak da kullanılır) ilk çift bağın, karbon zincirinin ucundaki (ω) metil grubundan itibaren sayılınca 3. karbon-karbon bağı olduğu anlamına gelir. İnsan beslenmesinde önemi olan omega-3 yağ asitleri şunlardır: alfa-linolenik asit (18:3, ALA), eikozapentaenoik asit (20:5, EPA) ve dokozaheksaenoik asit (22:6, DHA) (Şekil 2.31). Bu üç doymamış yağda, sırasıyla 18, 20 veya 22 karbonlu bir zincirde 3, 5, veya 6 çift bağ vardır. Çift bağların hepsi *cis*-biçimindedir, yani hidrojen atomları çift bağın aynı tarafındadır (47,109).



Şekil 2.31: Omega-3 yağ asitleri (100)

İnsanlar ve diğer memeliler doymuş yağ asitleri ile bazı tekli doymamış yağ asitlerini karbohidrat ve proteinlerdeki karbon gruplarından sentezleyebilirler ancak yağ asitlerinin (n-6) ya da (n-3) pozisyonuna *cis* çift bağımlı eklemelerini sağlayacak enzimleri yoktur (186). Şekil 2.32’te omega-3 yağ asitlerinin metabolik yolağı gösterilmiştir (40).



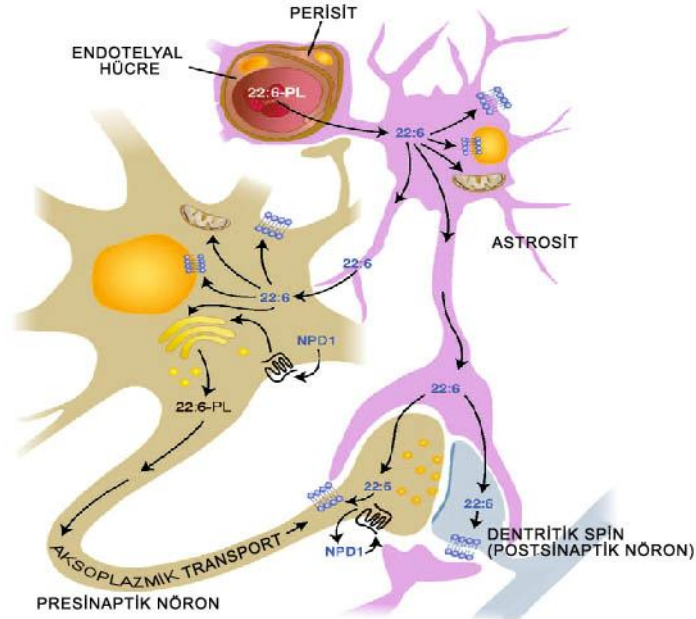
Şekil 2.32: Omega-3 yağ asitlerinin metabolik yolağı (40)

2.6.1. Omega-3 yağ asidinin beyin için önemi

Adipoz dokudan sonra beyin ikinci lipit yoğunluğuna sahip organdır (202). Beyindeki lipidlerin büyük çoğunluğunu fosfolipidler oluşturur. Fosfolipidlerin iki önemli alt bölümünde gliserofosfolipid ve sfingolipidler yer alır, özellikle beyin gri maddesinde oldukça fazla bulunurlar. Hücresel membranların elementleri olarak vazgeçilmezdirler. Gliserofosfolipidler; 1 gliserol iskeleti ve 2 yağ asidinden oluşmaktadır. Doymuş yağ asitleri genellikle Sn-1 pozisyonunda yer alırken, Sn-2 pozisyonunda doymamış yağ asitleri, Sn-3 pozisyonunda ise fosfat grubu yer alır ve bu polar başa kolin, serin, etanolamin, inozitol bağlanabilir. Beyinde bu fosfolipidlerden; fosfoetanolamin (PE), fosfotidilserin (PS) gibi gliserofosfolipidlerin içerisinde, en yüksek miktarda DHA bulunur. Gri maddenin çoğu nöronlardan ve %40 oranında lipidlerden oluşmaktadır. Beyaz maddenin ise %50-70'i lipidlerden ve miyelinden oluşur. Beyne spesifik bu gliserofosfolipidlerin doymamış yağ asidi dağılımı şöyledir: Beyaz maddede daha fazla tekli doymamış (monounsature) yağ asidi varken, gri maddede daha fazla çoklu doymamış (poliunsature) yağ asidi bulunur. Beyinde omega-3 yağ asidinden predominant olan DHA, omega-6 yağ asidinden predominant olan araşidonik asit (AA) tir. Gri maddede en fazla DHA bulunur (Şekil 2.33) (215).

Nöronal membran fosfolipidleri tercihen DHA'yı korur ve onu kolay bırakmaz. Aksine astrositler DHA'yı ortama kolayca bırakır. Astrositler nöronlar etrafındaki kimyasal ortamı kontrol eder ve uygun iyon ve aksiyon potansiyeli iletimini sağlarlar. Sinaptik membranlarda kolinerjik reseptörler gibi G protein bağlı reseptörler, fosfolipaz A₂ (PLA₂) tarafından, AA ve DHA içeren fosfolipidlerin uyarılmasını sağlar. Kolinerjik uyarılma boyunca AA ve DHA membrandan sitozole serbest bırakılır ve küçük miktarlarda biyoaktif ikincil mesajcılara (eikozanoid ve dokozanoid) dönüştürülürler. Serbest yağ asidi salınımı ile havuzda kalan yağ asitlerinin küçük bir kısmı β oksidasyona uğrar. Fakat yüksek oranda membran fosfolipidlerine geri dönüştürülürler. Bu dönüşüm benzer şekilde diğer membranlarda da örneğin sinaptik vezikülde de gerçekleşir. İlginç bir şekilde AA ve DHA, PLA₂'nin farklı izoformları tarafından düzenlenir. AA'ya spesifik form sitozolde c PLA₂, AA salgılatıcı form s PLA₂ dir,

kalsiyumdan bağımsız form i PLA₂ astrositlerde bulunmakta ve DHA ya spesifik olduğu düşünülmektedir. Örneğin; lityum, karbamazepin, valproat gibi ilaçlar AA, COX ekspresyonu, PGE₂ üretimini azaltırken; DHA dönüşümünü değiştirmemektedir (185).



Şekil 2.33: Dokozahekzaenoik asidin (DHA) (22:6) nöron ve astrositlerdeki dağılımı (22)

Hücre membranının yapısı ve içeriği, hücrenin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için çok önemlidir. DHA aksonal yapıyı koruyarak, elektriksel uyarıların düzgün olarak iletilmesine katkıda bulunur (29,138). Omega-3 yağ asitleri hücre membranının önemli bileşenlerinden olup membranın bütünlüğü ve akışkanlığı, hücre hareketleri, reseptörlerin yerleşimini düzenlerler (8,138). Hücre membranının kritik fonksiyonları şunlardır,

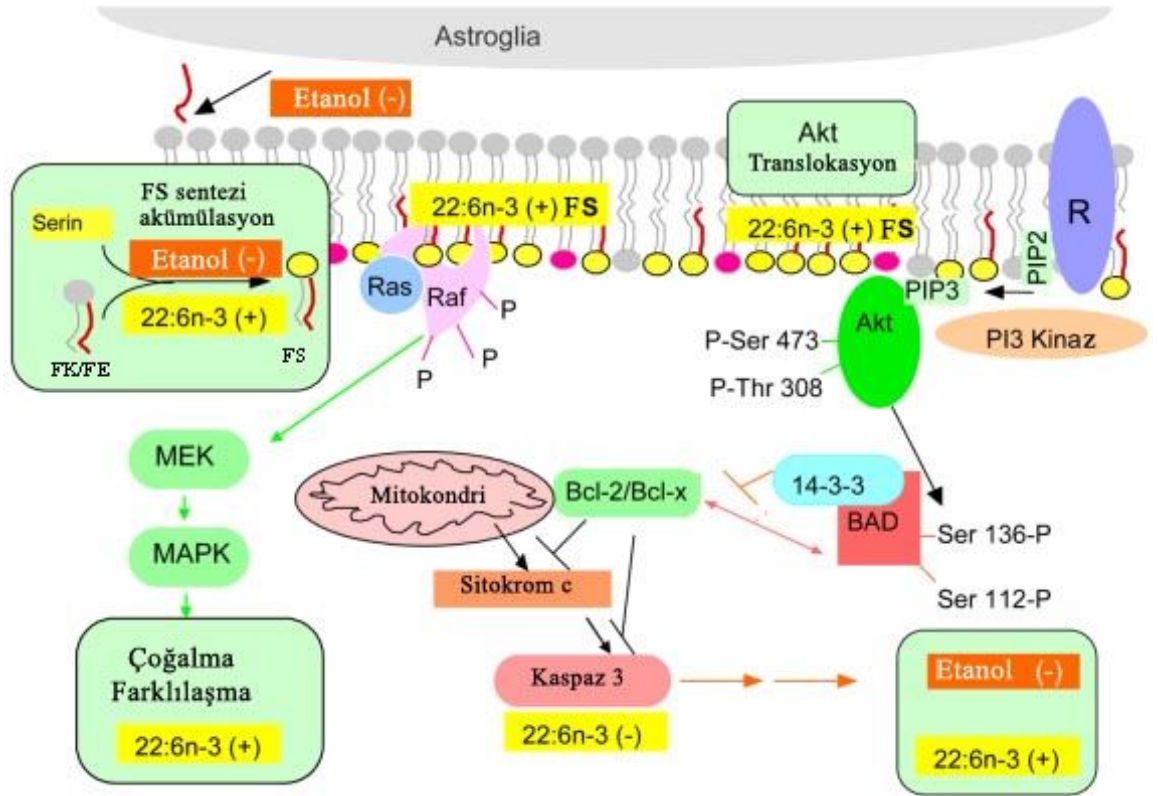
- Membran akışkanlığı,
- Hücre sinyali ve gen ekspresyonu,
- Eikozanoid ve dokozanoid sentezi (22).

Huber ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; membran fosfolipidlerinde bulunan doymamış uzun zincirli DHA'nın, rodopsin gibi G protein bağlı zar proteinlerinin yararına hidrofobik alanlarda çözünürlüğü kolaylaştırdığını düşünmektedirler (102).

Turner ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada; memeli ve kuşlardan alınan beyin, kalp, böbrek dokularını çevreleyen fosfolipidlerdeki DHA'nın membran konsantrasyonu ile Na⁺ K⁺ ATPaz pompası enzim moleküler aktivitesi arasında pozitif doğrusal ilişki gösterilmiştir. Dahası memeli beyinde en yüksek konsantrasyonda DHA içeriği ve Na⁺ K⁺ ATPaz pompasında buna benzer şekilde en yüksek aktivite oranı saptanmıştır (222).

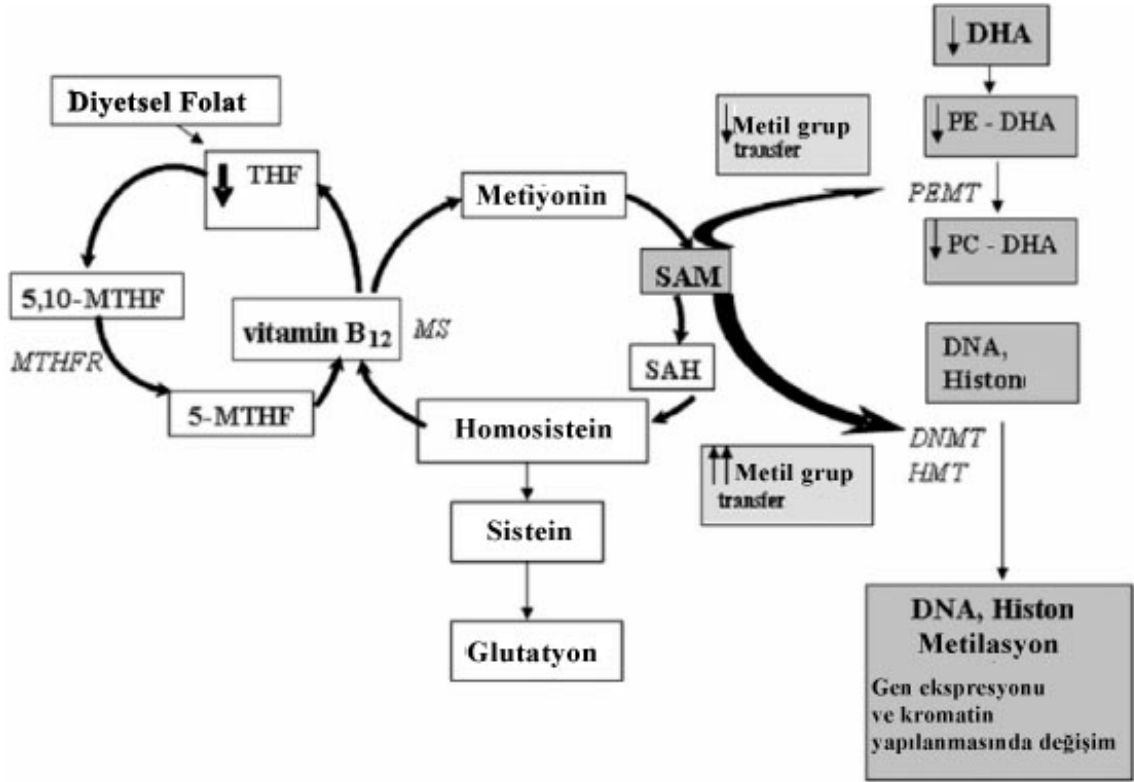
Brenna ve Diau'nun yaptığı çalışmada, serebral DHA düzeylerinin yüksek enerjili dokularda yüksek olduğunu bulmuşlardır. Beyin dokusundaki DHA seviyeleri ile lokal serebral metabolik hızda, hücrelere glukoz alımı arasında doğrusal bir ilişki saptamışlardır. Brenna ve Diau, yine hücre membranında yapısal rolü olan DHA'nın aynı zamanda oksidatif strese düzenleyici metabolik rolü olduğunu önermişlerdir. Bununla birlikte metabolik sendrom, nörodejeneratif hastalıklarda DHA yararının biyokimyasal temellerle incelenebileceğini düşünmektedirler (32).

DHA ile ilgili olarak son zamanlarda protektin olarak adlandırılan dokozenoid prekürsörleri (öncülleri) keşfedilmiştir ve merkezi sinir sistemini koruyucu role sahiptir. Protektin; periferal kan mononükleer hücreler, CD4 hücreler (oksidatif strese cevap) ve nöron, astrosit ve akciğer dokusunda bulunur (140). İlk protektin NPD1 olarak sinir dokuda bulunup adlandırılmıştır (166). NPD1; sinir rejenerasyonunu indükler, lökosit infiltrasyonu azalışı, yaşlanma aracılı proapoptotik ve proinflamatuvar sinyali azaltarak homeostazisi sağlar. NDP1; oksidatif stres aracılığı ile indüklenir ve retinal ve nöronal hücrelerde, oksidatif strese bağlı apoptozdan korur. Il-1 β baskılanması, Cox uyarımında dahil olduğu bir çok mekanizmadan sorumlu tutulmaktadır (21). Dokozahekzaenoikasitin sinir sistemindeki biyokimyasal ve biyolojik fonksiyonları Şekil 2.34 te gösterilmiştir (119).



Şekil 2.34: Dokozahekzaenoik asidin sinir sistemindeki biyokimyasal ve biyolojik fonksiyonları (119).

Betain ve vitamin B12; homosisteinin metiyonine dönüşümü, metiyonin düzeyinin korunması, homosisteinini detoksifiye etmek ve S-adenozilmethiyonini (SAM) üretmek için gereklidir. SAM'dan metil grupları PEMT(fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaz) ile DHA ya oradan da DNA ve histonlara aktarılır. Fosfatidilkolin (PC), çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) karaciğerden plazma ve periferel dokulara dağılımında önemli bir rol oynar. Şekil 2.35 de folik asit, vitamin B12 ve DHA arasındaki ilişkiyi göstermektedir (124).



Şekil 2.35: Bir karbon atomu siklusu: folik asit, vitamin B12 and DHA.

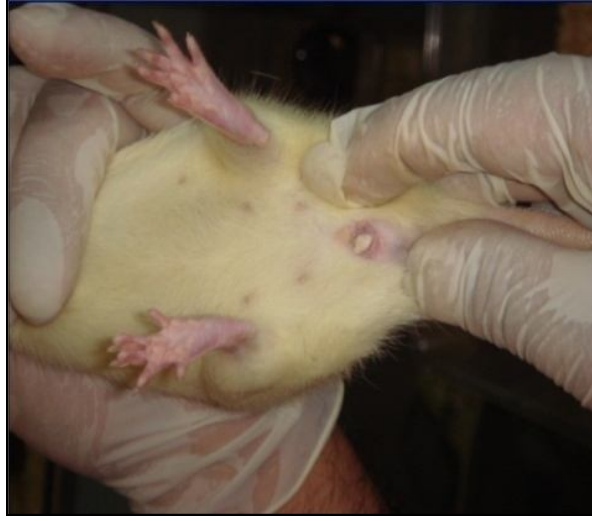
THF- tetrahidrofolat; 5, 10-MTHF- 5, 10-metilenetetrahidrofolat; 5-MTHF- 5-metiltetrahidrofolat; MTHFR- metilenetetrahidrofolat reduktaz; MS- methionin sentaz; SAH- S adenzil homosistein; SAM- S-adenozilmethionin; DHA-dokozahekzanoik asit; PE-DHA-phosphatidiletanolamin-DHA; PC-DHA-phosphatidilkolin-DHA; PEMT- fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaz; DNMT- DNA metiltransferaz; HMT- Histon metiltransferaz (124).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Madde uygulamaları

Deneylerde aynı yaşta, 200-250 g Spraque-Dawley cinsi dişi ve erkek ratlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi (TICAM)'dan sağlanmıştır. Bu çalışma için ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Komite Raporu alınmıştır (258-2/2013). Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz biyokimyasal analizler Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, histolojik analizler Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, morfometrik değerlendirme ise Anatomi Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Ratlar standart hayvan bakım kafeslerinde, 12 saatlik gece/gündüz dönüşümünde, sabit $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve sabit nemli ($\%55\pm 5$) ortamda tutuldular. Erkek ve dişi ratlar ayrı kafeslere koyulup deneylere başlamadan önce bir hafta laboratuvar koşullarına alıştırdı.

Vajinal plag oluşumu ratlarda döllenme belirtisidir (Şekil 3.1). Erkek ve dişi ratlar çiftleştirilmek üzere bir araya koyulduktan sonra, her gün dişi ratlarda vajinal plag oluşup oluşmadığının belirlenmesi için kontrol yapıldı. Plag oluşumu (E0) ile yavrunun doğumu arasında geçen zaman, çalışmada embriyonik prenatal dönem (E) olarak ifade edildi. Normal ratlar (kontrol grubu), E0 zamanından itibaren 20 veya 21 gün içinde (E20-21) doğumlarını gerçekleştirdiler. Ancak etanolün uygulandığı gruplarda, doğum zamanı 1- 3 gün gecikmiştir. Yavruların doğduktan sonraki ilk 24 saatlik zamanına postnatal dönem başlangıcı (P0) denilmiştir.



Şekil 3.1:Vajinal plak oluşumunun görülmesi

Çiftleştikleri veya döllandikleri plag oluşumuyla belirlenen gebe ratlar erkek ratlardan ayrı kafeslere alınıp bakıldılar. Fetal alkol sendromu oluşturmak için prenatal dönemin 6. gününden (E6), doğumun bir gün öncesindeki güne (E22) kadar geçen zamanda ve laktasyon süresince (P21), ilgili gruptaki dişi ratlara bilyalı şişeler ile deneylerde uygulanacak maddeler verilmiştir.

Prenatal ve postnatal alkol uygulaması için ayrı kafeslerde tutulan ratlara modifiye sıvı diyet (MSD) uygulaması yapıldı. Ratlar MSD'yi alkollü veya alkolsüz prenatal ve postnatal dönem boyunca her sabah saat 10.00'da aldılar. Ekstra süt/su desteği yapılmadı. Modifiye Sıvı Diyet (MSD): Düşük yağlı inek sütü 925 ml, 25-75ml Alkol %96.5 ve Sükroz 17 g içermektedir. Bu karışımın tamamı 1000.7 kcal/l'dir. Alkol oranı artarken diyetin izokalorik dengesini sağlamak için sükroz verilmesi azaltılmıştır. Deneyin başlangıcında ratlara adaptasyon süresinde sıvı diyet alkolsüz olarak 2 gün süre ile (E1-E2) verilmiştir. Deneyde etanol uygulamasına başlanılmadan önce omega-3 ve/veya betain, üç gün boyunca verilmiştir (E3-E5). Daha sonra etanol uygulamalarıyla beraber betain ve/veya omega-3 doğuma kadar (P0) ve laktasyon esnasında (P21) uygulandı. Hayvanlara alkol oranı yavaş yavaş artırılarak E6-E8. günlerde %2.4 oranında alkollü süt, E9-E11. günlerde %4.8 oranında alkollü süt, E12-E22. günlerde ve

P0-P21 günlerde %7.2 oranında alkollü süt verildi. Sıvı diyet her hayvana 100ml/gün miktarında taze olarak, her gün aynı saatte ve ağız kısmı bilyalı cam şişelerde verilmiştir. Ratların günlük alkol alımı ve ağırlık takibi yapılarak, ağırlıklarına göre alkolün uygulanması için gerekli değerler hesaplandı .

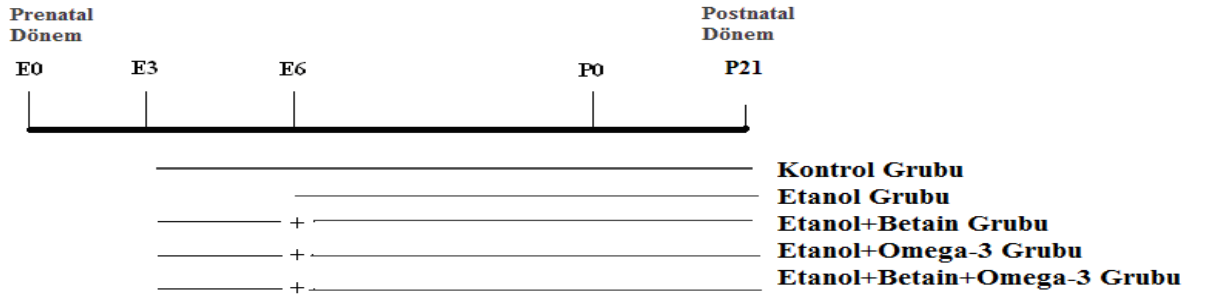
Kontrol grubundaki ratlara ise alkolsüz izokalorik MSD solüsyonu verildi. İzokalorik kontrol grubu, 75ml etanol (60,75g) yerine 75ml inek sütü ile 96gr sukroz içermiştir (72). Etanolün yanında betain uygulanan gruplara günlük %1 w/v dozlarında betain verilmiştir (172). Etanol diyeti ile beraber omega-3 uygulanan gruptaki ratlara 30mg/100g/gün omega-3 takviyesi yapılmıştır (13). Çalışmamızda toplam 65 yavru kullanıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Yeni doğan yavrular

3.1.1. Deney Grupları

1. Kontrol grubu (n=13): Bu gruptaki hayvanlara izokalorik MSD solüsyonu uygulandı.
2. Etanol grubu (n=13): Etanol ile beraber MSD solüsyonu uygulandı.
3. Etanol+Betain grubu (n=13): Etanol ile beraber MSD solüsyonu yanında ratlara %1 w/v betain uygulandı.
4. Etanol+Omega-3 grubu (n=13): Etanol ile beraber MSD solüsyonu yanında omega-3 (30mg/100g/gün) uygulandı.
5. Etanol+Betain+Omega-3 grubu (n=13): Etanol ile beraber MSD solüsyonu yanında betain ve omega-3 uygulandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Deneyde uygulanan maddelerin şekil üzerinde gösterilmesi

n=13 her deneysel grubun içerdiği toplam yavru rat sayısıdır. Bu yavru ratların (P 21.gün) 8 tanesi (n=8) biyokimyasal çalışmalar, 5 tanesi (n=5) histolojik çalışmalar için kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Postnatal 21.gündeki yavru ratlar

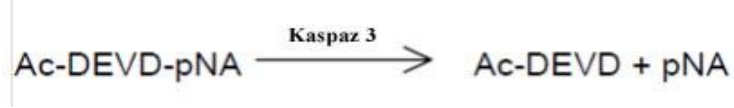
3.2. Cerrahi işlemler

P21-22'inci günde yavrular anestezi maddeleriyle (ketamin/Ksilazin 3:1, 1,32 mg/kg intraperitoneal) uyutulup, dekapitasyonla öldürüldü. Cerrahi olarak büyüteç altında serebral korteks kısmını çıkartıldı. Biyokimyasal çalışmalar için dokular çalışma anına kadar -20°C'de saklandı. Histolojik çalışmalar için dokular nötral formalinde 24–48 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyondan sonra dokuların rutin histolojik takipleri yapıldı.

3.3. Biyokimyasal Yöntemler:

3.3.1. Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini

Kaspaz-3 aktivitesi kolorimetrik aktivite analiziyle belirlendi. Kaspaz-3 aktivitesini ölçmek için ticari kit (Sigma CASP-3-C) kullanıldı. Bu kit, asetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilidin (Ac-DEVD-pNA), p-nitroanilin (pNA) oluşacak şekilde kaspaz-3 tarafından hidrolizi ile oluşan pNA2'nin absorbansının 405 nm'de ölçümü prensibine dayanmaktadır. p-Nitroanilin en yüksek absorbansı 405 nm ($\epsilon^{mM}=10.5$)dir.



Ac-DEVD-pNA: Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid

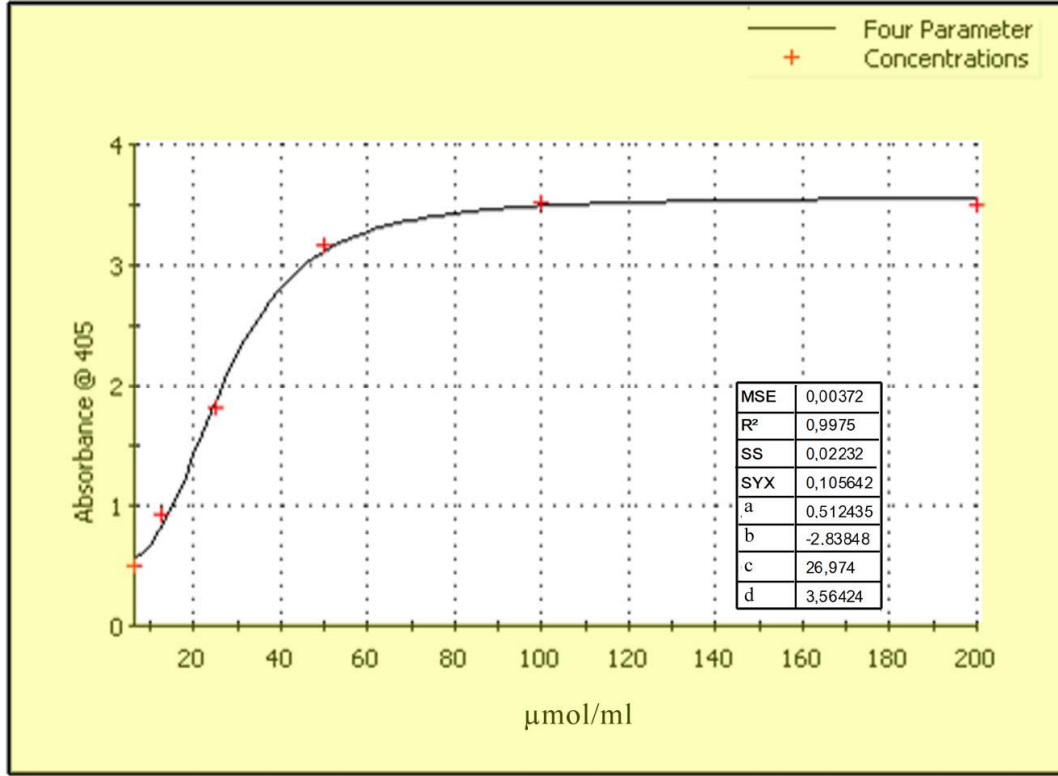
pNA: p-nitroanilin

Beyin doku örnekleri lizis tamponunda (250 mM HEPES, pH:7.4, %1 CHAPS, 50 mM DTT, 10 mM EDTA) homojenize (1/10) edilerek 3000 rpm'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, süpernatanda santrifüj işlemi tekrarlandı. Süpernatant fraksiyonunda Kaspaz-3 aktivitesi belirlenmiştir (234).

Kaspaz-3 aktivitesi ölçümü kısaca şu şekilde yapıldı:

1. 96'lık *plate* kuyucuklarına numune, kör ve standarttan 5 µl eklendi.
2. Üzerlerine 85 µl çalışma solüsyonundan (200 mM HEPES, pH 7.4, 1% CHAPS, 50 mM DTT, 20 mM EDTA) eklendi.
3. Kaspaz 3 substratı Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilidden 10 µl eklendi.
4. 1 saat 37 °C de bekletildikten sonra ELISA okuyucu ile 405 nm'de absorbanslar ölçüldü.

p-Nitroanilin kullanılarak standart grafiği çizildi (Şekil 3.5). Doku protein içeriğinin ölçülmesiyle µmol pNA/ dakika/ mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.5: Kaspaz 3 aktivitesi standart grafiği(Grafik VICTORTM X3, PerkinElmer Inc., USA, Plate okuyucuda, WorkOut 2.5, DAZAQ LTD, programında çizilmiştir)

3.3.2. Sitokrom c Ölçümü

Rat/farelerde bulunan sitokrom c, 104 amino asitlik bir polipeptiddir ve fosforilasyon ve apoptozda yer almaktadır. Sitozolde 12 kDa'luk bir apoprotein olarak sentezlenmektedir. Bu apoprotein dış mitokondriyal membrandan intermitokondriyal boşluğa geçer. Burada ise hemin N-terminal bölgesine, sitokrom c hem liyaz aracılığıyla kovalent bağla bağlanır. Orada konformasyonel değişikliğe uğrar. Ratlardaki sitokrom c, insanlardaki sitokrom c ile % 91 amino asitlik benzer homolojiye sahiptir. Sitokrom c ölçümü The Quantikine Rat/Fare Sitokrom c Immunassay 2.5 sa. lik katı faz solid ELISA ile yapılmaktadır. Bu faz doğal rat sitokrom c ve antikorunu içermektedir.

Yöntem:

Sitokrom c salınımı ölçümü için beyin dokusu tampon A (20 mmol/l HEPES-KOH, pH 7.5, 250 mmol/l sükröz, 10 mmol/l KCl, 1.5 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l dithiothreitol, 0.1 mmol/l fenilmetilsulfonil florid, 2 µg/ml of aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, ve 5 µg/ml pepstatin) içerisinde homojenize edildi. 800 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pellet, tampon A ile resüspanse edildikten sonra tekrar 8000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra supernatant başka bir tüpe alındı. Pellet tampon A ile yıkandıktan sonra, tampon B (10 mmol/l TrisHCl, pH 8.0, 0.5% Nonidet P-40 ve 5 mmol/l CaCl₂ içeren) içerisinde çözüldü ve mitokondriyal fraksiyon olarak kullanıldı. Supernatant ise 100000 g'de santrifüj edildi ve sonrasında supernatant sitozolik fraksiyon olarak kullanıldı (205).

Sitokrom c ölçümü hem sitozolik fraksiyonda hemde mitokondriyal fraksiyonda ticari kit (R&D Sistemleri MCTC0) kullanılarak Sitokrom c ölçümü yapıldı. Ölçüm, kantitatif sandviç enzim immunassay tekniğine dayanmaktadır. Örneklerde bulunan sitokrom c'nin özgül monoklonal antikora bağlanmasıyla bağlanan miktarı ölçülür. İmmobilize antikor ve enzim bağlı monoklonal rat sitokrom c si için spesifik antikor içeren platalere konjugat, standart, kontrol ve örneklerin pipetlenmesi, takiben yıkama aşaması, substrat solusyonu ilavesi ve mavi renk oluşumundan sonra stop solusyonu ilavesiyle sarı renge dönüşüm sonucu oluşan renk konsantrasyonuna göre ölçüm gerçekleştirilmektedir.

Sitozolik fraksiyonun mitokondriyal fraksiyona oranı mitokondriyal hasarın göstergesi olarak kullanıldı (88).

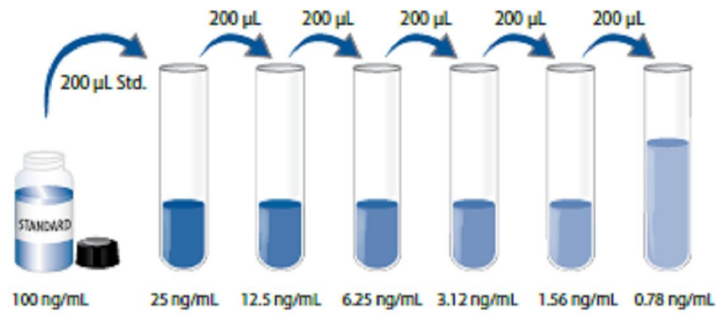
Sitokrom c ölçümü kısaca şu şekilde yapıldı:

1. Kitten çıkan *plate* de bulunan her bir kuyucuğa 75 µl konjugat solüsyonu (*Horseradish peroksidaz* bağlı rat/fare sitokrom c antikor) eklendi.
2. 50 µl standart (200 ng rat/fare sitokrom c), kontrol, numune *plate* pipetlenip karıştırıldı. 2 saat oda ısında bekletildi.
3. 400 µl yıkama solüsyonu ile her bir kuyucuk 5 kez yıkandı.

4. 100µl substrat (H₂O₂ ve Tetrametilbenzidin) eklenip 30 dakika oda ısısında ve ışıktan korunarak bekletildi.

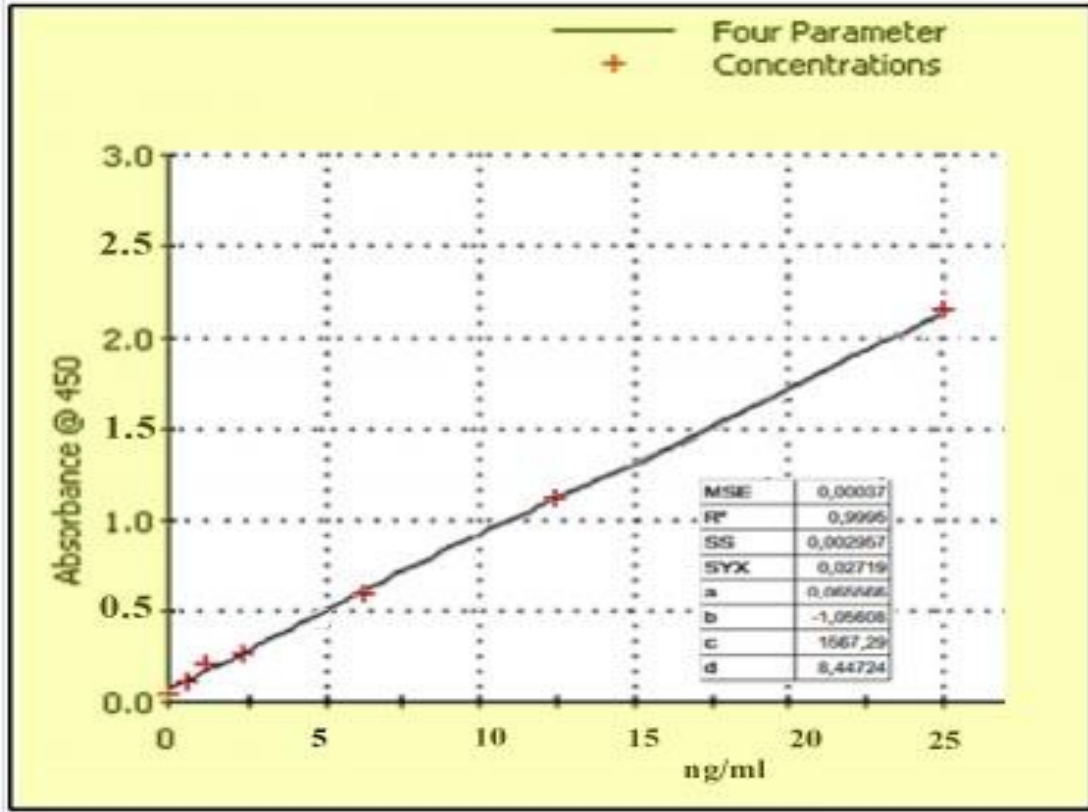
5. 100 µl stop solüsyonu (Hidroklorik asit) eklenip 30 dakika içinde 450nm’de elisa okuyucu (Victor) ile absorbanslar okutuldu.

Kitin içerisindeki standart ile seri dilüsyon yapıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Standart ile hazırlanan seri dilüsyonlar

Standartların absorbans değerleri ölçüldü ve standart grafiği yardımıyla sonuçlar ng/ml olarak hesaplandı (Şekil 3.7). Sitolik fraksiyonun sonuçları mitokondriyal fraksiyona oranlandı.



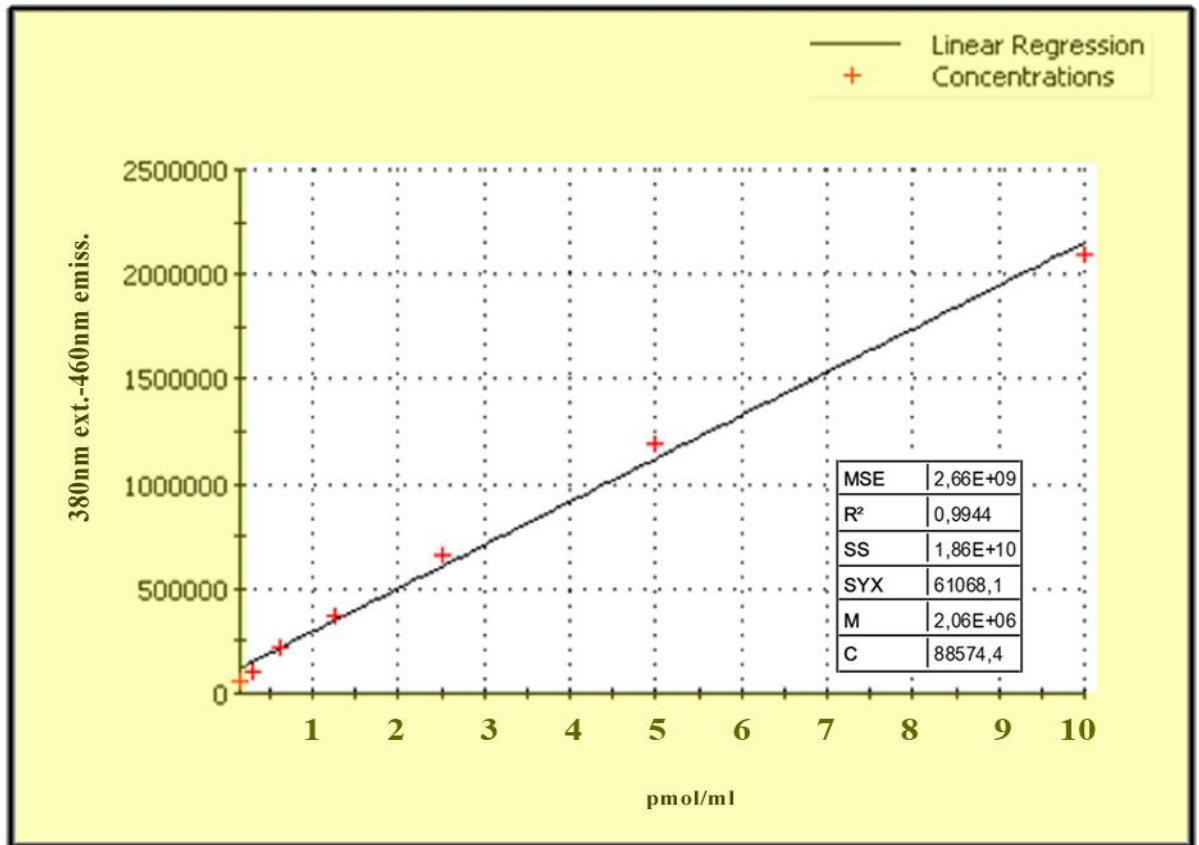
Şekil 3.7: Sitokrom c ölçümü standart grafiği(Grafik VICTORTM X3, PerkinElmer Inc., USA, Plate okuyucuda, WorkOut 2.5, DAZAQ LTD, programında çizilmiştir)

3.3.3. Kalpain Aktivasyonu Ölçümü

Kalsiyum içeren ve içermeyen iki farklı tampondaki ölçüm sonuçlarının farkı kalpain aktivitesi sonucu olarak kullanıldı. 63.2 mM imidazol-HCl içeren 10 mM of 2-merkaptanoethanol (pH 7.3) ölçüm tamponu olarak kullanıldı. Ölçüm tamponuna 20mM Etilenbis (oksonitrilo) tetra-asetat (EGTA) ve 25 mM Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ekleyerek pH'ı 7.3 olan “kalsiyumsuz tampon” olarak isimlendirildi. Ölçüm tamponuna 1.25 mM CaCl₂ (pH 7.3) eklenerek “kalsiyumlu tampon” elde edildi. Dokular “5 ml/g doku” oranında kalsiyumsuz tampona koyularak homojenize edildi. Daha sonra (14000 g, 4°C, 30 dakika) santrifüj edildi. Ölçüm supernatantın kalsiyumsuz tamponda 5 kez dilüsyonundan sonra yapıldı.

500 µl supernatant içeren 4 tüpün ilk ikisine 1.5 ml kalsiyumsuz tampon eklendi. Diğer ikisine 1.5 ml kalsiyumlu tampon eklendi. 37°C’de 10 dakikalık preinkübasyondan sonra 10 µl substrat N-süksinil-Leu-Tyr-7-amino-4-metil kumarin (10 mM DMSO içinde) eklendi.

30 dakikalık inkübasyondan sonra bütün tüpler fluometrede 380 eksitasyon ve 460 nm emisyonunda okundu. Kalpain aktivitesi kalsiyum bağımlı flurosans ve kalsiyum bağımlı olmayan flurosansın farkı olarak tespit edildi. A 7-amino-4-metil kumarin (AMC) ile standart grafiği çizildi (Şekil 3.8). Kalpain aktivitesi doku proteini ve dakikaya göre AMC salınımı olarak ifade edildi (146).

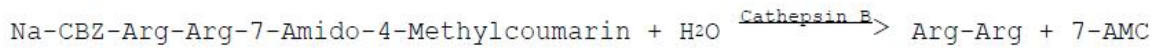


Şekil 3.8: Kalpain aktivitesi standart grafiği(Grafik VICTORTM X3, PerkinElmer Inc., USA, Plate okuyucuda, WorkOut 2.5, DAZAQ LTD, programında çizilmiştir)

3.3.4. Katepsin B ve Katepsin L Seviyelerinin Tayini

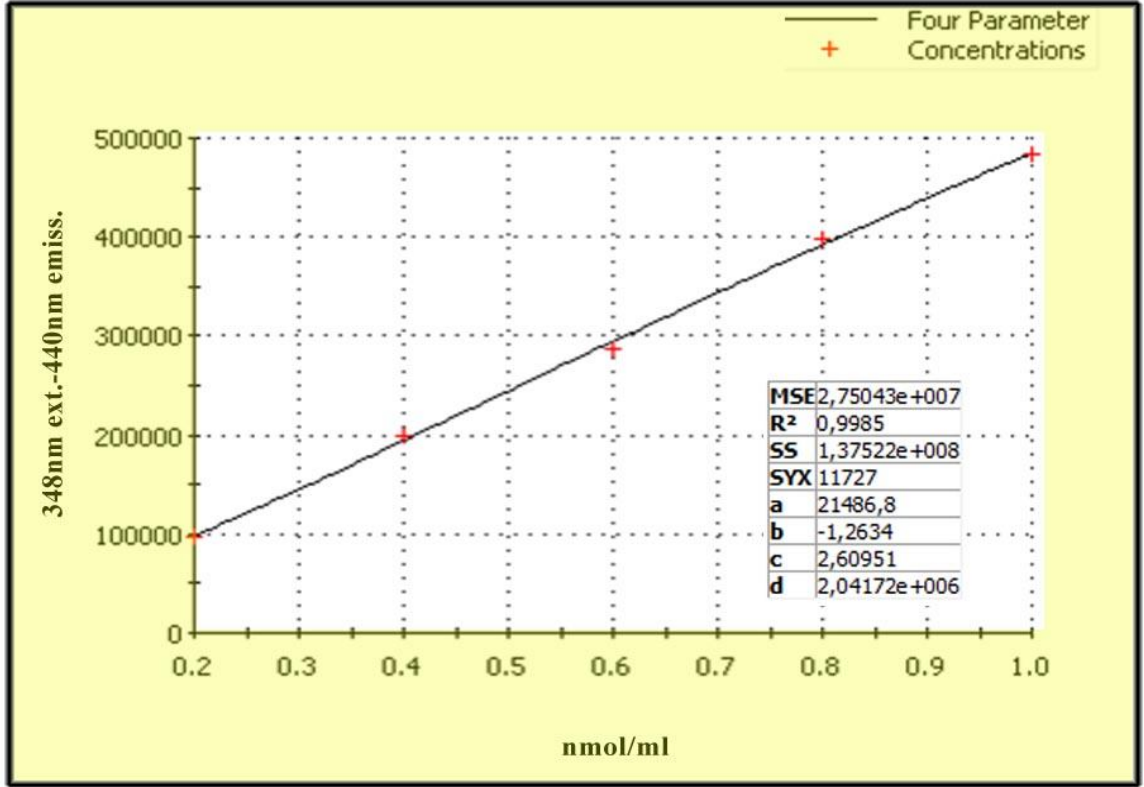
Lizozomlardan sitoplazmaya geçen ve bütünlüğü bozulmamış lizozomlarda kalan katepsinlerin tespit edilmesi hücre hasarı hakkında bilgi verebilmektedir. Süpernatanttan sitozolik fraksiyonun elde edilmesi için sukroz Tris-HCL tamponunda (0.32 M sukroz, 0.05 M Tris-HCl tamponu, pH 7.4) homojenizatör kullanılarak beyin dokusu homojenatı hazırlandı. Daha sonra homojenatlar +4 °C'de 5 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edildi. Pelletler ayrıldıktan sonra süpernatantlar +4 °C'de 20 dakika boyunca 10000 g'de santrifüj edildi. Süpernatantlar sitozolik fraksiyon olarak kullanıldı. Pellet ise 1 ml Triton X 100 içeren tampon ile resüspanse edilerek lizozomal fraksiyon olarak kullanıldı (104). Sitozolik ve lizozomal fraksiyonlarda ayrı ayrı ölçülen katepsin aktivitelerinin birbirine oranı lizozomal hasarın miktarını göstermektedir.

Katepsin B (E.C.3.4.22.1) ve L (E.C.3.4.22.15) enzim aktivitesi Kirschke ve arkadaşlarının modifiye ettikleri yöntemle göre çalışıldı. Enzim aktivitesi metilkumarilamid substratı kullanılarak ölçüldü. 0.75 ml. Madde B (8.0 mM L-sistein) 0.90 ml. Madde C (% 0.1 (v/v) Brij 35 çözeltisi), 0.10 ml. homojenat karıştırıldı. Üzerine 0.75 ml madde D (0.02 mM Z-Arg-Arg-7-Amido-4-Metilkumarin ve 0.02 mM Z-Phe-Arg-7-Amido-4-Metilkumarin) konulduktan sonra oluşan floresans 348 nm eksitasyon ve 440 nm emisyonunda ölçüldü (18).



AMC'nin seri dilüsyonu ile standart grafiği çizildi ve sonuçlar nmol/ml olarak hesaplandı (Şekil 3.9)

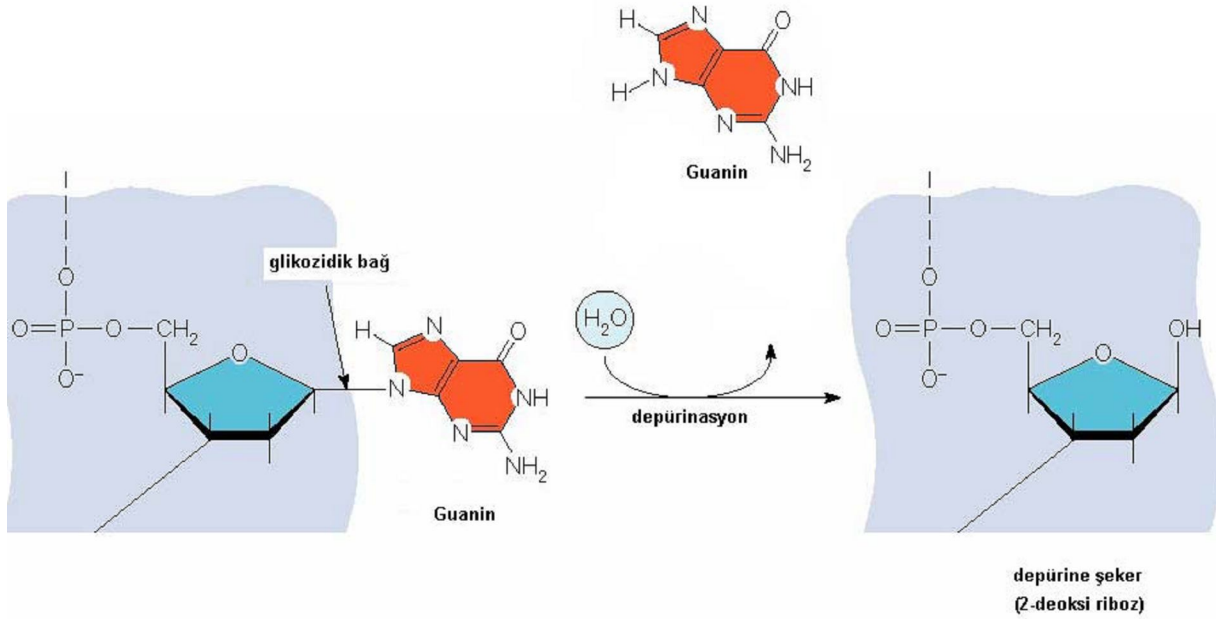
Sitozolik fraksiyonunun sonuçları lizozomal fraksiyona oranlandı.



Şekil 3.9: Katepsin aktivitesi standart grafiği (Grafik VICTORTM X3, PerkinElmer Inc., USA, Plate okuyucuda, WorkOut 2.5, DAZAQ LTD, programında çizilmiştir)

3.3.5. DNA Fragmantasyonu

DNA fragmantasyonu ölçümünde spektrofotometrik bir ölçüm metodu olan difenilamin reaksiyonu kullanılmıştır. Bu ölçüm temel olarak DNA'nın hidrolizi esasına dayanır (Şekil 3.10). Serbest 2-deoksi-riboz molekülleri bu şartlarda dehidrasyona uğrayarak ω -hidroksilevulinil aldehit'e dönüşür. Oluşan ω -hidroksi-levulinil aldehit ise reaksiyon ortamına ilave edilen "difenilamin" ile reaksiyona girdiğinde; mavi renkli bileşikler oluşturur (36).



Şekil 3.10: DNA'nın hidrolizi ve 2-deoksi-riboz şekeri oluşumu (92).

DNA fragmentasyonu elde edilmesi için beyin dokusu homojenatı homojenat tamponunda (20 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl buffer, % 0,5'lik Triton X-100 içeren pH 8.0) homojenizatör kullanılarak hazırlandı. Daha sonra 1 ml homojenat alınarak +4 °C'de 25 dakika boyunca 26000 g'de sanrifüj edildi. Süpernatantlar fragmente olmuş DNA, pelletler sağlam DNA içeren kısımlardı. Süpernatantın ve pelletin DNA içerikleri difenilamin reaksiyonu kullanılarak ölçüldü.

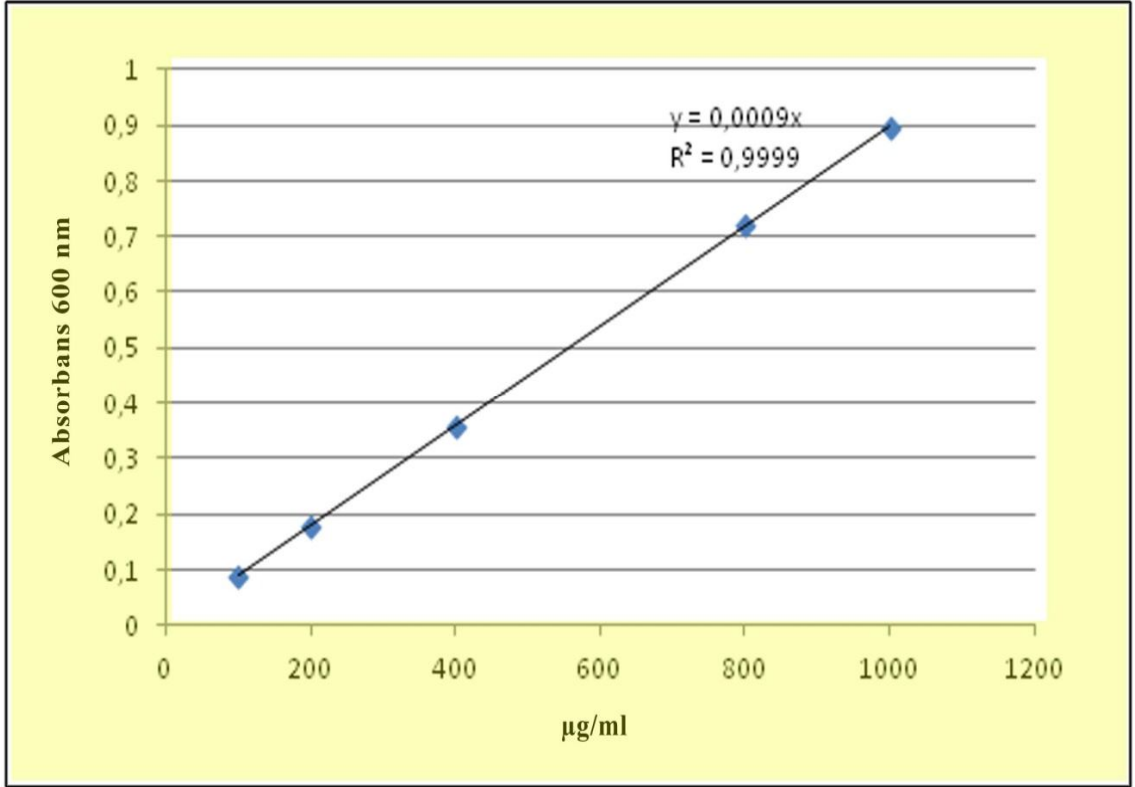
Çözeltiler:

1. 0,5 N Perklorik asit: 43 ml % 70'lik perklorik asit alındı ve distile su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.
2. Solüsyon A: 1,5 gram difenilamin, 100 ml saf glasiyel asetik asitte çözüldü. Üzerine 1,5 ml %98'lik sülfürik asit eklendi. Bu solüsyon karanlıkta saklandı.
3. Solüsyon B: 50 ml deiyonize su 1 ml asetaldehit karıştırılarak hazırlandı. Bu solüsyon taze kullanıldı.

Ölçüm: Pelletler 0,5 N perklorid asit ile resüspanse edildi. Süpernatantların üzerine 0,5 N konsantrasyonda olacak şekilde perklorik asit eklendi. Numuneler (pellet ve süpernatantlar) 90 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra 1500 g'de 10 dakika santrifüj edildi (11). 1 ml DNA örneği, 1 ml Solüsyon A (1,5 gram difenilamin 100 ml glusiyel asetik asitte çözdürülerek üzerine 1,5 ml sülfürik asit eklendi), 5 µl Solüsyon B (50 ml distile su, 1 ml asetaldehitte karıştırılır) karıştırıldı. 20 saat oda ısısında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbansları 600 nm'de köre karşı okundu.

Sonucun Hesaplanması: Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için DNA standardı (calf thymus) 100, 200, 400, 800 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlandı. Standartların 600 nm de spektrofotometrik ölçümü sonucu elde edilen absorbanslarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programında grafiğe geçirildi (Şekil 3.11). Örneklerin konsantrasyonları grafikten elde edilen doğrunun denklemi kullanılarak hesaplandı. DNA fragmentasyon sonuçları % olarak, aşağıda verilen formüle göre hesaplandı (182, 189). Sonuçlar yüzde süpernatant/pellet olarak verildi (11,36,82,92,170).

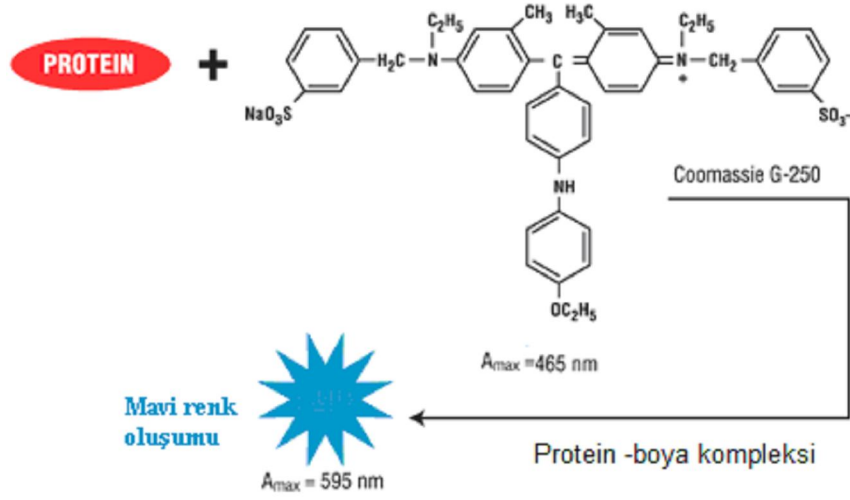
$$\text{DNA Fragmentasyonu (\%)} = \frac{\text{Süpernatant}}{\text{Pellet}} \times 100$$



Şekil 3.11: DNA fragmantasyonu standart grafiği (Microsoft Office Excel 2007 programında grafik çizilmiştir.)

3.3.6. Protein ölçümü

Bradford metodu herhangi bir örnek içerisindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde boya olarak, proteinlerdeki pozitif yüke bağlanan negatif yüklü Commassie Brilliant Blue G-250 kullanılmaktadır. Asidik çözeltilerde bu boyanın proteinlere bağlanması, boyanın maksimum absorpsiyonununun 465 nm (kırmızı) den 595 nm (mavi) ye kaymasına neden olmaktadır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: Bradford reaksiyonu (148)

Beyin dokusundan elde ettiğimiz homojenatların protein miktarı Bradford yöntemi ile ölçüldü. Whatman filtreden geçirilir ve bir cam şişede, oda sıcaklığında saklanır. 495-595 nm arasında maksimum absorpsiyon değerleri elde edildi. Kullanılmadan kalan Bradford stok çözeltisi ortalama 1 yıl 4°C’de saklanabilmektedir (30).

Reaktifler:

1. Coomassie Brilliant Mavi G-250
2. Ethanol %95
3. Fosforik asit (H₃PO₄) %85

Bradford solüsyonu hazırlamak için;

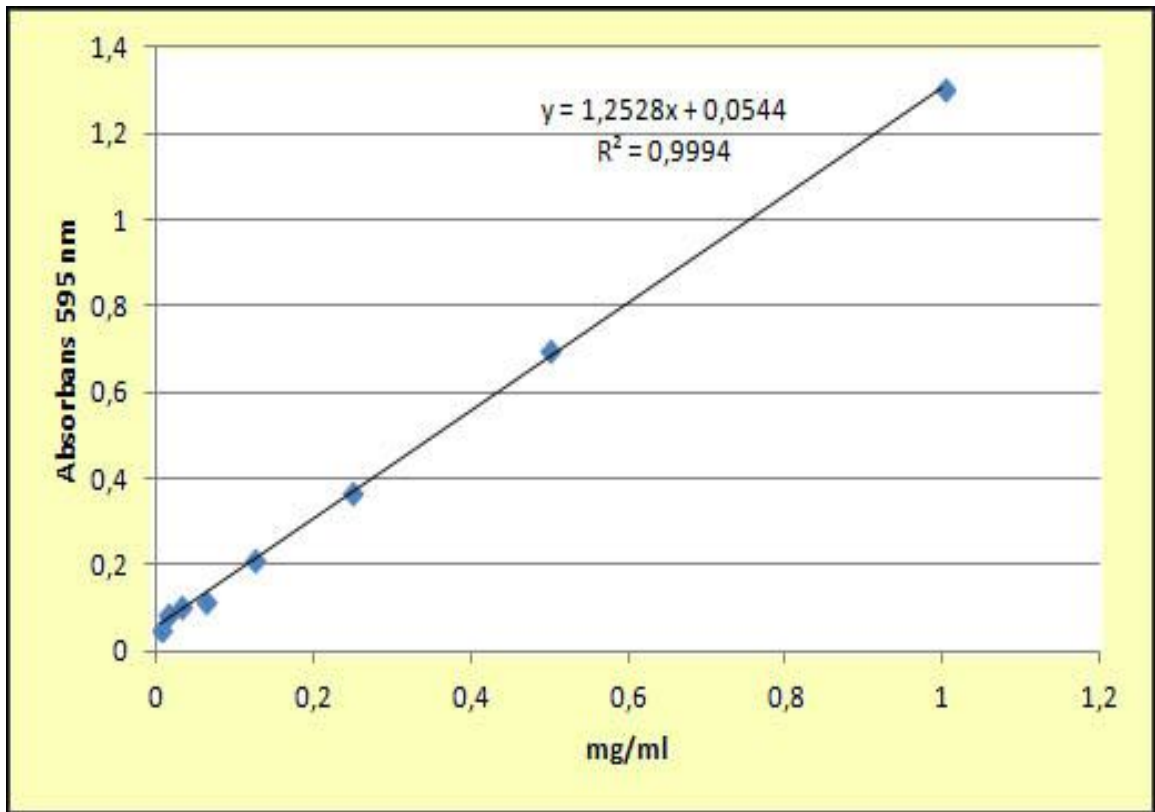
1. Basamak: 25 mg Coomassie brillant blue G-250, 12.5 ml %95 etanolde çözdürüldü.
2. Basamak: Üzerine 25 ml %85 fosforik asit (H₃PO₄) eklendi.
3. Basamak: Bu çözeltisi distile su ile 250 ml’ye tamamlandı.

Bu solüsyon derişik stok solüsyondur. Işıktan korunarak oda ısısında saklanabilir. Kullanımdan önce whatman filtre kağıdı ile süzüldü ve 5 kez sulandırılarak kullanıldı.

Ölçüm:

100 µl örnek 5 ml solüsyon ile karıştırıldı, vortekslendi. 5 dakika oda ısısında bekledikten sonra 595 nm spektrofotometrede ölçüldü.

Albumin ile seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlandı. Protein sonuçları mg/ml olarak ifade edildi. Standartların sonuçları elde edilen absorbanlarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programında grafiğe geçirildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: Doku protein ölçümü için albumin ile yapılan standart grafiği (Microsoft Office Excel 2007 programında grafik çizilmiştir.)

3.4. Histolojik Teknikler

Deney grubumuzdaki tüm yavru ratlar ketamin ksilazin ile 1,32 mg/kg 3:1 oranında intraperitoneal anestezi madde verilerek uyutuldu. Ratların beyin örnekleri, ışık mikroskopik düzeyde histolojik incelemelerinin yapılabilmesi için %10'luk formalin fiksatifine alınarak 1 hafta süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'er dakika ksilolde bekletildi. Beyin örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutulmuş, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikro metre kalınlığında doku kesitleri alındı. Bu kesitlerden bir kısmı Hematoksilen-Eosin boyama işlemi için, bir kısmı ise immünohistokimyasal değerlendirme amacıyla apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla TUNEL yöntemi uygulanması amacıyla ayrıldı. Hematoksilen-Eosin boyama için kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lam üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'er dakika tutularak şeffaflandırıldı. Şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapıldı ve beyin

örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi. Bulguların değerlendirilmesinde korteks dokusundaki hasar; hemoraji, konjesyon, ödem, PMNL (Polimorf nüveli lökosit) infiltrasyonu, mikroglia-makrofaj-MNL infiltrasyonu, nöronlardaki nekroz ve kromatolizis açısından değerlendirildi. Gruplara göre elde edilen bulguların medyan ve 25.-75. Persantilleri hesaplanmıştır (176).

Skorlamada; beyin korteks bölgesindeki doku hasarının semikantitatif olarak skorlaması yapıldı.

Hasarın şiddeti skorlamada

0: Hasar yok 2: Orta hasar

1: Az hasar 3: Çok hasar olarak değerlendirildi.

Hematoksilen ve Eosin boyama

Her bir yavru rattan bütün beyin alındıktan sonra immersiyon fiksasyonu yapıldı (1-2 gün +4 °C). Beynin o kısmı parafine gömüldü. Daha sonra 4-7 µm'lik doku kesitleri oluşturulacak ve bunlar slaytların üzerine yerleştirilip boyandı.

3.4.1. Tunel Yöntemi Analizi

Apoptoz rutin histolojik teknikler ile gösterilebilir. Ancak apoptozu tespit etmek için daha hassas yöntemler bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerin en erken evrelerde görülebilmesi için bu yöntemlerin başında TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labeling) yöntemi gelmektedir. Apoptotik sinyaller, DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçalarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığıyla digoxigenin işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra digoxigenin

işaretlenmiş yeni nükleotidler anti-digoxigenin konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile zıt boyama yapılarak işlem sonlandırılır. Araştırmamızda TUNEL aktivitesi deney ve kontrol gruplarına ait 4µm kalınlığındaki parafin kesitlerde çalışılmıştır (126,176).

Tablo 3.1: TUNEL yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri

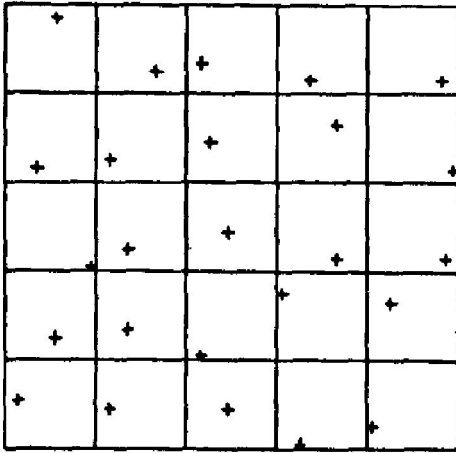
Kimyasal madde	Uygulama süresi (dk)
Ksilol I	5
Ksilol II	5
Ksilol III	5
%100 Alkol I	3
%100 Alkol II	3
%95 Alkol	3
%70 Alkol	3
Fosfat buffer solüsyonu (PBS)	5
Proteinaz K solüsyonu	15
Distile su I	2
Distile su II	2
% 3'lük hidrojen peroksit	5
PBS	5-10 dk çalkala
Eguilibration buffer	5
TdT enzimi 37°C'de nemli ortamda	60
Working Stop/ Wash buffer I	1/5 çalkala

Working Stop/ Wash buffer II	10
PBS I	1
PBS II	1
PBS III	1
<hr/>	
Anti- digoxigenin peroksidaz damlatılır üzerlerine plastik coverslip ile kapatılır nemli ortamda	30
PBS I	2
PBS II	2
PBS III	2
PBS IV	2
DAB solüsyonu	10
Distile su I	1
Distile su II	1
Distile su III	5
Metil green	15
Distile su I	1/10
Distile su II	1/10
Distile su III	1/10
Butanol	1/10
Ksilol I	2
Ksilol II	2
Ksilol III	5
Lamların Kapatılması	

3.4.2. Morfometrik Değerlendirme

Ratlardan elde edilen beyin dokuları %10'luk nötral formalinde fikse edildi, dereceli olarak artan alkol serilerinde dehidre edildikten sonra, ksilolde şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. 4 µm kalınlığındaki kesitler poly-L-lysine-kaplı lamlara alınıp, hematoksilen ve eosin ile boyandı. Çizim tüpü ataçmanlı stereo ışık mikroskopunda; sistematik rastgele örnekleme yöntemiyle, kortekste yer alan birkaç yüz adet nekrotik hücrelerin birim hacimdeki korteksi işgal etme yüzdesi (volume fraction) (Vv); nokta sayım yöntemi ile saptandı (225).

Her rat için iki ayrı kesitte sayım yapıldı.



Şekil 3.14: Nokta sayım yapılan alan

3.5. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda istatistiksel analizler, Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. İstatistiksel analizde SPSS 15.0 Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ve Sigmastat

3.5 (*Statcon INC.,B. Schäfer, Witzhausen GERMANY*) istatistiksel paket programları kullanılmıştır.

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ve veriler yüzdeler, medyan (25.-75. persantil) olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek amacıyla Kruskal-Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi testi ve Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılmıştır. Sıfır Hipotezinin reddi için $p < 0.05$ değeri yeterli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Ölçümler

4.1.1. Kaspaz-3 Aktivitesi

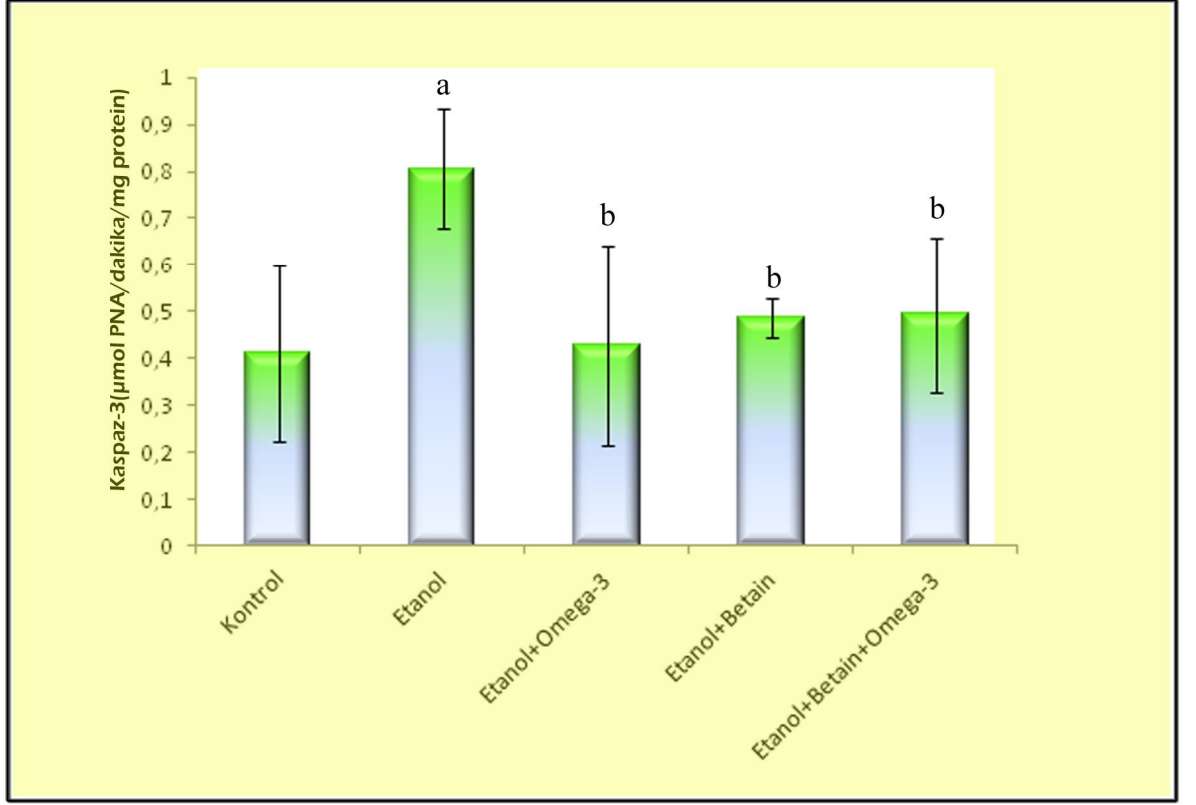
Çalışmamızda, etanolle beslenen gebe ratların yavrularının beyninin korteks bölgesinde meydana gelen kaspaz-3 aktivitesi etanol grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0,001$). Yine tedavi grupları etanol+omega-3, etanol+betain, etanol+omega-3+betain grupları etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ($p<0,001$).

Tablo 4.1: Kaspaz-3 aktivite sonuçları

Deney Grupları	N	Kaspaz-3 ($\mu\text{mol PNA/dakika/mg protein}$)
Kontrol	8	0,41 \pm 0,19
Etanol	8	0,81 \pm 0,13 ^a
Etanol+Omega-3	8	0,43 \pm 0,21 ^b
Etanol+Betain	8	0,49 \pm 0,04 ^b
Etanol+Betain+Omega-3	8	0,49 \pm 0,17 ^b

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$

b: Etanol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$



Şekil 4.1: Beyin dokusunda kaspaz-3 aktivitesi düzeyleri (µmol PNA/dakika/mg protein)

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$

b: Etanol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$

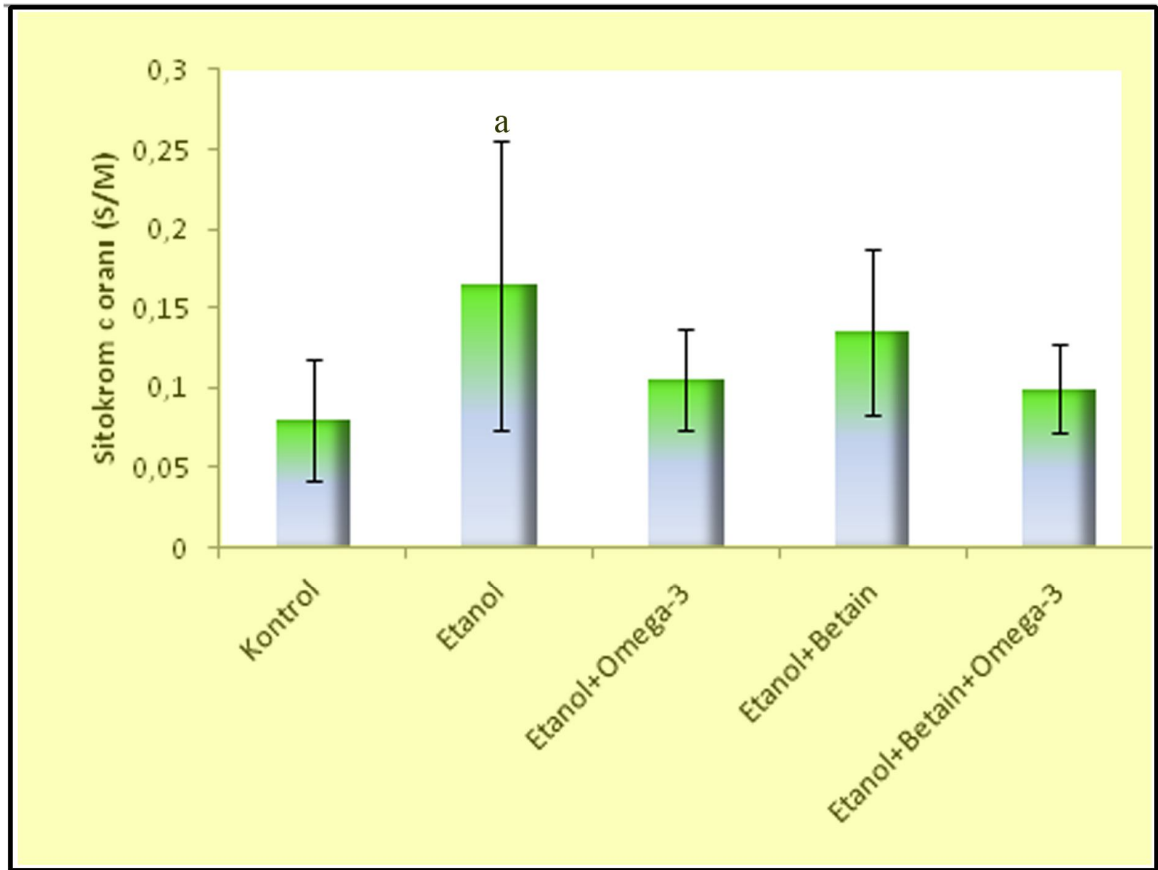
4.1.2. Sitokrom c Düzeyleri

Çalışmamızda, etanolle beslenen gebe ratların yavrularının beyнинin korteks bölgesinde meydana gelen sitokrom c düzeyi etanol grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0,025$).

Tablo 4.2: Sitokrom c sitozolik/mitokondriyal (S/M) fraksiyon oranı sonuçları

Deney Grupları	N	Sitokrom c (S/M) fraksiyon oranı
Kontrol	8	0,08±0,04
Etanol	8	0,17±0,09 ^a
Etanol+Omega-3	8	0,11±0,03
Etanol+Betain	8	0,14±0,05
Etanol+Betain+Omega-3	8	0,10±0,03

a: kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05



Şekil 4.2: Beyin dokusunda sitokrom c (S/M) oranı

a: kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

4.1.3. Kalpain Aktivitesi

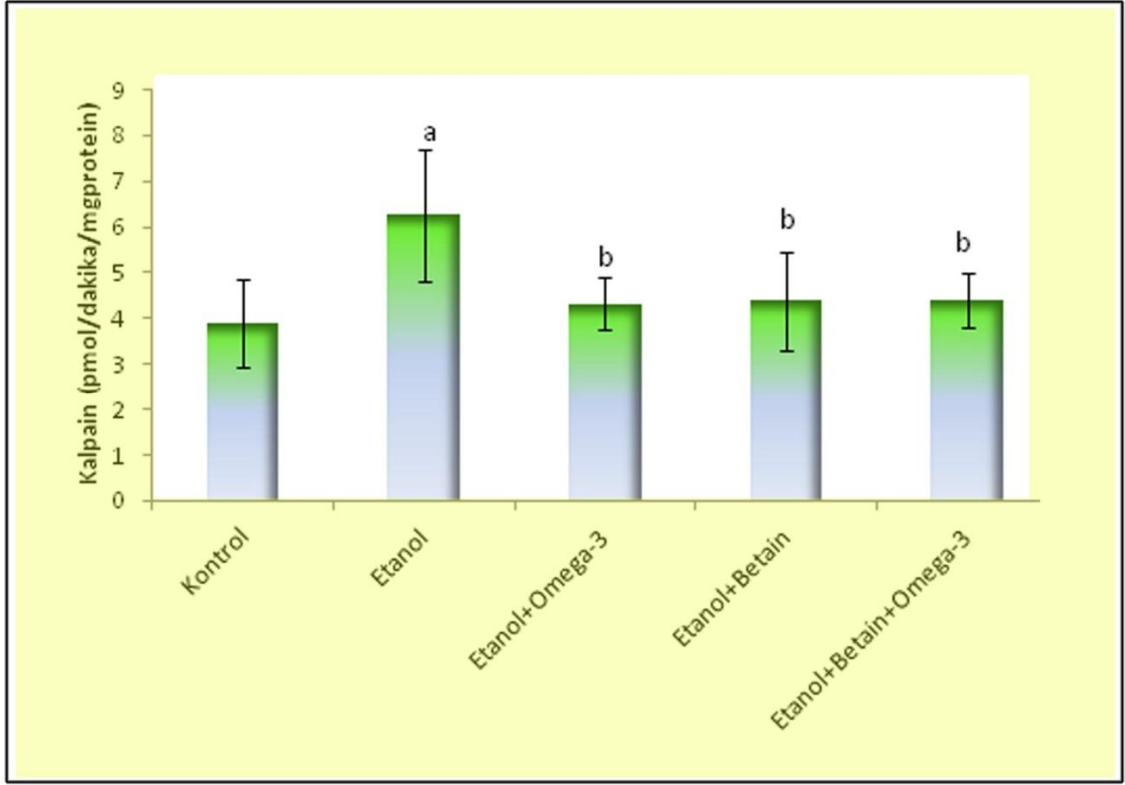
Çalışmada kalsiyumlu ve kalsiyumsuz iki farklı tampon kullanarak iki farklı ortamda kalsiyum bağımlı ve kalsiyum bağımsız aktiviteler ölçüldü. Kalsiyum bağımlı aktiviteden kalsiyum bağımsız aktivite çıkarılarak kalpain aktivitesi belirlendi. Çalışmada, etanolla beslenen gebe ratların yavrularının serebral korteks bölgesinde meydana gelen kalpain düzeyleri etanol grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0,001$). Yine tedavi grupları etanol+omega-3, etanol+betain, etanol+omega-3+betain grupları etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ($p<0,001$).

Tablo 4.3: Kalpain aktivitesi sonuçları

Deney Grupları	N	Kalpain (pmol/dakika/mg protein)
Kontrol	8	3,91±0,96
Etanol	8	6,26 ±1,43 ^a
Etanol+Omega-3	8	4,33 ±0,57 ^b
Etanol+Betain	8	4,39 ±1,07 ^b
Etanol+Betain+Omega-3	8	4,40 ±0,58 ^b

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$

b: Etanol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$



Şekil 4.3: Beyin dokusunda kalpain düzeyleri (pmol/dakika/mg protein)

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$

b: Etanol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$

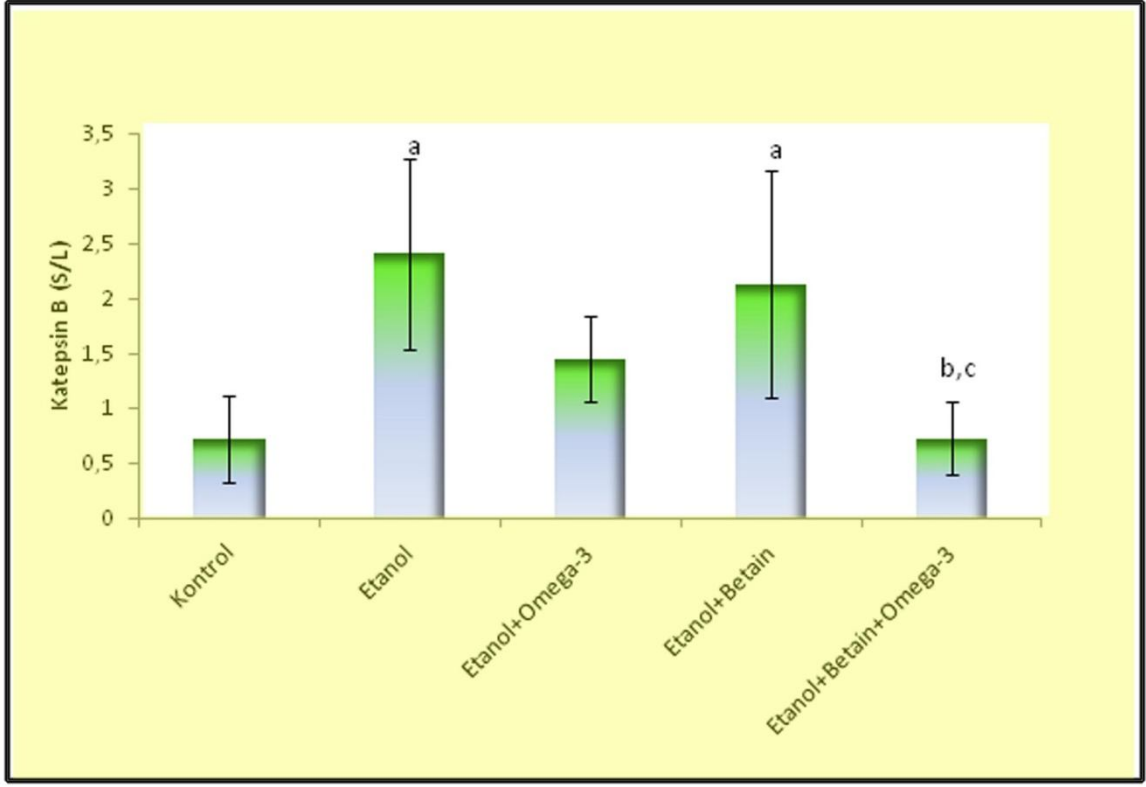
4.1.4. Katepsin B Düzeyleri

Çalışmada, etanolla beslenen gebe ratların yavrularının serebral korteks bölgesinde meydana gelen katepsin B düzeyleri etanol ve etanol+betain gruplarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p < 0,001$). Etanol+omega-3+betain grubu, etanol ve etanol+betain gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür.

Tablo 4.4: Katepsin B (Sitozolik/Lizozomal) oranı sonuçları

Deney Grupları	N	Katepsin B (S/L) oranı
Kontrol	8	0,72±0,40
Etanol	8	2,41 ±0,86 ^a
Etanol+Omega-3	8	1,45±0,39
Etanol+Betain	8	2,13 ±1,04 ^a
Etanol+Betain+Omega-3	8	0,72 ±0,33 ^{b,c}

- a. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- b. Etanol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- c. Betain grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$



Şekil 4.4 : Beyin dokusundaki katepsin B (Sitozolik/Lizozomal) oranı

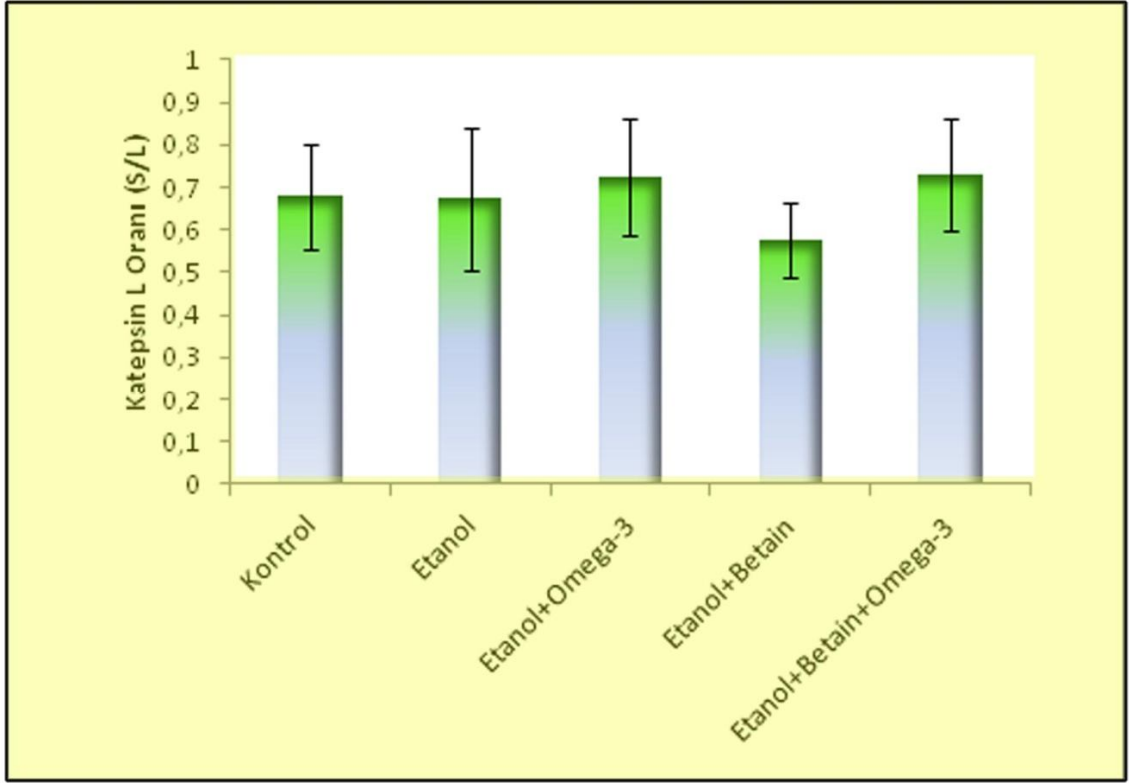
- a. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- b. Etanol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- c. Betain grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$

4.1.5. Katepsin L Düzeyleri

Lizozomal hasarın göstergelerinden olan, sitozolik fraksiyonun katepsin L aktivitesinin lizozomal fraksiyonun katepsin L aktivitesine oranında, gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

Tablo 4.5: Katepsin L (Sitozolik/Lizozomal) oranı sonuçları

Deney Grupları	N	Katepsin L (S/L) oranı
Kontrol	8	0,68±0,12
Etanol	8	0,68±0,17
Etanol+Omega-3	8	0,72±0,14
Etanol+Betain	8	0,58±0,09
Etanol+Betain+Omega-3	8	0,73±0,13



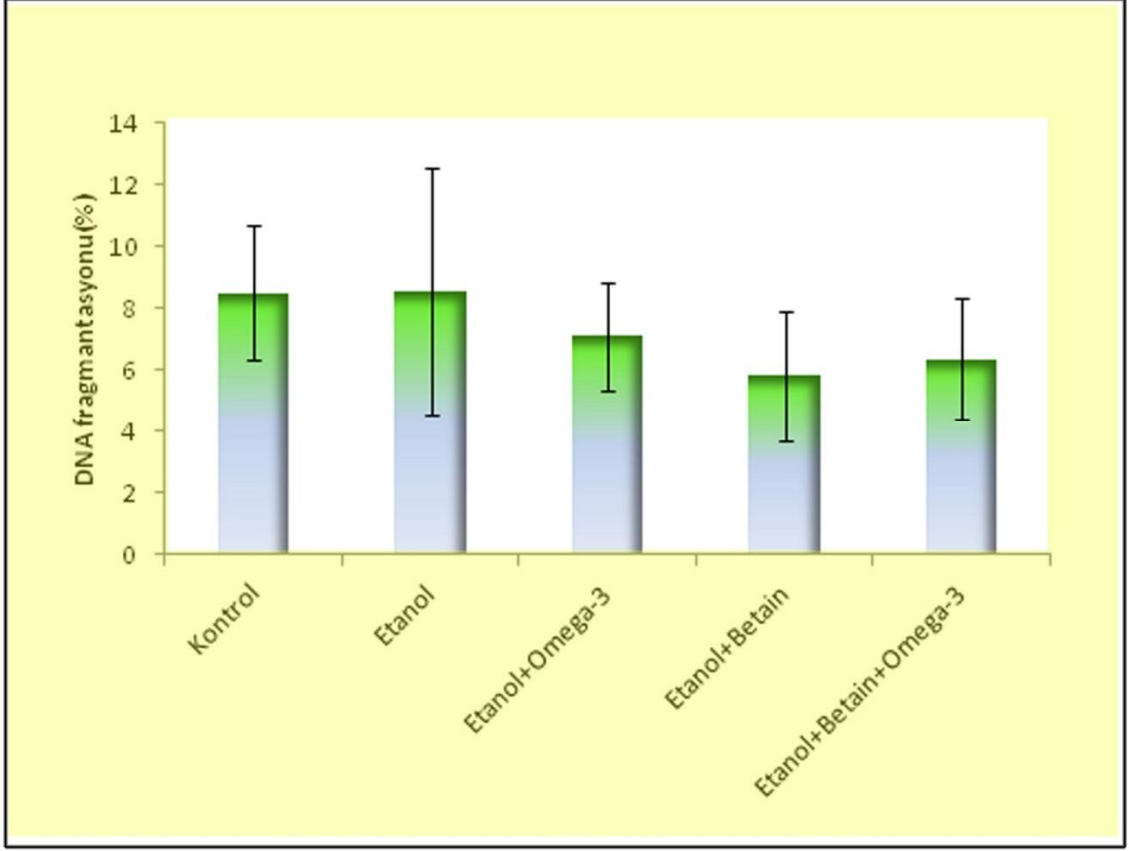
Şekil 4.5 :Beyin dokusundaki katepsin L (Sitozolik/Lizozomal) oranı

4.1.6. DNA Fragmentasyonu

DNA Fragmentasyonu açısından; gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

Tablo 4.6: DNA Fragmentasyonu Sonuçları

Deney Grupları	N	DNA fragmentasyonu % oranı
Kontrol	8	8,52±2,16
Etanol	8	8,56±4,01
Etanol+Omega-3	8	7,12±1,76
Etanol+Betain	8	5,84±2,11
Etanol+Betain+Omega-3	8	6,38±1,98



Şekil 4.6: DNA fragmentasyonu % oranı

4.2. Histolojik bulgular

4.2.1. H&E Bulguları

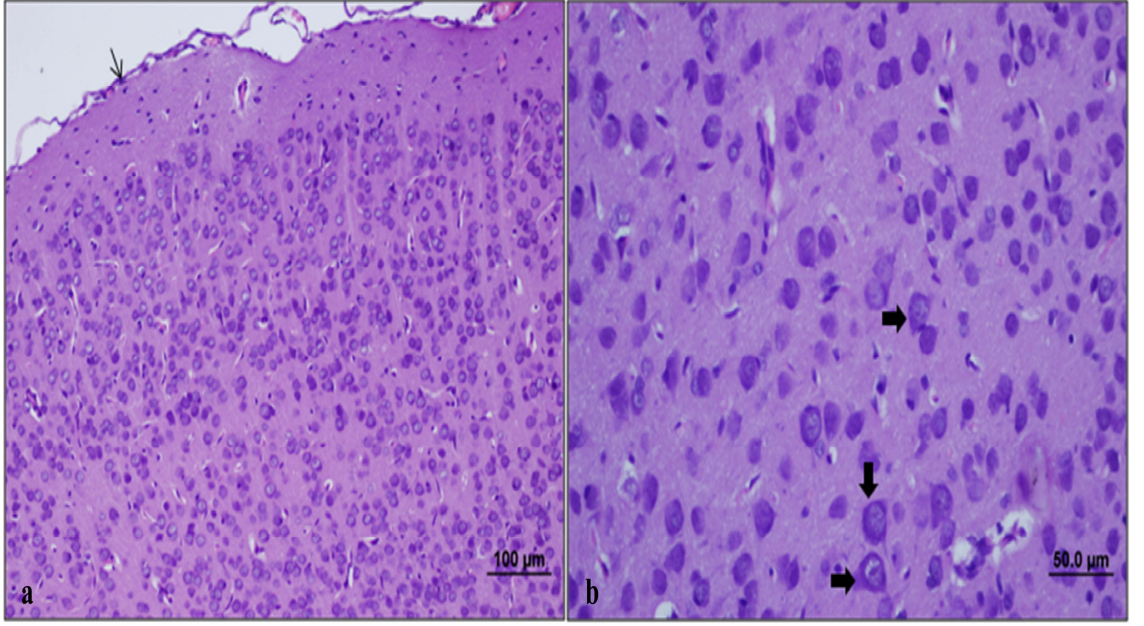
Hemotoksilen Eosin (HE) Bulgularına göre yapılan skorlamalar:

Hemotoksilen Eosin ile boyanan beyin dokusunun korteks bölgesinin genel histolojik özellikleri ve doku hasarı incelenmiştir. Gruplara göre elde edilen bulguların medyan ve 25.-75. persantilleri hesaplanmıştır.

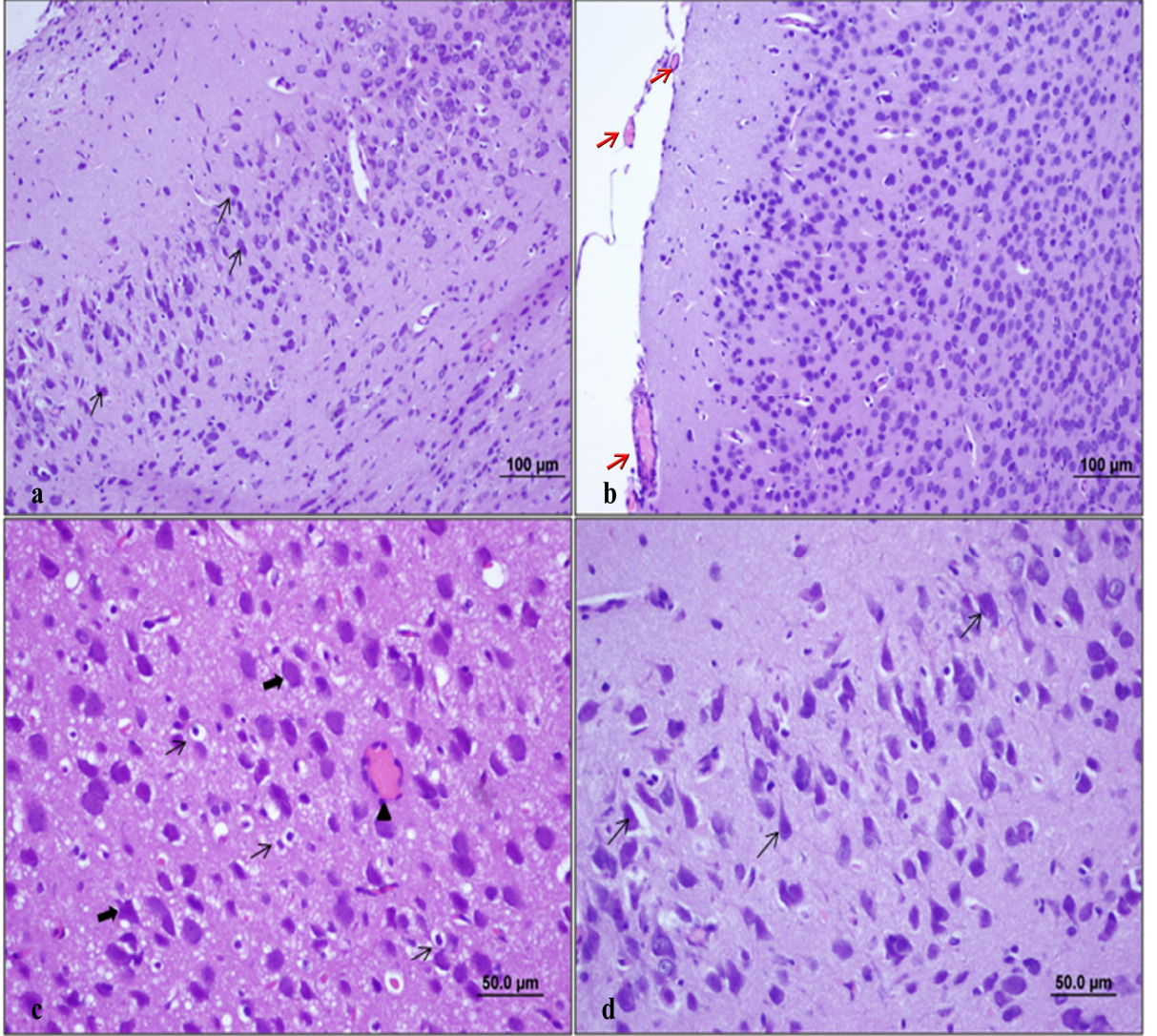
Tablo 4.7: Gruplara göre elde edilen bulguların medyan ve 25.-75. Persantilleri

	GRUPLAR (medyan ve 25.-75. Persantil)					
	Kontrol (n=5)	Etanol (n=5)	Etanol+Betain (n=5)	Etanol+Omega-3 (n=5)	Etanol+Betain+ Omega-3 (n=5)	
HEMORAJİ	0(0-0)*	2(1.75-2.25)	0(0-0)*	0(0-0)*	0(0-0)*	(P<0,001)
KONJESYON	0(0-0.25)*	3(2-3)	0(0-1)	0(0-0.25)*	1(0-1)	(P=0,005)
NEKROZ	0(0-0.25)*	3(3-3)	1(1-1.25)	0(0-1)*	1(0,750-1,250)	(P=0,004)
PMNL	0(0-0)*	1(0-1.25)	0(0-0)*	0(0-0)*	0(0-0)*	(P = 0,011)
MİKROGLİA	0(0-0)*	1(1-1.25)	0(0-0)*	0(0-0)*	0(0-0)*	(P <0,001)

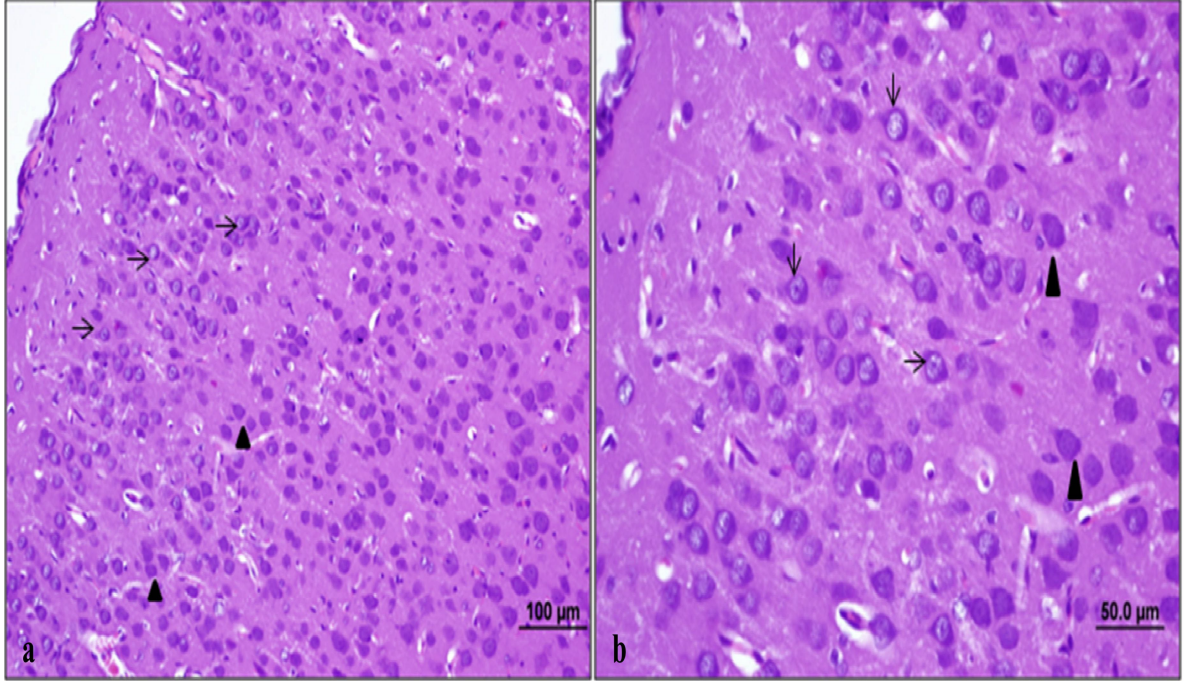
Gruplar hemoraji açısından incelendiğinde; etanol grubuna göre diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). Konjesyon açısından değerlendirildiğinde etanol grubuna göre kontrol ve etanol+omega-3 gruplarında ($p=0,005$) ve nekroz açısından ise etanol grubuna göre kontrol ve etanol+omega-3 grupları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur ($p=0,004$). PMNL açısından etanol grubuna göre diğer tüm gruplarda ($p=0,011$) ve mikroglia açısından etanol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı derecede istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur ($p<0,001$) (Şekil 4.7-4.11).



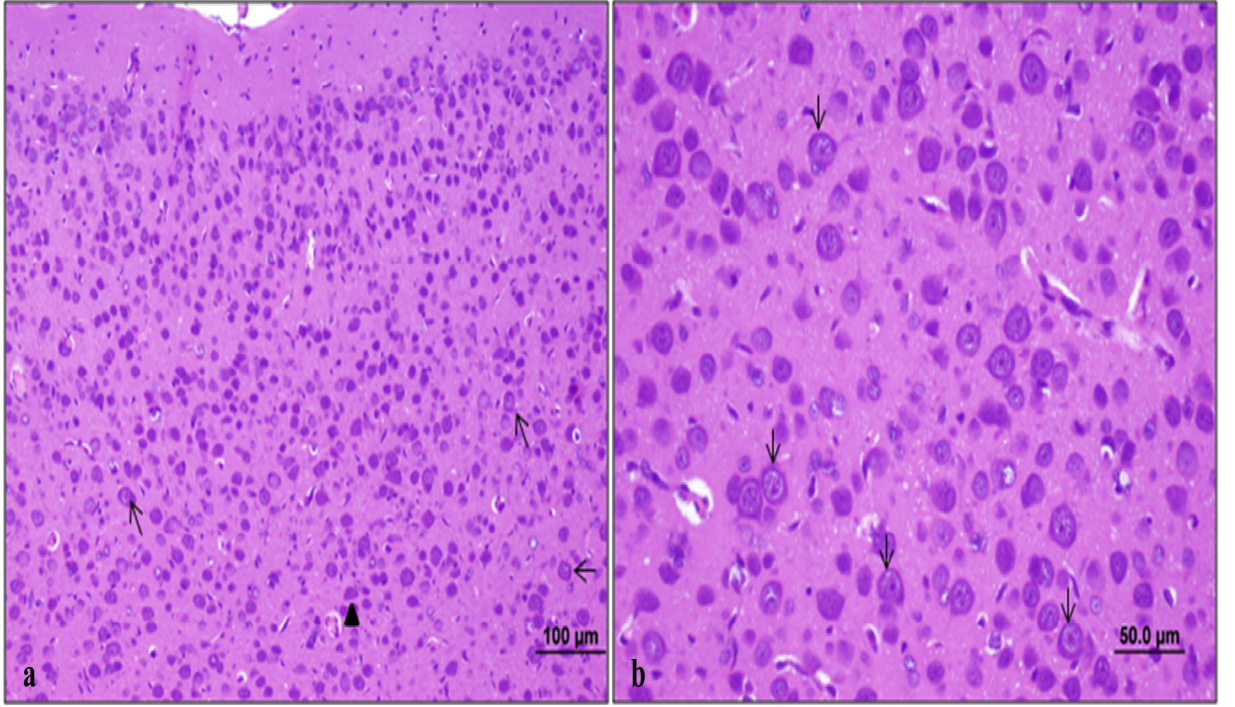
Şekil 4.7: Kontrol grubu: Kontrol grubunu oluşturan ratların beyinlerinin ışık mikroskopisi incelenmesinde normal görümlü piamater (→) ve beyin korteksinde yer alan nöronlar ve glial hücre yapısı (a) ile normal görümlü beyin korteksi ve burada yer alan ökromatik nükleuslu nöronlar (→) görülmektedir (b) (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).



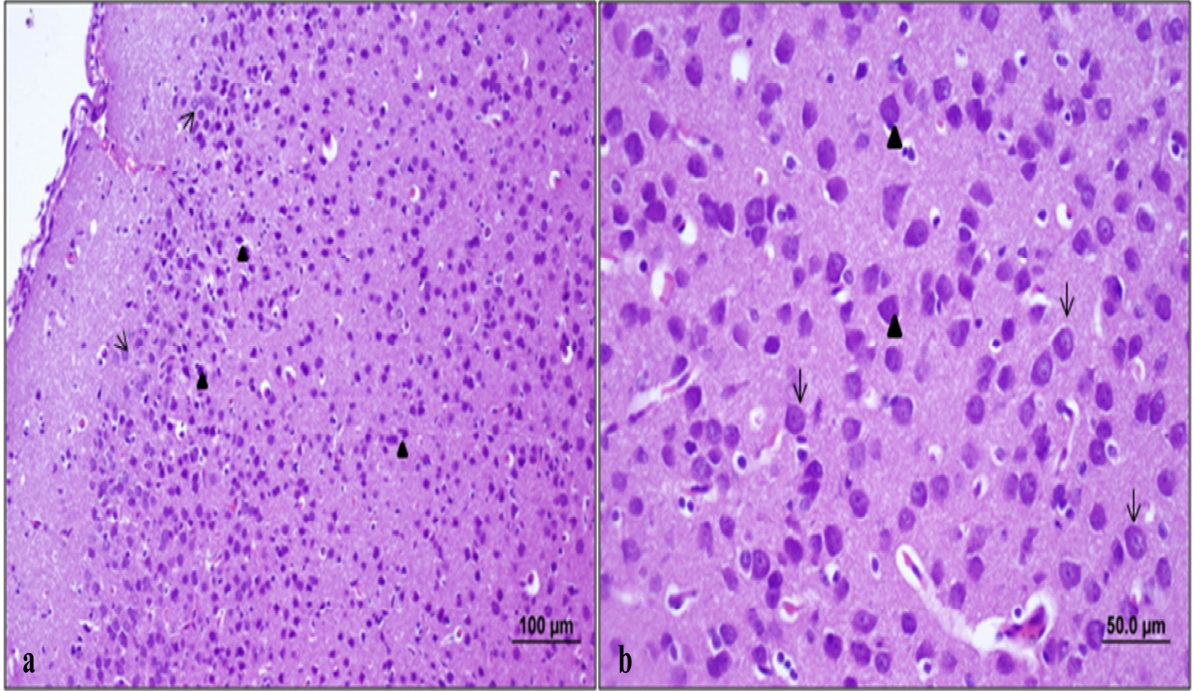
Şekil 4.8: Etanol grubu: Etanol grubunu oluşturan ratların beyin korteksinin farklı tabakalarındaki piramidal (→) ve nöroglial hücrelerde nekroz dikkat çekmekte (a) ve beyin korteksinin farklı tabakalarındaki piramidal ve nöroglial hücrelerde nekroz ile özellikle piamater tabakasındaki damarlarda kongesyon (→) dikkat çekmektedir (b) (bar: 100µm, HE). Beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde (➡) ve nöroglial hücrelerde (→) piknotik nükleus yapısı ve hücrelerin küçülerek etrafında boşluk oluşturmasıyla nekroza giden hücre yapıları dikkat çekmektedir. Ayrıca kortekste yer alan damarlarda kongesyon (▶) görülmekte (c) ve beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde piknotik nükleus ve hücrelerin küçülerek etrafında boşluk oluşturmasıyla nekroza giden hücre yapıları (→) dikkat çekmektedir (bar: 50.0µm, HE).



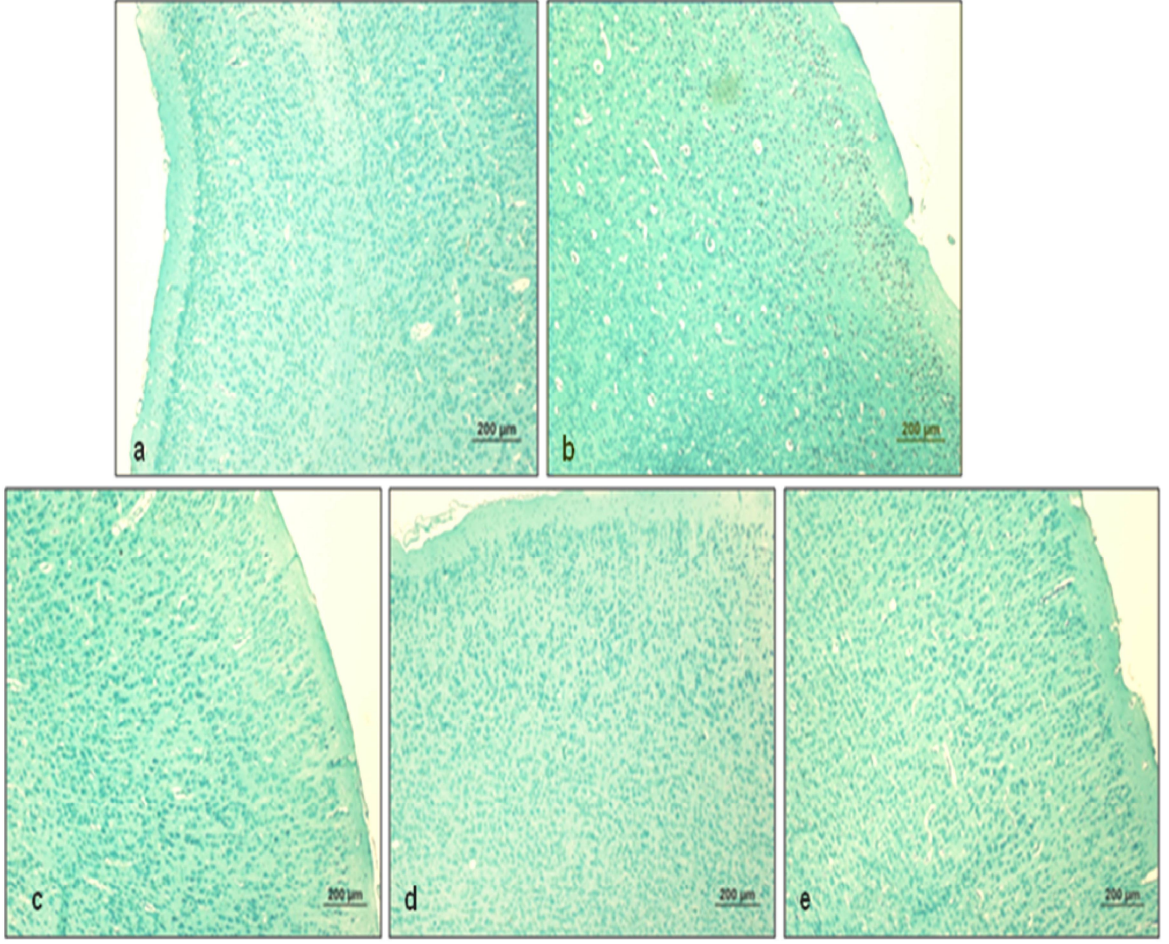
Şekil 4.9: Etanol + Betain grubu: Etanol + Betain grubu ratların beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde ve nöroglial hücrelerde azalmış hüresel hasar dikkat çekmektedir. Ancak yine de bazı hücreler ökromatik nükleusları (→) ile normal yapıda gözlenmekle beraber bazı hücrelerde nekrozun devam ettiği görülmekte (▶) (a) ve beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde ve nöroglial hücrelerde azalmış hüresel hasar dikkat çekmektedir. Ancak yine de bazı hücreler ökromatik nükleusları (→) ile normal yapıda gözlenmekle beraber bazı hücrelerde nekrozun devam ettiği görülmektedir (▶) (b). (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).



Şekil 4.10: Etanol + Omega-3 grubu: Etanol + Omega-3 grubu ratların beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde ve nöroglial hücrelerde azalmış hüresel hasar dikkat çekmektedir. Ancak yine de bazı hücreler ökromatik nükleusları (→) ile normal yapıda gözlenmekle beraber bazı hücrelerde az da olsa nekrozun devam ettiği görülmekte (►) (a) ve beyin korteksinde oldukça düzgün korunmuş ökromatik nükleuslu piramidal hücre yapıları (→) görülmektedir (►) (b). (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).



Şekil 4.11: Etanol + Betain + Omega-3 grubu: Etanol + Betain + Omega-3 grubu ratların beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde ve nöroglial hücrelerde etanol grubuna göre azalmış hüresel hasar dikkat çekmekle birlikte bazı hücrelerde nekrozun devam ettiği görülmektedir (►). Daha az sayıda olmakla birlikte ökromatik nükleusları (→) ile korunmuş hücreler de görülmekte (→) (a) ve beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde ve nöroglial hücrelerde etanol grubuna göre azalmış hüresel hasar dikkat çekmekle birlikte bazı hücrelerde nekrozun devam ettiği görülmektedir (►). Daha az sayıda olmakla birlikte ökromatik nükleusları (→) ile korunmuş hücreler de görülmektedir (→) (b) (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).



Şekil 4.12: TUNEL yöntemi uygulanmış beyin korteksinde tüm gruplar.

TUNEL negatif (-) olarak gözlenmektedir. Kontrol grubu (a), Etanol grubu (b), Etanol + Betain grubu (c), Etanol + Omega-3 grubu (d), Etanol + Betain + Omega-3 grubu (e). (bar: 200µm, TUNEL).

4.2.2. Histolojik bulguların değerlendirilmesi

Kontrol grubu: Kontrol grubunu oluşturan ratların beyinlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde gerek piamater yapısı, gerekse beyin korteksinde yer alan nöronlar ve nöroglial hücre yapıları normal histolojik yapıda gözlemlendi.

Etanol grubu: Etanol grubunu oluşturan ratların beyinlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde beyin korteksinin farklı tabakalarındaki piramidal ve nöroglial hücrelerde piknotik nükleus yapıları, belirsiz sitoplazmaları ve hücrelerin küçülerek etrafında boşluk oluşturmasıyla nekroza giden hücre yapıları dikkat çekti. Ayrıca kortekste yer alan damarlarda konjesyon görüldü.

Etanol + Betain grubu: Etanol+betain grubunu oluşturan ratların beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde ve nöroglial hücrelerde azalmış hücre hasar dikkat çekti. Ancak yine de bazı hücreler ökromatik nükleusları ile normal yapıda gözlenirken bazı hücrelerde ise nekrozun devam ettiği görüldü.

Etanol + Omega-3 grubu: Etanol + omega-3 grubunu oluşturan ratların beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde ve nöroglial hücrelerde etanol grubuna göre azalmış hücre hasar dikkat çekti. Ancak yine de bazı hücreler ökromatik nükleusları ile normal yapıda gözlenmekle beraber bazı hücrelerde az da olsa nekrozun devam ettiği görüldü. Ayrıca piamaterde ve burada yer alan damarlarda korunmuş yapı görüldü. Bu gruptaki beyin örnekleri etanol+betain grubu ve etanol+betain+omega-3 verilmiş gruplar karşılaştırıldığında hücrelerin daha iyi korunmuş olduğu dikkat çekti.

Etanol + Betain + Omega-3 grubu: Etanol+betain+omega-3 grubunu oluşturan ratların beyin korteksinde yer alan piramidal hücrelerde ve nöroglial hücrelerde etanol grubuna göre azalmış hücre hasar dikkat çekti. Ancak yine de bazı hücrelerde nekrozun devam ettiği görüldü. Daha az sayıda olmakla birlikte ökromatik nükleusları ile korunmuş hücreler de görüldü.

TUNEL yöntemi uygulanmış beyin örneklerinde ise tüm gruplarda TUNEL negatif (-) boyanma gözlemlendi. Burada beyin örneklerinde boyanmanın olmamasının hücrelerin piknotik nükleuslu belirsiz ve eozinofilik sitoplazmalı görünümüleriyle nekroza gittikleri ancak bir önceki aşama olan hücre ölümünün yani apoptotik hücrelerin bu deneyde kullanılan yüksek doz ve uzun süre neticesinde nekroza yönelmesi sebebiyle olabileceği düşünülmektedir.

4.3. Morfometrik Bulgular

Birim hacimde bulunan nekrotik hücre sayısı ($/\text{mm}^3$) incelendiğinde etanol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubu ve etanol+omega-3 grubu anlamlı derecede istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur ($p=0,002$).

Etanol+betain ve etanol+betain+omega-3 gruplarında etanol grubuna göre istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmamıştır. (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Beyin korteksi morfometrik bulguları

Deney grupları	N	Nekrotik hücre sayısı ($/\text{mm}^3$) Median (%25-%75)
Kontrol	5	3,60 (2,78-3,83) *
Etanol	5	12,04 (10,97-13,05)
Etanol+Omega-3	5	5,92 (4,49-9,47) *
Etanol+Betain	5	9,18 (9,08-9,80)
Etanol+Betain+Omega-3	5	9,59 (6,05-12,48)

*Etanol grubu ile karşılaştırıldığında; $p=0,002$

5. TARTIŞMA

Alkolün nörotoksik bir madde olup teratojenik etkilere neden olduğu bilinmektedir. Uzun süreli alkol kullanımının prematür ölümlere neden olduğu yine ciddi hastalıklarda artışa neden olduğu saptanmıştır (149). Yapılan çalışmalarda, fetal gelişim döneminde uzun süreli alkol maruziyetinin neden olduğu beyin hasarı sonucu, fetal alkol sendrom spektrumlu hastalıklara sebep olabildiği gösterilmiştir (12,141,86). Hamilelik sırasında aşırı alkol tüketimi, yeni doğan çocukların yüzlerinde morfolojik bozukluk, büyüme geriliği, beyin büyüklüğünün azalması, merkezi sinir sistemi anormallikleri ve fetal alkol sendromu ile sonuçlanır (211). Hiperaktivite, dikkat bozukluğu, motor koordinasyon bozuklukları, sosyal davranışların düzenlenmesindeki eksiklikler veya psikososyal fonksiyonların zayıflığı, kavrama bozukluğu, matematiksel yetenek, sözel akıcılık ve analitik hafıza gibi belirli nörodavranışsal bozuklukların FAS vakalarında sıkça rastlandığı rapor edilmiştir (86).

Gebelik ve laktasyon dönemi boyunca fetal alkol sendromuna neden olan alkol kullanımı bir çok nedenlerle beyne zarar vererek kalıcı hasarlar oluşturabilir. Örneğin; alkol kullanımı hücrel enerji dağılımını bozar. Glukoz kullanımı ve transportunu değiştirir, protein ve DNA sentezini baskılar (76,201,204). Hücrenin gelişim sürecini bozar. Hücre siklusunu değiştirir, nörogenez, gliogenez, hücre gelişimi ve göçü, sinaptogenez ve miyelinizasyonu bozar (133,155). Gen ekspresyonunu değiştirir. Retinoik asit sinyalini azaltır ve diğer transkripsiyon faktörlerine etki eder (5). Hücre-hücre etkileşimini bozar, L1 hücre adhezyon molekülü (L1 CAM) fonksiyonunu inhibe eder (23). Growth-faktör (büyüme faktörü) sinyal yollarında araya girerek diğer hücre sinyal yollarını da etkiler (28,55). Hücre hasarı/hücre ölümüne neden olur; apoptoz, oksidatif stres, glutamaterjik eksitotoksisite indüksiyonunu sağlar (44,94,98,122,132). “İkincil” hasar kaynağı olarak; plasental fonksiyon ya da diğer intrauterin faktörleri değiştirir, hipoksi/ iskemi, asetaldehit oluşumuna neden olur (97,218).

Savage ve arkadaşları tarafından gestasyonel ve laktasyon sürecinde alkol maruziyeti olan anne ratların yavrularında öğrenme ve hafızada bozukluklar tespit edilmiştir (197). Savage ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise ratların gebeliğinde %5 etanol içeren sıvı diyet uygulanılarak oluşturulan ılımlı tüketim modellerinde hafıza fonksiyonlarında bozukluklar görülmüştür (196). Etanol beyinde hücrelerin canlılığını, hücre göçlerini, nöron ve beyin gelişimini hasara uğrattır (153,157). Bunun yanı sıra alkol kullanımı, astroglial hücrelerin gelişmesini bozar (89,183). Glutamaterjik, serototerjik, dopaminerjik, kolinerjik, opioid nöron sistemini GABAerjik fonksiyonlarını engeller (51,66). Hipokampal yapıda ve nöron sayısında neonatal ratlarda azalan değişimler görülmüştür (151,168). Ratlardaki postnatal bu süre insanda intrauterin gelişimin son dönemine denk gelmektedir ve hücre ölümü artışı fetal alkol sendromu gelişiminde önemli bir bileşen olabilir (162). Rat beyninin hızlı büyüme dönemi, doğum sonrası 3. haftanın sonunda tamamlanır. Bu dönemin insandaki karşılığının; gebeliğin 2. döneminden postnatal yaşamın ikinci yılına kadar uzandığı bildirilmiştir (61). Sanchis ve arkadaşları, etanolla beslenen anne ratların yavrularının gelişiminde etanole bağlı yan etkiler tespit etmişlerdir ve bunlardan biri postnatal dönemde anne sütü ile etanole maruz kalan yavrularda büyüme geriliği ve beyin gelişiminde gerilemedir (194).

Ratlar poliöstrik hayvanlar olup, 4-5 günde bir düzenli olarak siklus göstermektedirler. Cinsel olgunluğa 6.5-7.5 haftalıkken ulaşırlar ve ilk çiftleşme yaşları da 80-90. günlerdir. Bir doğumdaki yavru sayısı ırka, soya ve yaşa göre farklılık göstermekle birlikte 6-12 arasında değişir. Gebelik süreleri 20-21 gün ve laktasyon süreleri de ortalama 21 gündür (14,235).

Çalışmamızda bu verilere dayanarak fetal alkol sendromu oluşturmak için prenatal dönemin 6. gününden (E6) başlayıp laktasyon süresince (P21) de ilgili gruptaki dişi ratlara modifiye sıvı diyet (MSD) uygulaması yapılmıştır. Deneyde etanol uygulamasına başlanılmadan önce betain ve/veya omega-3 üç gün boyunca verildi. Daha sonra etanol uygulamalarıyla beraber betain ve/veya omega-3 doğuma kadar (P0) ve laktasyon esnasında (P21) uygulanmıştır. Hayvanlara alkol oranı yavaş yavaş

artırılarak E6-E8. günlerde %2.4 oranında alkollü süt, E9-E11. günlerde %4.8 oranında alkollü süt, E12-P21. günlerde %7.2 oranında alkollü süt verilmiştir.

Çalışmada, etanolle beslenen dişi ratların yavrularının serebral korteks bölgesinde sitokrom c düzeyleri artmıştır. Özellikle çalışmamızda, etanolle beslenen gebe ratların yavrularının serebral korteks bölgesinde meydana gelen sitokrom c düzeyi etanol grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. Tedavi gruplarında, etanol grubuna göre sitokrom c düzeyinde azalma gözlenmiş fakat istatistiksel olarak anlam bulunamamıştır. Tedavi gruplarının kontrol grubu ile farkı yoktur. Bu durum tedavi etkinliğini gösterir niteliktedir. Daha önce yapılan çalışmalar da bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Sitokrom c salınımı, kaspaz-9 ve 3 ün aktivasyonu ve apoptoza götüren nükleer fragmentasyon ile sonuçlanır. Sitokrom c oksidaz elektron transport zincirinin major düzenleyici enzimidir. Patolojik durumlarda mitokondri hasarı sonucu ortaya çıkar. Ca^{+2} homeostazisindeki bozulma ile sitokrom c eksikliği durumunda ciddi derecede aerobik ATP üretiminde bozulma olur. Defektif sitokrom c mitokondriyal ROS üretimini artırır (208). Etanole bağlı organ toksisitesinde ve oksidatif stres durumunda mitokondrideki hasar sonucu enerji metabolizması bozularak hücre ölümüne yönelir ve bu durum apoptoz veya nekrozla sonuçlanır (96). Mitokondride hasar sonucu mitokondriyal glutatyon konsantrasyonu azalır, solunum zincirindeki kompleks IV ve ATP sentazın aktivitesi azalır ve mitokondrinin geçirgenliği artar (96,208,228). Bunun sonucunda sitozole doğru sitokrom c salınımı başlar. Bu da kaspaz kaskadını başlatır. Sari ve arkadaşları fetal alkol sendromunda alkol ile artmış sitokrom c düzeylerini göstermişlerdir (195). İnsanların üçüncü üç aylık dönemi, farelerin doğduktan sonraki 10-15 gününü içerir (63). Light ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, etanolle beslenen ratlarda bu dönemde purkinje hücrelerinde sitokrom c salınımının arttığını tespit etmişlerdir (132).

Çalışmamızda, etanolle beslenen gebe ratların yavrularının serebral korteks bölgesinde meydana gelen kaspaz-3 aktivitesi etanol grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olup; aynı zamanda tedavi grupları etanol+omega-3, etanol+betain, etanol+omega-3+betain grupları etanol grubuna göre

istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur. Bu durum betain, omega-3 ve kombine tedavi gruplarının kaspaz-3 aktivitesini azaltarak hücre ölüm yolları üzerine olumlu etki yapabileceğini gösterir niteliktedir. Kaspaz-3 aktivasyonu hücre ölümünde önemli bir aşamadır. Çünkü etanolün kaspaz-3 aktivitesini indükleyerek hücre ölümüne neden olduğunu gösteren birçok araştırma vardır (114,230). Chen ve arkadaşları, kaspaz-3 ün gecikmiş nöronal ölüme aracılık ettiğini rapor etmişler ve kaspaz-3 inhibitörlerinin hücre ölümü üzerine etkilerinin kaspaz-1 inhibitörlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (45). Nöronlarda apoptozun efektör fazında önemli bir rol oynayan kaspaz-3 ün aktivitesinin engellenmesi nörolojik defektlere yol açar. Deneysel iskemi ve travmatik beyin yaralanması sonucunda nöronal hücre ölümüne kaspaz-3 aktivitesi katkıda bulunur (49). DNA fragmantasyonunda, DNAaz aktivasyonuna sebep olan kaspaz-3 ün direk rolü olduğu düşünülmektedir. Kaspaz-3 geninin kromozom 8 üzerinde lokalize olduğu bilinmektedir. Bu gen embriyonik dönemin 4. gününden itibaren gelişimden sorumludur. Kaspaz-3 deki eksiklik ciddi nörolojik gelişim problemlerine hatta üç haftalık embriyoda ölüme neden olabilmektedir. Kaspaz-3 ün nöronal gelişim ve yaralanmada oldukça önemli rolü olduğu gösterilmiştir (7,129,206).

McAlhany ve arkadaşları, ratların nöroblastoma hücrelerinde 34 mmol/ml etanol konsantrasyonu DNA fragmantasyonunu artırmış, 103 mmol/ml etanol konsantrasyonu nekroz oluşturmuştur (143). Asetaldehide maruz kalan astrosit hücre kültürlerinde DNA fragmantasyonunda önemli artışlar görülmüştür (98). Çalışmamızda etanol tüketiminin neden olduğu DNA fragmantasyonunda gruplar arası istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Etanol grubunda az bir yükseliş gözlenmiş, tedavi grupları bir miktarda olsa azaltıcı etki olmuştur fakat istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Çalışmamızda uzun süreli doz uygulaması yapıldığından dolayı apoptozdan daha çok nekroza yönelik olduğundan DNA fragmantasyonu net olarak iyi sonuç vermemiş olabilir.

Etanol serbest radikallerin oluşumuna ve oluşan reaktif oksijen türleri lizozomal destabilizasyona neden olmaktadır (9,213,233). Böylece etanol, katepsinlerin

lizozomlardan sitozole sızmasına yol açmaktadır (213). Etanol verilen gruplarda gördüğümüz katepsin B düzeyleri literatürdeki bu bilgileri desteklemektedir. Çalışmamızda katepsin L seviyelerinde gruplar arasında bir fark bulunamamıştır. Çalışmamızda, katepsin B düzeyleri etanol ve etanol+betain gruplarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Katepsin B düzeyleri özellikle tedavi gruplarından; etanol+omega-3+betain grubu, etanol ve etanol+betain gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Lizozomal enzimlerin hücre sitoplazmasına salınması bir hücre içi yıkım olayları döngüsünü başlatıyor olabilir. Bu lizozomal enzimler; **a)** Doğrudan mitokondrilere sitokrom c salınımını uyarabilir **b)** Doğrudan ya da dolaylı olarak mitokondrial ROS oluşumu artışına (ve lizozomal destabilizasyonda oksidan kaynaklı artışa) sebep olabilir **c)** Hem mitokondri hem de lizozomlara fosfolipaz A₂ gibi litik proenzimleri aktive ederek saldırmasını sağlayabilir **d)** Bid ve/veya diğer apoptotik proteinleri aktive edebilir. **e)** Direkt olarak pro-kaspazları aktive edebilir (233).

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu; mekanik, metabolik ve regülatör prosesler gibi çeşitli hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde bir ikinci haberci olarak merkezi rol oynar (25). Etanolün de hücre içi kalsiyum depolarını bozucu etkisi vardır (59). İntrasellüler Ca⁺² artışı nöronal ölümden hem apoptoz hem nekrozla sonuçlanır. Ca⁺² artışı, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve kalsiyum bağımlı proteaz aktivasyonunu tetikler. Sitolik sistein proteaz (kaspaz ve kalpain) ve lizozomal aspartil proteazlar (katepsinler) nekrotik hücre ölümü ve nörodejenerasyona neden olur (168). Çalışmamızda etanol verilen gruplarımızda kalpain aktivasyonunda artış gözlenmiştir. Bu durum etanolün kalsiyum üzerindeki etkilerinin sonucu olabilir. Aynı zamanda tedavi grupları etanol+omega-3, etanol+betain, etanol+omega-3+betain grupları etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NMDA, kainat ve AMPA reseptörlerinin beyindeki fazla aktivasyonu, kalsiyumun voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından sürekli akımına neden olur. Kalsiyum homeostazisindeki dengesizlikler kalpainleri içeren bir çok kalsiyum bağımlı enzimin aktivasyonu ile sonuçlanır. Kalpainlerin aşırı salınımı, iskemi, travma ve Alzheimer hastalığı gibi hem akut hemde kronik nörodejeneratif oluşumlarla pozitif olarak

bağlantılıdır (207). Kronik alkol tüketenlerde patolojik ve fizyolojik olarak nöron kayıpları görülmüştür (123). Alkolün etkisiyle oluşan nöron hücre ölümleri ve merkezi sinir sistem hasarlarında hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonunda artma, kaspaz-3 ve kalpain aktivasyonuna neden olur (16,182). Neonatal serebral hipoksi ve iskemide Blomgren ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, kalpastatinin hipoksiye karşılık olarak upregüle olduğu ve kalpaine karşı bir intihar substratı olduğu tespit edilmiştir (27).

Nekroz, akut neonatal hipoksi iskemi hasarı durumunda rat yavru beyinlerinde major hücre yıkımıdır. Nekrotik hücre ölümünde; genel olarak sitoplazmik şişme, nükleer dissolusyon (karyolizis) ve lizis olur ve hücre hızlı ve ciddi şekilde homeostaza girer; hücrenin hacmi dikkate değer ölçüde değişir. Nekroz prosesi, hücre plazma membranı içeriğinde fonksiyonel ve yapısal hasarı içerir ve enzimler (Na^{+} , K^{+} , adozin trifosfataz, [ATPaz]) ile ilişkili olarak hücre içine aşırı iyon akışı, Na^{+} ve Ca^{+2} ve H_2O akışında bozulma, hızlı mitokondriyal hasar ve enerjetik kollapsa neden olur. Metabolik inhibisyon ve reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif stres nekrozu tetikleyen ana etkidir. Son zamanlarda hücrenel nekrozun kaotik veya rasgele meydana gelmediği bulunmuş, aktivasyonunda spesifik sinyal yolları veya hücre ölümünde belli programları içerdiği öngörülmüştür (171). Daha önce yapılan çalışmalara uyumlu olarak çalışmamızda, etanolün beyin dokusu korteks bölgesinde belirgin derecede doku hasarı yaptığı gözlenmiştir (162). Özellikle nöronlarda kromatolizis ve nekroz açısından görülen hasar çok belirgindir. Etanol grubunun neden olduğu nekrotik hücre ölümünün; betain ve omega-3 uygulamasıyla belirgin derecede gerileme göstermesi dikkat çekici bir bulgudur. Çalışmamızda hem gestasyonel hem laktasyon süresinde anne ratlara verdiğimiz etanol, yavru rat beyinlerinde nekrotik hücre sayısını belirgin derecede artırarak, ciddi bir hasara yol açmıştır. Bu sonuç daha önce yapılan çalışmalarla uyumludur (150,152,156,162,180). TUNEL boyamada boyanmanın olmamasının nedeni, hücrelerin piknotik nükleuslu belirsiz ve eozinofilik sitoplazmalı görünüşleriyle nekroza gittikleri ancak bir önceki aşama olan hücre ölümünün yani apoptotik hücrelerin bu deneyde kullanılan yüksek doz ve uzun dönem postnatal süre sonucunda nekroza yönelmesi sebebiyle olabileceği düşünülmektedir. Birim hacimde

bulunan nekrotik hücre sayısı (/mm³) incelendiğinde artan nekrotik hücre sayısı özellikle etanol+omega-3 grubunda etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış; yine ılımlı derecede etanol+betain ve etanol+betain+omega-3 uygulanmış tedavi gruplarında etanole göre azalış olduğu gözlemlenmiştir. Alkolün etkisiyle korteksteeki nekroza giden hücre sayısının arttığı, bu nekrotik hücre artışını en iyi şekilde omega-3 uygulanmasıyla azaltıldığı gözlenmiştir.

Omega-3 hücre membranının yapısı ve içeriği, hücrenin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için çok önemlidir. Beyinde omega-3 yağ asitlerinden biri olan DHA, özellikle beyin, retina ve diğer nöral dokularda yoğun olarak bulunan ve hücre membranının yapısına katılan bir yağ asitidir. Sinir sisteminin gelişimi için önemli rolü olan DHA, serebral korteks yağ içeriğinin %15-20'sini oluşturur. DHA, aksonal yapıyı koruyarak, elektriksel uyarıların düzgün olarak iletilmesine katkıda bulunur (29,138). DHA, infantların beyin gelişimi ve fonksiyonel gelişim için esansiyeldir. DHA eksikliği, fetal alkol sendromu, ADHD, kistik fibrozis, fenilketonüri, unipolar depresyon, adrenolökodistrofi ile ilişkilidir. Omega-6 ve omega-3 esansiyel yağ asitleri hem nöronal sağlamlık hem de fonksiyonel açıdan gereklidir ve eksikliği fetal ve neonatal gelişimi etkiler (164). Spesifik omega-3 yağ asidi eksikliği öğrenme yeteneğinde eksikliğe yol açar çünkü DHA hücre sinyalinde görevlidir. DHA, insan ve diğer memelilerde beyin ve retinal dokularda, özellikle beyinde gri maddede yüksek oranda bulunmaktadır (99). Omega-3 özellikle de DHA, beyin gelişimi ve beyin nöronlarının iletişimindeki mekanizmada rol alır. Omega-3 ün etkisi, mental hastalık ve anksiyete modeli oluşturulan hayvan çalışmalarında incelenmiştir ve n-3 PUFA eksikliğinin öğrenme ve hafızada belirgin şekilde bozukluğa sebep olduğu gösterilmiştir (190). DHA nöroprotektif faktörlerle ilişkilidir. DHA ile beslenen farelerde striatumda (bu bölge ise özellikle Parkinson hastalığını içermekte) yüksek seviyede BDNF (Beyinden türeyen nörotrofik faktor) seviyesi saptanmıştır (184). Mills ve arkadaşları yaptıkları araştırmada; ratlardaki travmatik beyin hasarına karşı DHA'nın profilaktik bir yarar sağlayacağını önermişlerdir (161). Yine Patten ve arkadaşları yaptıkları çalışmada gestasyonel ve laktasyon döneminde etanol maruziyetinde, omega-3 desteğinin oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan kapasiteyi artırdığını göstermişlerdir

(177). El-Ansary ve arkadaşları ise propiyonik asit ile indüklenen nörotoksisite geliştirilen 21 günlük rat yavrularında, omega-3 verilen grupta düşük Il-6, TNF- α ve kaspaz-3 düzeylerini ölçerek, omega-3 ün koruyucu etkisini göstermişlerdir (69). Dokozahekzaenoik asit (DHA, 22:6n-3), santral sinir sisteminin en fazla bulunan omega-3 yağ asididir ve nöronal ve retinal fonksiyon için gereklidir. Normalde nöronal membranlarda yüksek düzeyde bulunurken yetersiz omega-3 desteği veya alkol maruziyetinde nöronal hücrelerden belirgin derecede kayıplar olmaktadır (119). Bertrand ve arkadaşlarının yaptığı morfometrik analiz sonucu gestasyon döneminde omega-3 eksikliği sonucu embriyonik rat beyinlerinde nörogenezde inhibisyon yada gecikme gözlenmiştir (26). Martin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, ratlarda yaş ile ilişkili artan sitokrom c translokasyonu, kaspaz-3 aktivasyonu ve hücre ölümünü EPA (10ve 20 mg/rat/gün 3hafta) geriye çevirmiştir (136). DHA, enerji metabolizması ve ATP üretimini kontrol eden genlerin de dahil olduğu gen ekspresyonunu düzenlemekte; mitokondriyal biyogenezis ve oksidatif metabolizmayı düzenleyici rol oynamaktadır. DHA aynı zamanda peroksizomal β -oksidasyonu artırmaktadır (67).

Yaptığımız çalışmada tedavi olarak verdiğimiz etanol+omega-3 grubunda etanol grubuna göre biyokimyasal ölçümlerden kaspaz-3 ve kalpain düzeylerinde anlamlı azalış, sitokrom c, katepsin B, DNA fragmantasyonunda ise ılımlı ölçüde azalış gözlenmiştir. Histolojik açıdan hemoraji, konjesyon, nekroz, PMNL, mikroglia düzeylerinde ve morfometrik analizde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalış gözlenmiştir.

Betain hücre membranlarının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sağlanmasında önemli bir role sahiptir. Ganesan ve arkadaşları yaptığı çalışmada; betainin izoprenalinle indüklenen miyokardiyal infarktüste lizozomal membranı koruduğu ve membran stabilizasyonu ve serbest radikallere karşı korunmada önemli bir role sahip olduğunu önermişlerdir (84). Safra asidi indüklü apoptoz kolestatik karaciğer hastalığında önemli bir rol oynamaktadır. Safra asiti ile indüklenen in vitro ve in vivo çalışmada betainin antiapoptotik etkisi proapoptotik mitokondriyal yolağın inhibe edilmesiyle etki ettiği gösterilmiştir (87). Barak ve arkadaşları, etanolla beslenen

ratların hepatositlerinde yükselen S-adenozil-homosistein seviyesinin betainle düşürüldüğünü saptamışlardır (17).

Betainin antioksidan içeriği nedeniyle beyin sinaptozomlarında lizozomal membranları koruduğu betain ile yapılan 30 günlük bir ön tedavi çalışmasında gösterilmiştir (110). Homosisteinin erişkin ratlarda, apoptozu hızlandırdığı, nöronal plastisitede defekt oluşturduğu ve sonuçta, kognitif performansı kötüleştirdiği gösterilmiştir (160,212). Betain tedavisi, sistatyonin β -sentaz (CBS) eksikliği olan çocuklarda spinal kord sıvısındaki homosisteini dramatik şekilde azaltmaktadır (93). Önemli olarak betain, folat eksikliği durumunda bile hiperhomosisteinemi azaltabilir, MTHFR eksikliği olan kişilerde de betain tedavisi etkin bir yanıt oluşturabilmektedir (95).

Kharbanda ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; alkolle indüklenen hepatik SAM seviyesindeki azalışa bağlı, hepatosellüler SAM:SAH oranındaki azalışın; SAM bağımlı metilasyon reaksiyonlarında olumsuz bir çok etki oluşturduğunu önermişlerdir. Bu durumun alkolik karaciğer hastalığı gelişiminde önemli bir işaret olduğu gösterilmiştir. SAM ilavesi ile alkolle indüklenen SAM:SAH oranı normalize edilebilir. Aynı zamanda; SAM ilavesi ile mitokondriyal genom ve proteom düzeyinde, alkol bağımlı mitokondriyal süperoksit üretimi artışı azaltılarak; mitokondriyal solunum kapasitesinin korunabileceği gösterilmiştir. Betainin hepatosellüler SAM:SAH oranını normalize ettiği, defektif hücrel metilasyon reaksiyonlarını düzelttiği ve alkol aracılı steatozis, apoptoz ve hasarlı proteinlerin akümüleyonunu önlediği gösterilmiştir. Kronik alkol maruziyetine bağlı rat modelinde alkolle indüklenen mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemi değişikliklerine karşı betainin önleyici etkisi saptanmıştır (116). Betain lipotropiktir, dışardan verildiğinde membran lipit tabakasını hızlıca geçer ve hücrel membranlarda lipit peroksidasyonu inhibe eder. Betain ilavesinin nekrotik hasara karşı koruyucu olduğu Kim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (117). Kolin ve metaboliti olan betaininin maternal kolin eksikliğinde, fetal beyin gelişiminde nöral progenitor hücre proliferasyonunda azalış, apoptozda artış, DNA ve spesifik hipometilasyon kognitif ve hafıza ile ilgili fonksiyonlarda değişimler

söz konusudur (226). Chai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Alzheimer benzeri patolojik değişiklikler olan hafıza defektli hiperhomosisteinemik ratlarda, betainin koruyucu etkisi saptanmıştır. Ek olarak betain A β üretimi ve presenilin-1 protein seviyelerini azalttığı gözlenmiştir (42).

Çalışmamızda beyin dokusu, histolojik olarak incelendiğinde etanol+betain grubunda hemoraji, PMNL, mikrogliya açısından etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma ve morfometrik verilerimizde az da olsa düşüş gözlenmiştir. Bu verilere paralel olarak biyokimyasal olarak yapmış olduğumuz ölçümlerde kaspaz-3, kalpain düzeylerinde etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşüş olmuş, yine sitokrom-c, katepsin B, katepsin L, DNA fragmentasyonunda ılımlı bir düşüş gözlenmiştir. Elde ettiğimiz betainle ilgili verilere göre; etanol kaynaklı nöronal hasarı, betainin ortadan kaldırdığını düşünmekteyiz.

Yaptığımız çalışmada betain ve omega-3 ün birlikte kullanıldığı grupta, kaspaz-3, kalpain, katepsin B düzeyleri etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmış, bunun yanı sıra katepsin B seviyesini de etanol+betain grubuna göre de istatistiksel olarak daha fazla azalttığı gözlenmiştir. Yine sitokrom c düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da tedavi gruplarına göre daha fazla düşüş, DNA fragmentasyonunda da ılımlı düzeyde azalış saptanmıştır. Histolojik açıdan hemoraji, PMNL, mikrogliya da istatistiksel farklılık gözlenmiş ve morfometrik analizde ılımlı derecede etanol grubuna göre düşüş gözlenmiştir. Kulkarni ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da, çalışmamızı desteklemektedir. Kulkarni ve arkadaşlarının çalışmasında plasental olgunlaşma ve gelişimde vitamin B12 eksikliği ve DHA yokluğu, yüksek düzeyde hipometilasyona neden olmaktadır. Bulgularına göre DHA desteği metilasyon seviyelerinde artışa neden olmuştur. Buna bağlı olarak omega-3 yağ asitlerinden özellikle DHA, plasentada metilasyon seviyelerinin saptanmasında önemli role sahip olabilir (124).

Özetle biyokimyasal histolojik ve morfolojik verilerimize dayanarak hem gestasyonel (prenatal) hem laktasyon (postnatal 21.gün) süresinde etanol maruziyeti

sonucu etanol şiddetli bir teratojenik etki yapmış ve yavru rat beyinlerinde apoptozdan daha çok nekroz gözlenmiştir. Fakat buna rağmen elde ettiğimiz verilere göre tedavi gruplarımızda omega-3 başta olmak üzere, betain ve kombine kullanımının prenatal ve postnatal etanol maruziyeti sonucu oluşturulan fetal alkol sendromlu rat yavru beyinlerinde nörodejenerasyona karşı koruyucu etki göstermektedir.

Bu deneysel çalışma verileri fetal alkol sendromuna karşı koruyucu etkisi olan omega-3 ve betain ile ilgili araştırmalara önemli bir katkı sağlayabilir. Sonuç olarak prenatal ve postnatal dönemde alkol uygulanmış ratlardan doğan fetal alkol sendromlu yavru ratların korteksinde nörodejenerasyonun meydana geldiğini ve bu durumu engellemede betain ve omega-3 hem tek başına hem de kombine etkilerinin olabileceğini biyokimyasal ölçümlerimiz, histolojik ve morfometrik incelemelerimiz açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Yeni doğan rat yavrularının beyin dokusunda yaptığımız bu araştırma; daha ileriki zamanlarda alkol kullanan gebelerin çocuklarında oluşabilecek hasarların önlenmesinde, betain ve omega-3 kullanımını destekleyecek niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Alkol kullanımına bağı fetal alkol sendromu oluşumunu en aza indirebilmek ve hücre ölümünü azaltabilmek için uygun tedavi yöntemleri gerekmektedir. Prenatal (doğum öncesi) ve postnatal (laktasyon) dönemde anne tarafından kullanılan alkol, fetal alkol sendromuna (FAS) neden olabilmektedir. Çalışmada, serebral korteks bölgesinde prenatal ve postnatal alkol maruziyeti sonucu yeni doğanda oluşan nörodejenerasyonun betain ve omega-3 takviyesiyle koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada, ratlarda fetal alkol sendromu oluşturmak için prenatal ve postnatal dönemde anne ratlar etanole maruz bırakılmışlardır. Yaptığımız çalışmada yavru rat beyinlerinde biyokimyasal, histolojik ve morfometrik testler kullanılarak nörodejenerasyon saptanmıştır. Nörodejenerasyon hücre ölümünde bir çok mekanizmayı içermektedir. Çalışmamızda olduğu gibi prenatal ve postnatal dönemde sürekli olarak anne ratlar alkole maruz bırakılarak alkol miktarı artırılmış, buna bağı olarak apoptozdan nekroza yöneliş olmuştur. Özellikle histojik çalışmalar, TUNEL boyanmama ve morfometrik analizdeki nekrotik hücre sayısı artışı durumu desteklemektedir.

Beyin dokusunda etanol grubunda biyokimyasal metotlarla ölçülen kalpain, katepsin B ve L ve kaspaz-3, DNA fragmentasyonu aktiviteleri ile sitokrom c salınımının arttığı ve böylece hücre ölümü yolağının aktivasyonu gözlenmiştir. Histolojik metotlar ve morfometrik analizler, biyokimyasal verilerimizi destekler niteliktedir.

Yaptığımız çalışmada histolojik olarak beyin dokusu incelendiğinde etanol+betain grubunda etanol grubuna göre hemoraji, PMNL, mikroglia açısından istatistiksel olarak farklı düzeyde azalış ve morfometrik verilerimizde az da olsa düşüş gözlenmiş ve bunlara paralel olarak biyokimyasal olarak yapmış olduğumuz ölçümlerde kaspaz-3, kalpain seviyelerinde etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş; yine

sitokrom-c, katepsin B, katepsin L, DNA fragmantasyonunda ılımlı bir düşüş gözlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada etanol+omega-3 grubunda biyokimyasal parametrelerden kaspaz-3 ve kalpain düzeylerinde etanol grubuna göre anlamlı azalış, sitokrom c, katepsin B, DNA fragmantasyonunda ise ılımlı ölçüde azalış gözlenmiştir. Histolojik açıdan hemoraji, konjesyon, nekroz, PMNL, mikrogliya düzeylerinde ve morfometrik analizde etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalış gözlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada etanol+betain+omega-3 grubunda, kaspaz-3, kalpain, katepsin B düzeyleri etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmış, bunun yanı sıra katepsin B de etanol+betain grubuna göre de istatistiksel olarak daha fazla azalttığı gözlenmiştir. Yine sitokrom c düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da diğer gruplara göre etanol+betain+omega-3 grubunda daha fazla düşüş, DNA fragmantasyonunda da ılımlı düzeyde azalış saptanmıştır. Histolojik açıdan hemoraji, PMNL, mikrogliya da istatistiksel farklılık gözlenmiş ve morfometrik analizde etanol grubuna göre ılımlı derecede düşüş gözlenmiştir.

Sonuç olarak, etanolün rat beyinlerinde hücre ölümünü tetikleme kapasitesine sahip olduğu, biyokimyasal deneylerle, histolojik ve morfometrik incelemeler sonucu başta omega-3 olmak üzere betainin tek başına nekrozu azaltabileceği bulundu. Betain ve omega-3 birlikteğinin prenatal ve postnatal alkol kullanımından doğan hasarı ortadan kaldıracabilecek terapötik yaklaşımlara katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Hem betainin hem de omega-3 ün, potansiyel tedavi edici etkilerinin mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu sebeple, etanol kaynaklı beyindeki nörodejenerasyonda betain ve omega-3 ün iyileştirici fonksiyonlarını, hücre ölüm yollarında yer alan kaspaz-3, sitokrom c, kalpain, katepsin B, L, DNA fragmantasyonu seviyeleri gibi biyokimyasal ölçümler ve histolojik ve morfometrik analizlerin eş zamanlı olarak birlikte incelenerek değerlendirilmesi daha doğru veriler elde etmemizi sağlamıştır. Yeni doğan rat yavrularının beyin dokusunda yaptığımız bu

araştırma; daha ileriki zamanlarda alkol kullanan gebelerin çocuklarında oluşabilecek hasarların önlenmesinde betain ve omega-3 kullanımının etkisini destekleyecek niteliktedir. Bu bulguların sonraki çalışmalar için bir basamak oluşturacağına inanıyoruz.

Sonuç olarak, fetal alkol sendromu ve tedavi edici ajanların *in vivo* hayvan modelleri, *in vitro* hücre modelleri ve ileri moleküler çalışmaların yapılması ve bu bilgilerin klinik ve insan deney çalışmalarıyla desteklenmesi sonuçların güvenilirliğini artırmada fayda sağlayacağı düşünölmüştür.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Aase, J. M.,1994, Clinical recognition of FAS, Alcohol Health & Research World, 18(1) : 5- 9 p.
2. Abel, EL, Dintcheff, BA.,1984, Factors affecting the outcome of maternal alcohol exposure: I: parity, Neurobehav Toxicol Teratol, 6:373–377 p.
3. Abel, EL, Dintcheff, BA.,1985, Factors affecting the outcome of maternal alcohol exposure: II: maternal age, Neurobehav Toxicol Teratol,7:263–266 p.
4. Abel, EL, Hannigan, JH.,1995, Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: provocative and permissive influences, Neurotoxicol Teratol, 17:448–462 p.
5. Abel, EL.,1995, An update on incidence of FAS: FAS is not an equal opportunity birth defect, Neurotoxicol Teratol, 17:437–443 p.
6. Acevedo, CG., Carrasco, G., Burotto, M., Rojas, S., Bravo, I., 2001, Ethanol inhibits L-arginine uptake and enhances NO formation in human placenta, Life Sci.,68:2893-2903p.
7. Agniswamy, J., Fang, B., Weber, IT.,2007,Plasticity of S2-S4 specificity pockets of executioner caspase-7 revealed by structural and kinetic analysis, FEBS J. 274 (18): 4752–65 p. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05994.x. PMID 17697120
8. Alexander, JW., 1998, Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids, Nutrition, 14: 627-33 p.
9. Almansa, I., Fernandez, A., Garcia-Ruiz, C., Muriach, M., Barcia, J.M., Miranda, M., Fernandez-Checa, J.M., Romero, F.J., 2009, Brain mitochondrial alterations after chronic alcohol consumption, Journal of Physiology and Biochemist., 65, 3, 305-312 p.
10. Andersen, SL., 2003, Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity?, Neurosci Biobehav Rev., 27:3-18 p.
11. Atroshi, F., Rizzo, A., Biese, I., Veijalainen, P., Saloniemi, H., Sankari, S., Andersson, K., 1999, Fumonisin B-induced DNA damage in rat liver and spleen: 1 effects of pretreatment with coenzyme Q , l-carnitine, α -tocopherol and selenium, Pharmacol Res, 40, 6, 459-67 p.
12. Autti-Ramo, I., Fagerlund, A., Ervalahti, N., Loimu, L., Korkman, M., Hoyme, H.E.,2006, Fetal alcohol spectrum disorders in Finland: Clinical delineation of 77 older children and adolescents, American Journal of Medical Genetics Part A, 140, 137–143 p.
13. Bacova, B., Radosinska, J., Knezl, V., Kolenova, L., Weismann, P., Navarova, J., Barancik, M, Mitasikova, M., Tribulova, N., 2010, Omega-3 Fatty Acids And Atorvastatin Suppress Ventricular Fibrillation Inducibility In Hypertriglyceridemic Rat Hearts: Implication Of Intercellular Coupling Protein, Connexin-43, Journal Of Physiology and Pharmacology, 61, 6, 717-723 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

14. Baker, D. E. J., 1979, Reproduction and breeding, p. 153-168. *In* H. J. Baker, J. R. Lindsey, and S. H. Weisbroth (ed.), The laboratory rat, vol. I. Academic Press, Inc., New York
15. Bakır, T., Karacadağ, S., Telatar, H., Onul, B., Durusu, Z., 1985, Serum activity of lysosomal enzymes in the course of viral hepatitis, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3, 37-41 p.
16. Banik, N.L., Shields, D.C., Ray, S., Davis, B., Matzelle, D., Wilford, G., Hogan, E.L., 1998, Role of calpain in spinal cord injury: Effects of calpain and free radical inhibitors, *Ann. NY Acad. Sci.*, 844: 131-137 p.
17. Barak, A.J., Beckenhauer, H.C., Mailliard, M.E., Kharbanda, K.K., Tuma, D.J., 2003, Betaine lowers elevated S-adenosylhomocysteine levels in hepatocytes from ethanol-fed rats, *J. Nutr.*, 133, 2845-2848 p.
18. Barrett, A. J., Kirschke, H. , 1981, *Methods Enzymology*, Volume 80, 535-538 p.
19. Barrett, A.J., Kirschke, H., 1981, Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L, *Methods Enzymol.*, 80: 535–561 p. PMID 7043200
20. Barrett, A.J., Buttle, D.J., Mason, R.W. , 1988, Lysosomal cysteine proteinases, *ISI Atlas of Science Biochemistry*, 1: 256–260 p.
21. Bazan, N.G., 2009, Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer’s disease, *J. Lipid Res.*, 50, S400–S405 p.
22. Bazan, N.G., Musto, A.E., Knott, E.J., 2011, Endogenous Signaling by Omega-3 Docosahexaenoic Acid-derived Mediators Sustains Homeostatic Synaptic and Circuitry Integrity, *Mol Neurobiol.*, 44:216–222 p. DOI 10.1007/s12035-011-8200-6
23. Bearer, C.F., Swick, A.R., O’Riordan, M.A., Cheng, G., 1999, Ethanol inhibits L1-mediated neurite outgrowth in postnatal rat cerebellar granule cells, *J Biol Chem*, 274:13264–13270 p.
24. Beckemeier, M.E., Bora, PS., 1998, Fatty acid ethyl esters: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism, *J Mol Cell Cardiol*, 30, 2487-2494 p.
25. Berridge, M.J., Bootman, M.D., Lipp P., 1998, Calcium, a life and death signal, *Nature*, 395, 645 -648 p.
26. Bertrand, P.C., O’Kusky, J.R., Innis, S.M., 2006, Maternal Dietary (n-3) Fatty Acid Deficiency Alters Neurogenesis in the Embryonic Rat Brain, *J. Nutr.* 136: 1570–1575 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

27. Blomgren, K., Hallin, U., Andersson, A.L., Puka-Sundvall, M., Bahr, B.A., McRae, A., Saido, T.C., Kawashima, S., Hagberg, H., 1999, Calpastatin Is Up-regulated in response to hypoxia and Is a suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia, *J. Biol. Chem*, 274(20):14046-52 p.
28. Bonthius, D.J., Karacay, B., Dai, D., Hutton, A., Pantazis, N.J., 2004, The NO cGMP-PKG pathway plays an essential role in the acquisition of ethanol resistance by cerebellar granule neurons, *Neurotoxicol Teratol.*, 26:47–57 p.
29. Bourre, J.M., Bonneil, M., Chaudiere, J., Clement, M., Dumont, O., Durand, G., 1992, Structural and functional importance of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system, *Adv Exp Med Bio*, 318: 211-229 p.
30. Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254 p.
31. Brattström, L., Israelsson, B., Lindgärde, F., Hultberg, B., 1988, Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency, *Metabolism*, 37:175-178 p.
32. Brenna, J.T., Diau, G.Y., 2007, The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 77, 247–250 p.
33. Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., 2006, The sulfur-containing amino acids: an overview, *J Nutr.*, 136(6 Suppl):1636-1640 p. Review.
34. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X., 1999, Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15 269–290 p.
35. Burd, L., Roberts, D., Olson, M., Odendaal, H., 2007, Ethanol and the placenta: a review, *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 20(5): 361-375 p.
36. Burton, K., 1956, A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid, *Biochem J*, 62, 2, 315-23 p.
37. Caballería, J., 2003, Current concepts in alcohol metabolism, *Ann Hepatol*, 2, 2, 60-68 p.
38. Cagetti, E., Liang, J., Spigelman, I., 2003, Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors, *Mol Pharmacol*, 63, 53-64 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

39. Cao, L., Taggart, R.T., Berquin, I.M., Moin, K., Fong, D., Sloane, B.F., 1994, Human gastric adenocarcinoma cathepsin B: isolation and sequencing of full-length cDNAs and polymorphisms of the gene, *Gene*, 139 (2):163–9 p. doi:10.1016/0378-1119(94)90750-1. PMID 8112600
40. Carlson, S.J., Fallon, E.M., Kalish, B.T., Gura, K.M., Puder, M., 2013, The Role of the ω -3 Fatty Acid DHA in the Human Life Cycle, *JPEN J Parenter Enteral Nutr.*, 37: 15-22 p. DOI: 10.1177/0148607112467821
41. Catoni, G.L., 1953, S-Adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate, *J Biol Chem*, 204:403–416 p.
42. Chai, G.S., Jiang, X., Ni, Z.F., Ma, Z.W., Xie, A.J., Cheng, X.S., Wang, Q., Wang, J.Z., Liu, G.P., 2013, Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine, *Journal of Neurochemistry*, Volume 124, Issue 3, 388–396 p
43. Chandler, L.J., Sutton, G., Norwood, D., 1997, Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons, *Molecular Pharmacology*, 51, 733–740 p.
44. Chen, S.Y., Sulik, K.K., 1996, Free radicals and ethanol-induced cytotoxicity in neural crest cells, *Alcohol Clin Exp Res.*, 20:1071–1076 p.
45. Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., Stetler, R.A., Zhu, R.L., Graham, S.H., Simon, R.P., 1998, Induction of Caspase-3-Like Protease May Mediate Delayed Neuronal Death in the Hippocampus after Transient Cerebral Ischemia, *The Journal of Neuroscience*; 18: 13 4914-4928 p.
46. Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K., 2008, Caspases - an update, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 151(1): 10-27p.
47. Christie, W.W., 2010, Fatty acids: Methylene-interrupted double bonds: Structures, occurrence and biochemistry, Available online: http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/fa_poly/index.htm (accessed on 16 December 2010).
48. Chwieralski, C.E., Welte, T., Bühling, F., 2006, Cathepsin-regulated apoptosis, *Apoptosis*, 11, 2, 143-149 p.
49. Cimpan, M.R., Matre, R., Cressey, L.I., Tysnes, B., Lie, S.A., Gjertsen, B.T., Matre, R., 2000, The Effect Of Heat And Auto Polymerized Denture Base Polymers On Clonogenicity, Apoptosis, And Necrosis In Fibroblasts: Denture Base Polymers Induce Apoptosis And Necrosis, *Acta Odontol Scand.*, 58: 217-228 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

50. Codogno, P., Meijer, A.J., 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death, *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2:1509–18 p.
51. Costa, L.G., Guizzetti, M., 1999, Muscarinic cholinergic receptor signal transduction as a potential target for the developmental neurotoxicity of ethanol, *Biochemical Pharmacology*, 57, 721–726 p.
52. Cowan, J.M., Weathermon, A., McCutcheon, J.R., Oliver, R.D., 1996, Determination of volume of distribution for ethanol in male and female subjects, *J Anal Toxicol.*, 20(5):287-290 p.
53. Craig, S.A.S., 2004, Betaine in human nutrition, *Am J Clin Nutr.*, 80:539–49 p.
54. Cuervo, A.M., 2004, Autophagy: many paths to the same end, *Mol. Cell. Biochem.*, 263: 55–72 p.
55. Cui, S.J., Tewari, M., Schneider, T., Rubin, R., 1997, Ethanol promotes cell death by inhibition of the insulin-like growth factor I receptor, *Alcohol Clin Exp Res.* 21:1121–1127 p.
56. Cummings, M.C., Winterfold, C.M., Walker, N.I., 1997, Apoptosis, *Am J Surg Pathol.*, 21:88-101 p.
57. Cuzzocrea, S., McDonald, M.C., Mazzon, E., Mota-Filipe, H., Centorrino, T., Terranova, M.L., Ciccolo, A., Britti, D., Caputi, A.P., Thiernemann, C., 2001, Calpain inhibitor I reduces colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat, *Gut*, 48:478–488 p.
58. Daniel, J.W., Maximillian, M., 2005, Fetal Alcohol Spectrum Disorders, *American Family Physician*, 72, 279-82 p.
59. Delbridge, L.M., Connell, P.J., Harris, P. J., Morgan, T.O., 2000, Ethanol effects on cardiomyocyte contractility, *Clinical Science*, 98, 401–407 p.
60. Deng, J., Elberger, A.J., 2003, Corpus callosum and visual cortex of mice with deletion of the NMDA-NR1 receptor. II. Attenuation of prenatal alcohol exposure effects, *Developmental Brain Research*, 144, 135-150 p.
61. Dobbing, J., 1970, Undernutrition and the developing brain: The relevance of animal models to the human problem, *Am J Dis Child.*, 120:411 p.
62. Dobbing, J., Sands, J., 1973, Quantitative growth and development of the human brain, *Arch. Dis. Child.*, (48) 757– 767 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

63. Dobbing, J., Sands, J., 1979, Comparative aspects of the brain growth spurt, *Early Human Development*, 3, 79-83 p.
64. Dobbing, J., 1981, The later development of the brain and its vulnerability. In: J.A. Davis, Dobbing J. (Eds.), *Scientific Foundations of Pediatrics*. 2nd. Ed., London: William Heinemann Medical Books, 841–847 p.
65. Dutt, P., Spriggs, C.N., Davies, P.L., Jia, Z., Elce, J.S., 2002, Origins of the difference in Ca^{2+} requirement for activation of μ - and *m*-calpain, *Biochem. J.*, 367: 263–269 p. PMID 12014988
66. Eckardt, M.J., File, S.E., Gessa, G.L., Grant, K.A., Guerri, C., Hoffman, P.L., Harold, K., George, F.K., Ting-Kai, L., Tabakoff, B., 1998, Effects of moderate ethanol consumption on the central nervous system, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22, 998–1040 p.
67. Eckert, G.P., Lipka, U., Muller, W.E., 2013, Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: Focus on mitochondria, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 88, 105–114 p.
68. Eckhart, L., Uthman, A., Sipos, W., Tschachler, E., 2006, Genome Sequence Comparison Reveals Independent Inactivation of the Caspase-15 Gene in Different Evolutionary Lineages of Mammals, *Mol. Biol.Evol.*, 23: 11 2081-2089 p.
69. El-Ansary, A.K., Al-Daihan, S.K.R., El-Gezeery, A.R., 2011, On the protective effect of omega-3 against propionic acid-induced neurotoxicity in rat pups, *Lipids in Health and Disease*, 10:142 p
70. Entrez Gene: CASP3 caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
71. Entrez Gene: CTSB cathepsin B
72. Ertem, K., Kekilli, E., Elmalı, N., Ceylan, F., 2006, The Effects of Alcohol Exposure During Intrauterine and Postnatal Period on Bone Mineral Density and Bone Growth and Body Weight in Rats' Virgin Offspring, *Eur J Gen Med.*, 3(2):54-57 p.
73. Fadda, F., Rossetti, Z.L., 1998, Chronic ethanol consumption: from Neuroadaptation to Neurodegeneration, *Progress in Neurobiology*, 56, 385– 431 p.
74. Faingold, C.L., N'Gouemo, P., Riaz, A., 1998, Ethanol and neurotransmitter interactions – from molecular to integrative effects, *Prog Neurobiol*, 55, 509-535 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

75. Fakoya, F.A., Caxton-Martins, E.A., 2006, Neocortical neurodegeneration in young adult Wistar rats prenatally exposed to ethanol, *Neurotoxicology and Teratology*, 28, 229–237 p.
76. Fattoretti, P., Bertoni-Freddari, C., Casoli, T., Di Stefano, G., Giorgetti, G., Solazzi, M., 2003, Ethanol-induced decrease of the expression of glucose transport protein (Glut3) in the central nervous system as a predisposing condition to apoptosis: the effect of age, *Ann N Y Acad Sci*, 1010:500–503p.
77. Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V., Role of Apoptosis in disease, *AGING*, 2012, Vol. 4, No 5 p.
78. Finkelstein, J.D., 1990, Methionine metabolism in mammals, *J Nutr Biochem*, 1(5):228–237 p.
79. Fleming, M., Mihic, S.J., Haris, R.A., Hardman, J.G., Limbird, L.E., 2001, Ethanol, *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edR, Pregamon Press, New York, 429–445 p.
80. Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D., Storts, D., 1998, Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR Promega Notes Number 65, 27 p.
81. Friedlander, R.M., 2003, Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases, *N. Engl. J. Med.*, 348: 1365-1375 p. DOI: 10.1056/NEJMra022366
82. Fujise, T., Iwakiri, R., Wu, B., Amemori, S., Kakimoto, T., Yokoyama, F., Sakata, Y., Tsunada, S., Fujimoto, K., 2006, Apoptotic pathway in the rat small intestinal mucosa is different between fasting and ischemia-reperfusion, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291, 1, 110-116 p.
83. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Núñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G., 2012, Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death and Differentiation*, 19, 107–120 p.
84. Ganesan, B., Anandan, R., 2009, Protective effect of betaine on changes in the levels of lysosomal enzyme activities in heart tissue in isoprenaline-induced myocardial infarction in Wistar rats, *Cell Stress Chaperones*, 14(6): 661–667 p. doi: 10.1007/s12192-009-0111-3 PMID: PMC2866953

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

85. Goodlett, C.R., Horn, K.H., 2001, Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system, *Alcohol Res Health*, 25:175–184 p.
86. Goodlett, C.R., Horn, K.H., Zhou, F.C., 2005, Alcohol Teratogenesis: Mechanisms of Damage and Strategies for Intervention, *Exp Biol Med*, 230:394–406 p.
87. Graf, D., Kurz, A.K., Reinehr, R., Fischer, R., Kircheis, G., Haussinger, D., 2002, Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver, *Hepatology*, 36, 829-839 p.
88. Grunnet, L.G., Aikin, R., Tonnesen, M.F., Paraskevas, S., Blaabjerg, L., Størling, J., Rosenberg, L., Billestrup, N., Maysinger, D., Mandrup-Poulsen, T., 2009, Proinflammatory Cytokines Activate the Intrinsic Apoptotic Pathway in β -cells, *Diabetes*, 58, 8, 1807-15p.
89. Guerri, C., Renau-Piqueras, J., 1997, Alcohol, astroglia, and brain development, *Molecular Neurobiology*, 15, 65–81 p.
90. Guerri, C., 1998, Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure, *Alcohol Clin Exp Res.*, 22:304–312 p.
91. Guilliams, T.G., 2004, Homocysteine - A risk factor for vascular diseases: Guidelines for the clinical practice, *J Am Nutraceut Assoc.*, 7(1):1-24 p.
92. Gülelçin N. D., Gibberellik Asit ve 24-Epibrassinolid'in Tuz Stresi Koşullarında Çimlenirilen Arpa (*Hordeum vulgare*) Tohumlarında Total DNA ve Protein İçeriğine Etkilerinin Tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta-2008
93. Haworth, J.C., Dilling, L.A., Surtees, R.A., Seargeant, L.E., Lue-Shing, H., Cooper, B.A., Rosenblatt, D.S., Symptomatic and asymptomatic methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in two adult brothers, *Am J Med Genet.*, 1993; 45:572–576 p.
94. Henderson, G.I., Chen, J.J., Schenker, S., 1999, Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus, *Front Biosci.*, 4:D541–D550 p.
95. Ho, P.I., Collins, S.C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E., Shea, T.B., Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress, *J Neurochem.*, 2001; 78:249–253 p.
96. Hoek, J.B., Cahill, A., Pastorino, J.G., 2002, Alcohol and mitochondria: A dysfunctional relationship, *Gastroenterology*, 122, 2049–2063 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

97. Holownia, A., Ledig, M., Mapoles, J., Menez, J.F., 1996, Acetaldehyde-induced growth inhibition in cultured rat astroglial cells, *Alcohol*, 13:93–97 p.
98. Holownia, A., Ledig, M., Menez, J.F., 1997, Ethanol-induced cell death in cultured rat astroglia, *Neurotoxicol Teratol.*, 19:141–146 p.
99. Horrocks, L.A., Yeo, Y.K., 1999, Health Benefits Of Docosahexaenoic Acid (DHA), *Pharmacological Research*, Vol. 40, No. 3
100. <http://ipi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/omega3fa/fig1.html>
101. <http://www.abcam.com/ps/pdf/cardiovascular/autophagic.pdf>
102. Huber, T., Rajamoorthi, K., Kurze, V.F., Beyer, K., Brown, M.F., 2002, Structure of docosahexaenoic acid-containing phospholipid bilayers as studied by (2)H NMR and molecular dynamics simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 298–309 p.
103. Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovskaa, V., Horster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W., 2000, Ethanol-Induced Apoptotic Neurodegeneration and Fetal Alcohol Syndrome, *Science*, 287, 1056–60 p.
104. İşlekel, H., İşlekel, S., Güner, G., Ozdamar, N., 1999, Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia–reperfusion, *Brain Res*, 2, 843,18–24p.
105. İltter, T., Tekin, F., 2005, Alkol Metabolizması Güncel Gastroenteroloji, 9/1
106. Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., Sokol, R.J., Ager, J.W., 1998, Relation of maternal age and pattern of pregnancy drinking to functionally significant cognitive deficit in infancy, *Alcohol Clin Exp Res*, 22:345–351 p.
107. Jiang, Q., Hu, Y., Wu, P., Cheng, X., Li, M., Yu, D., Deng, J., 2007, Prenatal alcohol exposure and the neuroapoptosis with long-term effect in visual cortex of mice, *Alcohol - Alcoholism*, Vol. 42, No. 4, 285–290 p.
108. Jones, K.L., Smith, D.W., 1973, Recognition of fetal alcohol syndrome in early infancy, *Lancet*, 2, 999–1001 p.
109. Jump, D.B., 2002, The Biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, No. 11, 8755–8758 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

110. Kanbak, G., Arslan, O.C., Dokumacıoğlu, A., Kartkaya, K., İnal, M.E., 2008, Effects of chronic ethanol consumption on brain synaptosomes and protective role of betaine, *Neurochem. Res.*, 33 (3), 539-544 p.
111. Kay, H.H., Grindle, K.M., Magness, R.R., 2000, Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity, *Am J Obstet Gynecol.*, 182(3):682-688 p.
112. Kaya, M., 2005, Bir Kalpain İnhibitörü Olan Ak295'in Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzmanlık Tezi, 32-37 s.
113. Kayaalp, S.O., Uzbay, İ.T., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 61. Konu Alkoller, 11. Baskı, Hacettepe-Taş, Ankara, 2005.
114. Kelkar, S., Dong, Q., Xiao, Y., Joshi-Barve, S., McClain, C.J., Barve, S.S., 2002, Ethanol enhances activation-induced caspase-3 dependent cell death in T lymphocytes, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26, 3, 363-70 p.
115. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26:239-245 p.
116. Kharbanda, K.K., Todero, S.L., King, A.L., Osna, N.A., McVicker, B.L., Tuma, D.J., Wisecarver, J.L., Bailey, S.M., 2012, Betaine Treatment Attenuates Chronic Ethanol-Induced Hepatic Steatosis and Alterations to the Mitochondrial Respiratory Chain Proteome, *International Journal of Hepatology* Volume 2012, Article ID 962183, 10 pages doi:10.1155/2012/962183
117. Kim, S.K., Kim, Y.C., Kim Y.C., 1998, Effects of singly administered betaine on hepatotoxicity of chloroform in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 36, 655-661 p.
118. Kim, Y.D., Eom, S.Y., Ogawa, M., Oyama, T., Isse, T., Kang, J.W., Zhang, Y.W., Kawamoto, T., Kim, H., 2007, Ethanol-induced oxidative DNA damage and CYP2E1 expression in liver tissue of Aldh2 knockout mice, *J Occup Health*, 49, 5, 363-369 p.
119. Kim, H.Y., 2008, Biochemical and Biological Functions of Docosahexaenoic Acid in the Nervous System: Modulation by Ethanol, *Chem Phys Lipids.*, 153(1): 34-46 p.
120. Kodituwakku, P.W., 2007, Defining the behavioral phenotype in children with fetal alcohol spectrum disorders; a review, *Neurosci Biobehav Rev.*, 31(2):192-201 p.
121. Koob, G.F., 2003, Alcoholism: allostasis and beyond, *Alcohol Clin Exp Res*, 27, 232-243 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

122. Kotch, L.E., Sulik, K.K., 1992, Experimental fetal alcohol syndrome: proposed pathogenic basis for a variety of associated facial and brain anomalies, *Am J Med Genet.*, 44:168–176 p.
123. Kril, J.J., Halliday, G.M., 1999, Brain shrinkage in alcoholics: a decade on and what have we learned?, *Progress in Neurobiology*, 58, 381–387 p.
124. Kulkarni, A., Dangat, K., Kale, A., Sable, P., Chavan-Gautam, P., Joshi, S., 2011, Effects of Altered Maternal Folic Acid, Vitamin B12 and Docosahexaenoic Acid on Placental Global DNA Methylation Patterns in Wistar Rats, *PLoS ONE*, 6(3): e17706. doi:10.1371/journal.pone.0017706
125. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., *Basic Pathology*, 2003, 7. edition 3-30
126. Lai, P.C., Huang, Y.T., Wu, C.C., Lai, C.J., Wang, P.J., Chiu, T.H., 2011, Ceftriaxone attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats, *Journal of Biomedical Science*, 18:69 p.
127. Langman, L.J., Cole, D.E., 1999, Homocysteine, *Crit Rev Clin Lab Sci*, 36:365-406 p.
128. Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H., 2005, Caspases: pharmacological manipulation of cell death, *J.Clin.Invest.*, 115(10): 2665–2672 p. doi:10.1172/JCI26252. PMC 1236692. PMID 16200200.
129. Li, M., Ona, V.O., Chen, M., Kaul, M., Tenneti, L., Zhang, X., Stieg, P.E., Lipton, S.A., Friedlander, R.M., 2000, Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury, *Neuroscience*, 99: 333-342 p.
130. Lieber, C.S., 2003, Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease, *Alcohol Res Health*, 27, 3, 220-231 p.
131. Lieberman, M., Marks, A., Simith, C., 2007, Pathways of Sugar and Alcohol Metabolism: Fructose, Galactose, Pentose Phosphate Pathway, and Ethanol Metabolism, In: *Marks' Essential Medical Biochemistry*, 2nd Edition, Lieberman, M., Marks, A., Simith. C., Eds. Lippincott Williams & Wilkins, 341-359 p.
132. Light, K.E., Belcher, S.M., Pierce, D.R., 2002, Time course and manner of Purkinje neuron death following a single ethanol exposure on postnatal day 4 in the developing rat, *Neuroscience*, 114:327–337 p.
133. Lindsley, T.A., Kerlin, A.M., Rising, L.J., 2003, Time-lapse analysis of ethanol's effects on axon growth in vitro, *Brain Res Dev Brain Res*, 147:191–199 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

134. Littleton, J.,1998, Neurochemical mechanisms underlying alcohol withdrawal, *Alcohol Health Res World*, 22, 1, 13–24 p.
135. Makrides, M., Neumann, M.A., Gibson, R.A., 1996, Is dietary docosahexaenoic acid essential for term infants?, *Lipids*, Jan;31(1):115-9 p.
136. Martin, D.S., Lonergan, P.E., Boland, B., Fogarty, M.P., Brady, M., Horrobin, D.F., Campbell, V.A., Lynch, M.A., 2002, Apoptotic changes in the aged brain are triggered by interleukin-1beta-induced activation of p38 and reversed by treatment with eicosapentaenoic acid, *J. Biol. Chem.*, 277(37) ,34239–34246 p.
137. Martinez-Vicente, M., Sovak, G., Cuervo, A.M.,2005, Protein degradation and aging, *Exp Gerontol.*, 40(8-9):622-33 p.
138. Masters, C., 1996, Omega-3 fatty acids and the peroxisome, *Mol Cell Biochem*, 165: 83-93 p.
139. Mattson, M.P., Kruman, I.I., Duan, W., 2002, Folic acid and homocysteine in age-related disease, *Ageing Res Rev.*, 1:95-111 p.
140. Mattson, M.P., Shea, T.B., 2003, Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders, *Trends Neurosci.*, 26:137-146 p. Review.
141. May, P.A., Gossage, J.P., Marais, A.S., Hendricks, L.S., Snell, C.L., Tabachnick, B.G., Stellavato, C., Buckley, D.G., Brooke, L.E., Viljoen, D.L.,2008, Maternal risk factors for fetal alcohol syndrome and partial fetal alcohol syndrome in South Africa: A third study, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32, 738–753p.
142. May, P.A.,2011, Researching the prevalence and characteristics of FASD in international settings. In: Riley EP, Clarren S, Weinber J, Jonsson E, eds. *Fetal Alcohol Spectrum Disorder:Management and Policy Perspectives of FASD*, Weinheim, Germany:Wiley-Blackwell, 17-24 p.
143. McAlhany, R.E., West, J.R., Miranda, R.C.,2000, Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol-induced apoptosis and JUN kinase phosphorylation, *Developmental Brain Research*, 119, 209-216 p.
144. McCue, K.F., Hanson, A.D., 1990, Drought and salt tolerance: towards understanding and application, *Trends Biotechnol.*,8:358–362 p.
145. McCue, K.F., Hanson, A.D.,1992, Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression, *Plant Mol Biol.*,18:1–11 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

146. McDonald, M.C., Mota-Filipe, H., Paul, A., Cuzzocrea, S., Abdelrahman, M., Harwood, S., Plevin, R., Chatterjee, P.K., Yaqoob, M.M., Thiernemann, C., 2001, Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock, *FASEB J*, 15, 1, 171-186p.
147. McKeever, M.P., Weir, D.G., Molloy, A., Scott, J.M., 1991, Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat, *Clin Sci (Lond)*, 81:551-556 p.
148. Metin, K., 2007, Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri, Moleküler Biyoloji. (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B.), 555-597, Nobel, Ankara.
149. Milotová, M., Ríljak, V., Jandová, K., Bortelová, J., Marešová, D., Pokorný, J., Langmeier, M., 2008, Changes of Hippocampal Neurons after Perinatal Exposure to Ethanol, *Physiol. Res.*, 57: 275-282 p.
150. Miki, T., Harris, S.J., Wilce, P., Takeuchi, Y., Bedi, K.S., 2000, A Stereological analysis of the effect of early postnatal ethanol exposure on neuronal numbers in rat dentate gyrus, *Image Anal Stereol*;19:99-104 p.
151. Miki, T., Harris, S.J., Wilce, P., Takeuchi, Y., Bedi, K.S., 2000, Neurons in the hilus region of the rat hippocampus are depleted in number by exposure to alcohol during early postnatal life, *Hippocampus*, 10, 284–295 p.
152. Miki, T., Kuma, H., Yokoyama, T., Sumitani, K., Matsumoto, Y., Kusaka, T., Warita, K., Wang, Z.Y1., Hosomi, N., Imagawa, T., Bedi, K.S., Itoh, S., Nakamura, Y., Takeuchi, Y., 2008, Early postnatal ethanol exposure induces fluctuation in the expression of BDNF mRNA in the developing rat hippocampus, *Acta Neurobiol Exp*, 68: 484-493 p.
153. Miller, M.W., 1986, Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons, *Science*, 233, 1308–1311 p.
154. Miller, M.W., 1995, Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 19, 1500–1509 p.
155. Miller, M.W., 1996, Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursors cells in the cerebral cortex, *Alcohol Clin Exp Res*, 20:139–143p.
156. Miller, M.W., 1996, Effect of early exposure to ethanol on the protein and DNA contents of specific brain regions in the rat, *Brain Research*, 734, 286 -294p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

157. Miller, M.W., 1996, Mechanisms of ethanol induced neuronal death during development: From the molecule to behavior, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20, 128–132 p.
158. Miller, A.L., Kelly, G.S., 1996, Methionine and homocysteine metabolism and the nutritional prevention of certain birth defects and complications of pregnancy, *Alt Med Rev.*, 1:220-235 p.
159. Miller, M.W., 1997, Effects of prenatal exposure to ethanol on callosal projection neurons in rat somatosensory cortex, *Brain Research*, 766:121–128 p.
160. Miller, A.L., 2003, The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases, *Altern Med Rev*; 8:7-19 p.
161. Mills, J.D., Hadley, K., Bailes, J.E., 2011, Dietary supplementation with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in traumatic brain injury, *Neurosurgery*, 68(2):474-81 p. doi: 10.1227/NEU.0b013e3181ff692b.
162. Milotová, M., Riljak, V., Jandová, K., Langmeier, M., Marešová, D., Pokorný, J., Trojan, S., 2006, Alcohol Abuse in Mothers during Gravidity and Breastfeeding Brings Changes of Hippocampal Neurons in their Offspring, *Prague Medical Report*, Vol. 107 No. 1, 103–107 p.
163. Mineer, S.E., Evrovski, J., Cole, D., 1997, Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism, *An Update. Clin Bioch.*, 30:189-201 p.
164. Morse, N.L., 2012, Benefits of Docosahexaenoic Acid, Folic Acid, Vitamin D and Iodine on Foetal and Infant Brain Development and Function Following Maternal Supplementation during Pregnancy and Lactation, *Nutrients*, 4, 799-840 p. doi:10.3390/nu4070799 Review
165. Mudd, S.H., Levy, H.L., Skovby, F., 1995, Disorders of transsulfuration, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 1279-1328 p.
166. Mukherjee, P.K., Chawla, A., Loayza, M.S., Bazan, N.G., 2007, Docosanoids are multifunctional regulators of neural cell integrity and fate: Significance in aging and disease, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 77, 233–238 p.
167. Naassila, M., Daoust, M., 2002, Effect of prenatal and postnatal ethanol exposure on the developmental profile of mRNAs encoding NMDA receptor subunits in rat hippocampus, *Journal of Neurochemistry*, 80, 850-860p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

168. Naseer, M.I., Ullah, N., Ullah, I., Koh, P.O., Lee, H.Y., Park, M.S., Kim, M.O., 2011, Vitamin C protects against ethanol and PTZ-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat hippocampal neurons, *Synapse*, 65, 562-571, 2011.
169. Nelson, A.C., Haan, M., Thomas, K.M., 2006, *Neuroscience of Cognitive Development: The Role of Experience and The Developing Brain*, Canada: John Wiley & Sons
170. Noda, T., Iwakiri, R., Fujimoto, K., Matsuo, S., Aw, T.Y., 1998, Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 274, 2,1, 270-6 p.
171. Northington, F.J., Chavez-Valdez, R., Martin, L.J., 2011, Neuronal Cell Death in Neonatal Hypoxia-Ischemia, *Annals of Neurology*, Volume 69, Issue 5, pages 743–758 p.
172. Okada, T, Kawakami, S, Nakamura, Y, Han, K.H., Ohba, K, Aritsuka, T, Uchino, H, Shimada, K, Sekikawa, M, Ishii, H, Fukushima, M., 2011, Amelioration of D-Galaktosamine induced Acute Liver Injury in Rats By Dietary Supplementation with Betaine Derived from sugar Beet Molasses, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(7), 1335-1341 p.
173. OrthoMaM phylogenetic marker: CASP3 coding sequence
174. Paintner, A., Williams, A.D., Burd, L., 2012, Fetal Alcohol Spectrum Disorders—Implications for Child Neurology, Part 1: Prenatal Exposure and Dosimetry *Journal of Child Neurology*, 27(2) 258-263 p. DOI: 10.1177/0883073811428376
175. Paintner, A., Williams, A.D., Burd, L., 2012, Fetal Alcohol Spectrum Disorders—Implications for Child Neurology, Part 2: Diagnosis and Management. *Journal of Child Neurology* 27(3) 355-362 p. DOI: 10.1177/0883073811428377
176. Park, H.K, Seol, I,J, Kim, K.S, 2011, Protective Effect of Hypoxic Preconditioning on Hypoxic-Ischemic Injured Newborn Rats, *J Korean Med Sci* 26: 1495-1500 p.
177. Patten, A.R., Brocardo, P.S., Christie, B.R., 2013, Omega-3 supplementation can restore glutathione levels and prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure, *J Nutr Biochem*. May;24(5):760-9 p. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.04.003. Epub 2012 Jul 25.
178. Perry, D.K., Smyth, M.J., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Duriez, P, Poirier, G.G., Hannun, Y.A., 1997, Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis, *J. Biol. Chem.* 272 (30):18530-3. doi:10.1074/jbc.272.30.18530. PMID 9228015.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

179. Polster, B.M., Basañez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., Nicholls, D.G.,2005, Calpain I Induces Cleavage and Release of Apoptosis-inducing Factor from Isolated Mitochondria, *J Biol Chem.*,280(8):6447-54 p. DOI 10.1074/jbc.M413269200
180. Prasad, V.V.T.S., 1992, Effect of Prenatal and Postnatal Exposure to Ethanol on Rat Central Nervous System Gangliosides and Glycosidases, *LIPIDS*, Vol. 27, no. 5
181. Qiang, M., Wang, M.W., Elberger, A.J.,2002, Second trimester prenatal alcohol exposure alters development of rat corpus callosum, *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 719–732 p.
182. Rajgopal, Y., Vemuri, M.C. , 2002, Calpain activation and a-spectrin cleavage in rat brain by ethanol, *Neurosci Letters*, 321, 187–191 p.
183. Ramachandran, V., Perez, A., Chen, J., Senthil, D., Schender, S., Hendersen, G.,2001, In utero ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction, which can result in apoptotic cell death in fetal brain: a potential role for 4-hydroxynonenal, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 25, 6, 862-871 p.
184. Rapoport, S.I.; Rao, J.S.; Igarashi, M., 2007, Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 77, 251–261.
185. Rapoport, S.I.,2008, Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascades are selectively altered by drugs, diet and disease, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 79, 153–156 p. DOI: 10.1016/j.plefa.2008.09.010
186. Ratnayake, W.M.N., Gilani, G.S., 2004, Nutritional and Health Effects of Dietary Fats, *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(4):205-212 p.
187. Ray, S.K., Matzelle, D.D., Wilford, G.G., Hogan, E.L., Banik, N.L., 2001, Inhibition of calpain-mediated apoptosis by E-64 d-reduced immediate early gene (IEG) expression and reactive astrogliosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats, *Brain Res.*, 916:115-126 p. PMID:11597598
188. Ray, S.K., Hogan, E.L, Banik, N.L.,2003, Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors, *Brain Res.Reviews*, 42: 169-185 p.
189. Repnik, U., Turk, B., 2010, Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death, *Mitochondrion*, 10,6, 662-669p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

190. Ross, B.M., Seguin, J., Sieswerda, L.E., 2007, Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid?, *Lipids in Health and Disease*, 6:21p.
191. Salvesen, G.S., 2002, Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows, *Cell Death Differ.*, 9 (1): 3–5 p. doi:10.1038/sj.cdd.4400963. PMID 11803369.
192. Salway, J.G., 1999, *Metabolism at a Glance*, Foreword by Granner D.K., second edition.
193. Sampson, P.D., Streissguth, A.P., Bookstein, F.L., Little, R.E., Clarren, S.K., Dehaene, P., Hanson, J.W., Graham, J.M., 1997, Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder, *Teratology*, 56, 317–326 p.
194. Sanchis, R, Sancho-Tello, M, Guerri, C 1989, The role of liquid diet formulation in the postnatal ethanol exposure of rats via mother's milk, *J Nutr.*, 119(1):82-8 p.
195. Sari, Y., Zhang, M., Mechref, Y., 2010, Differential expression of proteins in fetal brains of alcohol-treated prenatally C57BL/6 mice: A proteomic investigation, *Electrophoresis*, 31, 483-496 p.
196. Savage, D.D., Becher, M., De La Torre, A.J., Sutherland, R.J., 2002, Dose-dependent effects of prenatal ethanol exposure on synaptic plasticity and learning in mature offspring, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26, 1752–1758 p.
197. Savage, D.D., Rosenberg, M.J., Wolff, C.R., Akers, K.G., El-Emawy, A., Staples, M.C., Varaschin, R.K., Wright, C.A., Seidel, J.L., Caldwell, K.K., Hamilton, D.A., 2010, Effects of a novel cognition-enhancing agent on fetal ethanol-induced learning deficits, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34, 10, 1793-802 p.
198. Schuler, M., Gren, D.R., 2001, Mechanisms of p53-dependent apoptosis, *Biochem. Soc. Trans.*, 29 684–688 p.
199. Schwartzman, R.A., Cidloski, J.A., 1993, Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death, *Endocrine Reviews*, 14:133-144 p.
200. Seshadri, N, Robinson, K., 2000, Homocysteine, B vitamins and coronary artery disease, *Med Clin North Am*, 84:215-237 p.
201. Shibley, I.A.J., Pennington, S.N., 1997, Metabolic and mitotic changes associated with the fetal alcohol syndrome, *Alcohol* 32:423–434 p.
202. Sinclair, A.J., Begg, D., Mathai, M., Weisinger, R.S., 2007, Omega 3 fatty acids and the brain: Review of studies in depression, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 16, 391–397 p.
203. Slawecki, C.J., Thomas, J.D., Riley, E.P., Ehlers, C.L., 2004, Neurophysiologic consequences of neonatal ethanol exposure in the rat, *Alcohol*, 34(2-3):187-96 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

204. Snyder, A.K., Jiang, F., Singh, S.P., 1992, Effects of ethanol on glucose utilization by cultured mammalian embryos, *Alcohol Clin Exp Res.*, 16:466–470 p
205. Soeda, J, Miyagawa, S, Sano, K, Masumoto, J, Taniguchi, S, Kawasaki, S., 2001, Cytochrome *c* release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 281: 1115–1123 p.
206. Springer, J.E., Azbill, R.D., Nottingham, S.A., Kennedy, S.E., 2000, Calcineurin-Mediated BAD Dephosphorylation Activates the Caspase-3 Apoptotic Cascade in Traumatic Spinal Cord Injury, *The Journal of Neuroscience*; 20: 19 7246-7251 p.
207. Squier, M.K., Miller, A.C., Malkinson, A.M., Cohen, J.J., 1994, Calpain activation in apoptosis, *J Cell Physiol.*, 159 (2) :229-37p.
208. Srinivasan, S., Avadhani, N.G., 2012, Cytochrome *c* oxidase dysfunction in oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 53, 1252–1263 p.
209. Stahl, S.M., 2003, *Temel Psikofarmakoloji Nörobilimsel Temeli ve Pratik Uygulamaları*. Taneli B, Taneli Y (Çevirenler) 2. Baskı, İstanbul: Yelkovan Yayıncılık.
210. Stennicke, H.R, Renatus, M., Meldal, M., Salvesen, G.S., 2000, Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8, *Biochem. J.*, 350 Pt 2: 563–8 p. PMC 1221285. PMID 10947972.
211. Stratton, K., Howe, C., Battaglia, F., 1996, *Fetal ethanol syndrome: Diagnosis, epidemiology, prevention, and treatment*, Washington, DC: National Academy Press.
212. Streck, E.L., Bavaresco, C.S., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2004, Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task, *Behav Brain Res*, 153:377-381 p.
213. Sun, A.Y., Ingelman-Sundberg, M., Neve, E., Matsumoto, H., Nishitani, Y., Minowa, Y., Fukui, Y., Bailey, S.M., Patel, V.B., Cunningham, C.C., Zima, T., Fialova, L., Mikulikova, L., Popov, P., Malbohan, I., Janebova, M., Nesper, K., Sun, G.Y., 2001, Ethanol and Oxidative Stress, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25, 5, 237–243 p.
214. Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., Sorimachi, H., 2004, Structure, Activation, and Biology of Calpain, *Diabetes*, 53, 1, 12-18p
215. Tassoni, D., Kaur, G., Weisinger, R.S., Sinclair, A.J., 2008, The role of eicosanoids in the brain, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 17, 220–228 p.
216. Tavernarakis, N., 2006, Proteolytic pathways in necrotic cell death , *BTİ*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

217. Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, *Nature Reviews Molecular Cell*, 9, 231-241 p. doi:10.1038/nrm2312
218. Thomas, J.D., Riley, E.P., 1998, Fetal alcohol syndrome: Does alcohol withdrawal play a role?, *Alcohol Health Res World*, 22:47–53 p.
219. Thornberry, N.A., 1996, The caspase family of cysteine proteases, *British Medical Bulletin*, 53: 3 478-490 p.
220. Tiso, N., Pallavicini, A., Muraro, T., Zimbello, R., Apolloni, E., Vale, G., Lanfranchi, G., Danieli, G.A., 1996, Chromosomal localization of the human genes, CPP32, Mch2, Mch3, and Ich-1, involved in cellular apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 225, 3, 983-9 p.
221. Tsai, G.E., Ragan, P., Chang, R., Chen, S., Linnoila, M.V., Coyle, T.J., 1998, Increased Glutamatergic Neurotransmission and Oxidative Stress After Alcohol Withdrawal, *Am J Psychiatry*, 155, 726-732 p.
222. Turner, N., Else, P., Hulbert, A.J., 2003, Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: Implications for disease states and metabolism, *Naturwissenschaften*, 90, 521–523 p.
223. Venkat, C., 2005, Omega-3 Fatty Acids, *Journal of the American College of Nutrition*, 21:495-505 p.
224. Viberg, H., Ponten, E., Eriksson, P., Gordh, T., Fredricksson, A., 2008, Neonatal ketamine exposure results in changes in biochemical substrates of neuronal growth and synaptogenesis, and alters adult behavior irreversibly, *Toxicology*, 249:153-159 p.
225. Weibel, E.R., 1969, Stereological principles for morphometry in electron microscope cytology, *International Review Cytology*, 26, 235-302 p.
226. Wu, B.T.F., Dyer, R.A., King, J.D., Richardson, K.J., Innis, S.M., 2012, Early Second Trimester Maternal Plasma Choline and Betaine Are Related to Measures of Early Cognitive Development in Term Infants, *PLOS ONE* | Volume 7 | Issue 8 | e43448
227. Wyllie, A.H., 1997, Apoptosis: an overview, *Br. Med. Bull.*, 53 (3): 451–65 p. PMID 9374030.
228. Xu, Y., Liu, P., Li, Y., 2005, Impaired development of mitochondria plays a role in the central nervous system defects of fetal alcohol syndrome, *Birth Defects Research Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 73, 83–91 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

229. Yorimitsu, T., Klionsky, D.J., 2005, Autophagy: molecular machinery for self-eating, *Cell Death Differ*,12 Suppl 2:1542–52 p.
230. Young, C., Roth, K.A., Klocke, B.J., West, T., Holtzman, D.M., Labruyere, J., Qin, Y.Q., Dikranian, K., Olney, J.W.,2005, Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration, *Neurobiology Of Disease*,20, 608–614 p.
231. Zakhari, S.,2006, Overview: how is alcohol metabolized by the body?, *Alcohol Res Health*, 29, 4, 245-54 p.
232. Zeybek, B., Türkmen, G., Sıçanlara Oral Yolla Uzun Süreli Uygulanan Alkolün Gebelik öncesi, Gebelik ve Laktasyon Dönemlerinde Serum İnsülin ve Glukagon Hormon Düzeylerine Etkisi, *Turk J Vet Anim Sci.*, 2002; 26 799-804 p.
233. Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J.W., Brunk, U.T., 2003, Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis, *European Journal of Biochemistry*, 270,18, 3778-3786 p.
234. Zovein, A., Flowers-Ziegler, J.,Thamotharan, S., Shin, D., Sankar, R., Nguyen, K., Gambhir, S., Devaskar, S.U., 2004, Postnatal hypoxic-ischemic brain injury alters mechanisms mediating neuronal glucose transport, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286: 273–282 p.
235. Zutphen van, L.F.M., Baumans, V., Beyren, A.C., *Principles of Laboratory Animal Science*, Elsevier Science Publisher B.V., Netherlands, 1993

8. ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı	:Kevser KUŞAT OL
Doğum tarihi ve yeri	:03.03.1981
Uyruğu	:T.C.
Medeni durumu	:Evli
İletişim adresleri	:kkusat@hotmail.com- 05057570881

Eğitim Durumu

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Biyokimyagerlik opsiyonu 2002-2007

Yük.Lis.: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı 2007-2009

Doktora: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 2009-....

Yabancı Diller

- İngilizce ÜDS:66,250
- Almanca

Mesleki Deneyim

Eskişehir SSK Dispanseri laboratuvarı 2001 – 2002

S.B. İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2002 – 2007

S.B. Bakırköy İl Halk Sağlığı laboratuvarı 2007

S.B. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2007 - 2009

S.B.Eskişehir Devlet Doğumevi 2009-2010

S.B.Eskişehir Yunusemre Devlet Hastanesi 2010-2012

Türkiye İlaç Ve Tıbbi Cihaz Kurumu 2012-

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar : Kimyagerler Derneği

Yayınlar

1-Cox-2 gene polymorphism and IL-6 levels in coronary artery disease

K.K. Ol, B. Agachan, U. Gormus, B. Toptas and T. Isbir

Genet. Mol. Res. 10 (2): 810-816 (2011) DOI 10.4238/vol10-2gmr967

2- Effect of kefir and low dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unhypertensive rats with 4 weeks salt diet

Kanbak G, Uzuner K, Kuşat Ol K, Oğlakçı A, Kartkaya K, Sentürk H.

Clin. Exp. Hypertens. 2014;36(1):1-8. doi: 10.3109/10641963.2013.783046. Epub 2013 Apr 30

Sözlü Bildiri

1-Betainin sıçanlarda oluşturulan deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde önleyici etkisi
XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi S-027 No.lu 3-6 Eylül 2013

Poster Bildiri

1-Effect of Morinda citrifolia (noni) and low dose aspirin on isoproterenol induced myocardial infarction in rats 39 no.lu poster FEBS Special Meeting 14-16 Kasım 2012

2-Effect of kefir and low dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unhyertensive rats with 4 weeks salt diet 40 nolu poster sunumu FEBS Special Meeting 14-16 Kasım 2012

3-Morinda citrifolia (noni) ve aspirinin miyokard infarktüsünde oksidatif stresi önleyici etkisi XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi P-197 nolu 3-6 Eylül 2013

4-20 yaş ve üzeri erişkinlerde metabolik sendrom sıklığı ve bunu etkileyen faktörler, 16.Ulusal Halk Sağlığı Kongresi, 28-31 Ekim 2013

Bilimsel Etkinlikler

Projeler

1002 TUBİTAK PROJESİ: Ratlarda İzoproterenol İle Oluşturulan Kalp Krizi Modelinde Kronik Alkol Kullanımının Miyokardiyal Apoptoz Üzerine Etkisi ve Kalpain İnhibitörü 1'in (N-Asetil-Lösın-Lorlösinal) Kardiyoprotektif Rolünün Araştırılması, Araştırmacı, 2012-2013

Kongre, Kurs

1-Microsoft sertifikasyon programları – Vatan Bilgisayar Kursu M.E.B: Onaylı 14/08-05/10/2000

2-İstanbul Üniversitesi –II. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu Katılım ve PCR Çalışma Belgesi 18-21/03/2005

3-Ege Üniversitesi – EBİLTEM- Adli Bilimlerde Güncel Gelişmeler sempozyumu 25/03/2005

4-Adli Tıp Kurumu – Adli Kimya Kursu 11-13/12/2007

5- Klinikte ve Tedavide Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi 29-05/01-06/2008 ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Metodlara Giriş Uygulamalı Kursu(Real time PCR Kursu)

6-ESOGÜ Deney Hayvanları Kullanımı Temel Eğitimi Araştırmacı Sertifikası 05/2011

7-FEBS Special Meeting 14-16 Kasım 2012

8. XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi 3-6 Eylül 2013

9-17025: 2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği (Laboratuvar Akreditasyonu)- TSC Yönetim Sistemleri Akademisi-9 Aralık 2013



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 25. 07. 2013
TOPLANTI SAYISI : 59
DOSYA KAYIT NUMARASI : 258-2
KARAR NUMARASI : 258-2
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof. Dr. Güngör KANBAK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Prof. Dr. Ferruh YÜCEL
Yrd. Doç.Dr. Dilek BURUKOĞLU
Doktora öğrencisi Kevser Kuşat OL
Doktora öğrencisi Ayşegül OĞLAKÇI

HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Sprague-Dawley (dişi ve erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof.Dr. Güngör KANBAK 'ın araştırma yürütücüsü olduğu 258-2/2012 kayıt numaralı ve "Prenatal ve Postnatal Alkol Kullanımı Sonucunda Rat Beyinlerinde Oluşan Nörodejenerasyonun Betain ve/veya Omega-3 Uygulanmasıyla Önlenmesinin Araştırılması." konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Ömür ELÇİOĞLU (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sümmen DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

Adres: Meşelik Kampüsü 26480 Eskişehir
Telefon: 0 222 239 29 79 / (45 63)

GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Prof.Dr. Güngör KANBAK** 'ın araştırma yürütücüsü olduğu 258-1/2012 kayıt numaralı ve “**Prenatal ve Postnatal Alkol Kullanımı Sonucunda Rat Beyinlerinde Oluşan Nörodejenerasyonun Betain ve/veya Omega-3 Uygulanmasıyla Önlenmesinin Araştırılması.**” konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Deneysel hayvanlarda aynı yaşta 200-250gr 65 adet Spraque-Dawley cinsi (dişi ve erkek) sıçanlar kullanılacaktır. Sıçanlar standart hayvan bakım kafeslerinde, 12 saatlik gece/gündüz dönüşümünde, sabit $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve sabit nemli (%55 \pm 5) ortamda tutulacaktır. Erkek ve dişi sıçanlar ayrı kafeslere koyulup deneylere başlamadan önce bir hafta laboratuvar koşullarına alıştıracaktır. Vajinal plag oluşumu sıçanlarda döllenme belirtisidir. Erkek ve dişi sıçanlar çiftleştirilmek üzere bir araya koyulduktan sonra her gün dişi sıçanlar vajinal plag oluşup oluşmadığının belirlenmesi için kontrol edilecektir. Plag oluşumu (E0) ile yavrunun doğumu arasında geçen zaman, çalışmada embriyonik prenatal dönem (E) olarak anılacaktır. Normal sıçanlar, E0 zamanından itibaren 20 veya 21 gün içinde (E20-21) doğumlarını gerçekleştirirler. Ancak bazı çalışmalarda etanolün, doğum zamanını 1-2 gün geciktirdiği belirtilmiştir. Yavruların doğduktan sonraki ilk 24 saatlik zamanına postnatal (P0) dönem denilecektir.

Çiftleştikleri veya döllendikleri plag oluşumuyla belirlenen gebe dişiler erkek sıçanlardan ayrı kafeslere alınıp bakılacaklardır. Fetal alkol sendromu oluşturmak için embriyonik prenatal dönemin 6. gününden (E6), doğumun bir gün öncesindeki güne (E22) kadar geçen zamanda ve laktasyon süresince postnatal dönem(P21), ilgili gruptaki dişi sıçanlara bilyalı şişeler ile deneylerde uygulanacak maddeler verilecektir.

Prenatal alkol uygulaması için ayrı kafeslerde tutulan sıçanlara modifiye sıvı diyet (MSD) uygulaması yapılacaktır. Sıçanlar MSD'yi alkollü veya alkolsüz her sabah saat 10.00'da alacaklardır. Ekstra süt/su desteği yapılmayacaktır. Modifiye Sıvı Diyet (MSD): Düşük yağlı inek sütü 925 ml, 25-75ml Alkol %96.5 ve Sükroz 17 gr içermektedir. Bu karışımın tamamı 1000.7 kcal/L'dir. Alkol oranı artarken diyetin izokalorik dengesini sağlamak için sükroz verilmesi azaltılır. Deneyin başlangıcında sıçanlara adaptasyon süresinde sıvı diyet alkolsüz olarak 2 gün süre ile (E1-E2) verilecektir. Deneyde etanol uygulamasına başlanılmadan önce betain ve/veya omega-3 3 gün boyunca verilecektir (E3-E5). Daha sonra etanol uygulamalarıyla beraber betain ve/veya omega-3 doğuma kadar (P0) ve laktasyon esnasında (P21) uygulanır. Hayvanlara alkol oranı yavaş yavaş artırılarak E6-E8. günlerde %2.4 oranında alkollü süt, E9-E11. günlerde %4.8 oranında alkollü süt, E12-E22. günlerde %7.2 oranında alkollü süt verilecektir. Sıvı diyet her hayvana 100ml/gün miktarında taze olarak, her gün aynı saatte ve ağız kısmı bilyalı cam şişelerde verilecektir. Sıçanların günlük alkol alımı ve ağırlık takibi yapılacak, ağırlıklarına göre alkolün uygulanması için gerekli değerler hesaplanacaktır .

Kontrol grubundaki sıçanlara ise alkolsüz izokalorik MSD solüsyonu verilecektir. İzokalorik kontrol grubu, 75ml etanol (60,75g) yerine 75ml inek sütü ile 96gr sukroz içerecektir (1). Etanolün yanında Betain uygulanan gruplara günlük sıçanlara %1 w/v dozlarında destekleyici madde verilecektir (2).

Etanol diyeti ile beraber omega-3 uygulanacak gruptaki sıçanlara 30mg/100g/gün omega-3 takviyesi yapılacaktır (3). Çalışmamızda toplam yavru sayısı 65 olarak düşünülmektedir.

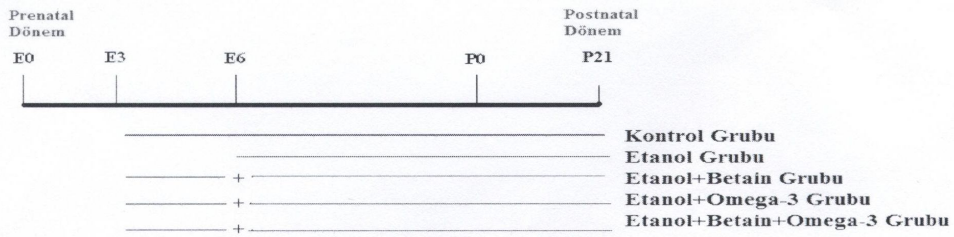
DeneY Grubları

1. **Kontrol grubu (n=13):** Bu gruptaki hayvanlara izokalorik MSD solüsyonu uygulanacak grup.
2. **Etanol grubu (n=13):** Etanol ile beraber MSD solüsyonu uygulanacak grup.
3. **Etanol+Betain grubu (n=13):** Etanol ile beraber MSD solüsyonu yanında sıçanlara %1 w/v Betain uygulanacak grup.
4. **Etanol+omega-3 grubu (n=13):** Etanol ile beraber MSD solüsyonu yanında omega-3 (30mg/100g/gün) uygulanacak grup.
5. **Etanol+Betain+omega-3 grubu (n=13):** Etanol ile beraber MSD solüsyonu yanında betain ve omega-3 uygulanacak grup (Şekil 1).

n=13 her deneysel grubun içerdiği toplam yavru sıçan sayısıdır. Bu yavru sıçanların 8 tanesi (n=8) biyokimyasal çalışmalar, 5 tanesi (n=5) histolojik çalışmalar için kullanılacaktır.

Cerrahi işlemler

P21-22'inci günde yavrular anestezi maddeleriyle (ketamin/Ksilazin 3:1, 1,32 mg/kg intraperitoneal) uyutulup ve dekapitasyonla öldürülecektir. Cerrahi olarak büyüteç altında serebral korteks kısmı çıkartılacaktır. Biyokimyasal çalışmalar için dokular çalışma anına kadar -20°C saklanacaktır. Histolojik çalışmalar için dokular nötral formalinde 24-48 saat süre ile fikse edilecektir. Fiksasyondan sonra dokuların rutin histolojik takipleri yapılacaktır.



Şekil 1: DeneYde uygulanan maddelerin şekil üzerinde gösterilmesi

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.