

**AKROLEİNİN NÖROTOKSİK ETKİLERİNİN
SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI**

**THE INVESTIGATION OF NEUROTOXIC
EFFECTS OF ACROLEIN IN RATS**

GÖKÇEN MÜLAYİMÇELİK

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİMDALI'NDA YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

:

Prof. Dr. Terken BAYDAR

Üye (Danışman)

:

Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Üye

:

Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA

Üye

:

Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

Üye

:

Prof. Dr. E. Arzu KOÇKAYA

ONAY

Bu tez / / Tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Canım Aileme...

AKROLEİNİN NÖROTOKSİK ETKİLERİNİN SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI

Gökçen Mülayimçelik

ÖZ

İnsanlar sağlığı olumsuz yönde etkileyen pek çok kimyasala çevre ve besin yoluyla maruz kalmaktadırlar. Akrolein, tütün ve diğer bitkilerin, benzinin ve yağların yanması ve yemeklerin pişme süresince, karbohidratlar, bitkisel ve hayvansal yağların ısı ile muamelesi sonucunda oluşur.

Yapılan çalışma kapsamında akroleinin gelişmekte olan erkek sıçanlarda subkronik nörotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışmada her grupta 10 sıçan olacak şekilde 3 farklı doz (0,5 mg/kg/gün, 1 mg/kg/gün, 2 mg/kg/gün) akrolein uygulanan uygulama grubu ve 2 adet kontrol grubu olmak üzere toplam 5 grup yer almıştır. Uygulama gruplarındaki sıçanlara 90 gün süreyle akrolein oral yolla verilmiş, çalışma süresince hayvanların yem ve su tüketimleri günlük olarak ölçülerek, hayvan ağırlıkları haftalık olarak kaydedilmiştir.

Uygulama süresi sonunda sıçanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda biyokimyasal analizler yapılmıştır. Total protein, Miyelin Temel Proteini (MBP) ve Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamazken, histolojik ve immünohistokimyasal olarak yapılan incelemeler sonucunda uygulama gruplarında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Beyin korteks yapısındaki hücre tabakalaşmasında bozulma, nöron sitoplazmalarında vakuolleşme ve hücre küçülmesi gibi bulguların yanında nörofilamentlerde anlamlı farklılık derecesinde birikme olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonunda çeşitli yollarla maruziyet söz konusu olan akroleinin olası subkronik nörotoksik etkilere neden olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Akrolein; Histopatoloji; Nörotoksisite; Sıçan; Subkronik etki.

Danışman: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı

THE INVESTIGATION OF NEUROTOXIC EFFECTS OF ACROLEIN IN RATS

Gökçen Mülayimçelik

ABSTRACT

People are exposed to many chemicals that effect health in a negative way by environment and food. Acrolein is a chemical that is formed by burning tobaccos and other plants, dizel and oils and it is formed by heating carbohydrates, herbal and animal fats.

Within the content of the study, subchronical neurotoxic effects of acrolein in growing male rats have been examined. In the examination there have been 5 groups, including 10 rats in every group, which include 3 different acrolein treatment dose groups (0,5 mg/kg/day, 1 mg/kg/day, 2 mg/kg/day) and two control groups. The rats in treatment groups have been exposed to acrolein orally for 90 days. During the study, the amounts of food and water consumption have been recorded daily and weights of the animals have been recorded weekly.

At the end of the treatment, bloods samples have been taken from the animals and then biochemical analyses have been conducted. However, no significant differences for statistically has been dedicated amount of total protein, Myelin Basic Protein (MBP), Glial Fibrillary Asidic Protein (GFAP) histologically and immunohistochemically.examination showed significant differences in treatment groups. With results such as degredation of brain cortex cell layers, vacuolization of neuron cytoplasms and cell reduction, statistically significant accumulation of neurofilaments has been detected. At the end of the study, possible subchronical neurotoxic effects of acrolein that is exposed in many ways have been found out.

Keywords: Acrolein; Histopathology; Neurotoxicity; Rat; Subchronic effect.

Advisor: Prof Dr. Güldeniz SELMANOĞLU, Hacettepe University, Department of Biology, Zoology Section

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında bana destek olan ve yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU'na,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta Araş. Gör. Elif KUŞ KARACAOĞLU olmak üzere Yüksek Lisans öğrencisi Saadet ÖZER, Araş. Gör. Aysun KILIÇ ve Uzm. Bio. Gözde IŞIK'a, istatistiksel analizlerin yapılması aşamasındaki desteklerinden dolayı Araş. Gör. Burak AKBABA'ya,

Bana her zaman destek ve yardımcı olan bütün Zooloji Anabilim Dalı elemanlarına,

Maddi ve manevi her zaman yanımda olarak desteklerini benden hiç esirgemeyen ailem ve müstakbel eşim Aytunç ÖZGÜN'e,

Çalışmamızın gerçekleşmesindeki finansal desteğinden dolayı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne (010D08601008 nolu proje),

Tüm katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|------|
| ÖZ | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | viii |
| KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Sinir Sistemi ve Nörotoksisite | 3 |
| 2.2. Sinir Sisteminin Hücreleri | 3 |
| 2.3. Nörotoksik Etkilerin Sınıflandırılması | 6 |
| 2.3.1. Nöronlar Açısından Nörotoksisite | 5 |
| 2.3.2. Kan Damarları Açısından Nörotoksisite..... | 7 |
| 2.3.3. Glial Hücreler Açısından Nörotoksisite | 7 |
| 2.4. Nörotoksisite Biyobelirteçleri | 9 |
| 2.4.1. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) | 9 |
| 2.4.2. Miyelin Temel Proteini (MBP) | 11 |
| 2.4.3. Nörofilamentler | 11 |
| 2.5. Bazı Nörodejeneratif Hastalıklar | 12 |
| 2.6. Akrolein | 14 |
| 2.6.1. Besinlerde Akroleinin Oluşumu ve Analizi | 17 |
| 2.6.2. Tütün Kaynaklı Akrolein Maruziyeti | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6.3. Yağlardan Akrolein Oluşumu ve Analizi..... | 18 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 20 |
| 3.1. Kimyasal maddeler | 20 |
| 3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması | 20 |
| 3.3. Laboratuvar Koşulları | 20 |
| 3.4. Besin - Su Tüketimlerinin ve Vücut Ağırlıklarının Saptanması..... | 21 |
| 3.5. Hematolojik Analizler | 21 |
| 3.6. Biyokimyasal Analizler..... | 21 |
| 3.7. Histolojik İncelemeler | 21 |
| 3.8. İmmünohistokimyasal İncelemeler | 22 |
| 3.9. İstatistiksel Analizler | 22 |
| 4. SONUÇLAR..... | 23 |
| 4.1. Vücut Ağırlıkları, Günlük Yem ve Su Tüketim Sonuçları..... | 23 |
| 4.2. Kan Analiz Sonuçları | 26 |
| 4.3. Biyokimyasal Analizler..... | 28 |
| 4.4. Histopatolojik Analizler | 29 |
| 4.5. İmmünohistokimyasal Analizler | 36 |
| 5. TARTIŞMA..... | 39 |
| KAYNAKLAR..... | 47 |
| ÖZGEÇMİŞ | 53 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Merkezi sinir sisteminde yer alan hücreler | 4 |
| Şekil 2.2. Serebral kortekste bulunan hücre tabakaları..... | 5 |
| Şekil 2.3. Akroleinin moleküler yapısı | 15 |
| Şekil 4.1. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların haftalık ortalama ağırlıkları | 24 |
| Şekil 4.2. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların günlük ortalama yem tüketimleri..... | 24 |
| Şekil 4.3. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların günlük ortalama su tüketimleri..... | 25 |
| Şekil 4.4. Kontrol grubu sıçana ait beyin dokusu korteks yapısı (Cresyl Violet boyama, 20x büyütme) | 30 |
| Şekil 4.5. Metilselüloz kontrol grubuna ait sıçanın beyin dokusu korteks yapısı (Cresyl Violet boyama, 20X büyütme) | 30 |
| Şekil 4.6. 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulama grubuna ait sıçanın beyin dokusu kortekste bozulma (Cresyl Violet boyama, 20X büyütme) | 31 |
| Şekil 4.7. 1 mg/kg/gün akrolein uygulama grubuna ait sıçanın beyin dokusu kortekste bozulma (Cresyl Violet boyama, 20X büyütme) | 31 |
| Şekil 4.8. 2 mg/kg/gün akrolein uygulama grubuna ait sıçanın beyin dokusu kortekste bozulma (Cresyl Violet boyama, 20X büyütme) | 32 |
| Şekil 4.9. Kontrol grubu sıçana ait beyin dokusu (H&E, 40X büyütme) | 32 |
| Şekil 4.10. Metilselüloz kontrol grubu sıçana ait beyin dokusu (H&E, 40 X büyütme)..... | 33 |
| Şekil 4.11. 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda hücre çekirdeği küçülmesi ve hücre vakuolleşmesi (⇒) (H&E, 40X büyütme)..... | 33 |
| Şekil 4.12. 1 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda hücre çekirdeği küçülmesi ve hücre vakuolleşmesi (⇒) (H&E, 40X büyütme)..... | 34 |

- Şekil 4.13.** 2 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda hücre çekirdeği küçülmesi ve hücre vakuolleşmesi (⇒) (H&E, 40X büyütme)..... 34
- Şekil 4.14.** Kontrol grubu sıçana ait beyin dokusunda daha yoğun boyanan Nissl cisimcikleri içeren beyin dokusu hücreleri (⇒) (Cresyl Violet, 20X büyütme).....35
- Şekil 4.15.** 1 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda daha yoğun boyanan Nissl cisimcikleri içeren beyin dokusu hücreleri (⇒) (Cresyl Violet, 20X büyütme) 35
- Şekil 4.16.** Kontrol grubu sıçana ait beyin dokusu (DAB chromogen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme) 36
- Şekil 4.17.** Metilselüloz kontrol grubu sıçana ait beyin dokusu (DAB chromogen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme) 37
- Şekil 4.18.** 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda NF birikimi (*) (DAB kromojen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme)..... 37
- Şekil 4.19.** 1 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda NF birikimi (*) (DAB kromojen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme)..... 38
- Şekil 4.20.** 2 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda NF birikimi (*) (DAB kromojen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme)..... 38

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 4.1.** Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların vücut ağırlıkları ve deney süresince ortalama günlük yem ve su tüketimleri 23
- Çizelge 4.2.** Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların kan analiz sonuçları..... 27
- Çizelge 4.3.** Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların biyokimyasal analiz sonuçları 28
- Çizelge 4.4.** Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların beyin dokularında gözlenen korteks bozulması sıklığı 29
- Çizelge 4.5.** Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanlara ait beyin dokularındaki immünohistokimyasal inceleme sonuçları 36

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------|--|
| % | : Yüzde |
| °C | : Santigrat derece |
| µg | : Mikrogram |
| ALS | : Amiyotrofik Lateral Sklerozis |
| ATSDR | : Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Toksik Maddeler ve Hastalıklar Kayıt Kurumu) |
| Da | : Dalton |
| DNA | : Deoksiribo Nükleik Asit |
| dl | : Desilitre |
| dk | : Dakika |
| EPA | : Environmental Protection Agency (Çevre Koruma Örgütü) |
| g | : Gram |
| GFAP | : Glial Fibrillary Acidic Protein (Glial Fibriler Asidik Protein) |
| GSH | : Glutasyon |
| H&E | : Hematoksilen&Eosin Boyası |
| IARC | : International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı) |
| KBB | : Kan-Beyin Bariyeri |
| kDa | : Kilodalton |
| kg | : Kilogram |
| MBP | : Myelin Basic Protein (Miyelin Temel Proteini) |
| MCH | : Ortalama Eritrosit Hemoglobini |
| MCHC | : Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu |
| MCV | : Ortalama Eritrosit Hacmi |

| | |
|-----------------|---|
| mg | : Miligram |
| mm ³ | : Milimetreküp |
| uRNA | : Ulak Ribo Nükleik Asit |
| MSS | : Merkezi Sinir Sistemi |
| MS | : Multiple Sklerozis |
| NF | : Nörofilament |
| OMIM | : Online Mendelian Inheritance in Man (Çevrimiçi İnsanda Mendel Kalıtımı) |
| PCB | : Poliklorlu bifenil |
| Pct | : Prokalsitonin |
| pg | : Pikogram |
| PSS | : Periferel Sinir Sistemi |
| ROS | : Reaktif Oksijen Türleri |
| WHO | : World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü) |

1. GİRİŞ

Çevre ve besin yoluyla maruz kalınan pek çok kimyasal madde, insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Besinlerin ısıyla muamelesi ile birçok kimyasal madde oluşmaktadır. Oluşan bu kimyasal maddelerin ortama salınanlarına soluma, besinde oluşanlarına ise oral yolla maruziyet söz konusudur. Bunların birçoğunun insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir.

Akrolein besinlerin ısıyla muamelesiyle ortaya çıkan bir maddedir. Akroleinle ilgili yapılmış olan çalışmalar daha çok solunum yolu maruziyetinin neden olduğu etkilerle ilgilidir. Ağız yoluyla alınımı durumunda oluşabilecek etkileriyle ilgili yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma kapsamında besin yoluyla maruz kalınan akroleinin gelişmekte olan erkek sıçanlarda subkronik etkileri ve özellikle sinir sistemi üzerine olası etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Akrolein uygulaması sonucunda gelişmekte olan erkek sıçanlarda biyokimyasal, hematolojik analizler ile histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır.

Çevredeki kimyasal maddelere karşı özellikle çocuklar oldukça duyarlıdırlar. Çünkü metabolik ve sistemik olarak henüz gelişim aşamasındayken toksik bir maddeye maruz kalma sonucu oluşabilecek bir hasar ileride ciddi sağlık problemlerine neden olabilmektedir (Suk, 2003). Bu nedenle daha hassas bireyler göz önüne alınarak bu tez çalışması 3-4 haftalık sıçanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Serum örneklerinde miyelinizasyonun oluşumunda oldukça önemli olan ve miyelin stabilizasyonunu sağlayan bir protein olan Miyelin Temel Proteini (MBP) miktarı tayin edilerek değerlendirilmiştir. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) sinir sistemi glial hücrelerinden olan astrositlerde bulunan hücre iskeleti arafilamenti olup, nicel ve nitel analizleri bu biyobelirtecin nörotoksik durumların duyarlı ve spesifik indikatörüdür (O'Callaghan, 2005). Glial hücrelerde meydana gelen hasarlar birçok hastalığa neden olmaktadır. Bu nedenler göz önüne alınarak sıçanlardan alınan kan serum örneklerinde GFAP ve MBP miktarları tespit edilerek değerlendirilmiştir.

Nörofilamentler (NF) önemli sinir hücre iskeleti elemanlarıdır. Çalışmada nörofilamentin altbirimleri olan NF-L ve NF-H'nin miktarındaki değişiklikler tespit edilmiştir. Beyin dokularında immünohistokimyasal olarak yapılan nörofilament incelenmesine ilave olarak, beyin dokularından alınan kesitlerde ışık mikroskobu altında histopatolojik incelemeler yapılmış, ayrıca Nissl boyama ile boyanmış kesitler incelenerek akrolein maruziyetine bağlı meydana gelen değişiklikler değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi ve Nörotoksisite

Hücre, doku ve organlarda, çeşitli fonksiyonların sağlıklı bir şekilde yapılabilmesi, bu yapılar arasında çok hassas bir koordinasyonun olması ile mümkündür. Yapılar arasındaki koordinasyonun, canlı hayatının devamı süresince sağlıklı bir şekilde devamı da şarttır. Bunun için, önemli bir sisteme ihtiyaç vardır. Bu sistem, sinir sistemidir.

Omurgalıların tümünde beyin ve omurilik, merkezi sinir sistemini (MSS) oluşturur; MSS dışında kalan kısımlar, periferal sinir sistemine (PSS) aittir. Periferal sinir sistemi MSS'ne bilgi gönderir, ondan bilgi alır ve organizmanın iç ortamını düzenler (Hayes ve ark., 2008).

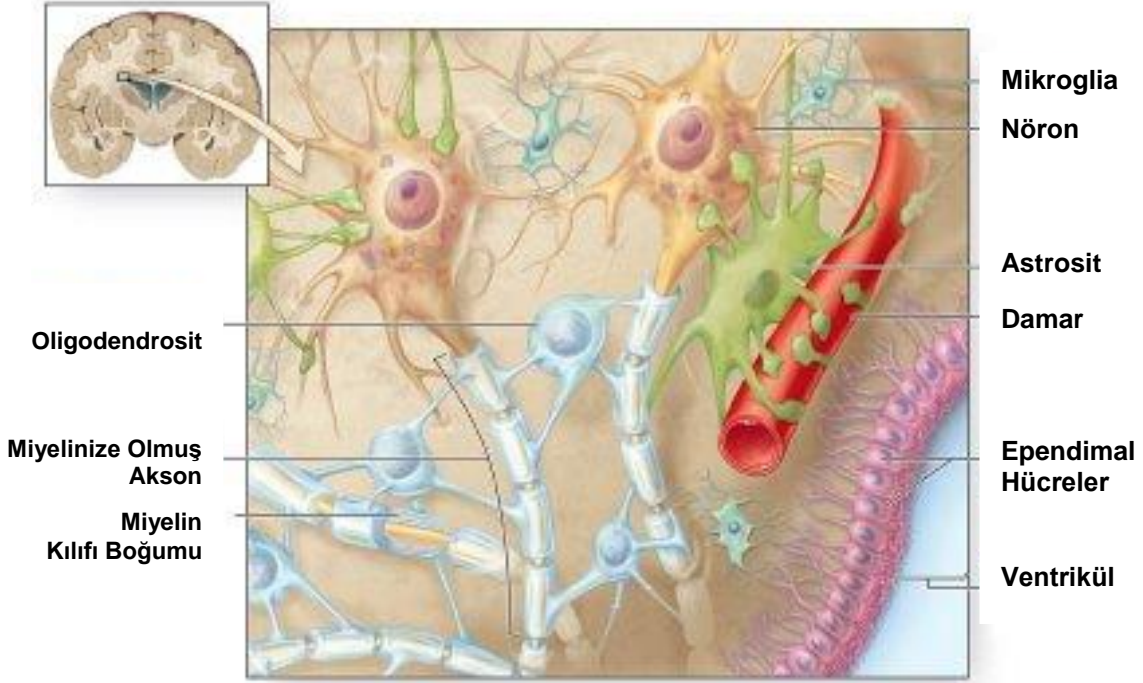
Nörotoksisite, bir ajanın sinir sisteminin yapısal bütünlüğünü ve fonksiyonunu bozma kabiliyeti olarak adlandırılır. Çok sayıda ajan düşük dozlarda güvenli ya da iyileştiriciyken yüksek dozda nörotoksiktir. Nörotoksikantlar sinir sistemini birçok farklı yolla etkilemektedir. Bazıları aksonun distal kısmına zarar verip hücrenin geri kalan kısmını etkilemezken, bazıları doğrudan hücre ölümüne neden olur. Bazıları da yapısal hasara neden olmadan sinir sistemini, sinyal iletim sürecini bozarak etkilerler (Hayes ve ark., 2008).

2.2. Sinir Sisteminin Hücreleri

Sinir sistemindeki temel hücreler aksonlarıyla uzanan nöronlardır. Nöronlar sinir iletiminden sorumludurlar. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi esas destekleyici yapıyı oluşturan glia hücreleri iletkenlik özelliğinin az olmasının yanında, nöronlardan farklı olarak tüm diğer hücre tipleri gibi çoğalabilme özelliğine de sahiptirler (Hayes ve ark., 2008).

MSS'de glial hücreler astrositleri, oligodendrositleri ve mikrogliaı içerir. Astrositler nöronların etrafında uygun mikro çevrenin ve kan-beyin bariyerinin oluşması ve desteklenmesine yardımcı olurlar. Oligodendrositler merkezi sinir sistemindeki aksonların etrafını saran yağca zengin bir materyal olan miyelin kılıfı oluştururlar.

Miyelin kılıf, elektriksel izolasyonu sağlar. Çevresel sinir sisteminde ise bu görevi Schwann hücreleri yapar. Mikroglia ise merkezi sinir sistemindeki makrofajlardır (Hayes ve ark., 2008).



Şekil 2.1. Merkezi sinir sisteminde yer alan hücreler.

Kan-beyin bariyeri, sinir sistemini belli nörotoksinlerden korur. Nörotoksisitedeki farklılıklar bazen bu bariyerin temel yapı ve fonksiyonu ile açıklanabilir.

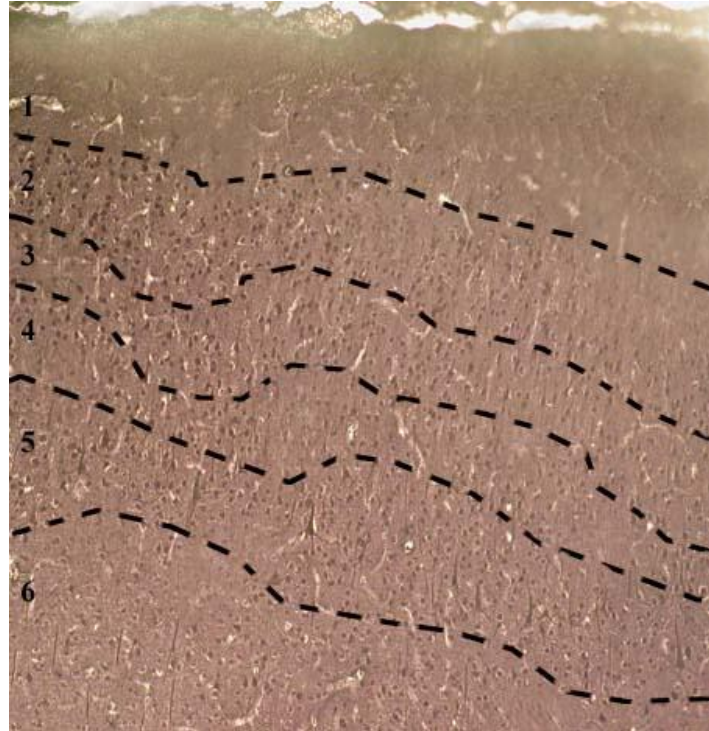
Merkezi sinir sistemi kapillerinin periferik kapillerden farklı olarak bazı karakteristik özellikleri vardır. Beyin kapillerini oluşturan endotel hücreler arasında sıkı bağlantı bölgeleri bulunur ve devamlı bir bazal membrana sahiptirler. Bu bağlantılar bariyerin endotel hücreleri arasında yüksek bir elektrik direnci oluştururlar ve bunun sonucunda paraselüler permeabilite düşer. Molekül ağırlığı 10.000 kDa'nun altındaki moleküllerin geçişine izin veren porların yokluğu ile periferik kapillerden farklılık gösterirler (Gültürk ve ark., 2007).

Yüksek derecede yağda çözülebilen bileşikler ve bir kimyasal maddenin iyonize olmayan fraksiyonları kan-beyin bariyerinden geçebilirler (Yılmaz, 2006, Banks, 1999). Hipertansiyon, radyasyona maruziyet, ödem, inflamasyon ve iskemi gibi

birçok durum bariyerin geçirgenliğinde artışa neden olur. Bu artışa, kan-beyin bariyerinde sıkı bağlantıların açılması, pinositik aktivite artışı, membran stabilitesinin azalması, hastalık veya toksinlerin neden olduğu besin taşınımındaki değişiklikler ve por oluşumu gibi bazı spesifik değişiklikler neden olmaktadır (Banks, 1999).

Serebral korteks memeli beyninin en büyük, en karmaşık ve omurgalı evrimi sırasında en fazla değişikliğe uğramış bölgesidir. Beyin yüzeyine teğet olarak uzanan altı nöron tabakasından oluşur (Şekil 2.2). Serebral korteks sağ ve sol bölgelere ayrılır ve bunların herbiri vücudun ters yarısından sorumludur. Corpus callosum olarak bilinen kalın bir sinir teli demeti sağ ve sol yarım küreler arasındaki iletişimi sağlar (Campbell, 2006).

- 1 – Moleküler tabaka
- 2 – Dış Granüler tabaka
- 3 – Piramidal hücre tabakası
- 4 – İç Granüler tabaka
- 5 – Ganglionik tabaka
- 6 – Multiform hücre tabakası



Şekil 2.2 Serebral kortekste bulunan hücre tabakaları

Ribozomlar, yoğun bazofiliktirler çünkü bileşenlerinde çok sayıda fosfat grupları bulunmaktadır. Bu bileşenlerden biri olan ribozomal ribonükleik asit, bazı bazik boyalarla tepkimeye girer. Sitoplazmadaki ribozom bakımından zengin olan

bölgeler boyalarla yoğun şekilde boyanır. Nöronlardaki bu bazofilik bölgeler Nissl cisimcikleri olarak adlandırılmaktadır. Nissl cisimciklerinin miktarı hücrenin tipine ve fonksiyonuna göre çeşitlilik göstermektedir. Motor nöronlar gibi büyük nöronlarda miktarları oldukça fazladır (Adesina ve ark., 2009). Nissl cisimcikleri nöronların diğer beyin hücrelerinden ayırt edilmesinde ve bulunduğu hücredeki protein sentezinde görev almaktadır (Ekeoma ve ark., 2010).

2.3. Nörotoksik Etkilerin Sınıflandırılması

Nörotoksisite, nörotoksik etkinin görüldüğü yere göre sınıflandırılabilir. Bunlar hücre gövdesi ve nöronların diğer kısımları olabilir, özellikle de aksonları, glial hücreleri ve vasküler sistem olabilir. Bir toksik madde bir ya da daha fazla yeri etkileyebilir.

2.3.1. Nöronlar Açısından Nörotoksisite

Nörotoksik maddeler nöronları, sadece hücre gövdesinin ya da sadece aksonun hasar görmesi gibi farklı şekillerde etkileyebilmektedir.

Aksonopati, nöronal hasarın özelleşmiş bir formudur. Hücre gövdesinde herhangi bir hasar olmaksızın sadece aksonda meydana gelen dejenerasyonu içerir. Bazı toksik maddeler aksonal hasarı, doğrudan aksonun kendisini hedef alarak gerçekleştirirler. Bazıları ise, nöronun metabolik sistemine zarar vererek aksonda hasarın oluşmasına neden olmaktadır (Blake, 2004).

Nöronopati ise, hücre gövdesinin hasar görmesi durumudur. Hücre gövdesinin fonksiyonunu yitirmesi ile ikincil olarak aksonal ve dendritik süreçler de son bulur. Vücuttaki diğer hücreler gibi nöronlar da moleküler ve morfolojik özelliklerine göre apoptoza ya da nekroza uğrayarak ölürlür. Birçok nörotoksik madde nöronopatiye neden olmaktadır. Nörotoksik maddeyle indüklenmiş sitotoksisite, Alzheimer, Parkinson ve amiyotrofik lateral sklerozis (ALS) gibi birçok nörodejeneratif hastalığın patogenezinde de görülmektedir ve yapılan çalışmalar toksik madde maruziyetinin bu hastalıklar için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (Blake, 2004).

2.3.2. Kan Damarları Açısından Nörotoksisite

MSS ve PSS'deki vasküler sistemin permeabilitesi, yüksek kan basıncı ya da düşük plazma ozmolaritesi ile artabilir. Belirli toksinlerin maruziyeti sonucu bu durum gerçekleşir. Bu sistemin daha geçirgen hale gelmesi sıvıların hücre dışı alanda birikmesine neden olur. Birçok nörotoksik ajanın hücre dışı ödeme neden olduğu bilinmektedir (Hayes ve ark., 2008).

2.3.3. Glial Hücreler Açısından Nörotoksisite

Erken gelişim periyodundan itibaren glia hücreleri ve nöronlar yüksek derecede dinamik ve karşılıklı ilişki içinde olurlar. Bu ilişki, yaşam boyunca devam eder, sinir sisteminin gelişimini, morfolojiyi, davranışları, yenilenmeyi ve yaşlanmayı etkiler. Bu ilişkinin karmaşıklığı ve çeşitliliği göz önüne alındığında glial-nöronal karşılıklı ilişkisinin sinir sisteminin en az bir fonksiyonel birimi olduğunu düşünmek mantıklıdır (nöron-nöron, glial-glial, endotelial-glial etkileşimler vb.). Glial ya da nöronal hücre tiplerindeki homeostatik düzensizlik olasıdır, bu nedenle birimde fonksiyon bozukluğu olur. Nörotoksik bir etken adhezyon molekül etkileşimini ve sonunda da glia-nöron etkileşimini bozabilir; hücreler arası bağlantılar ya da makromolekül değişiminde değişiklik olabilir. Bu durumlar, her hücre için hem yapısal hem de fonksiyonel sonuçlar doğurur. Bir nörotoksik madde öncülü, metabolizasyonu sonucu aktif toksik maddeye dönüşebilir ve toksisiteye neden olur (McQueen, 2002).

Mikroglia, beyinin hasar durumlarına verdiği cevaplarda önemli rol oynamaktadır. Önemli immünolojik özellikler sergiler. Toplam glial hücre popülasyonunun %10'unu oluşturur ve beyinin makrofajları olarak bilinirler. Temel fonksiyonları temizleyici hücre olarak bulunmaktır; hücresel atıkları sindirirler, gelişim ya da sinir sistemi hasarı durumlarında doku modellenmesinde önemli role sahiptirler. Mikroglia hücreleri, fagositik yeteneklerinden dolayı yetişkin merkezi sinir sisteminde inflamasyon ve yenilenme süreçlerine de dahil olurlar. Ayrıca bazı bağışıklık düzenleyici sitokinlerin salınımından ve sitokin stimülasyonuna verilen cevaptan sorumlu oldukları da bilinmektedir. Mikroglia hücreleri travma ya da enfeksiyon durumlarında ilk sayısı artan beyin hücreleridir (McQueen, 2002).

Glutamat, nitrik oksit, reaktif oksijen türleri ve moleküler ağırlığı 500 Da'dan daha küçük olan bazı potansiyel nörotoksik bileşikler, mikroglia tarafından ayrılır ve fagosite edilir. Bu nedenle mikroglianın nörotoksik bir hasardaki kesin rolünü saptayabilmek için *in vivo* koşullarda çalışmak gerekir.

Astroditler merkezi sinir sisteminin yaklaşık olarak %25'ini oluştururlar. Erken beyin gelişimi süresince astrositlerin önemli rolleri arasında, sentez, nöronal göç, nöronal bölünme ve farklılaşma için önemli olan nörotrofik faktörlerin üretimi sıralanabilir. (Shanker ve ark., 2003). Astrositler ve nöronlar arasındaki doğrudan ilişki adhezyon molekülleri tarafından sağlanır. Bu ilişki, hücrelerarası iletişimi kolaylaştırır, sırasıyla, her hücre tipi için morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel farklılaşmayı belirler. Bu nedenle glial-nöronal hücre birlikteliğinin bozulması durumunda, her iki hücre tipinin fonksiyonlarının etkilenmesi beklenir. Nörotoksik madde nedeniyle adhezyon molekülü fonksiyonunun bozulması durumunda sinir hücresi göçü engellenir (McQueen, 2002).

Oligodendroglia ya da oligodendrositler, MSS'de miyelin kılıf oluşmasından sorumludurlar. Bu kılıf, sinir iletimini hızlandırır ve nöronlararası karışık bağlantıların oluşabilmesine izin verir. Fonksiyonlardaki bozukluklar ya da doğrudan miyelin kılıf üzerinde meydana gelen hasar normal miyelin üretimi ile iyileştirilemez ve sonuç olarak miyelin kılıfın kaybı ya da demiyelinizasyon sorunu ortaya çıkar (McQueen, 2002).

Akut toksik, viral, mekanik ya da otoimmün kökenli olayları takiben demiyelinizasyon ortaya çıkabilmektedir. Erken dönemde erişkin MSS'nin remiyelinizasyon kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Ancak, ağır vakalarda, özellikle hasara yol açan olay kronikleşmiş ise remiyelinizasyon kapasitesi azalmaktadır (McQueen, 2002).

Multiple skleroz; genetik olarak yatkın kişilerde; çevresel faktörler, viral ya da bakteriyel ajanlar, inflamatuvar ve otoimmün cevap sırasında salgılanan sitokinler ve henüz tanımlanamayan bazı etiyolojik ajanların kombinasyonu sonucu gelişen bir hastalıktır. Hastalıkta, MSS'de marjinal demiyelinizasyondan oligodendrositlerin

tamamen kaybolmasına kadar değişen doku kaybı, ağır glial skar gelişimi ve aksonal kesilerin oluşması gözlenir (Shanker ve ark., 2003).

2.4. Nörotoksisite Biyobelirteçleri

Nörotoksisiteyi değerlendirmek için geleneksel histopatolojik boyamalar ve davranış testleri vardır. Bununla beraber bu metodlar bazı nörotoksik etkileri belirlemede yeterli olabilir ancak, nörotoksisite değerlendirmesindeki genel skala için duyarlılık ve özgüllük açısından yetersiz kalmaktadır. Sinir sistemi hasarına verilen glial reaksiyon, gliosis olarak adlandırılan, sinir sistemi yaralanmalarının en belirgin özelliğini temsil etmektedir. Aslında, gliosis biyobelirteçlerinin gelişmesi ve uygulanması, nörotoksisitenin güvenilir değerlendirmesi için genel olarak uygulanabilen bir yaklaşımdır (O'callaghan ve Sriram, 2005, El-Fawal ve O'callaghan, 2008).

2.4.1. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)

Bu protein ilk kez Eng ve ark tarafından 1971 yılında izole edilmiştir (Geel ve ark., 2002), ve sadece MSS glial hücrelerinde bulunur (Chamoun ve ark., 2009). GFAP astrositlerin hücre iskeleti yapısında yer alan arafilamenttir. GFAP astrositin mekanik sağlamlığını sağlamaktadır (Cullen ve ark, 2007).

Glial Fibriler Asidik Protein'in ekspresyonunun gelişim planı detaylı olarak bilinmemektedir. Fare MSS'inde GFAP ekspresyonu ilk olarak gebeliğin sonunda belirlenmiştir. Transkripsiyonel çalışmalar GFAP mRNA'sının doğumla ilk 15 gün arasında ve daha sonra da 55. güne kadar arttığını göstermiştir. Erişkin yaşamın 2. yılına ulaştıktan sonra GFAP uRNAsı ve protein seviyeleri hipokampus, striatum ve korteks gibi bazı beyin bölgelerinde artış eğilimindedir. Bu durum genellikle reaktif astrositlerin artışıyla ilişkili olmaktadır (Gomes ve ark, 1999).

Son bir yüzyıldır, nöropatoloji literatürünün de belirttiğine göre MSS'nde meydana gelen bir hasar sonucu mikroglia ve astrositler 'reaktif' ya da 'aktive olmuş' formlara dönüşmektedirler. Bu durum gliosis olarak adlandırılmaktadır ve yapılan çalışmalar gliosis durumlarında kanda ve hücredeki GFAP miktarında anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir (O'Callaghan ve Sriram, 2005).

Gliyal fibriler asidik protein molekülleri biraraya gelerek astroglial hücreler içinde bulunan arafilamentlerin bir tipini oluştururlar. Böylece hücreye sağlamlık ve destek sağlamış olurlar. Astroglial hücreler de beyin ve omurilikteki destekleyici ve besleyici hücrelerdir (GHR, 2012). Astrogliosis, MSS'de kimyasal bozukluğun ya da fiziksel yaralanmanın sonucu olarak ortaya çıkar ve GFAP ekspresyonundaki artışla karakterize edilir (Holden, 2007). Eğer beyin ya da omurilik bir travma ya da hastalık sonucu hasarlanırsa, astroglial hücreler reaktif olur ve tekrarlı olarak daha fazla GFAP üretir (GHR, 2012).

GFAP'nin nörolojik hastalıkların kontrolünde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (Gomes ve ark 1999). Felç, travmatik beyin yaralanması, kalp krizi gibi akut beyin hasarında kandaki GFAP miktarında artış olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinin kandaki miktarının ölçülmesi beyinde bulunan doku bileşenlerinin (nöron, glia ya da miyelin gibi), yapısal ya da fonksiyonel olarak oluşan hasardan hangi derecede etkilendiğini tespit etmek ve hastalık için teşhis ve tedavi yöntemlerini belirlemek açısından önemlidir (Lamers ve ark., 2003).

Birden fazla fonksiyonun GFAP ifadesi ile düzenlendiği, GFAP knockout fareler kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Bu knockout farelerin hipokampuslarında ve omuriliğin beyaz maddesinde arafilament azlığı gözlenmiştir. Çalışmalar ayrıca, GFAP knockout farelerde, anormal miyelinleşme, ak madde yapısının bozulması ve kan-beyin bariyerinde değişiklikler gibi birçok dejeneratif süreçleri de göstermiştir (Liedtke ve ark., 1996). GFAP knockout farelerdeki Purkinje hücreleriyle yapılan çalışmalar bu hayvanların normal yapı sergilemediklerini ve bu farelerin göz kırpmaya gibi kondisyon deneylerinde bozukluk olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, GFAP'nin Purkinje ve diğer bir çok hücrenin bütünlüğünün devamını sağladığı düşünülmektedir (OMIM).

Düzensiz GFAP regülasyonu ile ilişkili bir çok hastalık vardır ve nöronal yaralanma gliyal hücrelerin hasara neden olacak şekilde reaksiyona girmesine neden olabilir. Skarlaşma, birçok nörodejeneratif hastalığın ve önemli nöronal yaralanmanın sonucudur. Yara, astrositlerin fibröz doku ile etkileşimiyle oluşur. Bu etkileşim yaranın etrafında yeniden gliyal sınırın oluşturulmasını ve GFAP'nin düzenlenmesinin artmasını sağlar (Bunge ve ark., 1961).

Liedtke ve ark. (1996) multiple skleroz için bir model olan deneysel otoimmün ensefalomyelitis hastalığı olan GFAP knockout farelerde, astroglial yanıtı analiz etmişlerdir. GFAP knockout astrositler düzensiz boşluk ve hemidesmozomların sayısındaki düşüşten dolayı organize olmayan bir yapı göstermişlerdir.

GFAP'nin beyin fizyolojisi ve patolojisindeki fonksiyonu hakkında halen bazı tartışmalar olmasına rağmen, bu yapısal ara filament proteininin beyin gelişimindeki aktif ve ilgili rolü için geçen birkaç yılda büyük miktarda kanıt birikmiştir.

2.4.2. Miyelin Temel Proteini (MBP)

Miyelin temel proteini (MBP), sinir fibrillerinin etrafını saran yağca zengin miyelin kılıfın temel protein bileşenidir. Kılıfın yapısını stabilize eder, sinir fibrillerinin hücre zarının sitoplazmik yüzeyine bağlanmasına yardımcı olur (Stapulionis ve ark, 2008)

Bununla birlikte, MBP'nin hücresel fonksiyonları ve oligodendrosit morfogenezindeki temel moleküler rolü halen tam olarak açıklanmamıştır. Diğer taraftan, miyelin kılıftaki mikrotübüller ile ortak yerleşim dizilimi olduğuna dair belirtiler vardır. Bu durum MBP'nin hücre morfogenezinde önemli bir rolü olduğu olasılığını arttırmaktadır (Galiano ve ark., 2006).

Multiple Skleroz, insan merkezi sinir sistemindeki demiyelinizasyon ile ilişkili inflamatuvar bir hastalıktır. İnflamasyonu başlatan belirlenmiş bazı hücreler olmasına rağmen, doku lezyonlarında yapılan analizler miyelin temel proteininin de bu sürece oldukça etkili bir şekilde dahil olduğunu göstermiştir. MS patogenezinde MBP'ye karşı antikorun rolü olduğunu göstermiştir. Çünkü MS hastalığında proteolizisin hedefi miyelin proteinleridir (Medveczkey ve ark., 2006).

2.4.3. Nörofilamentler

Nörofilamentler 10 nanometre çapında, nöronlarda bulunan ara filamentlerdir. Altbirimleri NF-L, NF-M, NF-H olarak isimlendirilmektedir (Bajo ve ark, 2001). Bu

isimler altbirimlerin SDS-PAGE yöntemi sonucu belirlenen moleküler ağırlıklarına göre verilmiştir.

- en hafif birim (NF-L), 68-70 kDa
- orta birim (NF-M), 145-160 kDa
- en ağır birim (NF-H), 200-220 kDa

Nörofilamentler, geniş miyelinlenmiş aksonlarda öne çıkan bileşenlerdendir. Ayrıca, en çok bulunan nöronal arafilament proteinleridir (Elder, 1998). Nörofilamentler omurgalı nöronlarında özellikle aksonal çapı düzenlemek için aksonlarda yoğun olarak bulunur. Aksonal büyüme boyunca, yeni nörofilament altbirimleri akson içerisinde dinamik bir birliktelik içindedir. Bu durum altbirimlerin filamentin son kısmına eklenmesini içermektedir. Bir akson büyüdüktan ve hedef hücreye bağlandıktan sonra aksonun çapı beş katı kadar artabilir. Nörofilamentler itici güce sahiptir. Bu özelliği dendrit ve aksonların çapını düzenleyebilme nedenidir. Bunu, birbirlerini polariteleri dolayısıyla uzağa itebilme güçleri ile yaparlar. Nörofilament gen ifadesi doğrudan aksonal çap tarafından kontrol edilir. Bu ifade seviyesi aksondan aşağı doğru elektriksel sinyalin iletilmesini de kontrol eder (Bruce, 2002).

2.5. Bazı Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar beynin spesifik bölgelerindeki nöronların hasarı ya da geri dönüşümsüz kaybı ile karakterize olan bir takım patolojik durumu içermektedir. Pek çok tipi olan bu patolojik durumların bir kısmı aşağıda açıklanmıştır.

Parkinson hastalığı, yaşlı popülasyonu etkileyen, oldukça sık görülen, yavaş progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. Parkinson hastalığının nedeni halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Hastalıkta patolojik olarak substantia nigranın pars kompaktasında nöromelanin içeren pigment hücrelerinde dejenerasyon vardır (Dadalı, 2008). Hastalığın etiolojisinde çevresel nedenler önemlidir ancak bunların hiçbirisi kesin olarak ispatlanmamıştır. Vaka control çalışmaları, Parkinson Hastalığının genellikle çiftçilerde veya çeşitli metallere, kimyasal

maddelere teması olan kişilerde daha fazla olduğunu göstermiştir. Parkinson hastalığı, kırsal kesimde yaşamak, çeşitli tarım ilaçları ile veya pestisitlerle temas etmek ile ilişkili olarak düşünülmektedir. Aile hikayesinin olması da risk artışına neden olur (Dadalı ve ark., 2008).

Demans; normal bilinçli bir kişide dil, görsel deneyim, duygulanım, kişilik ya da kavrama gibi entelektüel fonksiyonların bir veya daha fazlasında görülen defektlerle birlikte gelişen, sonradan kazanılmış ve dirençli hafıza bozuklukları nedeniyle öncelikle mesleksi ya da sosyal fonksiyonlarda azalma olarak tanımlanabilir. Demansa yol açan hastalıklar; klinik uygulamada en sık gözlenen nörolojik bozukluklar olarak ortaya çıkmaktadır. Demansın en yaygın nedeni Alzheimer hastalığıdır. Tüm demanslı hastaların %50-75'ini oluşturur. İnsidansı yaş ile artış gösterir. Öncelikle yüksek entelektüel fonksiyonlarda ve buna bağlı olarak düşünme ve davranışlarda görülen, defektif özelliklerle karakterize, sinsi gelişen bir hastalıktır (Sezer ve Memiş, 2001).

Alzheimer Hastalığının patogenezi ile ilgili gelişmelere hastalığın patolojik bulguları yol gösterici olmuştur. Makroskopik patoloji bulguları, özellikle korteks ve hipokampüste diffüz atrofidir. Histolojik olarak ise hücre içinde biriken nörofibriller yumaklar, ekstrasellüler yerleşimli nörotik (amiloid) plaklar, granülovakuolar dejenerasyon, sinaptik kayıp ve asosiyasyon korteksinde kolinerjik hücre kaybı patoloji bulgularını oluşturur (Topçuoğlu ve Selekler, 1998).

Amyotrofik lateral sklerozis (ALS) ise yaygın üst ve alt motor nöron dejenerasyonu ile seyreden, semptomların başlangıcından itibaren ortalama üç yıl içinde, genellikle solunum yetmezliğine bağlı olarak ölümlü sonuçlanan bir hastalıktır. Progresif motor nöron harabiyetine mikroglial aktivasyon, astrositoz, lenfosit infiltrasyonu ve dendritik hücreler eşlik etmektedir (Özden ve ark., 2009). Motor nöron dejenerasyonunun öncesinde ve dejenerasyon sırasında inflamatuvar kaskadların aktive olduğu bildirilmiştir. Mikroglial aktivasyon nitrik oksit, proteaz ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini arttırmakta ve hücre ölümünü kolaylaştırmaktadır. Normal şartlar altında, aktive olmuş mikrogliaların yaratmış olduğu bu durum, astrositlerin koruyucu etkileri ile tamponlanabilirken, ALS'de mikrogliaların sitotoksik etkileri, astrositlerin koruyucu etkilerini yenmektedir (Uluç

ve ark., 2008). ALS patogenezinde bir diğerk önemli mekanizma nörofilamentlerin nitrasyonudur. Nörofilamentlerin biraraya gelişi engellendiğinde, ki bu engellemeyi mutant SOD1 enziminin ürettiğı peroksinitrit gerçekleştirir, nörofilament altbirimlerindeki çok sayıda tirozin nitrasyona karşı açık hale gelmektedir. Nitrasyona uğramış küçük bir nörofilament altbirimi nitratlanmamış nörofilament ağlarını bozmakta ve ALS'de dejenere motor nöronların soma ve proksimal aksonlarında bulunan nörofilament agregatları oluşturmaktadır (Uluç ve ark., 2008).

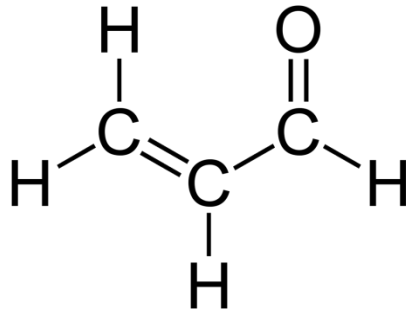
Multiple skleroz, genç erişkinlerde görülen, genellikle alevlenme ve düzelmelerle seyreden, merkezi sinir sisteminin progresif, demiyelinizan ve otoimmün bir hastalığıdır. Hastalığın nedeni tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, etiyojisinde genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimlerinin rol aldığı düşünölmektedir (Kurban ve ark., 2010). Genetik olarak yatkın bir bireyde, bakteriyel ya da viral enfeksiyon gibi çevresel etmenlerin MS'in başlangıcında ya da atakların tetiklenmesinde rol oynadığı kabul edilmektedir. Oksidatif stresin MS'in patojenezinde ve inflamatuvar olaylarda rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stresi oluşturan ve esas olarak makrofajlarda üretilen reaktif oksijen türleri, MS ve deneysel otoimmün ensefalopatide demiyelinizasyon ve akson hasarından sorumlu bulunmuştur. ROS, hücrelere oldukça toksik olan peroksinitrit gibi ürönlere dönüşerek lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrenin ana komponentlerinde hasarlanmaya, sonuç olarak da nekroz veya apopitoz yolu ile hücre ölümine sebep olurlar. Ayrıca, MS'de azalmış hücrenel antioksidan savunma sistemi bu hasarın artmasına katkıda bulunabilir. MS'de oksidatif streste artma ve antioksidanlarda azalma olduğı gösterilmiştir (Kurban ve ark., 2010).

2.6. Akrolein

Akrolein yakıcı, keskin kokulu, renksiz ya da sarı renkli bir aldehittir (şekil 2.3). Havada kolayca tutuşur ve yanar. Akrolein normal sıcaklıklarda sudan daha hızlı buharlaşır. Sıcaklık arttıkça sıvı fazdan buhar fazına geçiş hızlanır. Akrolein, eğer tam anlamıyla önlem alınmamışsa, tehlikeli derecede kirli alanların yakınındaki havada, suda ya da toprakta bulunabilir. Yüzey suyunda ve toprakta bulunmasına rağmen, hızlı bir şekilde buharlaşabilir ya da tekrarlı olarak topraktaki materyallere

bağlanarak inaktive olur. Ayrıca akrolein bir pestisitir ve sulama kanallarına ve sualtı bitkilerinin, alglerin ve bazı bitkilerin büyümesini engellemek için sulama sularına eklenir. Yüksek konsantrasyonlarda, kimyasal silah olarak kullanılır. Küçük miktarlarda akrolein, ağaçlar ve diğer bitkiler (tütün dahil) gibi organik maddeler yandığı zaman ve aynı zamanda benzin ve yağlar gibi yakıtlar yandığı zaman oluşabilir ya da havaya karışır (Uchida ve ark., 1998). Akrolein ayrıca, bina yangınlarında apartman sakinleri için ölümcül olabilecek konsantrasyonlarda oluşabilir (ATSDR, 2007). İmmünoisitokimyasal analizlerde formaldehite alternatif fiksatif olarak da kullanılmaktadır (King ve ark., 1983).

Akrolein solunduğunda, saniyeler içinde önemli bir kısmı dokulara girer. Yutulur ya da deri teması olursa, bir miktar akrolein tekrarlı olarak vücut dokularına girer ancak miktarı bilinmemektedir. Bir kez dokulara giren akrolein, metabolitlerine dönüşür. Bu durum muhtemelen dakikalar ya da saatler içinde olur. Bu metabolitlerin bir kısmı vücudu idrar yolu ile terkeder. Ancak bu sürecin ne kadar zaman aldığı da bilinmemektedir (ATSDR, 2007).



Şekil 2.3. Akroleinin moleküler yapısı

Bir kimyasal maddenin kişiye zarar verip vermediğini açıklamak için, bu kimyasal maddenin absorpsiyonu, dağılımı, biyotransformasyonu ve kinetiğinin bilinmesi gerekir. Hayvan testleri genel toksisite verisi yanında kanser ya da doğum kusurları gibi özel toksik etkilerin belirlenmesine de yardımcıdır. Bir kimyasal maddenin toksisitesi, maruziyet miktarına ve süresine bağlıdır. Çok uzun süre, fazla miktarda akroleine maruz kalmak, kişinin daha kötü etkilenmesine neden olur. Kısa bir süre için çok düşük seviyelerde akrolein solunursa, gözlerde

yaşarma ve boğazda ağrı oluşabilir. Bu etkiler maruziyetten kısa bir süre sonra yok olur (ATSDR, 2007). Bununla birlikte, eğer yüksek dozlarda daha uzun süreli ve tekrarlı maruziyet söz konusu ise akciğerler etkilenebilir. Akroleini ağız yoluyla alan hayvanlarda, mide irritasyonu, kusma, mide ülseri ve kanama görülmüştür (ATSDR, 2007). Akroleini solumanın, yemenin ya da cilde dökülmesinin doğum hasarına, çocuk sahibi olamama durumuna ya da kansere neden olup olmadığı bilinmemektedir. Amerika Sağlık ve İnsan Hizmetleri Birimi (Department of Health and Human Services) akroleinin karsinojenitesi konusunda bir sınıflandırma yapmamıştır. IARC (The International Agency for Research on Cancer), akroleinin insanlarda kanserojen olarak sınıflandırılmadığını belirtmiştir. Çevre Koruma Ajansı (EPA) ise akroleinin kanserojenlik potansiyelini yetersiz veritabanına bağlı olarak açıklanamadığını belirtmiştir (ATSDR, 2007).

Akroleinin ya da metabolitlerinin etkileriyle ilişkili olarak insan doku ya da vücut sıvılarında bulunduğu miktara dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Toksikokinetik çalışmalar akroleinin organizmadaki proteinlerle ve asitlerle reaksiyona girdiğini göstermektedir. Ancak bu kimyasal madde veya metabolitleri ile ilgili belirgin bir etki bulunamamıştır (ATSDR, 2007)

İnsanlarda akroleinin indüklediği bir etkinin nicel olarak bağlantılı olduğu bir biyobelirteci yoktur. Bazı biyobelirteçlerin belirlenmesi ve kullanımı, insanlarda akrolein alımı ve maruziyeti arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek, havadaki, içme suyundaki ya da yemeklerdeki akrolein miktarını belirlemekten çok daha faydalı olacağı belirtilmiştir (ATSDR, 2007).

Akroleinin glutatyon ile konjugasyonunda oluşan bir ürün olan 3-hidroksipropilmerkaptürik asit, siklofosamid ilacını kullananların idrarlarında belirlenmiştir (ATSDR, 2007). Aynı metabolit derialtı akrolein maruziyeti sonucu sıçanların idrarlarında da bulunduğundan, idrardaki 3-hidroksipropilmerkaptürik asidin seviyesinin akroleine maruziyeti belirlemede kullanılabileceği düşünülmektedir. Parent ve ark. (1998) tarafından sıçanlarda oral ve intravenöz işaretlenmiş akrolein alımı sonucu 6 üriner metabolit bulunmuş, fakat metabolit seviyesi ve doz arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır.

Akrolein ve akrilamid organizmada önemli miktarda glutatyon (GSH) ile reaksiyona girer ve degradesyondan sonra idrarda merkaptürik asit olarak atılırlar. Merkaptürik asit türevleri idrarda biyobelirteç olarak ölçülmüştür.

Yemeklerin hazırlanma süreçleri ve bundan kaynaklı değişen yiyeceğin içeriği ülkeler arasında farklılık gösterir. İçerik çeşitliliği, yemeklerin kompozisyonuna, pişirme sürecine ve hazırlanma aşamasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu sebeple, yemeklerde yapılacak ölçümler “yemeye hazır” aşamasında yapılmalıdır. Mevcut maruziyet verilerine göre, en yüksek akrolein içeriği alkollü içeceklerde ölçülmüştür. Bazı çalışmalarda akrolein, havyar, kuzu eti, tuzlanmış domuz eti, tavuk eti, kakao ve çikolata likörü, kahve ve çay gibi alkollü olmayan içeceklerde, sadece kalitatif olarak belirlenmiştir (Abraham ve ark., 2011).

2.6.1. Besinlerde Akroleinin Oluşumu ve Analizi

Akrolein yemeğin pişmesi süresince farklı aşamalarda aminoasitlerden, yağlardan ve karbonhidratlardan oluşabilir. Sebzelerin ve yağların kızartma sırasında ısıtma ya da gereğinden fazla ısıtılması ile oluşur. Bu reaksiyon boyunca, trigliseritler hidrolitik olarak sudan ayrılarak ve gliserinin dehidrate olmaya devam etmesiyle oluşurlar. Yüksek reaktifliğine bağlı olarak, suda polimerleşme eğilimindedir ve analitik olarak serbest akrolein olarak tespit edilemez. Buna ek olarak, akrolein aminoasit dönüşümü boyunca (Maillard reaksiyonu sırasında Strecker degradesyonu) oksidatif deaminasyonu boyunca oluşur. Besinlerdeki akrolein miktarının tespiti oldukça karışıktır. Osorio ve de Lourdes (2011) tarafından yapılan bir çalışmada patates kızartmasındaki akrolein içeriği 1-5 mg/kg olarak rapor edilmiştir. Ölçümlerin tekrarlanması boyunca, %100'e kadar farklılıklar elde edilmiştir. Eğer yemekler yağda ısıtılırsa, akrolein emilimi soya fasülyesi yağı için yaklaşık 20 mg/kg/saat'e, kolza tohumu yağı için ise 10 mg/kg/sa'e kadar azalmıştır. Bu verilerden yola çıkarak 100 g patates kızartmasının 10 dakika ısıtılması sonucu yaklaşık 150 mg akrolein açığa çıkmaktadır. Yemekler için şimdiye kadar oluşturulmuş tüm analitik metodlar henüz standardize edilememiştir ve laboratuvarlar arası metodların karşılaştırılmasıyla ilgili çalışma yapılmamıştır (Abraham ve ark., 2011).

Karbonhidrat içeren besinlerin ısıtılması ya da pişirilmesi sonucu, karbon-karbon ayrılması ya da proteinlerdeki aminoasit kalıntıları ile reaktif karbonhidrat ara ürünleri oluşur (Stevens ve Maies, 2008). Dehidratasyonla (ya da ısı indüklenmesiyle) akrolein oluşturan 2-hidroksi-propenal akroleinin öncül maddesidir. Akroleinin glikozdan oluşum aşamaları şu şekilde gerçekleşmektedir:

Glukoz → deoksiglukozon → hidroksi aseton → 2-hidroksi propanal → akrolein (Stevens ve Maies, 2008).

2.6.2. Tütün Kaynaklı Akrolein Maruziyeti

Sigara dumanı ile akrolein maruziyeti toplam insan maruziyetinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Sigara içenler ile içmeyenlerin idrar örnekleri karşılaştırıldığında içenlerde akroleinin metaboliti olan 3-hidroksipropilmerkaptürikasidin 2 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada, 4 hafta sigara içmeyi bırakan bir kişide, akrolein metaboliti seviyesinde ortalama %78 düşüş gözlenmiştir (Stevens ve Maies, 2008).

Sigaranın üretim sürecinde, ağırlığın %1-5'i kadar, nemin korunması ve tat vermesi için, tütüne gliserol eklenmektedir. 100 g tütünde 5 g gliserol olan (60 µg akrolein/sigara) ya da kontrol sigaraları (56 µg akrolein/sigara) ile karşılaştırıldığında, 100 g tütüne 10 ya da 15 g gliserol eklenmesinin dumanda %9 oranında akrolein miktarının artışına neden olduğu bulunmuştur (sırasıyla 67 ve 69 µg akrolein/sigara). Bu bilgilere göre, 100 g tütüne eklenen her gram gliserol için sigara başına akrolein salınımının 0,9 µg olduğu hesaplanmıştır. Bu nedenle, gliserol bağlı akrolein salınımı gliserol olmadan sigara dumanından salınan akrolein miktarından (56 µg/akrolein/sigara) daha fazladır (Stevens ve Maies, 2008).

2.6.3. Yağlardan Akrolein Oluşumu ve Analizi

Akroleinin en bilinen kaynağı triaçil ve diaçil gliseridin bileşeni gliseroldür, ama akrolein yağ asitlerinden ya da lipid peroksidasyonundan da oluşabilir. Bazı araştırmacılar lipid peroksidasyonu sürecinde çoklu doymamış yağ asitlerinden

akrolein oluşumu üzerinde durmaktadırlar. Esterbauer'in mekanizması akroleinin yağ asitlerinin asitalkil ucundan ya da karboksi ucundan oluşmasının olası olmadığını göstermektedir. Esterbauer bu mekanizmayı önermiştir, çünkü akrolein alifatik zincirin ortasından orijin alır (Stevens, 2008).

Pedersen ve ark. (1999) kolza tohumu yağında ısı ile muamele sonu salınan akrolein miktarı ile kolza tohumu yağ asidi metil esterleri ve petrolyumdan türemiş dizel yakıtların ısıyla muamelesi sonucu oluşan akrolein miktarlarını karşılaştırmıştır. Uçucuların miktarını belirlememiş olmalarına rağmen, GC-MS kromotogram deneyleri, kolza tohumu yağından oluşan akrolein miktarının 550°C'de hücre reaktöründe tutulan yağ asidi metil esterleri karışımından 102 kat daha fazla açığa çıktığı tespit edilmiştir. Gliserolün akroleinin önemli bir ön maddesi olduğu kanıtlanmıştır (Stevensve Maies, 2008).

Akrolein ve akrilamidin eşit oranlarda merkaptürikasit türevlerine metabolize oldukları göz önüne alınarak, 150 g patates cipsinde 15 mg/kg ile 100 mg/kg akrolein konsantrasyonu olabileceği hesaplanmıştır. Osório ve ark.'ı (2011) 170°C'de 12-15 dk farklı yağlarda yaptığı kızartma sonucu analizlerinde daha düşük konsantrasyonda akrolein oluştuğunu tespit etmişlerdir. Ewert ve ark.'ı (2011) 140°C'de 24 saat hindistancevizi yağında kızartıldığında 6,7 mg/kg, keten tohumu yağında ise 242,3 mg/kg akrolein içerdiği tespit etmiştir. Araştırmacılar su ve havanın varlığının kızartma sırasında oksidatif ya da hidrolitik bir sürece neden olabileceğini savunmuşlardır. Sonuç olarak, veriler patates kızartmasının önemli miktarlarda akrolein içerdiğini göstermektedir (Abraham ve ark., 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan akrolein ve metilselüloz, Sigma (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Tam kan sayımı, MS9-5 veteriner amaçlı kan sayım kiti kullanılarak yapılmıştır. İmmünohistokimya için HRP Kiti ve Nörofilament antikoru Thermo Scientific/LabVision firmasından (Amerika) temin edilmiştir. Protein analizleri için, BCA Protein analiz kiti Pierce firmasından, Glial Fibriler Asidik Protein ve Miyelin Temel Proteini ELISA kitleri USCN Life firmasından satın alınmıştır.

3.2. Deneysel Hayvanlarının Temini ve Deneysel Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada, oral yolla akrolein uygulaması sonucu meydana gelebilecek hematolojik, biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için gelişmekte olan Wistar (*Rattus norvegicus*) erkek sıçanlar kullanılmıştır. Deneyde kullanılan 3-4 haftalık yavru sıçanlar Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi'nden temin edilmiştir. Sıçanların 3-4 gün boyunca laboratuvar koşullarına alışması sağlanmıştır. Deneye başlanırken sıçanlar rastgele seçilerek gruplandırılmışlardır. Deneysel grupları kontrol, metilselüloz-kontrol, 0,5 mg/kg/gün akrolein, 1 mg/kg/gün akrolein, 2 mg/kg/gün akrolein uygulanan gruplar oluşturmuş (Aurebach, 2008) ve her grupta 10 hayvan olmak üzere toplam 50 erkek sıçan kullanılmıştır. Akrolein, haftalık olarak hazırlanan %0,05'lik metilselüloz çözeltisi içinde çözülerek sıçanlara 90 gün süreyle oral yolla ile verilmiştir. Sıçanlar standart sıçan pellet yemi ve çeşme suyu ile beslenmişler, kontrol grubu sıçanlara herhangi başka uygulama yapılmazken, metilselüloz kontrol grubu sıçanlara 2mg/kg/gün metilselüloz uygulanmıştır..

3.3. Laboratuvar Koşulları

90 gün devam eden deneysel süresince laboratuvarda bulunan fotoperiyot zaman ayarlayıcısı ile 12 saat aydınlık 12 saat karanlık koşulları sağlanmıştır. Günlük takip edilen laboratuvar sıcaklığı ortalama $20,6 \pm 1,3$, nisbi nem ise ortalama $50,3 \pm 3,9$ olarak kaydedilmiştir. Tüm deneysel hayvanlarının ortam koşullarından aynı

şekilde yararlanabilmesi için kafeslerin yerleri 2 haftada bir olacak şekilde düzenli olarak değiştirilmiştir.

3.4. Besin - Su Tüketimlerinin ve Vücut Ağırlıklarının Saptanması

Bütün gruptaki sıçanların yem ve suları her gün yenilenmiş ve tüketilen miktarlar günlük olarak kaydedilmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların vücut ağırlıkları haftalık olarak kaydedilmiştir. 90 gün sonunda sıçanların canlılığı servikal dislokasyon yöntemi ile sonlandırılmıştır. Diseksiyon sonunda hayvanların beyin dokularındaki morfolojik değişiklikler incelenerek, yaş doku ağırlıkları kaydedilmiştir.

3.5. Hematolojik Analizler

Tam kan sayımı için sıçanın kalbinden steril enjektörle alınan kan örneği EDTA'lı kan tüplerine aktarılmıştır. Örnekler MS59 marka kan sayım cihazı ile okutulmuştur. Tam kan sayımı kapsamında eritrosit sayısı ve yüzdesi, hemoglobin değerleri ve hematokrit yüzdesi, lökosit sayıları ve yüzdeleri, trombosit sayıları ve MHCH, MCH, Pct, MVC değerleri tespit edilmiştir.

3.6. Biyokimyasal Analizler

Sıçanlardan alınan kan örneklerinin bir kısmı biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere kitlerin belirlediği protokole uygun olarak 3500 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek serum elde edilmiştir. Serum örneklerinde total protein, glial fibriler asidik protein ve miyelin temel proteini miktarları analiz edilmiştir. Total protein analizi spektrofotometrik olarak BCA protein analiz kiti (Pierce, Rockford, Illinois) kullanılarak yapılmıştır. Standart olarak sığır serum albumini kullanılmıştır. GFAP ve MBP analizleri ELISA kitleri (Uscn Life Science Inc. Wuhan) kullanılarak BIOTEK µQuant Mikroplate Spektrofotometre cihazında yapılmıştır.

3.7. Histolojik İncelemeler

Sıçanların beyin dokuları bütün halde çıkartılarak organ ağırlığı kaydedilerek %10'luk formol çözeltisine alınmıştır. Dokular fiksatif içinde ortalama 24 saat bekletilerek doku takibi işlemleri yapılmıştır. Doku takibi aşamasından sonra 55^olik

parafin içine gömülerek bloklanan dokulardan mikrotomda 5 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler histolojik inceleme için rutin Hematoksilin&Eosin (H&E) boyası ile, Nissl cisimcikleri için Cresyl Violet boyası kullanılarak boyanmıştır. H&E ile boyanmış preparatlarda her hayvandan alınan doku kesitlerinde rastgele 10 farklı alan seçilerek bu alanlarda değişiklik gözlenen hücreler sayılmış ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.8. İmmünohistokimyasal İncelemeler

İmmünohistokimyasal inceleme kapsamında sıçan beyin dokularından elde edilen kesitler polilizin ve jelatin kaplı lama alınarak Thermo-Scientific marka Nörofilament (68kDa&200kDa) antikoru ve HRP-DAB immünohistokimya kiti kullanılarak kitin protokolünde belirtilen şekilde nörofilamentler boyanarak ışık mikroskobunda incelenmiştir.

3.9. İstatistiksel Analizler

Deney sonucunda elde edilen tüm veriler Statistica programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiş, Dunnet post-hoc testleri ile gruplar arasındaki farkın önemi anlamlılık derecesinde test edilmiştir. $P \leq 0,05$ anlamlılık derecesi olarak kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Vücut Ağırlıkları, Günlük Yem ve Su Tüketim Sonuçları

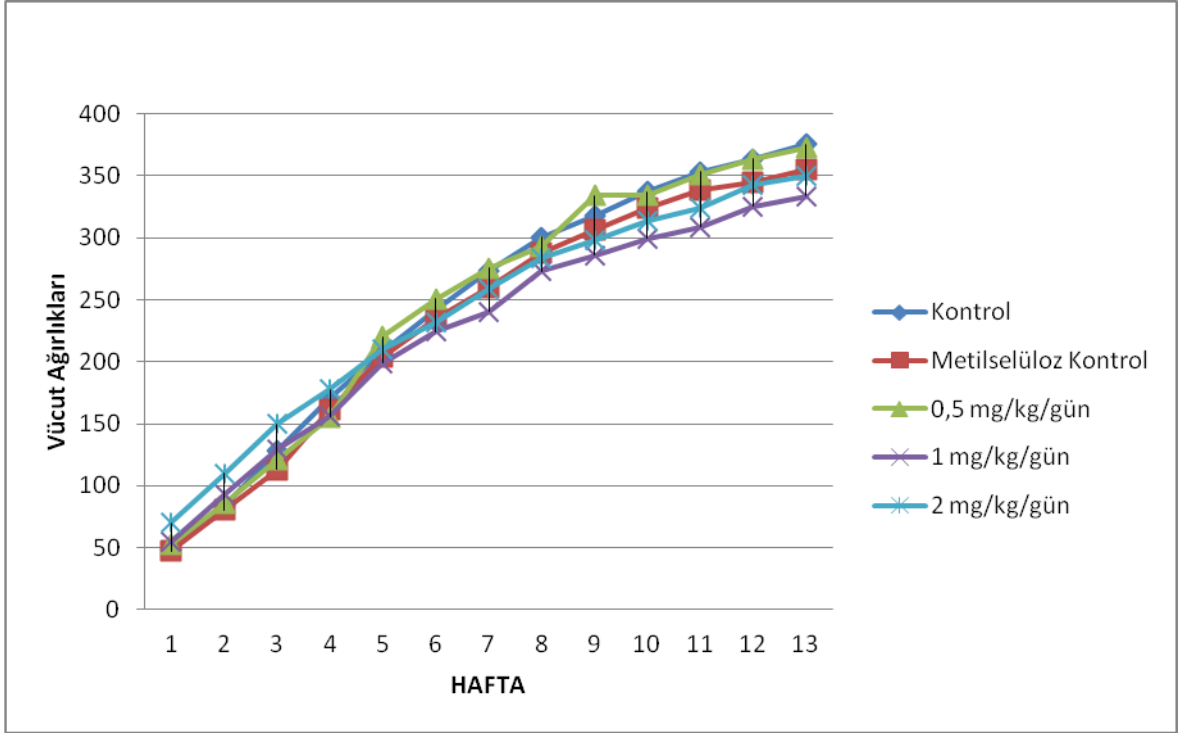
Kontrol ve akrolein uygulaması yapılan gruplardaki sıçanların deney başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları, deney süresince kazanılan vücut ağırlıkları ve beyin dokusu ağırlıkları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Kontrol ve akrolein gruplarındaki sıçanların deney süresi boyunca vücut ağırlıkları, günlük yem ve su tüketimlerini gösteren grafik sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların vücut ağırlıkları, deney süresince ortalama günlük yem su ve tüketimleri

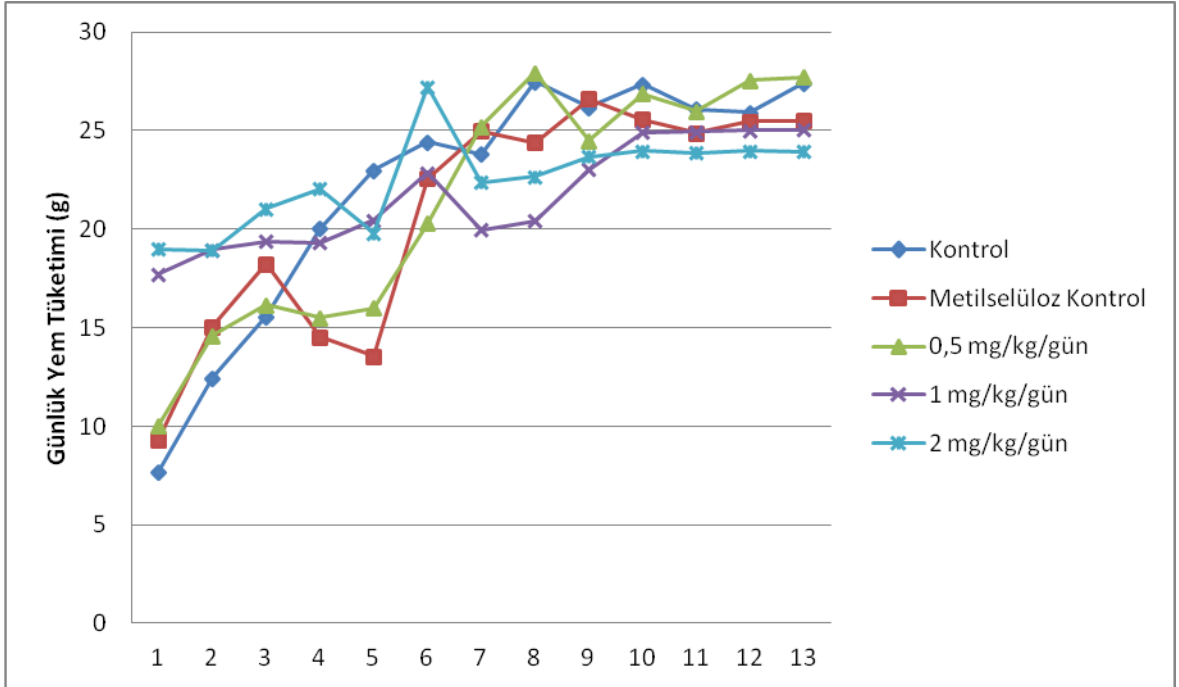
| | Kontrol | Metilselüloz Kontrol | Akrolein Grupları (mg/kg/gün) | | |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | 0,5 | 1 | 2 |
| Başlangıç vücut ağırlığı (g) | 48,7±2,58 | 47,4±3,06 | 52,6±4,27 | 54,7±8,82 | 69,9±18,75 |
| Bitiş vücut ağırlığı (g) | 367,2±30,31 | 352,7±40,52 | 388,75±23,32 | 344,875±24,20 | 363,11±34,38 |
| Kazanılan Ağırlık (g) | 326,9±8,88 | 305,3±12,38 | 336±8,57 | 290,25±6,77 ^a | 293,11±9,67 ^a |
| Kazanılan Ağırlık (%) | 670,9±12,68 | 644,6±23,95 | 642,9±31,71 | 539,4±23,90 ^a | 598,9±51,17 ^a |
| Beyin dokusu Ağırlığı (g) | 1,9±0,09 | 2,0±0,1 | 2,0±0,05 | 1,8±0,1 | 1,9±0,07 |
| Yem tüketimi (g) | 22,1±1,77 | 20,8±1,62 | 21,4±1,72 | 21,7±0,74 | 22,5±0,65 |
| Su tüketimi (ml) | 38,4±3,38 | 36,9±2,58 | 51,1±7,90 | 34,6±2,03 | 32,9±1,62 |

^aKontrol grubundan farklı (P≤0,05)

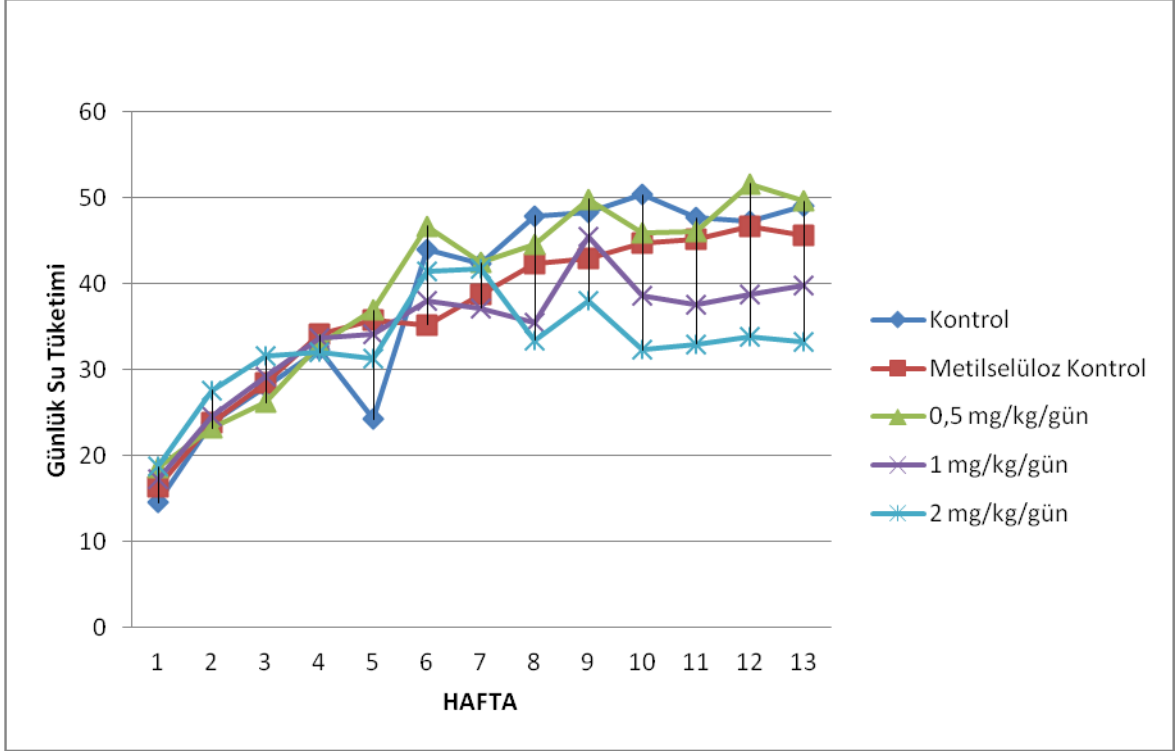
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.1. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların haftalık ortalama ağırlıkları



Şekil 4.2. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların günlük ortalama yem tüketimleri



Şekil 4.3. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların günlük ortalama su tüketimleri

Akrolein uygulanan sıçanlara ait değerler kontrol gruplarının değerleri ile karşılaştırıldığında 1 mg/kg/gün ve 2 mg/kg/gün uygulama grubu sıçanlarının ağırlık artışlarında kontrol grubundan istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklılık gösterdiği görülmektedir (sırasıyla $P=0,0125$; $P=0,0057$).

Uygulama gruplarındaki sıçanların günlük yem ve su tüketimlerinde ve beyin dokusu ağırlıklarında kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Uygulama süresince hayvanlarda gözlenen kilo kaybının yanında gözlerde akıntı ve kanama, burun akıntısı ve kanama gibi klinik bulgular kaydedilmiştir.

4.2. Kan Analiz Sonuçları

Deney gruplarındaki sıçanların kan analiz sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Metilselüloz kontrol grupları ve uygulama grupları, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında bazı kan parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede değişiklik tespit edilmiştir. 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulanan sıçanların lökosit yüzdesinde anlamlı derecede %92,6 artış görülmektedir (P=0,015). 1 mg/kg/gün akrolein uygulanan grubun monosit yüzdesinde ise %54,75 artış gözlenmiştir (P=0,010). 0,5 mg/kg/gün ve 2 mg/kg/gün akrolein uygulanan gruplardaki monosit sayısında sırasıyla %134,62 ve %130,77 artış olduğu görülmüştür (Sırasıyla P=0,023; P=0,030). 0,5 mg/kg/gün uygulama grubuna ait sıçanların MCV değerlerinde %3,91 oranında düşüş olduğu görülmektedir (P=0,039). Metilselüloz kontrol ve 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulama gruplarının hematokrit oranlarında sırasıyla %48,05 ve %50,59 artış olduğu bulunmuştur (P=0,001; P=0,001). Metilselüloz kontrol ve 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulama gruplarının MCH değerlerinde sırasıyla %33,52 ve %32,40 (Sırasıyla P=0,0001; P=0,0002); MCHC değerlerinde sırasıyla %31,59 ve %29,60 (P=0,0002; P=0,0004); Pct değerlerinde sırasıyla % 85,42 ve % 83,10 (P=0,0001; P=0,0001); trombosit değerlerinde ise yine sırasıyla %78,53 ve %72,37 oranlarında düşüş olduğu gözlenmiştir.

Uygulama grupları metilselüloz kontrol grupları ile karşılaştırıldığında bazı değerlerin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösterdiği görülmektedir. 1mg/kg/gün ve 2 mg/kg/gün uygulama gruplarına ait hematokrit değerlerinde sırasıyla %30,35 ve %42,81 düşüş (P=0,0048; P=0,0001); MCH değerlerinde sırasıyla %48,11 ve %55,15 (P=0,0002; P=0,0001); MCHC_değerlerinde sırasıyla %46,56 ve %54,20 (P=0,0003; P=0,0001); trombosit değerlerinde %363,97 ve %379,27 (P=0,0001; P=0,0001); Pct değerlerinde ise sırasıyla %566,95 ve %599,14 (P=0,0001; P=0,0001) artış olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların kan analiz sonuçları

| Parametreler | Kontrol | Metilselüloz Kontrol | Akrolein (mg/kg/gün) | | |
|------------------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | | 0,5 | 1 | 2 |
| Lökosit (mm ³) | 3,36 ± 1,72 | 4,91 ± 1,97 | 6,47 ± 1,59 ^a | 4,73 ± 2,60 | 4,83 ± 1,84 |
| Lenfosit (%) | 83,73 ± 4,70 | 78,02 ± 4,77 | 77,3 ± 12,33 | 73,64 ± 10,61 | 84,67 ± 3,48 |
| Mononosit (%) | 8 ± 2,25 | 8,89 ± 2,37 | 9,2 ± 2,34 | 12,38 ± 4,26 ^a | 7,09 ± 1,59 |
| Nötrofil/Granülosit (%) | 8,29 ± 3,34 | 13,07 ± 3,09 | 13,48 ± 10,47 | 13,96 ± 6,55 | 8,22 ± 2,43 |
| Lenfosit | 2,84 ± 1,52 | 3,85 ± 1,59 | 4,9 ± 1,12 | 3,46 ± 2,02 | 4,09 ± 1,54 |
| Monosit | 0,26 ± 0,14 | 0,42 ± 0,17 | 0,61 ± 0,24 ^a | 0,6 ± 0,40 ^a | 0,33 ± 0,18 |
| Nötrofil/Granülosit | 0,26 ± 0,1 | 0,64 ± 0,30 | 0,95 ± 1,00 | 0,69 ± 0,49 | 0,39 ± 0,18 |
| Eritrosit (mm ³) | 10,58 ± 0,69 | 16,32 ± 464,44 | 16,61 ± 2,83 | 10,82 ± 4,47 | 9,15 ± 1,3 |
| MCV (fl) | 32,73 ± 0,53 | 31,74 ± 0,74 | 31,45 ± 1,32 ^a | 32,61 ± 1,21 | 32 ± 0,64 |
| Hematokrit (%) | 34,65 ± 2,76 | 51,3 ± 5,96 ^a | 52,18 ± 9,17 ^a | 35,73 ± 16,51 ^b | 29,34 ± 4,54 ^b |
| MCH (pg) | 14,32 ± 0,63 | 9,52 ± 1,55 ^a | 9,68 ± 2,99 ^a | 14,1 ± 2,48 ^b | 14,77 ± 1,04 ^b |
| MCHC (g/dl) | 43,72 ± 2,06 | 29,91 ± 4,25 ^a | 30,78 ± 8,96 ^a | 43,46 ± 8,27 ^b | 46,12 ± 0,63 ^b |
| Hemoglobin (g/dl) | 15,14 ± 1,06 | 15,2 ± 1,52 | 15,39 ± 1,12 | 14,38 ± 2,54 | 13,28 ± 2,09 |
| Trombosit (mm ³) | 867,1 ± 921,78 | 186,2 ± 2624,02 ^a | 239,6 ± 2184,9 ^a | 863,9 ± 3087,78 ^b | 892,3 ± 1623,25 ^b |
| Pct (%) | 15,98 ± 1,53 | 2,33 ± 5,19 ^a | 2,7 ± 4,67 ^a | 15,54 ± 5,88 | 16,29 ± 2,58 |

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubundan farklı (P≤0,05)

^bMetilselüloz kontrol grubundan farklı (P≤0,05)

4.3. Biyokimyasal Analizler

Deney sonunda sıçanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda GFAP, MBP ve total protein miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve Çizelge 4.3'te verilmiştir. Akrolein uygulanan grupların kontrol gruplarından GFAP, MBP ve total protein değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların biyokimyasal analiz sonuçları

| | Kontrol | Metilselüloz Kontrol | Akrolein (mg/kg/gün) | | |
|------------------------------|---------------|----------------------|----------------------|---------------|----------------|
| | | | 0,5 | 1 | 2 |
| Total Protein (pg/ml) | 1273,01±95,98 | 1139,55±133,53 | 1200,30±90,09 | 1118,53±62,31 | 1229,11±247,22 |
| MBP (pg/ml) | 0,47±0,14 | 0,39±0,27 | 0,46±0,25 | 0,28±0,09 | 0,32±0,12 |
| GFAP (pg/ml) | 52,95±24,16 | 48,57±22,40 | 33,38±2,66 | 48,08±17,54 | 38,03±6,03 |

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.4. Histopatolojik Analizler

Rutin histopatolojik yöntemlerle hazırlanan, H&E ve Cresyl Violet ile boyanan beyin dokularına ait preparatlar ışık mikroskobu altında histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda akrolein uygulanan gruplara ait sıçanların beyin dokularında korteksin hücre tabakalaşmasında bozulmanın kontrol gruplarından farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.4 – 4.8).

H&E ile boyanmış preparatlarda, hücre sitoplazmasında vakuolleşme ve kenara çekilmiş küçük çekirdekler incelendiğinde 1 mg/kg ve 2 mg/kg uygulama gruplarının kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Çizelge 4.4'te kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların beyin dokularında gözlenen hücre çekirdeği küçülmesi ve sitoplazmik vakuolleşmenin sıklığı verilmiştir (Şekil 4.9-4.13).

Cresyl Violet ile boyanmış olan preparatlarda, ışık mikroskobu altında yapılan incelemelerde Nissl cisimciklerinin yoğunluğu değerlendirilmiştir. İncelemeler sonucunda kontrol ve uygulama gruplarına ait beyin dokularında Nissl cisimcikleriyle ilgili yoğunluk farkına rastlanmamıştır (Şekil 4.14 ve 4.15) .

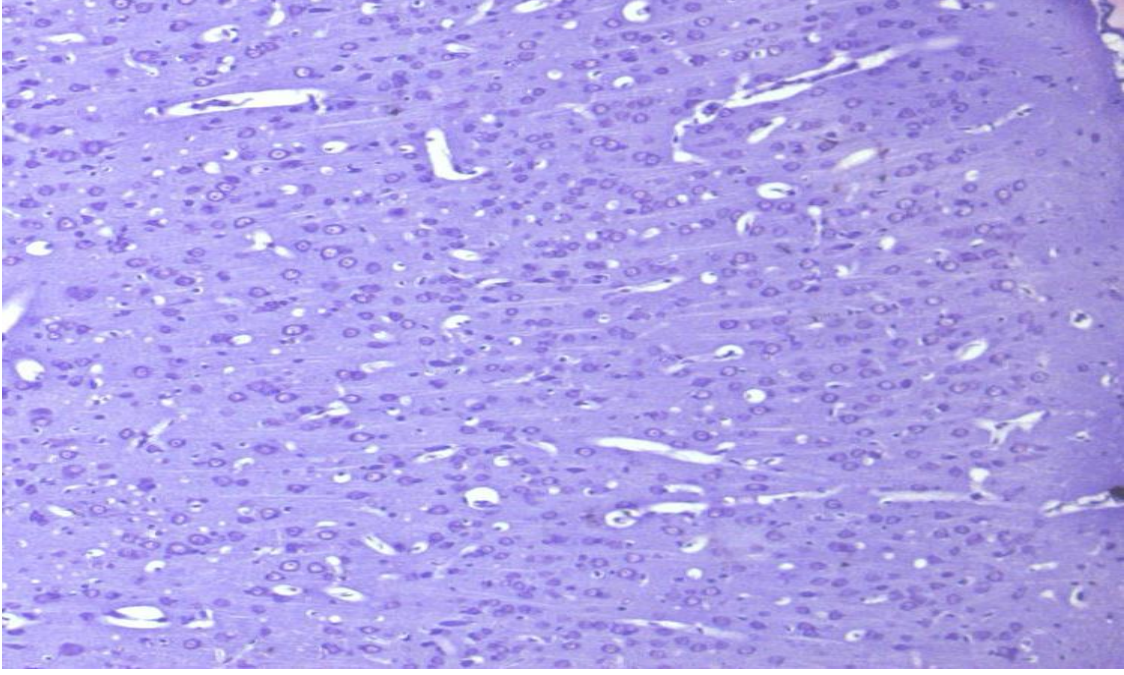
Çizelge 4.4. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanların beyin dokularında gözlenen histopatolojik değişikliklerin sıklığı

| | Kontrol | Metilselüloz Kontrol | Akrolein (mg/kg/gün) | | |
|--|----------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| | | | 0,5 | 1 | 2 |
| Çekirdek küçülmesi ve vakuolleşme | 0,57±0,1 | 0,72±0,13 | 0,53±0,01 | 1,17±0,3 ^a | 1,92±0,29 ^a |
| Kortekste Bozulma | 0/10 | 1/10 | 6/7 | 6/7 | 8/8 |

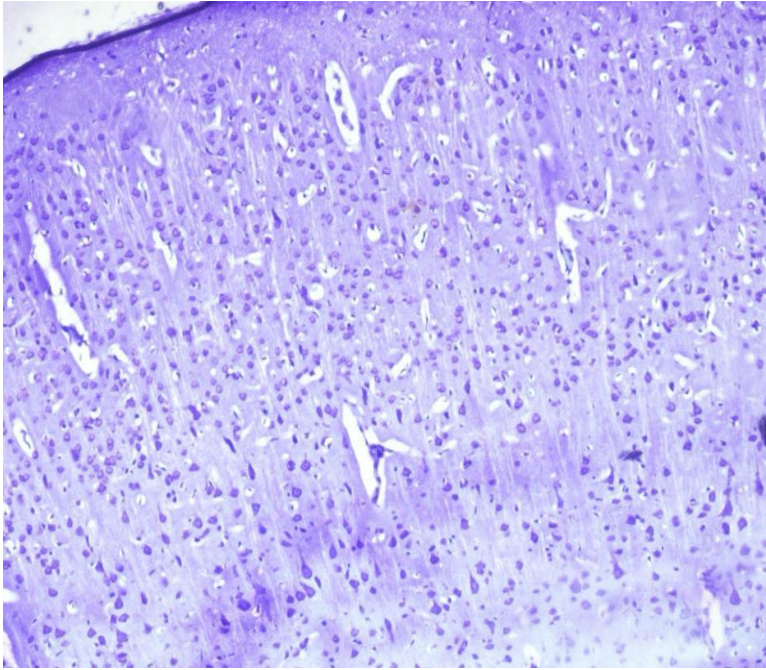
* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubundan farklı

** Değerler değişiklik gözlenen hayvan sayısı/grupta yer alan toplam hayvan sayısı şeklinde verilmiştir.

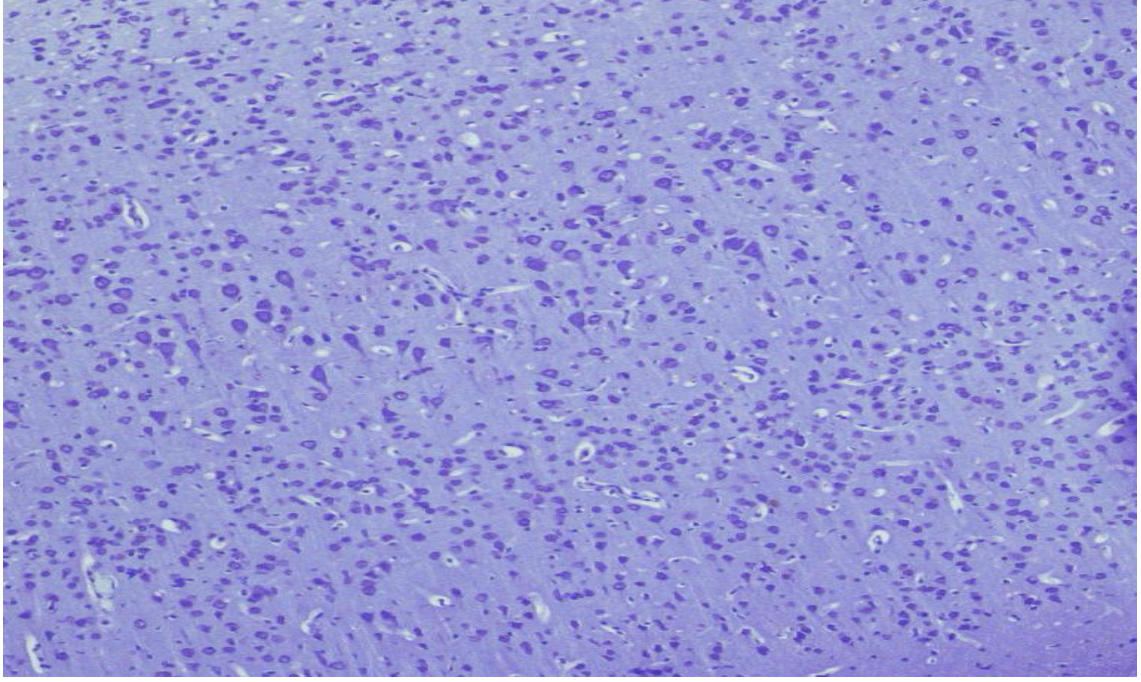


Şekil 4.4. Kontrol grubu sıçanına ait beyin dokusu korteks yapısı (Cresyl Violet boyama, 20X büyütme).

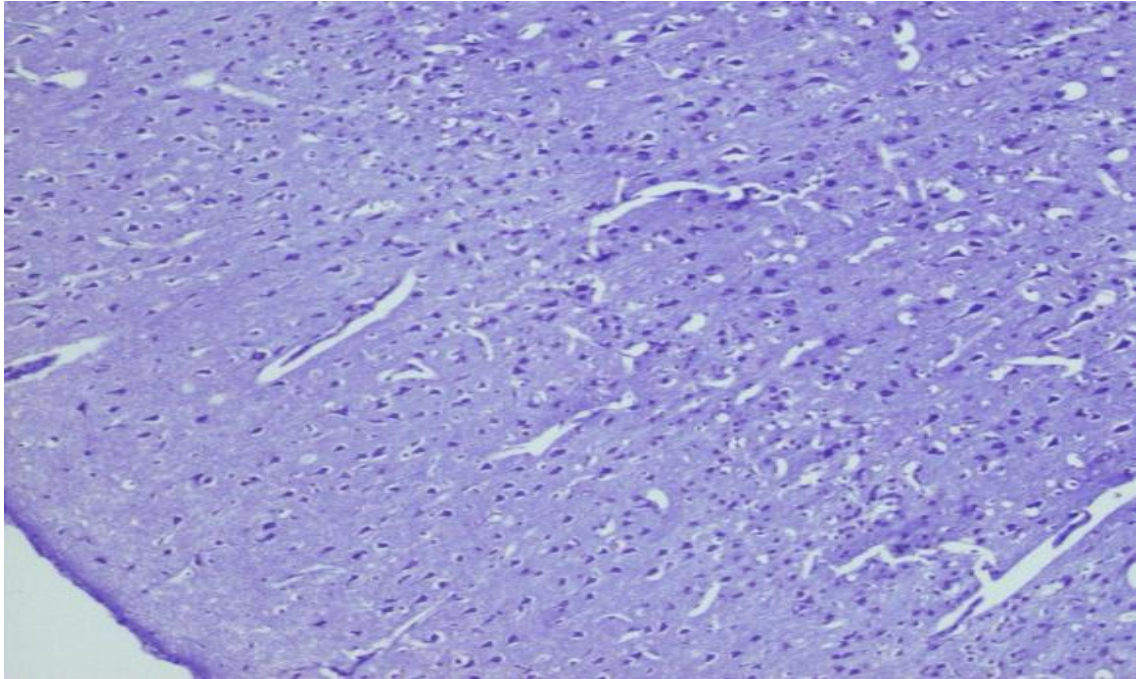


Serebral Korteks

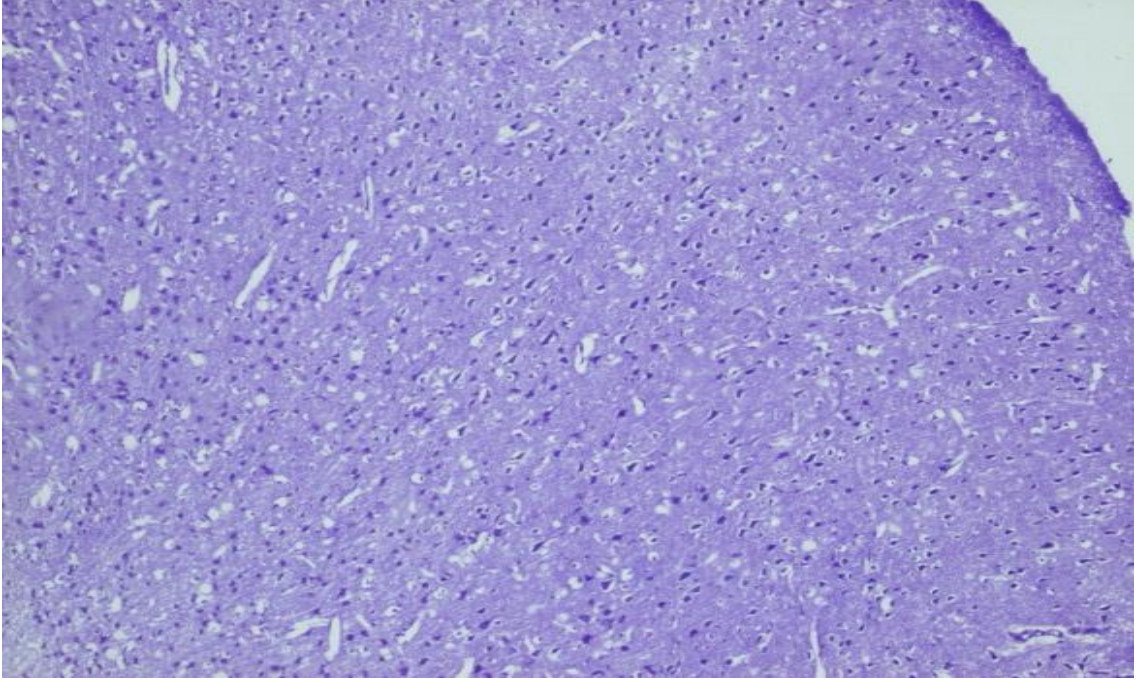
Şekil 4.5. Metilselüloz kontrol grubuna ait sıçanın beyin dokusu korteks yapısı (Cresyl Violet boyama, 20X büyütme).



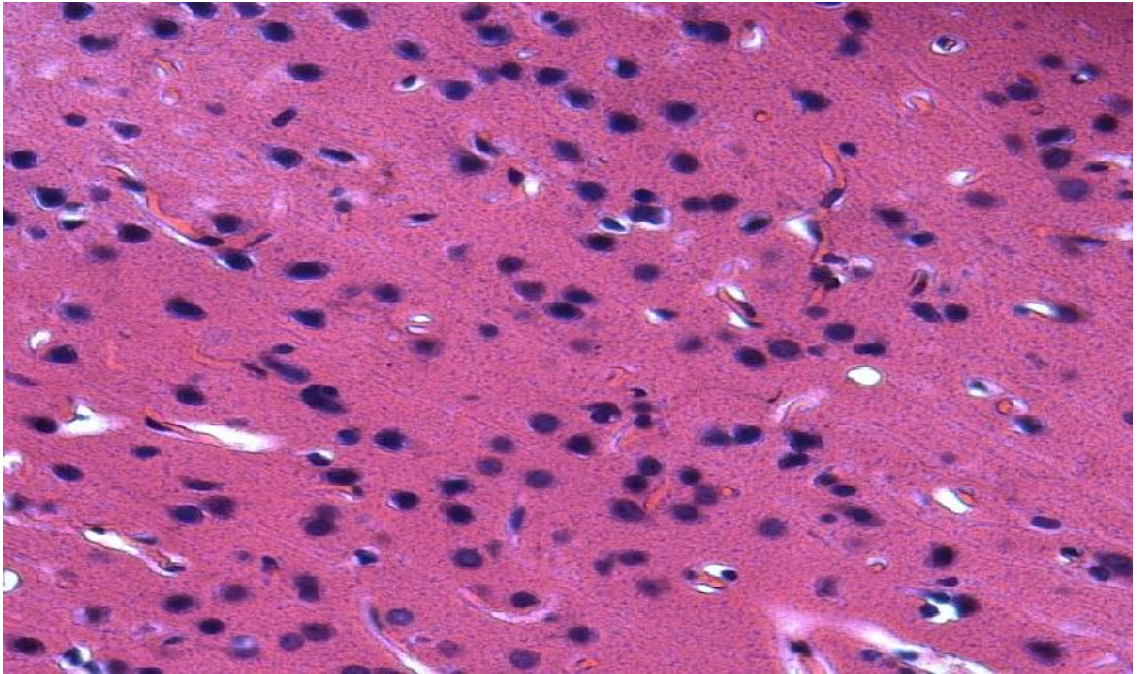
Şekil 4.6. 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulama grubuna ait sıçanın beyin dokusu korteksinde bozulma (Cresyl Violet boyama, 20X büyütme).



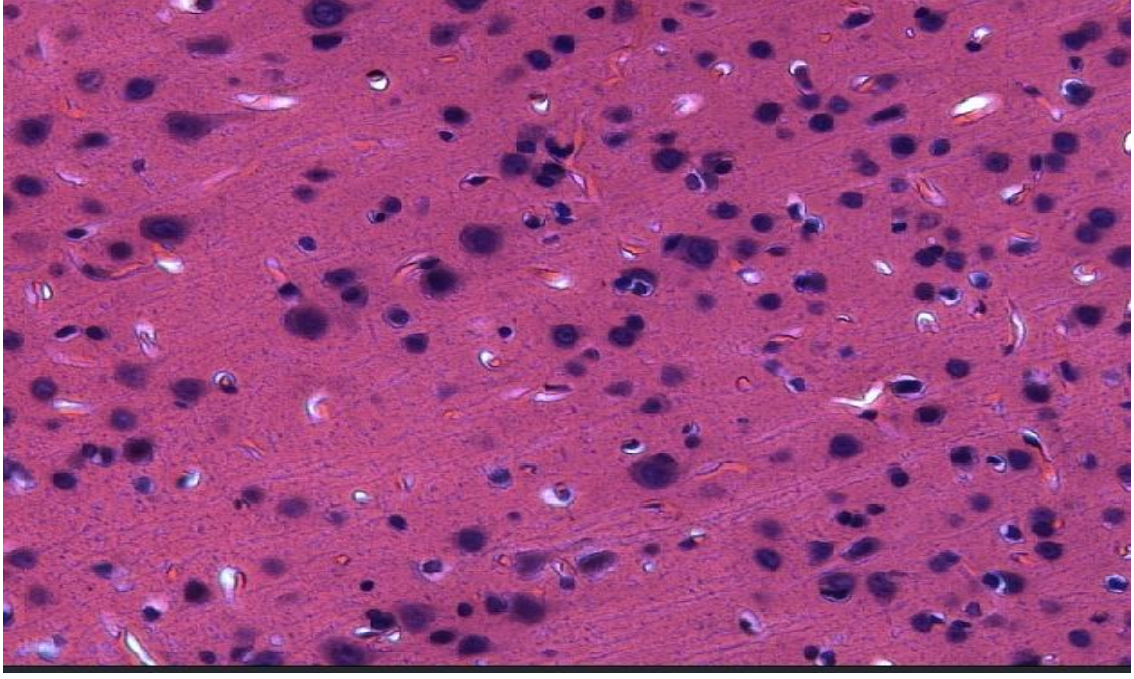
Şekil 4.7. 1 mg/kg/gün akrolein uygulama grubuna ait sıçanın beyin dokusu kortekste bozulma (Cresyl Violet boyama, 20X büyütme).



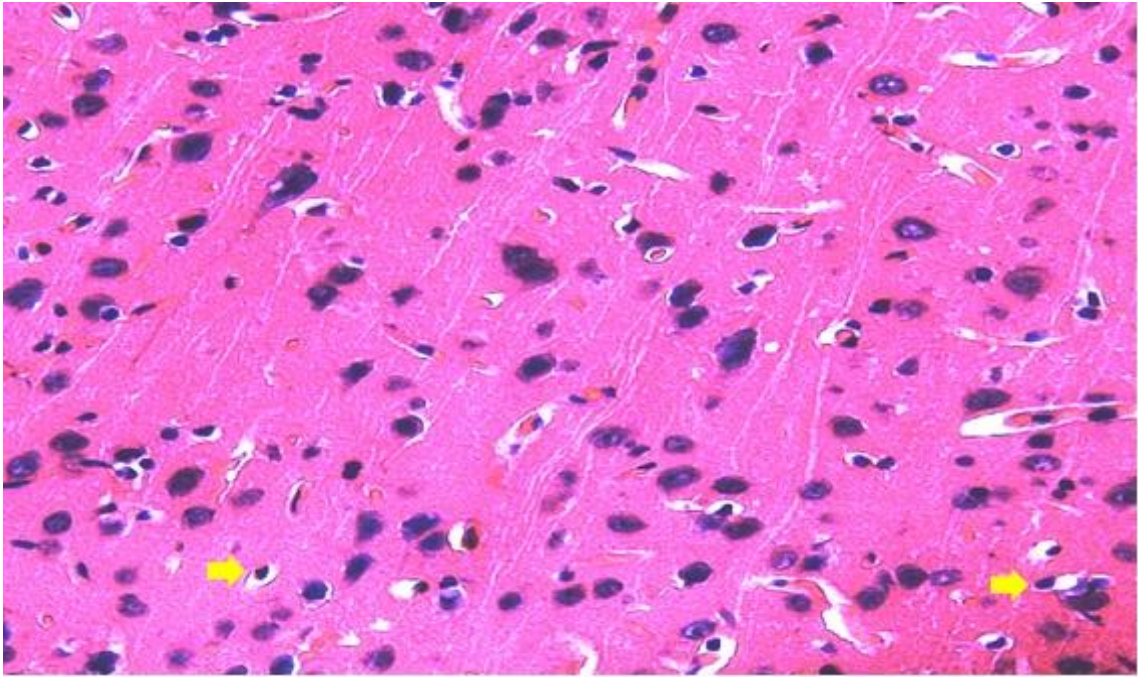
Şekil 4.8. 2 mg/kg/gün akrolein uygulama grubuna ait sıçanın beyin dokusu korteksinde bozulma (Cresyl Violet boyama, 20X büyütme).



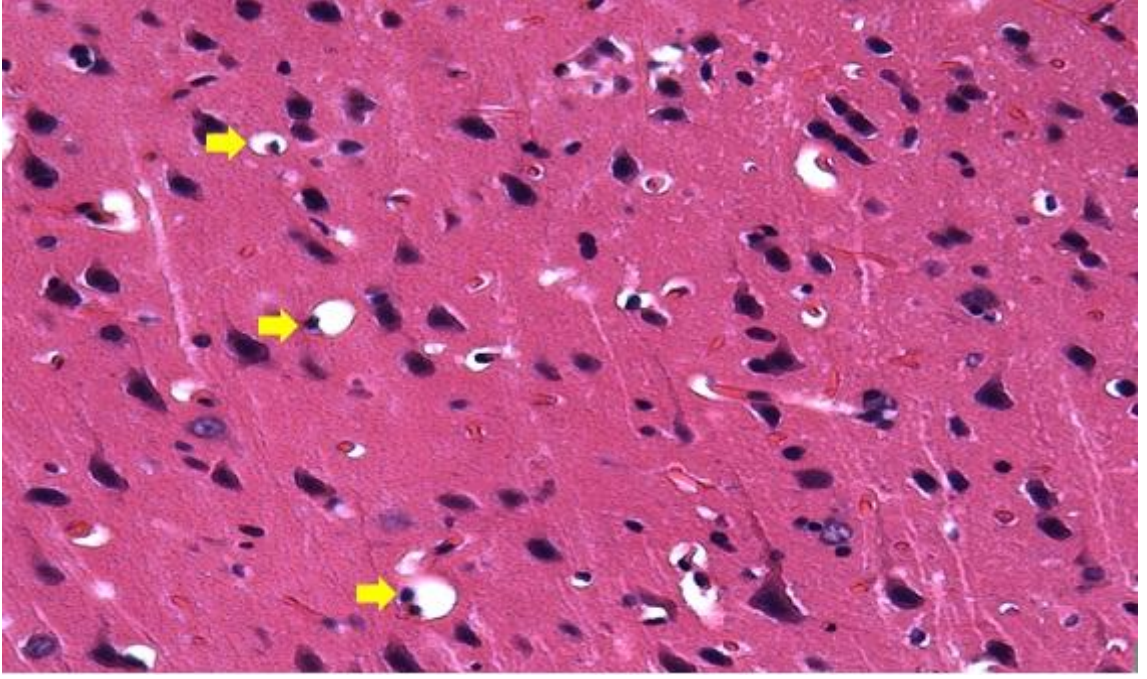
Şekil 4.9. Kontrol grubu sıçanına ait beyin dokusu (H&E, 40X büyütme).



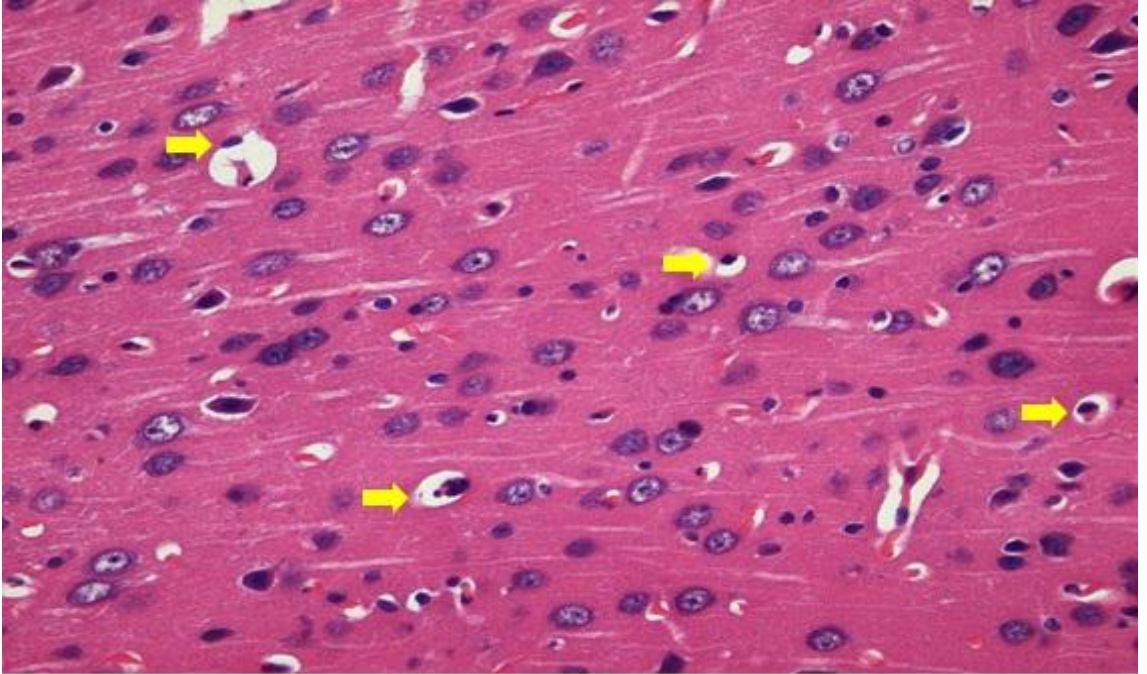
Şekil 4.10. Metilselüloz kontrol grubu sıçanına ait beyin dokusu (H&E, 40X büyütme).



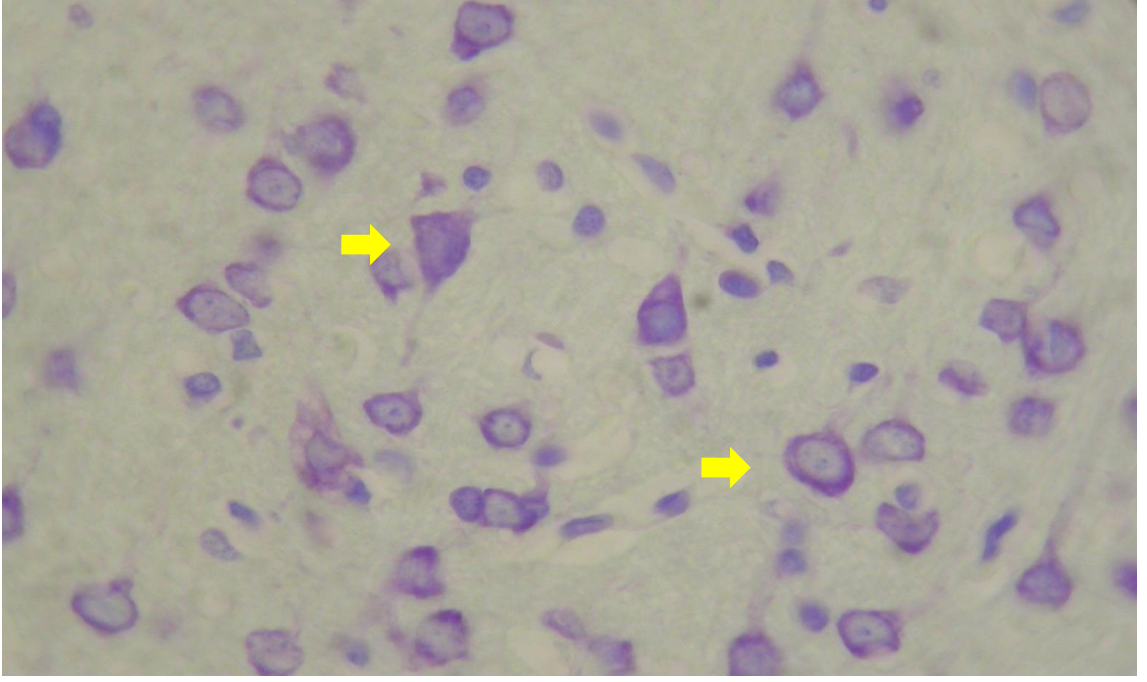
Şekil 4.11. 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçanına ait beyin dokusunda hücre çekirdeği küçülmesi ve hücre vakuolleşmesi (⇒) (H&E, 40X büyütme).



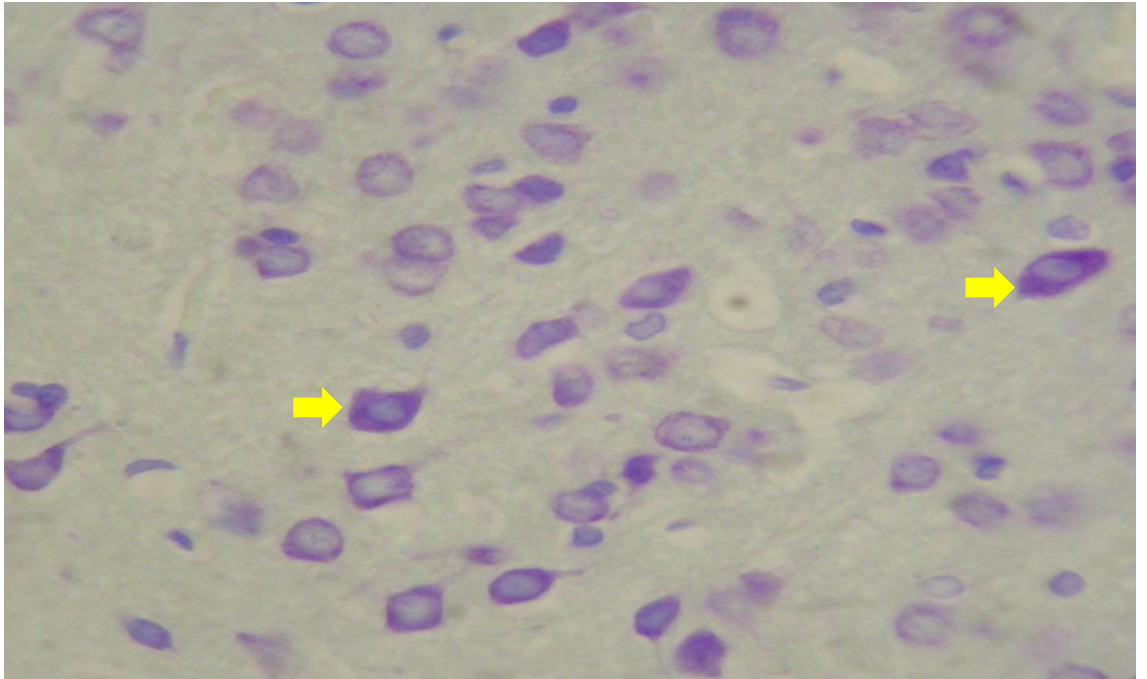
Şekil 4.12. 1 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçanına ait beyin dokusunda hücre çekirdeği küçülmesi ve hücre vakuolleşmesi (⇒) (H&E, 40X büyütme).



Şekil 4.13. 2 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçanına ait beyin dokusunda hücre çekirdeği küçülmesi ve hücre vakuolleşmesi (⇒) (H&E, 40X büyütme).



Şekil 4.14. Kontrol grubu sıçanına ait beyin dokusunda daha yoğun boyanan Nissl cisimcikleri içeren beyin dokusu hücreleri (⇒) (Cresyl Violet, 40X büyütme).



Şekil 4.15. 1 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçanına ait beyin dokusunda daha yoğun boyanan Nissl cisimcikleri içeren beyin dokusu hücreleri (⇒) (Cresyl Violet, 100X büyütme).

4.5. İmmünohistokimyasal Analizler

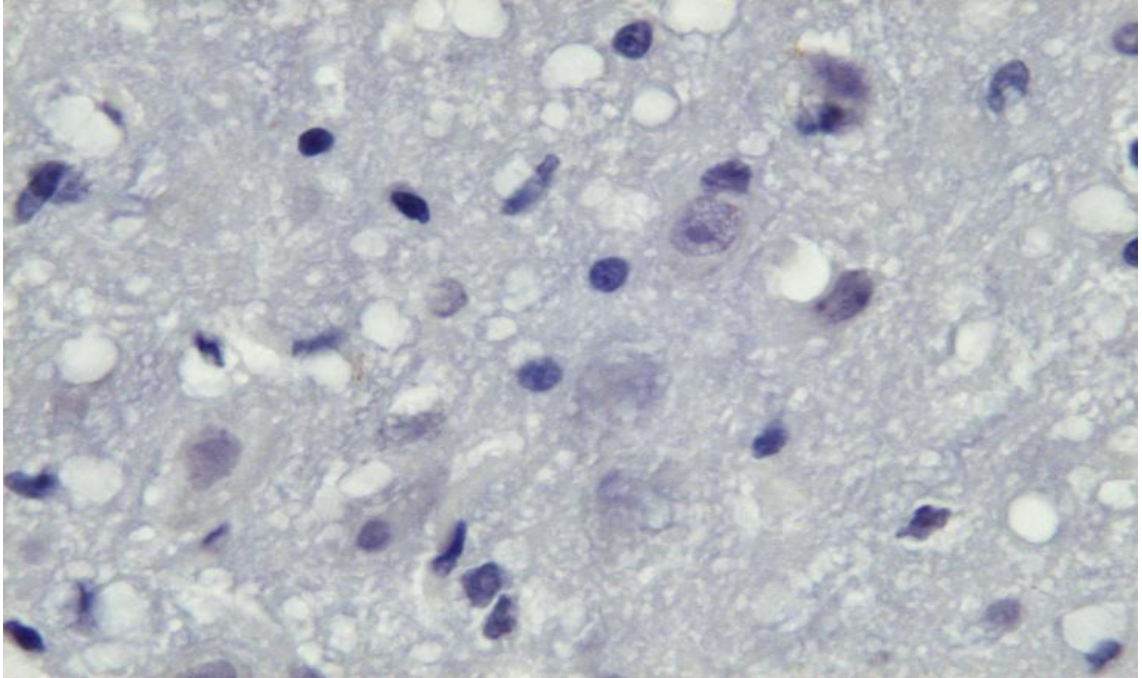
Sıçan beyin dokusunda nörofilament yoğunluğu immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Beyin dokusunda nörofilament birikimi olup olmadığı değerlendirilmiş ve uygulama gruplarının (Şekil 4.16-18) kontrol gruplarından (Şekil 4.14-15) anlamlı derecede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. İncelemeler sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Kontrol grupları ve akrolein uygulanan gruplardaki sıçanlara ait beyin dokularındaki nörofilament birikiminin yoğunluğu

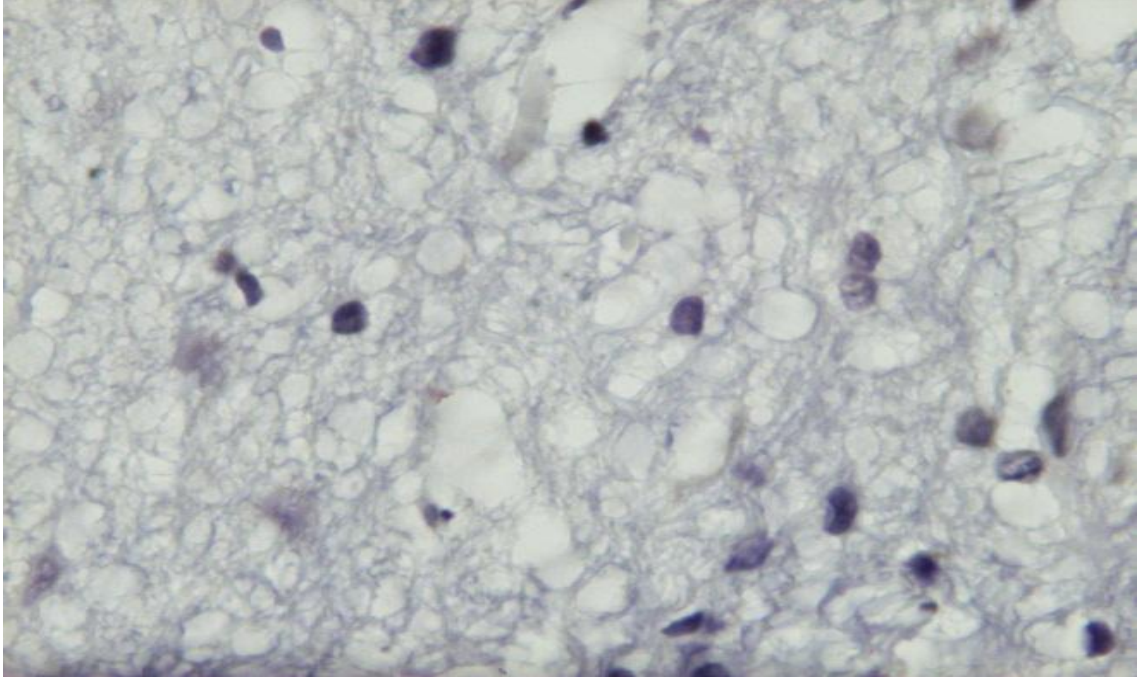
| | Kontrol | Metilselüloz Kontrol | Akrolein (mg/kg/gün) | | |
|--------------------|---------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|
| | | | 0,5 | 1 | 2 |
| NF Birikimi | 1/10 | 2/10 | 5/7 ^a | 6/7 ^a | 8/8 ^a |

Değerler değişiklik gözlenen hayvan sayısı / grupta yer alan toplam incelenen hayvan sayısı şeklinde verilmiştir.

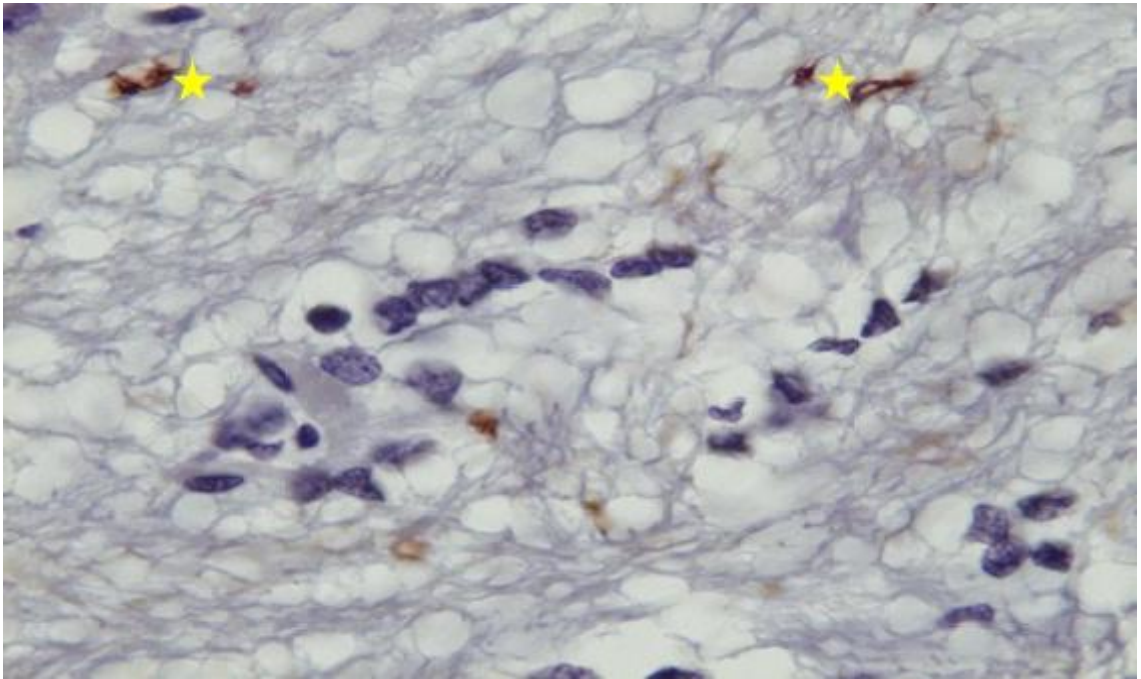
^a Kontrol grubundan farklı



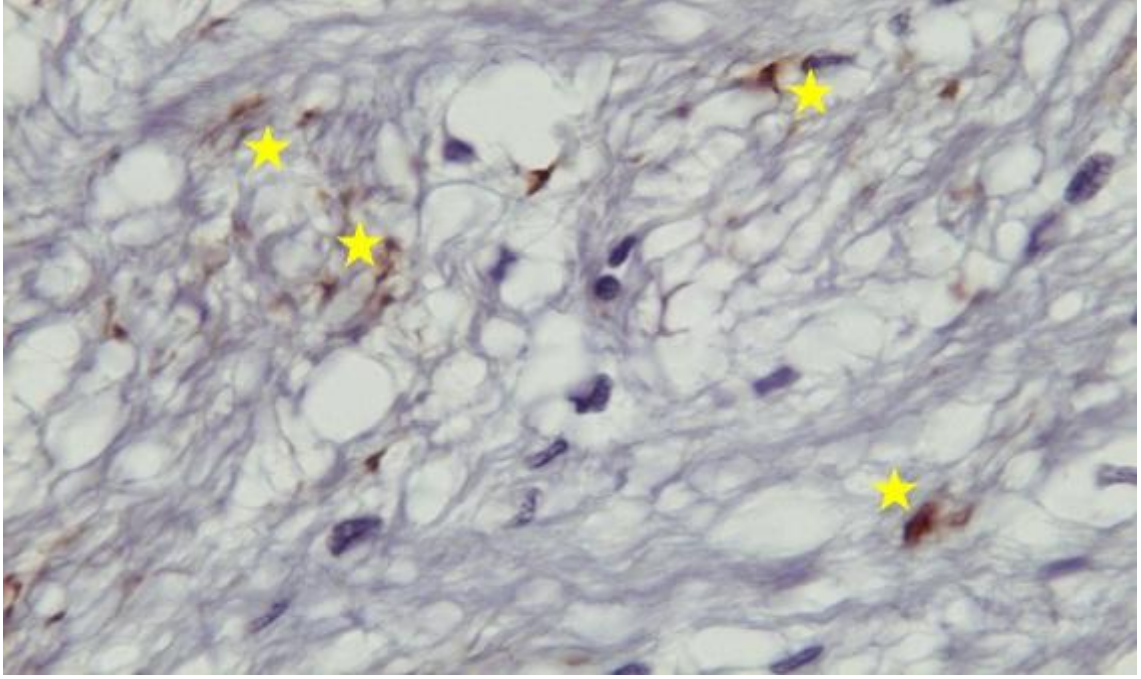
Şekil 4.16. Kontrol grubu sıçana ait beyin dokusu (DAB kromojen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme).



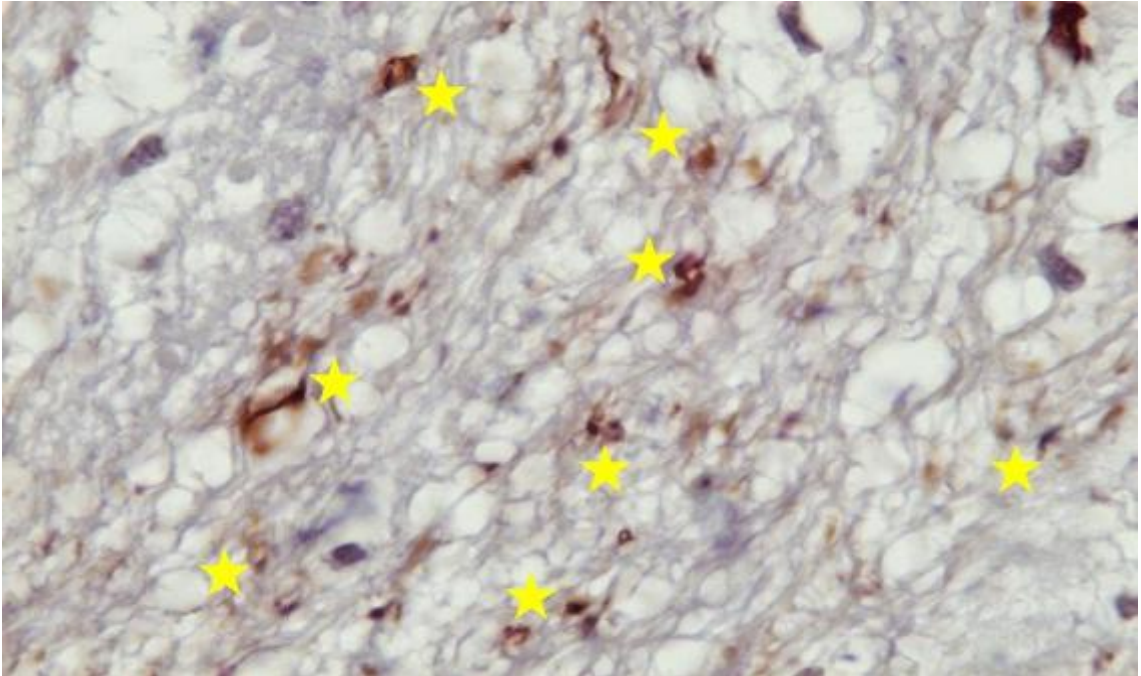
Şekil 4.17. Metilselüloz kontrol grubu sıçana ait beyin dokusu (DAB kromojen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme).



Şekil 4.18. 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda NF birikimi (*) (DAB kromojen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme).



Şekil 4.19. 1 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda NF birikimi (*) (DAB kromojen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme).



Şekil 4.20. 2 mg/kg/gün akrolein uygulama grubu sıçana ait beyin dokusunda NF birikimi (*) (DAB kromojen ile immünohistokimyasal boyama, 100X büyütme).

5. TARTIŞMA

Yiyeceklerin tüketilmeye hazır hale getirilmesi sırasında ısı ile muameleleri sonucu çeşitli kimyasal maddeler açığa çıkmakta ve insanlar tarafından bu kimyasal maddelere maruziyet kaçınılmaz olmaktadır. Akrolein yemeklerin pişmesi sırasında, karbohidratlar, bitkisel ve hayvansal yağların ısı ile muamelesi sonucunda oluşur. Akrolein karışmış suyu, içinde akrolein oluşmuş yağlarda pişen besinleri tüketmek ile maruziyet söz konusu olmaktadır. Besin işleme sürecinde meydana gelmesine ek olarak akrolein, ağaç, tütün ve diğer bitkilerin, benzinin de yanması sonucu oluşan ve havaya karışan bir maddedir.

Bu çalışmada; besinlerin tüketilmeye hazır hale getirilmesi sırasında ısı ile muamelesi sonucu oluşan akroleinin gelişmekte olan erkek sıçanlara uygulanmasıyla, sinir sistemi üzerine olası etkileri, beyin dokusunda histopatolojik, immünohistokimyasal incelemeler, ayrıca biyokimyasal ve hematolojik analizler yapılarak araştırılmıştır. Yapılan literatür araştırmalarında akroleinin besin yolu ile maruziyeti sonucu oluşan toksik etkileriyle ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Akroleinin sinir sistemi üzerine etkileriyle ilgili ise sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (WHO, 2002). Bu çalışma toksisite veri tabanına katkıda bulunmasının yanısıra akroleinin nörotoksik etkilerini gösteren bir çalışma olması sebebiyle önem taşımaktadır.

Toksikolojik değerlendirmeler için yapılan toksikoloji testlerinde maruziyet süreleri akut ya da subakut (30 günden daha az), subkronik (30 – 90 gün arası) ve kronik (90 günden fazla) olarak belirlenir (Vural, 2005). Yapılan önceki çalışmalar (Auerbach, 2008) göz önüne alınarak çalışma subkronik bir çalışma olarak gerçekleştirilmiştir.

Deney süresince kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları günlük olarak ölçülmüştür. Bunun yanısıra deney süresince kazanılan vücut ağırlıkları haftalık olarak kaydedilmiştir. Deney sonunda, akrolein uygulanan sıçanlara ait değerler kontrol gruplarının değerleri ile karşılaştırıldığında 1 mg/kg/gün ve 2 mg/kg/gün uygulama grubu sıçanların ağırlık artışlarında kontrol grubundan istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklılık gösterdiği görülmektedir.

Oldukça toksik etkili bir aldehit olan akroleinin sindirim sistemi ve mide epiteli üzerinde olumsuz etkili olduğu bildirilmiştir (EPA, 2003). Çalışmamızın sonuçlarına göre akrolein, uygulama gruplarında ağırlık artışında azalmaya neden olmuştur. Bunun yanısıra uygulama grubundaki sıçanların günlük yem ve su tüketimlerinde kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2002 yılında akrolein ile ilgili yayınladığı bir raporda, Spargue-Dawley sıçanları ile yapılan bir çalışmada oral gavaj yöntemi ile hayvanlara 102 hafta süreyle, 0,05 mg/kg/gün, 0,5 mg/kg/gün, 2,5 mg/kg/gün akrolein uygulanmıştır. Çalışmanın devam ettiği süre boyunca 0,5 mg/kg/gün ve 2,5 mg/kg/gün akrolein uygulanan sıçanlarda ölüm oranlarında artış olduğu gözlenmiştir. 90 gün süreyle akrolein uygulanan sıçanlarla ilgili yapılan bir başka çalışmada, sıçanlara 0,75 mg/kg, 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg akrolein verilmiş ve deney süresince 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg doz gruplarında deney süreci tamamlanmadan ölümler olduğu gözlenmiştir (Auerbach, 2008). Deneyimizin akrolein uygulama aşamasında, her üç uygulama grubunda da süreç tamamlanmadan önce ölen hayvanlar olmuştur. Auerbach ve ark. (2008) yürüttüğü aynı çalışmada 10 mg/kg/gün akrolein uygulanan doz grubuna ait sıçanlarda anormal nefes alıp verme, göz ve burunda akıntı, bozulmuş tüy yapısı ve gruba ait tüm sıçanlarda zayıflık-kilo kaybı gibi klinik bulgulara rastlanmıştır. Çalışmamızda hayvanlarda, gözlerde akıntı ve kanama, burun kanaması ve kilo kaybı gibi durumlar gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda gözlenen belirtilerle paralellik göstermekte olan bu belirtilerin, akroleinin bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, akrolein ve ayrıca 4-hidroksi-2-transnonenal gibi diğer lipid peroksidasyonu ürünleri nörolojik hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Beyin ya da medulladaki endojen akrolein seviyesinin Alzheimer, Parkinson ALS ve diğer nörolojik hastalığı kişilerde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca Alzheimer hastalarında DNA-akrolein ataklarının seviyesinin arttığı da belirtilmiştir (Abraham ve ark., 2011).

Çalışmamızda akroleinin hematolojik parametreler üzerine etkilerinin tespit edilmesi için tam kan sayımı yapılmıştır. Tam kan sayımı birçok hastalığın

belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Lökosit, eritrosit, platelet sayımının yanı sıra, hemoglobin, MCHC gibi pek çok değerin belirlenmesi tam kan sayımıyla gerçekleşmektedir. Akrolein uygulanan grupların lökosit, monosit, MCV, MCHC, hematokrit, platelet ve trombosit değerleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulanan sıçanların lökosit yüzdesinde kontrol grubundan farklı olarak anlamlı derecede artış görülmektedir İnvasküler lökosit birikimi mikrodolaşımı bozmakta, endotel hasarını arttırmakta ve vasospazma yol açabilmektedir (Güldiken, 2008). Sonuçta lökositoz inme şiddetini artıran önemli bir faktördür. Ancak Beray-Berthat ve ark. (2003b)'nin çalışmasında lökosit artışının hasarlı beyin dokusuna ve oksidatif strese göre değişebileceği, farklı beyin bölgelerinin deneysel iskemik hasarlarında farklı lökosit yanıtlarının oluşabileceği gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar farklı bir deneysel çalışmada ise iskemik beyin hasarında lökositlerin infarkt hacmini etkilemediğini göstermişlerdir (Beray-Berthat, 2003a). Uygulama gruplarının kontrol gruplarından farklı olarak monosit sayı ve yüzdesinde artış olduğu gözlenmiştir. Monosit artışı monositoz olarak tanımlanır. Monositozis ile ilişkili durumlar; enfeksiyonlar, malign hastalıklar, bağ dokusu hastalıkları ana başlıkları altında gruplandırılabilirler (Güneş, 2010).

Metilselüloz kontrol ve 0,5 mg/kg/gün akrolein uygulama gruplarının trombosit değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş olduğu gözlenmiştir. Trombositler kanın pıhtılaşmasında rol alan hücreler olmakla birlikte, pıhtılaşma dışında bir çok işlevleri de bulunmaktadır. Bu nedenle hücre sayısındaki değişiklikler kadar, işlevlerindeki bozukluklar da önem taşımaktadır. Trombosit sayısında düşme görülen bazı hastalıklar; immün sistemdeki edinsel ya da kalıtsal kusurlara bağlı olarak oluşmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre akrolein uygulanması bazı kan değerlerinde değişikliklere neden olmuştur.

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda akroleinin gelişmekte olan erkek sıçanların beyin dokuları üzerindeki olası etkileri ortaya çıkarılmıştır. Histopatolojik değişiklik olarak kaydedilen korteksteki tabakalaşmanın bozulması kontrol gruplarından farklı olarak uygulama gruplarında gözlenmiştir. Udomuksorn ve ark. (2011) yapmış olduğu çalışmada, 21 gün, 3 ay ve 6 ay, düşük (2 g/kg vücut ağırlığı) ve yüksek (5 g/kg vücut ağırlığı) dozlarda etanol uygulanan sıçanların

korteks kalınlıkları ölçülmüş ve en fazla 6 ay uygulanan yüksek doz grubundaki hayvanlarda olmak üzere tüm uygulama gruplarında korteks kalınlığında belirgin bir düşüşün olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kortekste bulunan nöronların sayıca azaldığı da belirtilmiştir. Normal yaşlanma ile ilgili olduğu kadar kortikal kalınlık/hacim nörodejeneratif yada gelişimsel hastalıklara da bağlı olarak farklılık göstermektedir. Alzheimer hastalarında ve Multiple Sklerozis hastalığına sahip olan kişilerin beyinlerinde normal beyinlerle karşılaştırıldığında, kortikal hacimde anlamlı bir redüksiyon olduğu gözlenmiştir (Scott ve ark. 2005). Çalışma sonunda yapmış olduğumuz histopatolojik değerlendirmeler sonucunda gözlemlediğimiz bir diğer durum da beyin hücre çekirdeklerinde meydana gelen küçülme ve sitoplazmanın kaybolması olmuştur. Uygulama ve kontrol grupları karşılaştırıldığında akroleine maruz bırakılmış gruplara ait sıçanların beyin dokularının kontrol gruplarından anlamlı şekilde farklı olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde daha önce Bisfenol A uygulanan sıçanlar ile yapılmış bir çalışmada da uygulama gruplarına ait sıçanların beyin dokularında yapılan inceleme sonucu beyin hücre çekirdeklerinde küçülme ve hücre sitoplazmasında vakuolleşme olduğu gözlenmiştir (Aydoğan ve ark., 2008). Çalışmamızda beyinde gözlenen korteks tabakalaşmasındaki bozulma, beyin hücre çekirdeklerinde meydana gelen küçülme ve sitoplazma kaybolması bulgularımıza göre akroleinin beyinde histolojik düzeyde olumsuz etkiye neden olmaktadır.

Nöronlar vücuttaki en kompleks hücrelerden biridir. Nöronların perikaryonlarındaki en belirgin özellikleri Nissl cisimcikleridir. Nissl cisimcikleri, granüllü endoplazmik retikulum yığınlarından oluşmuş, ortamda bulunan serbest ribozom gruplarıdır. Bu durum, bu yapıları nöronal popülasyonun takibinde önemli kılmaktadır. Sinir hücreleri kendi bütünlüklerini sağlamak ve fonksiyonlarını yerine getirebilmek için fazla miktarda proteine gereksinim duymaktadırlar. Hasarlı nöronlarda, kromatolizis olarak adlandırılan, Nissl cisimciklerinin kaybı gözlenmektedir (Ekeoma, 2010). Adesina ve ark.nın (2009) yapmış olduğu çalışmada da sıçanlara kas içi uygulanan kinin maddesinin Nissl cisimcikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma sonunda, uygulama grubundaki sıçanlara ait serebellumların histopatolojik incelemelerinde kontrol grubundaki sıçanlara göre daha az yoğun boyanma, yani nissl yoğunluğunda azalma olduğu gözlenmiştir. Ancak bu tez

çalışmasında kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların incelenen beyin dokularında Nissl cisimcikleri ile ilgili herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır.

Akroleinin nörotoksisite biyobelirteçleri üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi için sıçanların serumlarında GFAP, MBP ve total protein miktarları analiz edilmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında uygulama gruplarına ait sıçanların GFAP, MBP ve total protein miktarlarının kontrol gruplarından farklı olmadığı tespit edilmiştir. Holden ve ark. nın (2007) insan astrositoma hücreleri kullanarak, hücre kültürü ortamında ELISA yöntemi ile GFAP immünoreaktivitesini değerlendirdikleri bir çalışmada, klorokin ve etanolün GFAP immünoreaktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Surendran ve ark.nın (2008) Fischer 344 sıçanları ile yapmış olduğu çalışmada nörotoksik olduğu kesinleştirilmiş 3 farklı organometal [Trimetiltin (TMT), metilciva, trimetil (TML)] sıçanların içme suyuna eklenerek uygulanmış ve nörotoksisite biyobelirteci olarak da GFAP, NF ve MBP nörotoksisite biyobelirteci olarak kullanılmıştır. Çalışma sonunda NF ve MBP miktarlarında TML'ye maruz bırakılan hayvanlarda diğer maddelere oranla daha fazla artış olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan metilciva maruziyetinin MBP üzerinde herhangi anlamlı bir değişiklik yapmadığı gözlenmiştir. Her üç organometal grubundaki sıçanların hipokampal GFAP miktarlarında kontrol grubundan farklı olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Organometallerin hayvan gruplarına eşit miktarlarda verilmiş olmasına ve maddelerin nükleofilik moleküller ile kompleks oluşturabilme elektrofilik özelliklerinin de benzerliğine rağmen her maddenin nörotoksisite etkisini farklı bir mekanizma ile gösterdiği belirlenmiştir (Surendran ve El-Fawal, 2008).

Sinir hücresi iskeleti arafilamenti olan nörofilamentler, NF-L, NF-M ve NF-H olmak üzere üç altbirimden oluşurlar (Ching ve ark., 1998). Nörofilament proteinlerinin kültür ortamında akrolein ile muamele edildiği *invitro* bir çalışmada artan doz miktarına bağlı olarak nörofilamentlerde birikim olduğu gözlenmiştir (Jeong ce Kang, 2008). Çalışmamızda sıçanların beyin dokusundan yapılan immünohistokimyasal incelemelerde, uygulama gruplarına ait sıçanların beyin dokularında kontrol gruplarından farklı olarak nörofilament birikiminin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu gözlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar *in vitro* koşullarda yapılmış çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Akroleinin gelişmekte olan sıçanların beyin hücresinde nörofilamentler üzerinde olumsuz

etkiye neden olduğu ve dolayısıyla hücre iskeleti yapısını olumsuz yönde etkilediğini söyleyebiliriz.

Pestisit maruziyetine bağlı gelişen kronik sinir sistemi hasarının en sık görülen şeklinin Parkinson olduğu söylenmektedir. Poliklorlu bifenil (PCB)'in memelilerin sinir sisteminde gelişimsel defektlere neden olduğu düşünölmektedir. Sıçanlarda ve primatlarda prenatal ve perinatal PCB maruziyeti ile öğrenme, hafıza bozukluğu ve sinir hücrelerinde morfolojik değişiklikler arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Prenatal dönemde PCB'lere maruz kalan çocuklarda baş ağrılarında ve bilişsel fonksiyon bozukluklarında artış ve psikomotor gelişimde gecikme tespit edilmiştir (İstanbuluoğlu, 2009).

ABD'de herbisit üreten bir fabrikada 1945-1994 arasında çalışanların çeşitli hastalıklara bağlı ölüm oranları aynı hastalıklara bağlı ABD ulusal ölüm oranlarıyla karşılaştırılmış, ALS'den ölüm sıklığı fabrika çalışanlarında yüksek bulunmuştur (Burns, 2001). Pestisit maruziyetinin ALS hastalığına sebep olduğuna dair araştırmalardan çıkan veriler destekleyici nitelikte olsa da, konunun kesin olarak ifade edilebilmesi için daha çok araştırmaya ihtiyaç olduğu değerlendirilmiştir (İstanbuluoğlu, 2009).

Oksidatif stresin MS'in patogenezinde ve inflamatuvar olaylarda rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stresi oluşturan ve esas olarak makrofajlarda üretilen reaktif oksijen türleri (ROS), MS ve deneysel otoimmün ensefalopatide demiyelinizasyon ve akson hasarından sorumlu bulunmuştur. Reaktif oksijen türleri, hücrelere oldukça toksik olan peroksinitrit gibi ürünlere dönüşerek lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrenin ana komponentlerinde hasarlanmaya, sonuç olarak ta nekroz veya apoptoz yolu ile hücre ölümüne sebep olurlar. Ayrıca, MS'de azalmış hücrenel antioksidan savunma sistemi bu hasarın artmasına katkıda bulunabilir (Kurban, 2010).

Çeşitli bozukluklara neden olan oksidatif stresin iki nedenden dolayı oluştđu düşünölmektedir. Bunlardan ilki süperoksit anyon radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal gibi reaktif oksijen türleridir. İkincisi ise, akrolein ve hidroksinonenal gibi doymamış aldehidlerdir (Yoshida, 2009). Yoshida ve ark.

(2009)'nın yaptığı bu çalışmada akroleinin ilave edildiği hücre kültürü ortamında meydana gelen hücre hasarının, reaktif oksijen türlerinin aynı şartlardaki hücre kültürü ortamında meydana getirdiği hasara neredeyse eşit derecede olduğu bulunmuştur.

Mikroskopik olarak Alzheimer hastalığı birkaç morfolojik anomalinin varlığı ile karakterizedir. Ancak bunlardan hiçbiri Alzeihmer hastalığı için spesifik değildir. Gözlenen major patolojik değişikliklerden biri plak adı verilen spesifik amiloid depolanmasıdır. İkinci major patolojik değişiklik nörofibriler yumak adı verilen intranöronal filamentöz inklüzyonlardır. Üçüncü major değişiklik distrofik nöritler ve nörofil iplikçikleri olarak adlandırılan nöronal yapıların distorsiyonudur. Bir diğer major değişiklik serebral kortekste önce sinapsların kaybı ve bundan daha sonraki aşamalarda ise nöron kaybıdır (Sezer, 2001).

Nörodejeneratif hastalıkların beynin spesifik bölgelerindeki nöronların hasarı ya da geridönüşümsüz kaybı ile karakterize olan bir takım patolojik durumu içerdiği göz önüne alındığında akroleinin kullanım alanının genişliği ile ilişkili olarak beyin dokusunun farklı yollarla bu kimyasaldan etkilenecek bazı hastalıklara sebep olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların literatürdeki diğer nörotoksisite çalışma sonuçları ile paralellik göstermesine dayanarak akroleinin nörodejeneratif hastalıkların oluşması basamaklarında etkili bir kimyasal madde ve sinir sistemi üzerinde istenmeyen etkiler oluşturduğunun gösterildiği söylenebilir.

Sonuç olarak; akroleinin biyokimyasal analizler sonucu GFAP ve MBP üzerinde bir etkisi tespit edilememiş olmasına rağmen, sıçanların beyin dokusunda histopatolojik değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir. Bunun yanısıra akroleinin, hücrenin dinamikliğini sağlayan nörofilamentler üzerinde de olumsuz etkiye neden olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre uzun süreli akrolein maruziyetinin beyin gelişimi ve fonksiyonları üzerine olumsuz etkilere neden olabileceği söylenebilir. Ayrıca çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların literatür ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmesi yapıldığında bazı nörodejeneratif hastalıklar için akroleinin öncü bir kimyasal olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle akrolein içeren besinler ya

da pişirme sürecinde akroleinin oluşabileceği besinlerin içeriğiyle ilgili limitlerin belirlenebilmesi için yeni tekniklerin oluşturulması ve maruziyet miktarının belirlenmesi, besin yolu ile akrolein alınımının azaltılmasında yararlı olabilir. Ayrıca yemeklerin tüketilmeye hazır hale getirilmesi aşamasında kullanılan tekniklerle ilgili de yapılacak olan iyileştirmeler akrolein maruziyetini azaltacaktır.

KAYNAKLAR

- Abraham K., Andres S., Palavinskas R., Berg K., Klaus E. A. and Lampen A., Toxicology and risk assessment of acrolein in food, *Mol. Nutr. Food Res.*, 55, 1277–1290, 2011.
- Agency For Toxic Substances And Disease Registry, Division Of Toxicology And Environmental Medicine Toxfaqstm, August 2007.
- Adesina, J. A., Olusola A. A., David, A. O., Thomas, K. A., Olufunto, O. I., Ebenezer, A., Ashamu, Spencer, C., Microstructural Observations on Nissl Substances in the Cerebellar Cortex of Adult Wistar Rats following Quinine Administration, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (2): 105-109; April 2009.
- ATSDR - Acrolein (C₃H₄O), Cas 107-02-8; Un 1092, General Information. (Available at: http://www2.udec.cl/matpel/hazardous_materials/acrolein.pdf).
- Auerbach, S. S., J. Mahler, G. S. Travlos, R. D. Irwin, A Comparative 90-Day Toxicity Study Of Allyl Acetate, Allyl Alcohol And Acrolein, *Toxicology* 253 79-88, 2008.
- Aydoğan, M., Korkmaz, A., Barlas, N., Kolankaya, D., The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats, *Toxicology* 249 35–39, 2008.
- Bajo, M., Yoo, B.C., Cairns, N., Gratzner, M., Lubec, G., Neurofilament Proteins NF-L, NF-M and NF-H in Brains of Patients with Down Syndrome and Alzheimer's Disease, *Amino Acid*, 21; 293-301, 2001.
- Banks W.A., Physiology and pathology of the blood-brain barrier: implications for microbial pathogenesis, drug delivery and neurodegenerative disorders, *Journal of NeuroVirology* 5, 538 ± 555, 1999.
- Beray-Berthat V, Palmier B, Plotkine M, Margail I., Neutrophils do not contribute to infarction, oxidative stress, and NO synthase activity in severe brain ischemia, *Exp. Neurol.* Aug; 182 (2): 446-54, 2003.^a
- Beray-Berthat, V., Croci, N., Plotkine, M., Margail, I., Polymorphonuclear neutrophils contribute to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum after ischemia–reperfusion in rats, *Brain Research* Volume 987, Issue 1, Pages 32-38, 2003.^b
- Blake, B. L., Toxicology of Nervous System, A Textbook of Modern toxicology, Third Edition, 2004.
- Bruce, A., Molecular biology of the cell (4th ed.). New York: Garland Science, 2002.

- Bunge, M. B., Bunge, R., P., Ris, H., Ultrastructural Study of Remyelination in an Experimental Lesion in Adult Cat Spinal cord, *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 10 (1): 67-94, 1961.
- Burns, C J., Beard K K., Cartmill J B., Mortality in chemical workers potentially exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1945–94: an update, *Occup Environ Med* 58:24–30; 2001.
- Campell, N.A., Reece, J.B., *Biology*, 2006.
- Chamoun, R. B., Gopinath, S. P., Robertson, C. S., Biomarkers for Traumatic Brain Injury Department of Neurosurgery, Baylor College of Medicine, 2009.
- Ching, Y., Ronald K. H. Liem, Roles of head and tail domains in a-interneixin's self-assembly and coassembly with the neurofilament triplet proteins, *Journal of Cell Science* 111, 321-333, 1998.
- Cullen D. K., Simon C. M., LaPlaca M. C., Strain rate-dependent induction of reactive astrogliosis and cell death in three-dimensional neuronal-astrocytic co-cultures, *National Institutes of Health, Brain Res.* 16; 1158: 103–115, 2007.
- Dadalı Ş., Okuyucu E., Coşkun Ö., Tunç T., Yandı Vargel S., İnan L., Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim Ve Araştırma” Hastanesi Nöroloji Bölümünde Takip Edilen İdiopatik Parkinson Hastalarının Özellikleri, *Parkinson Hast. Hareket Boz. Der.*, 11(1): 17-23; 2008.
- Ekeoma¹, A. O. , Ekanem, T. B., Eluwa, M. A., Ekong, M. B., E. E. Osim, Kpela, T., The effect of Stavudine on the Nissl bodies of the hippocampus of albino mice, *International Journal of Biomedical and Health Sciences* Vol. 6, No. 3, September 30, 2010.
- Elder G. A., V. L. Friedrich, Jr., P. Bosco, C. Kang, A. Gourov, P.Tu, V. M.-Y. Lee, and R. A. Lazzarini, Absence Of The Mid-Sized Neurofilament Subunit Decreases Axonal Calibers, Levels of Light Neurofilament (Nf-L), And Neurofilament Content, *The Journal Of Cell Biology*, Volume 141, Number 3, May 4, 727–739, 1998.
- El-Fawal, H.A.N., , J. P. O’callaghan, Autoantibodies To Neurotypic And Gliotypic Proteins As Biomarkers Of Neurotoxicity: Assessment Of Trimethyltin (Tmt), *Neurotoxicology* 29 109–115, 2008.
- Ewert, A., Granvogl, M., Schieberle, P., Development of Two Stable Isotope Dilution Assays for the Quantitation of Acrolein in Heat-Processed Fats, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3582–3589, 2011.
- Galiano, M.R., Andrieux, A., Deloulme, J.C., Bosc, C., Schweitzer, A., Job, D., Hallak, M.E., Myelin Basic Protein Functions as a Microtubule Stabilizing

- Protein in Differentiated Oligodendrocytes, *Journal of Neuroscience Research* 84:534–541, 2006.
- Geel, W.J.A., Reus, H.P.M., Nijzing, H., Verbeek, M.M., Vos, P.E., Lamer, K.J.B., Measurement of glial fibrillary acidic protein in blood: an analytical method, *Clinica Chimica Acta* 326; 151–154, 2002.
- GHR, 2012., Genetics Home Reference, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), 2012. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/GFAP>
- Gomes, F. C. A., Paulin, Neto, V.M., Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): Modulation by Growth Factors and Its implication in astrocyte differentiation, *Barzilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 619 – 31, 1999.
- Güldiken, B., Özkan, H., Kabayel, L., Akut İskemik İnmede Ortalama Trombosit Hacmi ve Periferik Kan Hücre Sayısı Yanıtı, *Trakya Univ Tıp Fak Derg*; 25(2):130-135, 2008.
- Gültürk, Sefa, İmir, G., Tuncer, E., Kan-Beyin Bariyeri, *Erciyes Tıp Dergisi*, 29(2):147-154, 2007.
- Güneş, A., Çocukluk Çağında Monositoz Sendromları, XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2010.
- Hayes W., John A. T., and Donald E. Gardner, Target Organ Toxicology Series, Neurotoxicology, 2008.
- Holden, L.J., Coleman, M.D., Investigation of GFAP levels as a marker of toxicity in human glioma cell lines, *Abstracts / Toxicology* 231; 104–119, 2007.
- İstanbuluoğlu, H., Oğur, R., Güleç, M., Pestisit maruziyeti ve nörolojik bozukluklar, *Genel Tıp Dergisi*;19(4); 2009.
- Jeong M. S., & J. H. Kang, Acrolein, The Toxic Endogenous Aldehyde, Induces Neurofilament-L Aggregation, *BMB Reports*, 2008.
- King, J. C., R. M. Lechan, G. Kugel, and E. L.P. Anthony, Acrolein: A Fixative For Immunocytochemical Localization Of Peptides In The Central Nervous System, *The Journal Of Histochemistry And Cytochemistry*, Vol. 31, No. 1, Pp. 62-68, 1983.
- Kurban, S., Akpınar, Z., Mehmetoğlu, İ., Multiple skleroz hastalarında serum paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri ile oksidatif stresin araştırılması, *Genel Tıp Derg*;20(1); 2010.
- Lamers, K.J.B., P. Vosb, M.M. Verbeek, F. Rosmalen, W.J.A. Van Geel, B.G.M. Van Engelen, Protein S-100b, Neuron-Specific Enolase (Nse), Myelin Basic Protein (Mbp) And Glial Fibrillary Acidic Protein (Gfap) İn

- Cerebrospinal Fluid (Csf) And Blood Of Neurological Patients, Brain Research Bulletin 61 261–264, 2003.
- Liedtke, W., Edelman, W., Bieri, P. L., Chiu, F. C., Cowan, N. J., Kucherlapati, R., Raine, C. S., GFAP Is Necessary for the Integrity of CNS White Matter Architecture and Long-Term Maintenance of Myelination, Neuron, Vol. 17, 607–615, 1996.
- McQueen, C. A., Comprehensive Toxicology, Volume 13 - Nervous System and Behavioural Toxicology., 2002.
- Medveczky, P., Antal, J., Patthy, A., Kekesi, K., Juha'sz, G., Szilagyi, L., Graf, L., Myelin basic protein, an autoantigen in multiple sclerosis, is selectively processed by human trypsin 4, FEBS Letters, 580 545–552, 2006.
- O'callaghan, J. P, K. Sriram, Glial Fibrillary Acidic Protein And Related Glial Proteins As Biomarkers Of Neurotoxicity, Centers For Disease Control And Prevention, National Institute For Occupational Safety And Health, Morgantown, Wv 26505, Usa, 2005.
- OMIM, Online 'Mendelian Inheritance in Man' (OMIM) Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP -137780.
- Osório, V., de Lourdes, Z., Determination of acrolein in french fries by solid-phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry, Journal of Chromatography A, Volume 1218, Issue 21, Pages 3332-3336, 2011.
- Organisation For Economic Co-Operation And Development (OECD), Neurotoxicity Study in Rodents, OECD Guideline For The Testing of Chemicals, 1997..
- Özden, H., Parman, Y., Şengün, İ., Koç F., Oflazer, P., Amyotrofik Lateral Sklerozda Kök Hücre Uygulamaları, Turk Noroloji Dergisi;15:105-108, 2009.
- Parent, R., Paust, D., Schrimp, M., Talaat, R., Doane, R., Caravello, H., Lee, S., Sharp, D., Metabolism and Distribution of [2,3-14C] Acrolein in Sprague-Dawley Rats II. Identification of Urinary and Fecal Metabolites, Toxicological Sciences 43, 110 – 120, 1998.
- Pedersen, J., Ingemarsson, A., Olsson, J., Oxidation of rapeseed oil, rapeseed methyl ester (RME) and diesel fuel studied with GC/MS, Chemosphere Volume 38, Issue 11, Pages 2467-2474, 1999.
- Scott M.L.J. , Thacker N.A., Cerebral Cortical Thickness Measurements, Tina Memo No. 2004-007, 2005.
- Sezer C., Memiş L., Alzheimer Hastalığı Histopatolojisi, Demans Dergisi;1: 42-49, 2001.

- Shanker G., Syversen T., Aschner M., Astrocyte-Mediated Methylmercury Neurotoxicity, *Biological Trace Element Research*, Vol. 95, 2003.
- Stapulionis, R., Oliveira, C. L. P., Gjelstrup, M. C., Pedersen, J. S., Hokland, M. E., Hoffmann, S. V., Poulsen, K., Jacobsen, C., Vorup-Jensen, T., Structural Insight into the Function of Myelin Basic Protein as a Ligand for Integrin $\alpha_M\beta_2$, *Journal of Immunology*;180;3946-3956, 2008.
- Stevens J. F., and C. S. Maies, Acrolein: Sources, Metabolism, And Biomolecular Interactions Relevant To Human Health And Disease, *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 7- 25, 2008.
- Suk, W. A., K. Murray, M. D. Avakian, Environmental hazards to children's health in the modern world, *Mutation Research*, 544 235–242, 2003.
- Surendran, G., El-Fawal H.A.N., Neuroimmune responses to toxic agents: comparison of organometal electrophiles using detection of antibodies to neural cytoskeleton and myelin as biomarkers, *Journal of pharmacology and Toxicology* 3 (3): 173-189, 2008.
- Topçuoğlu E., Selekler K., Alzheimer Hastalığı, *Geriatrici* 1 (2): 63-67, *Turkish Journal Of Geriatrics*, 1998.
- Toxicological Profile For Acrolein, U.S. Department Of Health And Human Services, Public Health Service, Agency For Toxic Substances And Disease Registry, August 2007. (Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp124.pdf>).
- Uchida, K., M. Kanematsu, Y. Morimitsu, T. Osawa, N. Noguchi, and E. Niki, Acrolein Is A Product of Lipid Peroxidation Reaction, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 273, No. 26, Issue of June 26, Pp. 16058–16066, 1998.
- Udomuksorn, W., Mukem, S., Kumarnsit, E., Vongvatcharano, S., Vongvatcharanon, U., Effects of alcohol administration during adulthood on parvalbumin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat cerebral cortex, *Acta Histochemica*, 113, 283–289, 2011.
- Uluç, K., İşak, B., Tanrıdağ, T., Us, Ö., Als Patofizyolojisi: Neyi, Ne Kadar Biliyoruz?, *Marmara Medical Journal*;21(1);102-11; 2008.
- U.S. Department Of Health And Human Services Public Health Service Agency For Toxic Substances and Disease Registry, *Toxguide for Acrolein*, October, 2007.
- U.S. Environmental Protection Agency Washington, Dc., *Toxicological Review Of Acrolein*, May 2003.

Vural, N., Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73, 2005.

WHO, Acrolein, Concise International Chemical Assessment Document 43, 2002.

Yılmaz, N., Kan-Beyin Bariyerinin Fizyopatolojisi, Van Tıp Dergisi; 13 (1): 25-27, 2006.

Yoshida, M., Tomitori, H., Machi Y., Hagihara M., Higashi K., Goda H., Ohya T., Niitsu M., Kashiwagi K., Igarashi K., Acrolein toxicity: Comparison with reactive oxygen species, Biochemical and Biophysical Research Communications 378 313–318; 2009.

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Gökçen

Soyadı: Mülayimçelik

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Yılı: 1986

Medeni Hali: Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise: İstanbul Orhan Cemal Fersoy Lisesi (2004)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2009)

Yabancı Dil: İngilizce