T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

DENEYSEL ETANOL UYGULAMASINDA DARBEPOETİN ALFA'NIN NÖROPROTEKSİYONA VE PLAZMA ASPROSİN DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

EMİNE UYGUR

DANIŞMAN
PROF. DR. HAKKI OKTAY SEYMEN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Rahmetli babam Ali TOPAÇ'a,
İthaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimin ve tez çalışmamın bütün aşamalarında derin bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan, hayata dair bakış açımı ve ufkumu genişleterek bana cesaret veren ve bana her anlamda rehberlik eden, Danışman Hocam Prof. Dr. Hakkı Oktay Seymen'e,

Doktora eğitimim boyunca mesleki anlamda bilgi ve beceri edinmemde çok emekleri olan çok değerli Anabilim Dalı Başkanım Prof. Dr. Gönül Şimşek'e ve Fizyoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Nuran Darıyerli, Prof. Dr. Nermin Yelmen, Prof. Dr. Gökhan Metin, Doç. Dr. Sibel Akyol'a,

Bilgi ve tecrübeleriyle mesleki anlamda yetişmemde emeği çok büyük olan ve idealist duruşu ve çalışkanlığıyla kendisini örnek aldığım çok kıymetli hocam Prof. Dr. Gülderen Şahin'e,

Her türlü destekleriyle yanımda olan, bilgi ve tecrübeleriyle meslek hayatıma ışık tutan çok değerli hocalarım Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim Güner'e ve Dr. Öğretim Üyesi Murat Mengi'ye,

Çok değerli bilgi ve tecrübeleriyle tez çalışmamın ortaya çıkmasında katkıları olan hocam Prof. Dr. Hafize Uzun'a,

Hayatımın her anında yardımlarından ve sabrından dolayı sevgili eşime

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-34657

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XVİ
ABSTRACT ..... XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Alkol (Etanol) 3
2.1.1. Etanolün Farmokokinetiği 4
2.1.1.1. Etanolün Emilimi 4
2.1.1.2. Etanolün Metabolizması 5
2.1.2. Etanolün Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri 9
2.1.3. Etanolün Lipit Metabolizması Üzerine Etkileri 10
2.1.4. Etanolün Biyomembranlara Etkisi 13
2.1.5. Etanolün Merkezi Sinir Sistemi Üzerindeki Morfolojik Etkileri 14
2.1.5.1. Etanolün İyon Kanallarına Etkileri 15
2.1.5.2. Etanolün Nörotransmitterler Üzerine Etkileri 15
2.1.5.3. Etanolün Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Patofizyolojik Etkileri 19
2.1.5.4. Etanolün Oksidatif Stres Yoluyla Nörodejenerasyona Etkileri 23
2.2. Serbest Radikaller 24
2.2.1. ROS 26
2.2.1.1. Oksijen Molekülü (O_2, Üçlü Oksijen, Dioksijen) 28
2.2.1.2. Süperoksit Anyonu ($O_2^{\cdot -}$) 28
2.2.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) 29
2.2.1.4. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$) 29
2.2.1.5. Peroksil Radikali ($ROO^{\cdot}$) 30
2.2.1.6. Hipokloröz asit (HOCl) 30

2.2.2. ROS'un Kaynakları....31
2.2.2.1. ROS'nin Endojen Kaynakları....31
2.3. Oksidatif Stres....35
2.3.1.1. Oksidatif DNA Hasarı....36
2.3.1.2. Lipit Peroksidasyonu....37
2.3.1.3. Proteinlerin Oksidasyonu....39
2.4. Antioksidan Savunma Sistemi....39
2.4.1. Antioksidan Enzimler....41
2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)....41
2.4.1.2. Katalaz (CAT)....42
2.4.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)....43
2.4.1.4. Glutatyon Redükdaz (GR)....43
2.4.2. Endojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar....44
2.4.2.1. Glutatyon....44
2.4.3. Ekzojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar....45
2.4.3.1. E Vitamini (α-Tokoferol)....45
2.4.3.2. C Vitamini (Askorbik Asit)....45
2.4.3.3. β-karoten....46
2.4.3.4. Flavonoidler....46
2.5. Nöron Spesifik Enolaz (NSE)....46
2.6. S100-β....48
2.7. Darbepoetin Alfa (DA)....48
2.8. Asprosin....53
3. GEREÇ VE YÖNTEM....56
3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi....56
3.2. Gruplar ve Deney Protokolü....56
3.3. Biyokimyasal Analizler....58
3.3.1. Dokuların Homojenizasyonu ve Numunelerin Hazırlanması....59
3.3.2. ELİSA Yöntemi ile Yapılan Analizler....59
3.3.3. Spektofotometrik Yöntemle Yapılan Analizler....62
3.3.3.1. SOD Enzim Aktivitesi....62
3.3.3.2. MDA Düzeyleri....63
3.4. Histopatolojik İncelemeler....63

3.5. İstatistiksel Analiz....63
4. BULGULAR....65
4.1. Biyokimyasal Bulgular....65
4.1.1. SOD, MDA, CAT, GR ve GPx Değerleri....65
4.1.2. NSE ve S100-β Değerleri....68
4.1.3. Açlık Kan Glikozu, İnsülin ve HOMA-IR Değerleri....70
4.1.4. Asprosin, İnsülin, HDL, Total Kolesterol ve Trigliserit Değerleri....72
4.1.5. Asprosin ile Kan Glikozu, İnsülin, HDL, Total Kolesterol ve Trigliserit Değerleri Arasındaki Korelasyonlar....74
4.2. Histopatolojik Bulgular....75
4.2.1. Beyin Dokusuna Ait Histopatolojik Bulgular....75
4.2.1.1. Kontrol Grubunun Histopatolojik Bulguları....77
4.2.1.2. Glikoz Grubunun Histopatolojik Bulguları....78
4.2.1.3. DA Grubunun Histopatolojik Bulguları....79
4.2.1.4. Etanol Grubunun Histopatolojik Bulguları....79
4.2.1.5. Etanol+DA Grubunun Histopatolojik Bulguları....80
4.2.2. Karaciğer Dokusuna Ait Histopatolojik Bulgular....81
4.2.2.1. Kontrol Grubunun Histopatolojik Bulguları....81
4.2.2.2. Glikoz Grubunun Histopatolojik Bulguları....81
4.2.2.3. DA Grubunun Histopatolojik Bulguları....82
4.2.2.4. Etanol Grubunun Histopatolojik Bulguları....82
4.2.2.5. Etanol+DA Grubunun Histopatolojik Bulguları....83
5. TARTIŞMA....84
KAYNAKLAR....102
ETİK KURUL KARARI....121
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI....122
ÖZGEÇMİŞ....123

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: ROS'un Endojen Kaynakları-Dasgupta ve Klein'den (2014 p.3)..... 31
Tablo 2-2: ROS'un Ekzojen Kaynakları-Dasgupta ve Klein'den (2014 p.5)..... 34
Tablo 2-3: Antioksidanların Sınıflandırılması- Karabulut ve Gülay'dan (2016). 40
Tablo 3-1: Deney Protokolü 57
Tablo 4-1: SOD, MDA ve CAT Değerleri 66
Tablo 4-2: GR ve GPx Değerleri 66
Tablo 4-3: NSE ve S100-β Değerleri..... 69
Tablo 4-4: Açlık Kan Glikozu, İnsülin ve HOMA-IR Değerleri..... 71
Tablo 4-5: Asprosin, HDL, Total Kolesterol ve Trigliserit Değerleri 73
Tablo 4-6:Asprosin ile Kan Glikozu, İnsülin, HDL, Total Kolesterol veTrigliserit Değerleri Arasındaki Korelasyonlar 75
Tablo 4-7: Dentat Gyrus'a Ait Nörodejenerasyon Skorları..... 76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Etanolün Oksidatif ve Nonoksidatif Yolla Metabolizması-Hyun ve ark. (2021)'dan 6
Şekil 2-2 : Mezokortikolimbik Yol-Alasmari ve ark. (2006)'dan 17
Şekil 2-3: Etanolle İlişkili Nörolojik Disfonksiyon Mekanizmaları-Pervin ve Stephen 2021; Hammoud ve Jimenez-Shahed (2019)'den 20
Şekil 2-4: $OH^{\cdot}$ ın Yağ Asidi Rezidülerindeki Hidrokarbon Yan Zincirinden Hidrojen Atomunu Uzaklaştırması-Halliwell ve Gutteridge'dan (p.30 2015). 26
Şekil 2-5: ROS ve Reaktif Metabolitleri Arasındaki Karşılıklı İlişkiler-Durackova'dan (2014) 27
Şekil 2-6: Oksidatif Stres-Özcan ve ark (2015) 'dan 35
Şekil 2-7:EPO/EPO-R Etkileşimi ve Hücre İçi Sinyal Yolağı- Chateauvieux ve ark. (2011)'dan 50
Şekil 3-1: Makroskobik Olarak Koronal Kesit Alınan Bölgeler 58
Şekil 3-2: ELİSA Analizleri İçin Çizilen Standart Eğri Örneği 61
Şekil 4-1: SOD, MDA ve CAT Dağılımları (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001) 67
Şekil 4-2: GR ve GPx Dağılımları (* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) 68
Şekil 4-3: NSE ve S100-β Dağılımları (*p<0,05, **p<0,01) 70
Şekil 4-4: Açlık Kan Glikozu, İnsülin ve HOMA-IR Dağılımları (* p<0,05, **p<0,01) 72
Şekil 4-5:Asprosin, İnsülin, HDL, Total Kolesterol ve Trigliserit Dağılımları (*p<0,05, **p<0,01) 74
Şekil 4-6: Dentat Gyrus Nörodejenerasyon Skoru (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) .. 77
Şekil 4-7: Kontrol Grubuna Ait Luxol Fast Blue-Cresyl Violet Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (x200). 77
Şekil 4-8: Kontrol Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400). 78
Şekil 4-9: Glikoz Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400). 78
Şekil 4-10: DA Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400). 79

Şekil 4-11: Etanol Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400). ⟶ : Pignotik hücre, ➡: İskemik kırmızı nöron, V: Vakuol 80
Şekil 4-12: Etanol+DA Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400). ⟶ : Piknotik hücre..... 80
Şekil 4-13:Kontrol Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400). 81
Şekil 4-14: Glikoz Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400). ➡: inflamatuar hücre infiltrasyonu, ★: Dilatasyon..... 82
Şekil 4-15: DA Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400). ★: Dilatasyon..... 82
Şekil 4-16: Etanol Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400). ⟶ :Şeffaf stoplazmalı hücre, ★: Dilatasyon..... 83
Şekil 4-17: Etanol+DA Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400). ➡: inflamatuar hücre infiltrasyonu, ★: Dilatasyon..... 83

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Semboller	Açıklama
Fe^{+3}:	Ferrik Demir
Fe^{+2} :	Ferröz Demir
H_2O_2:	Hidrojen Peroksit
HO_2^- :	Hidroperoksil
HOCl:	Hipokloröz Asit
$LOO^{\cdot}$:	Lipit Peroksit
LOOH:	Lipit Hidroperoksit
iNOS:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
NO_3^-:	Peroksinitrit
O_2:	Oksijen Molekülü
O_3:	Ozon
$O_2^{\cdot-}$:	Süperoksit
$OH^{\cdot}$:	Hidroksil Radikali
$RO^{\cdot}$:	Alkoksil Radikali
$ROO^{\cdot}$:	Peroksil Radikali

Kısaltmalar	Açıklama
4-HNE:	4-Hidroksinonenal
ADH:	Alkol Dehidrogenaz
AgRP:	Aguti İlişkili Peptit
ALDH:	Asetaldehit Dehidrogenaz
AMPA:	α-Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit
AQP:	Aquaporin
BDNF:	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (Brain Derived Neurotrophic Factor)
BK kanalları:	Ca^{+2}'la Aktive Edilen İletkenliği Büyük K^+ kanalları
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
CA:	Cornu Ammonis

cAMP:	Siklik Adenozin Monofosfat
CAT:	Katalaz
CREB:	Cyclic AMP-Response Element Binding Protein
CYP450:	Sitokrom P450
CYP2E1:	Sitokrom 2E1
DA:	Darbepoetin Alfa
ELİSA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPO:	Eritropoetin
EPO-R:	Eritropoetin Reseptörü
ERK:	Hücre Dışı Sinyal İlişkili Kinaz (Extracellular signal-regulated kinase)
FAEE:	Yağ Asidi Etil Esterleri
FATP:	Yağ Asidi Taşıma Proteini
FBN1:	Fibrillin Geni 1
$FMNH_2$:	İndirgenmiş Flavin Mononüklotit
Fox:	Forkhead box (Forkhead transkripsiyon faktörü)
GABA:	Gama Aminobütrik Asit
GIRK:	G Protein Kapılı İçe Doğrultucu K^+ Kanalları
GPx:	Glutatyon Peroksidaz
GR:	Glutatyon Redüktaz
GSH:	İndirgenmiş Glutatyon
GSSH:	Okside Glutatyon
HDL:	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HIF:	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
HOMA-IR:	Homeostatik Model Değerlendirmesi-İnsülin Rezistansı; Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance
INF-γ:	İnterferon Gama
IL:	İnterlökin
JAK:	Janus Kinaz
LDL:	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LTD:	Uzun Süreli Depresyon (Long Term Depresyon)

LTP:	Uzun Süreli Potensiyasyon (LongTerm Potensiasyon)
MAPK:	Mitojenle İlişkili Protein Kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MDA:	Malondialdehit
MEOS:	Mikrozomal Etanol Oksitleme Sistemi
MPO:	Miyeloperoksidaz
NAc:	Nukleus Akümbens
NAD^+:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH:	İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NBT:	Nitroblue Tetrazolium
NFKB:	Nükleer Faktör Kappa B
NIAAA:	Ulusal Alkol Suistimali ve Alkolizm Enstitüsü
NMDA:	N-metil-D-aspartat
NPS:	Neonatal Progeroid Sendrom
NSE:	Nöron Spesifik Enolaz
OD:	Optik Yoğunluk
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PFC:	Prefrontal Korteks
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-Kinaz,
POMC:	Proopiomelanokortin
Prx:	Peroksiredoksin
PUFA:	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
rHuEPO:	Rekombinant İnsan Eritropoetini
RNS:	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri-Reactive Oxygen Species
SH2:	Src Homoloji-2
SREBP-1:	Steroid Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein-1
SOD:	Süperoksit Dismutaz
STAT:	Sinyal Transdüksiyonu ve Transkripsiyon Aktivatörü
TBA:	Tiyobarbitürik Asit

TNF-α: Tümör Nekroz Faktör-α

Trx: Tioredoksin

XO: Ksantin Oksidaz

XOR: Ksantin Oksidoredükdaz

VTA: Ventral Tegmental Alan

VLDL: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Uygur, E. (2022). Deneysel etanol uygulamasında darbepoetin alfanın nöroproteksiyona ve plazma asprosin düzeylerine etkisinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Fizyoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Etanol kullanımının beyin dahil olmak üzere vücutta birçok organa zararlı etkileri olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur. Araştırmamızda sıçanlarda etanolün oluşturduğu nöronal hasara karşı darbepoetin alfanın (DA) nöroprotektif etkileri ve etanolün kan glikozunu yükselten asprosin hormonunun plazmadaki seviyeleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda 50 adet Wistar Abino erkek sıçan kullanıldı. Kontrol (K) grubu (3,15 ml/kg serum fizyolojik, i.g), glikoz (G) grubu (3,15 ml/kg glikoz çözeltisi, i.g.), etanol (E) grubu (3 g/kg %20'lik etanol çözeltisi, i.g), DA grubu (0,25 µg/kg, i.p.) ve E+DA grubu olmak üzere 5 grup oluşturuldu.

Deneyin ilk günü, 15. ve 30. günlerinde açlık kan glikozu ölçüldü. Beyin dokusunda ve serumda oksidatif stres/antioksidan parametleri, S100-β ve nöron spesifik enolaz (NSE) seviyeleri incelendi. Ayrıca serumda lipit profili, insülin seviyeleri ile beyin dokusunda ve plazmada asprosin seviyeleri incelendi. Beyin ve karaciğer dokusu histopatolojik yöntemlerle incelendi.

E grubunda K grubuna göre S100-β (beyin dokusunda $p<0,01$, serumda $p<0,05$) ve NSE (beyin dokusunda $p<0,05$, serumda $p<0,01$) seviyelerinin anlamlı olarak yüksek olduğu; antioksidan parametrelerin anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0,05$), beyin dokusunda malondialdehit (MDA) düzeylerinin anlamlı olarak yüksek ($p<0,001$) olduğu bulundu. E+DA grubunda ise E grubuna göre S100-β (beyin dokusu ve serumda $p<0,05$) ve NSE (serumda $p<0,05$) seviyelerinin anlamlı olarak düşük olduğu; glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin (beyin dokusunda $p<0,05$) ve katalaz (CAT) (serumda $p<0,05$) seviyelerinin anlamlı olarak yüksek; MDA düzeylerinin ($p<0,001$) anlamlı olarak düşük olduğu bulundu. Histopatolojik olarak hipokampüsün dentat girusunda etanol grubunda orta düzeyde nörodejenerasyon, E+DA grubunda ise hafif düzeyde nörodejenerasyon olduğu bulundu. Tüm gruplarda plazma asprosin seviyeleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu. Serum lipit profili açısından sadece trigiliserit seviyelerinin DA ve E+DA gruplarında diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$).

DA'nın uzun süreli aralıklı etanol intoksikasyonu üzerine antioksidan etkilere sahip olduğu ve nöroprotektif etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Uyguladığımız etanol dozuna ve süresine bağlı olarak deneysel etanol maruziyetinin plazma asprosin seviyeleri ve lipit profili üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Anahtar Kelimeler: Etanol, darbepoetin alfa, asprosin, nörodejenerasyon, nöroproteksiyon.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-34657

ABSTRACT

Uygur E. (2022). Investigation of Effect of Darbepoetin Alpha on Neuroprotection and Plasma Asprosin Levels in Experimental Ethanol Administration. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Physiology, Thesis of PhD. Istanbul.

Various studies have shown that the use of ethanol has harmful effects on many organs in the body, including the brain. In our study, we aimed to investigate the neuroprotective effects of darbepoetin alfa (DA) against neuronal damage caused by ethanol and the effects of ethanol on the plasma levels of the hormone asprosin, which raises blood glucose in rats.

50 Wistar albino male rats were divided into five groups of control (C) (3.15 ml/kg saline, ig), glucose (G) (3.15 ml/kg glucose solution, ig), ethanol (E) (3 g/kg 20% solution ethanol solution, ig), DA (0.25 µg/kg, ip) and etanol+DA.

Fasting blood glucose was measured on the first day, 15th and 30th days. Oxidative stress/antioxidant parameters, S100-β and neuron-specific enolase (NSE) levels were investigated in brain tissue and serum. In addition, lipid profile in serum, insulin levels and asprosin levels in brain tissue and plasma were investigated. Brain and liver tissue were investigated by histopathological methods.

S100-β (in brain tissue $p<0,01$; in serum $p<0,05$) and NSE (in brain tissue $p<0,05$; in serum $p<0,01$) levels were significantly higher in both brain tissue and serum, antioxidant parameters were significantly lower, and in brain tissue Malondialdehyde (MDA) levels ($p<0,001$) were significantly higher in group E compared with group K. S100-β (in both brain tissue and serum $p<0,05$) and NSE (in serum $p<0,05$) levels were significantly lower, glutathione peroxidase (GPx) activity (in brain tissue $p<0,05$) and catalase (CAT) levels (in serum $p<0,05$) were significantly higher, and MDA levels ($p<0,001$) were significantly lower in group E+DA compared with group E. Histopathologically, there was moderate neurodegeneration in E group and mild neurodegeneration in group E+DA in the dentate gyrus of the hippocampus. In the plasma asprosin levels there was no significant difference between the groups. Triglyceride levels, one of the lipid profile markers were significantly higher in groups DA and E+DA compared with other groups ($p<0,05$).

Our findings suggest that DA has antioxidant effects and neuroprotective effects on long-term intermittent ethanol intoxication. It was observed that experimental ethanol exposure did not have any effect on plasma asprosin levels and lipid profile depending on ethanol dose and duration of ethanol exposure.

Key Words: Ethanol, darbepoetin alpha, asprosin, neurodegeneration, neuroprotection.

This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University-Cerrahpasa. Project number: TDK-2020-34657

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alkol dışarıdan alınabildiği gibi vücudumuzda çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda da üretilmektedir. Normal fizyolojik düzeylerde üretilen alkolün yanında özellikle içecekler yoluyla alınan alkolün fizyolojik fonksiyonları değiştirdiği açıktır. Fizyolojik etki mekanizmasının ortaya konulması üzerine yapılan birçok çalışma sonucunda alkolün etki mekanizmasının Gama Aminobütrik Asit (GABA) nörotransmitteri üzerinden olduğu gösterilmiştir (Olsen ve Liang 2017; Yeomans ve ark. 2003). Yüksek dozlarda alınan alkolün vücuttaki doku ve organlar üzerinde fizyolojik etkileri dışında çeşitli fizyopatolojik etkileri de bulunmaktadır (Hammoud ve Jimenez-Shahed 2019). Alkolün fizyopatolojik etkilerinin azaltılması önemli bir araştırma konusunu oluşturmaktadır. Alkol kullanımı sinir sistemi de dahil birçok organ sistemlerini etkiler.

Aşırı alkol tüketimi beynin yapısında ve fonksiyonlarında değişikliklere sebep olur. Alkol kullanımına bağlı nörodejenerasyon; apopitoz, nöronal proliferasyon ve miyelinizasyon gibi nöronal süreçlerdeki değişikliklerle ilgilidir. Akut ve kronik alkol maruziyeti serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozarak reaktif oksijen türlerinin (Reactive Oxygen Species; ROS) ve lipit peroksidasyonunun oluşumunu takip eden oksidatif strese yol açar (Silva-Pena ve ark. 2019).

Alkol farklı durum ve uygulama koşullarında serum insülin konsantrasyonunda hem artışa hem de azalışa neden olmuştur. Akut alkol tüketimi alkolün enerji verici özelliğinden dolayı hepatik glikoneogenezisi inhibe eder ve hipoglisemiye neden olur. Kronik alkol tüketimi bazı kişilerde insülin rezistansı ve bozulmuş glikoz toleransına yol açan hepatik steatoza neden olabilir (Lanng ve ark. 2019).

Eritropoetin (EPO) kemik iliğinde eritroblastların proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırmanın yanı sıra apopitozu da inhibe ederek eritropoezi kolaylaştıran 30 kDa ağırlığında bir glikoproteindir.

EPO reseptörleri (EPO-R) nöronlar, endotel hücreleri, kardiyomiyositler, renal tübüler hücreler, podositler ve mezenşiyal hücreler gibi eritroid olmayan hücrelerde de eksprese edilir (Canadillas ve ark. 2010). EPO gelişmekte olan ve olgun merkezi sinir sistemi hücrelerinin nöronlarında, astrositlerinde ve immün hücrelerinde hücre canlılığına

ve proliferasyona aracılık eder (Schober ve ark. 2018). Yapılan çalışmalarda EPO'nun beyin yaralanmalarından sonra beyin fonksiyonlarının iyileşmesinde ve anatomik yıkımın azalmasında rol aldığı bildirilmektedir (Oshima ve ark. 2018). Rekombinant insan EPO'sunun gelişmekte olan sıçan beyninde etanolün neden olduğu nörotoksisiteye karşı koruyucu olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kumral ve ark. 2005). DA rekombinant insan EPO'sunun hiperglikozillenmiş bir analoğudur ve daha uzun yarı ömre sahiptir. Rekombinant insan EPO'su ile aynı reseptörü kullanan DA'nın sıçanlarda serebral iskemiden sonra nörodejenerasyonda azalmaya neden olarak nöroprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Belayev ve ark. 2005).

Beyin dokusunun tek enerji kaynağı glikozdur. Bu yüzden kan glikoz seviyesi beyin dokusunun metabolizmasının sürdürülmesinde önemli bir yere sahiptir. Asprosin açlık esnasında beyaz yağ dokusundan salınan kan glikozunu yükselten protein yapıda bir hormondur. Ayrıca asprosin kan-beyin bariyerini geçerek siklik adenozin monofosfat (Cyclic Adenosine Monophosphate; cAMP) yoluyla oreksijenik aguti ilişkili peptit (Agouti-Related Peptide; AgRP) nöronlarını doğrudan aktive eder ve bunun sonucunda anoreksijenik proopiomelanokortin (POMC) nöronları inhibe olur. Böylece iştahın artmasına ve vücut ağırlığında artışa neden olur (Duerrschmid ve ark. 2017). Yapılan çalışmalarda asprosin seviyesi ile obezite, lipit profili, açlık plazma glikozu, insülin rezistansı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (Zang ve ark. 2019, Wang ve ark, 2018). Ayrıca bozulmuş glikoz toleransı olan hastalarda ve tip 2 diyabet hastalarında asprosin seviyesi sağlıklı bireylere göre daha yüksek bulunmuştur.

Literatürde akut doz etanolün beyin üzerinde oluşturduğu oksidatif hasara karşı DA'nın nöroprotektif etkilerini gösteren çalışma bulunmasına rağmen uzun süreli etanol maruziyetine karşı DA'nın nöroprotektif etkilerine ilişkin çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden sıçanlarda uzun süreli etanol maruziyetinin beyinde oluşturduğu nöronal hasara karşı DA'nın etkilerini ve etanolün glikoz metabolizmasındaki etkileri dikkate alındığında hepatik glikoneogenezis yoluyla kan glikozunu yükselten yeni bir hormon olan asprosinin plazmadaki seviyelerini incelenmesi planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alkol (Etanol)

Alkol çok uzun yıllardan beri toplumlar tarafından bilinen ve sıklıkla toplumsal yaşamda iletişimi arttırmak amacıyla kullanılan bir maddedir. Hafif ve orta derecede alkol kullanımının faydalı etkileri olmasına rağmen alkol alımının sağlık açısından olumsuz sonuçlarını gösteren çok sayıda klinik ve deneysel veriler mevcuttur. Alkolün kötüye kullanımı ve alkolizm önemli sosyoekonomik küresel sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Aşırı içki tüketimi beyin, karaciğer, kalp, akciğer gibi birçok önemli organda hasara yol açar. Kronik alkol maruziyeti ve alkol kullanım bozukluğu kişinin iş hayatında problemler yaşamasına, mesleğini kaybetmesine, suça yönelmesine ve suç işlemesine sebep olur. Ayrıca ailelerin parçalanması, ekonomik problemlere sebep olması ve en önemlisi trafik kazalarına neden olarak can ve mal kaybına sebep olması gibi toplumsal yaşamda çok boyutlu problemlere de yol açan bir olgudur.

Dünya çapında alkollü içeceklerin tüketimi arttıkça, morbidite ve mortalite de önemli ölçüde artmaktadır. 2018 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), alkol tüketiminin dünya çapında yılda 3 milyon ölümden sorumlu olduğunu ve 20 ila 40 yaşları arasındaki toplam ölümlerin yaklaşık %14'ünü oluşturduğunu tahmin etmektedir (Hyun ve ark. 2021). WHO verilerine göre yetişkinler arasında yaygın olan alkol tüketimi şekli olan "aşırı içki içme" dünya nüfusunun %7'sinden fazlasını kapsamaktadır. Bu oran Amerika'da %13 ve Avrupa'da %16'dır. Alkol tüketen her üç kişiden biri aşırı içicidir. Dünya nüfusunun %2'den fazlası (Amerika'da %3,4 ve Avrupa'da %4) alkole bağımlıdır (WHO; Global status report on alcohol and health 2014).

Aşırı içki içme (tek seferde riskli içme) tabiri genellikle akşamları ve hafta sonları gün içerisinde çok fazla miktarda içki kullanımı ya da yoğun miktarda içkiyi aralıklı şekilde içme anlamında kullanılan bir kavramdır. Son yıllarda aşırı içki içme kavramı farklı şekillerde ifade edilmeye başlanmıştır. Bu tanımlamalardan birine göre aşırı içki içme erkekler için tek seferde 5 birim, kadınlar için 4 birim etanoldür. Birim ifadesi toplumdan topluma değişmektedir. Bazı toplumlarda birim yerine "standart drink" (standart içki) ifadesi kullanılmaktadır. İngiltere'de 1 birim 8 g, Polonya ve Avustralya'da 10 g, ABD'de 14 g saf etanole karşılık gelmektedir (Waszkiewicz ve ark. 2018). Aşırı içki içmenin yeni ve kapsamlı bir tanımı ise ABD Ulusal Alkol Suistimali ve Alkolizm Enstitüsü (NIAAA) tarafından yapılmıştır. Bu tanımlamaya göre aşırı içki içme kan

etanol konsantrasyonunun 2 saat içinde %0,08 (w/v) veya 0,08 g/dl'ye ulaşması ve üzerinde olmasıdır (Bagley ve ark. 2019; Crews ve ark. 2016; Waszkiewicz ve ark. 2018). Kan etanol konsantrasyonun bu seviyeye ulaşması için tüketilen alkol miktarı yaş, cinsiyet, vücut büyüklüğü ve vücut kompozisyonuna göre değişir. Bu seviye kadınlar için 2 saat boyunca 4 standart içki, erkekler için 5 standart içkiye karşılık gelmektedir. Diğer bir tanımlamaya göre aşırı içki içme; haftalık önerilen alkol limitinin yarısından fazlasını (kadınlar için 1-14 içki, erkekler için 1-21 içki) veya günlük önerilen maksimum etanol dozunun 2 katından fazlasını (kadınlar için günlük maksimum doz 1-2 birim, erkekler için 2-3 birim) tüketmektir (Waszkiewicz ve ark. 2018).

2.1.1. Etanolün Farmokokinetiği

Alkol farmokolojik açıdan "etanol" olarak bilinen, kimyasal formülü CH_3CH_2OH olan, berrak ve renksiz bir sıvıdır. Alkollü içeceklerde birincil bileşen olarak kullanılan etanolün suda çözünürlüğü yüksektir ve yapısal olarak küçük bir moleküldür. Basit difüzyon yoluyla kolay bir şekilde tüm mukozal yüzeylerden geçerek gastrointestinal sistemden emilir ve karaciğere gelir. Sistemik dolaşım yoluyla vücudun bütün dokularına ve beyin omurilik sıvısı (BOS) dahil bütün vücut sıvılarına dağılır (Soderpalm ve ark. 2017; Cederbaum 2012; Olsen ve ark 2007). Dokulardaki etanolün denge konsantrasyonu dokuların nispi su içeriğine bağlıdır ve sıvı veya dokudaki mutlak su miktarını yakından takip eder. Beyin, akciğerler, böbrekler ve karaciğer gibi organlarda dengeye hızla ulaşılırken kanlanması daha zayıf olan iskelet kasında dengeye daha yavaş ulaşılır (Agarwal ve Goedde 1990, p.8)

Etanolün emilimi, dağılımı ve eliminasyon hızındaki değişiklikler kronik alkol tüketiminden sonra gözlenen klinik durumları önemli ölçüde etkiler. Etanolün tüketiminden sonra kandaki konsantrasyonu farmokokinetiğine bağlıdır. Etanolün farmokokinetiği sadece kandaki konsantrasyonunu değil aynı zamanda etanolün farklı dokularda biriken metabolik ürünlerini ve bu yüzden farmokolojik ve toksikolojik cevapları da belirler.

2.1.1.1. Etanolün Emilimi

Yetişkinlerde alınan etanolün tamamına yakını pasif difüzyonla emilir ve etanol 30-90 dakika içinde kanda en yüksek konsantrasyona ulaşır. Etanolün emilimi iki faktörden dolayı ince bağırsaklarda mideden daha fazladır. Birinci olarak mideyi koruyan mukus kalınlığının ince bağırsaktaki mukus kalınlığından 16 kat daha dirençli olması

midedeki emilimi azaltır. Ayrıca ince bağırsakların yüzeyinde bulunan villuslar ve mikrovilluslar yüzey alanını artırarak emilimin burada daha fazla olmasına neden olur. İkinci olarak ince bağırsaklardaki peristaltizmin neden olduğu karıştırma hızı midedeki peristaltizmden daha fazladır (Hernandez ve ark. 2016). Etanolün emilimini etkileyen diğer faktör ise mide boşalma hızıdır. Mide boşalması hızlı olduğunda etanolün emilimi de hızlıdır. Midede gıdaların varlığı, tüketilen alkollü içeceğin türü, bireysel yapısal farklılıklar, etanolün midede kalma süresini ve buna bağlı olarak etanolün emilim oranını etkiler. Yemekle birlikte ya da yemekten sonra etanol tüketildiği zaman midenin dolu olması mide boşalmasını yavaşlatır, mide lümeninde bulunan sıvılar ve yiyecekler alınan etanolü seyreltir. Böylece etanol emiliminin hızı ve verimi düşer. Bunun sonucunda kan etanol konsantrasyonunun zirve seviyeye ulaşma süresi uzar. Ayrıca mide motilitesini etkileyen herhangi bir faktör mide boşalma hızını etkilediği için etanolün emilim oranını değiştirir. Mide içeriğinin bileşimi, hacmi, pH'sı, viskozitesi, otonom ve hormonal kontrol, emosyonel durum, ağrı, postür, mide yüzeyinde bulunan aktif maddeler, sigara, yaygın kullanılan birçok ilaç mide motilitesini değiştiren faktörler arasında yer alır. Yüksek protein, yağ ve karbonhidrat içeren yiyeceklerin etanolle birlikte tüketilmesi, vücut ısısının azalması ve egzersiz etanolün emilini azaltır. Hormonal durumdaki değişiklikler ve menstrual siklus da etanol emilimini etkiler (Holt 1981; Agarwal ve Goedde 1990, p.8)

Etanol çeşitli mekanizmalarla vücuttan elimine edilir. Alınan etanol gastrointestinal sistemden hızla emildikten ve dolaşım yoluyla vücuda dağıtıldıktan sonra %95-98 oranında metabolize edilir (Heier ve ark. 2016; Pizon ve ark. 2007). Normal koşullar altında insanda etanol bozunma veya metabolizma hızı saatte yaklaşık 120-150 mg/kg vücut ağırlığıdır. İnsan vücudu tarafından saatte atılan toplam alkol genellikle ortalama vücut ağırlığına sahip sağlıklı bir kişide saatte 100-300 mg aralığındadır ve saatte 6-9 g alkole eşdeğerdir. Çok az miktarda etanol değişmeden solunum yoluyla (%5), ter (%0,5) ve idrarla (%0,5-2) atılır. Yüksek sıcaklıklarda ve daha yüksek kan etanol seviyelerinde bu değer aşılabilir. Etanolün idrarla atılımı pasif bir işlemdir ve 0,9 ile 12,7 ml/dk arasında klirens oranları bildirilmiştir (Agarwal ve Goedde 1990, p.9).

2.1.1.2. Etanolün Metabolizması

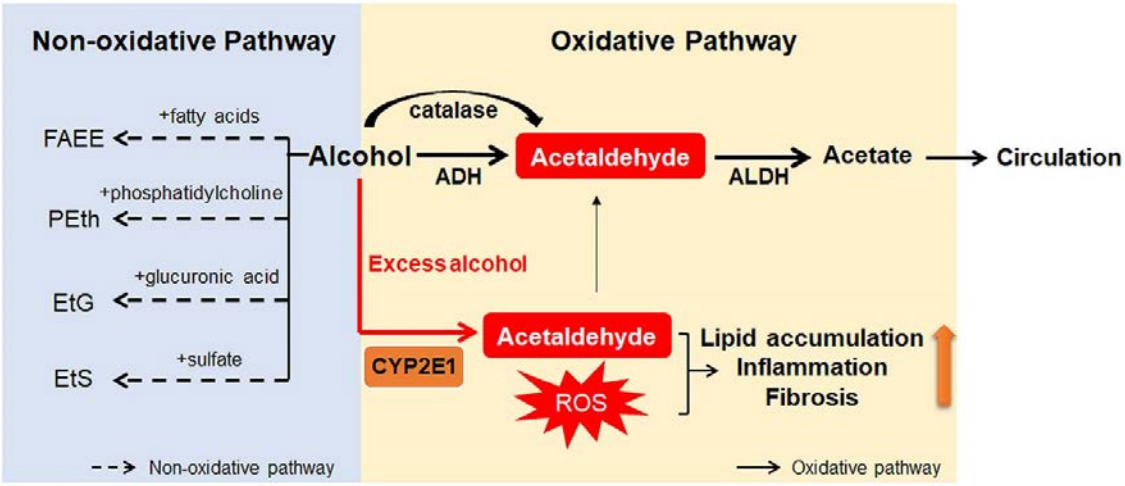
Etanol metabolizması hem etanolü yıkan enzimlerdeki çeşitlilik ve cinsiyet gibi genetik faktörler, hem de tüketilen bireysel alkol miktarı ve kişinin beslenmesi gibi

çevresel faktörlere bağlı olarak değişir. Etanol metabolizmasındaki farklılıklar bazı insanlarda etanolle ilgili problemler açısından büyük bir risk oluştururken bazı insanların etanolün zararlı etkilerinden bir şekilde korunmasına neden olabilir (NIHAAA, 2007).

Alınan etanolün %90'ından fazlası hepatik etanol oksidasyonu yoluyla metabolize edilir (Heier ve ark. 2016). Bunun için gerekli olan primer enzimler alkol dehidrogenaz (ADH), asetaldehit dehidrogenaz (ALDH), sitokrom P450 (CYP450) enzimlerinden biri olan sitokrom 2E1 (CYP2E1) ve katalaz (CAT)'dır.

Etanolün metabolize edilmesinden sorumlu olan primer organ karaciğer olmasına rağmen gastrik ADH da buna katkı sağlar. Ayrıca etanol beyin gibi ADH içermeyen ekstrahepatik dokularda da CYP2E1 ve CAT enzimleri tarafından metabolize edilir.

Hyun ve arkadaşlarının (2021) Şekil 2-1'de gösterdiği gibi etanol oksidatif yol ve nonoksidatif yol olmak üzere iki şekilde metabolize edilir.



Şekil 2-1: Etanolün Oksidatif ve Nonoksidatif Yolla Metabolizması-Hyun ve ark. (2021)'dan

2.1.1.2.1. Etanolün Oksidatif Metabolizması

Oksidatif yoldaki ilk adım etanolün sitozolik ADH tarafından ve çok küçük miktarlarda da mikrozomal CYP2E1 ve CAT tarafından asetaldehite dönüştürülmesidir.

Etanolün ADH ile oksidasyonu sırasında bir elektron ara taşıyıcısı olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) iki elektron alarak indirgenmiş formu olan

NADH'a dönüşür. Oksidasyon işlemleri sırasında açığa çıkan serbest radikaller ve asetaldehit gibi etanol metabolizmasının bu yan ürünleri hepatosit adı verilen karaciğer hücrelerini hasara karşı savunmasız bırakır (Zakhari 2006).

İkinci adımda ise asetaldehit hızlı bir şekilde mitokondrilerde ALDH enzimi (özellikle ALDH2) tarafından asetata dönüştürülür ve bu esnada NADH oluşur. NADH daha sonra mitokondride mitokondriyal elektron taşıma zinciri veya solunum zinciri adı verilen bir dizi kimyasal reaksiyonla oksitlenir.

Oluşan asetatın büyük bir kısmı karaciğerden kana geçer ve en sonunda kalp, iskelet kası ve beyin hücrelerinde CO_2'e metabolize edilir. Asetat durağan bir ürün değildir. Karaciğerde kan akımını artırır, santral sinir sistemini baskılar ve çeşitli metabolik süreçleri etkiler. Asetat ayrıca periferik dokuların ve beyin dokusunun mitokondrilerinde lipit ve kolesterol biyosentezinde rol oynayan asetil koenzim A'ya da metabolize edilir. Kronik alkol kullanımında beynin enerji kaynağı olarak glikoz yerine asetat kullanmaya başladığı düşünülmektedir.

CYP450 enzimleri mikrozomlarda, hücre içi membran ağı olarak bilinen endoplazmik retikulumda ve özellikle de mitokondride bulunur (Suastegui ve ark. 2017). CYP450 enzimlerinden biri olan CYP2E1 mikrozomal etanol oksitleme sisteminde (MEOS) önemli bir rol oynar. CYP2E1 kronik alkol tüketiminde görev alır ve yüksek etanol konsantrasyonlarında etanolün asetaldehite metabolize edilmesinde önemli rol oynar. CYP2E1 hepatik ADH ile karşılaştırıldığında daha yüksek Km[1] değeri ile daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir. CYP2E1 aktivitesi etanolü asetaldehide okside etmek için O_2 ve NADPH'ın $H^{+'}$ ını kullanır. CYP2E1 ile etanolün oksidasyonu sonucunda doku hasarı riskini artıran etoksi radikali, hidroksietil radikali, asetil radikali, süperoksit (O_2^{-}) gibi radikallerini hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$) ve peroksil ($ROO^{\cdot}$) radikallerini içeren ROS oluşur (Neuman ve ark. 2020). CYP2E1 bağımlı etanol oksidasyonu ADH aktivitesi daha düşük olan beyin gibi diğer dokularda da meydana gelir. CYP450'ler beyinde plazma membranı, endoplazmik retikulum, golgi

[1] Km: Bir reaksiyonda en yüksek reaksiyon hızının (Vmax) yarısının elde edildiği substrat konsantrasyonuna Michaelis-Menten sabiti denir ve Km ile gösterilir.

aygıtı, peroksizomlar, lizozomlar ve mitokondri gibi birçok farklı subsellüler hücre bölmesinde bulunur (Zakhari 2006).

Hücrede peroksizomlarda bulunan CAT nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzim kompleksi veya ksantin oksidaz enzimi gibi H_2O_2 oluşturan sistemlerin varlığında etanolü okside edebilir. CAT ile oksidasyon nicel olarak açlık durumu hariç etanol oksidasyonunun küçük bir yolu olarak kabul edilir (Zakhari 2006).

2.1.1.2.2. Etanolün Nonoksidatif (Oksidatif Olmayan) Metabolizması

Etanolün nonoksidatif yolla metabolizması çok küçük oranlarda gerçekleşir. Az miktarda etanol nonoksidatif olarak farklı enzimlerin etkisiyle çeşitli endojen metabolitlere konjuge edilir.

Nonoksidatif yollardan biri alkolün yağ asitleri ile reaksiyonu sonucunda yağ asidi etil esterleri (Fatty Acid Ethyl Esters; FAEE) olarak adlandırılan moleküllerin oluşumunu içerir (Hyun ve ark. 2021; Zakhari 2006). FAEE'ler etanol alımından sonra serum ve diğer dokularda tespit edilebilir ve etanol elimine edildikten sonra da çok uzun süre serum ve diğer dokularda kalır (Zakhari 2006).

Diğer nonoksidatif yol fosfatidil etanol olarak bilinen fosfolipit içeren bir tür lipit molekülünün oluşmasına neden olur. Bu yol fosfolipitleri özellikle de fosfotidilkolini parçalayarak fosfotidik asit oluşmasına neden olan fosfolipaz D enzimini gerektirir (Hyun ve ark. 2021; Zakhari 2006). Bu yol hücresel iletişimde kritik bir bileşendir. Fosfolipaz D enziminin etanol için yüksek bir K_m'si vardır ve enzimatik reaksiyon daha çok dolaşımdaki yüksek etanol konsantrasyonlarında meydana gelir. Bu reaksiyonun ürünü olan fosfatidil etanol zayıf bir şekilde metabolize edilir ve büyük miktarda etanolün kronik tüketimini takiben saptanabilir seviyelerde birikebilir, ancak hücre üzerindeki etkileri henüz belirlenmemiştir. Fakat fosfatidil etanol oluşumu fosfolipaz D aracılığıyla oluşturulan fosfatidik asit oluşumunu inhibe eder ve hücresel sinyali bozar (Zakhari 2006).

Ayrıca nonoksidatif olarak etanolün glukuronik asitle konjuge edilmesiyle etil glukuronid, sülfatla konjuge edilmesiyle de etil sülfat oluşturulur (Hyun ve ark. 2021).

Etanol metabolizmasının oksidatif ve oksidatif olmayan yolları birbiriyle ilişkilidir. Etanol oksidasyonunun ADH, CYP2E1 ve CAT'ı inhibe eden bileşikler

tarafından inhibisyonu etanolün oksidatif olmayan metabolizmasında bir artışa ve karaciğer ve pankreasta FAEE'lerin artmasına neden olur.

2.1.2. Etanolün Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri

Glikoz merkezi sinir sistemi için temel substrattır. Bu yüzden yeterli besinin sağlanabilmesi için kan glikoz konsantrasyonun sabit değerlerde tutulması önemlidir. Karaciğer ve böbrekler glikojenoliz ve glikoneogenez yoluyla kan glikozu homeostazını sürdürmekle görevli organlardır. Bu iki organ hipoglisemiye erken yanıt olarak glikojenoliz yoluyla kana glikoz salınımını sağlar. Bununla birlikte glikojen depoları azaldıkça kan glikoz konsantrasyonunun azalmasına engel olmak için glikoneogenez artırılır. Açlık esnasında glikoneogenez kan glikoz seviyelerini korumak için birincil reaksiyondur. Böylece karaciğer ve böbrekler kan glikozu homeostazını koruyarak hipoglisemiye bağlı organ hasarı oluşumunu önler (Sumida ve ark. 2004).

Etanolün karbonhidrat metabolizması üzerine etkileri çok karmaşıktır ve fiziksel durum, beslenme, hormonal gibi bir çok faktörden etkilenebilir. Genel olarak etanolün karbonhidrat metabolizmasına etkileri asetatın $NADH/NAD^+$ oranında değişiklik yapması, etanolün ve asetaldehitin direkt olarak karaciğer metabolizmasını etkilemesi yoluyla gerçekleşir. $NADH/NAD^+$ oranında değişiklik karbonhidrat sentezi ve yıkımında birçok bozuklukla sonuçlanan trikarboksilik asit döngüsünü değiştirir. Asetatın aktif formu olan asetil koenzim A seviyeleri etanol metabolizmasından etkilenir. Etanolün oksidasyonuyla ilişkili redoks değişiklikleri pirüvatın laktata dönüşümü ile sonuçlanır ve kanda laktat seviyeleri artar. Kanda laktat artışı idrarla ürik asit çıkışını azaltır. Bunun sonucunda ise serumda ürik asit konsatrasyonu artar (Agarwal ve Goedde 1990, p.73).

Klinik olarak alkole bağlı hiperglisemi ve hipoglisemi başlıca en sık görülen rahatsızlıklardır. Akut etanol kullanımının hepatik glikoneogenezi inhibe ederek hipoglisemi riskini artırdığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Lanng ve ark. 2019; Krebs 1968, Kaynak: Sumida ve ark. 2004; Arky ve Freinkel 1969, Kaynak: Sumida ve ark. 2004; Krebs ve ark. 1969, Kaynak: Sumida ve ark. 2004). Hepatik glikoneogenezisin inhibisyonu, karbonhidratlara karşı artmış insülin cevabı, glikozun alfa-gliserofosfata dönüştürülmesinin artması, birçok düzenleyici hormonun sekresyonunda bozulmaya yol açan hipotalamik-pitüiter-adrenal yetmezlik gibi mekanizmalar alkol kaynaklı hipoglisemiye neden olabilir. Kan glikozu etanolün verildiği andaki beslenme durumuna (açlık durumu ve süresi), verilen etanol miktarına

ve etanolün kanda ulaştığı kan etanol konsantrasyonu değerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Steiner ve ark. 2015). Örneğin ~12 saat (gece boyunca) aç kalan insanlarda (Kreisberg ve ark. 1971; Siler ve ark. 1998), sıçanlarda (Spolarics ve ark. 1994, Kaynak: Steiner ve ark. 2015) ve farelerde (Guo ve ark. 2010) akut etanol maruziyetinden sonra kan glukoz konsantrasyonunda değişiklik olmamıştır ve öglisemi korunmuştur. Akut etanol uygulamasının glikoneogenezi inhibe etmesine rağmen kısa süreli açlık koşullarında ögliseminin devam ettirilebilmesi etanolün eşzamanlı olarak glikojen sentaz aktivitesini inhibe ederek glikojenolizi artırmasına bağlıdır (Mokuda ve ark. 2004; Field ve ark. 1963). Buna karşılık etanol ~ 3-4 gün açlığın ardından insanlara veya hayvanlara akut olarak uygulandığında şiddetli ve sürekli bir hipoglisemi ortaya çıkar. Bu nedenle hipoglisemi yalnızca alkol kullanım bozukluğu olan ve aynı zamanda nispeten zayıf beslenme durumu veya ciddi şekilde bozulmuş karaciğer fonksiyonu olan insanlarda beklenebilir (Steiner ve ark. 2015).

Kronik etanol tüketimi insülin direnci ve bozulmuş glikoz toleransına yol açan hepatik steatoza yol açar. Ayrıca etanol kullanımı nedeniyle glikozun azalmış periferal kullanımı ve karaciğerde artmış glikojen yıkımı glikoz toleransının artmasına neden olabilir (Lanng ve ark. 2019; Agarwal ve Goedde 1990, p.73).

Etanol uygulama şekline göre ve farklı koşullarda serum insülin konsantrasyonunda hem artışa hem de azalışa neden olur. Etanolün plazma glukagon konsantrasyonu üzerine etkisi ise belirsizdir. Benzer şekilde etanolün bağırsak kaynaklı insülinotropik inkretin hormonları, glikoz bağımlı insülinotropik polipeptit (GIP) ve glukagon benzeri peptit 1 (Glucagon-Like Peptide 1; GLP-1) üzerine etkileri belirsizdir.

2.1.3. Etanolün Lipit Metabolizması Üzerine Etkileri

Karaciğer tüm organizma için lipit metabolizmasında merkezi rol oynar. Lipit metabolizması sadece karaciğerdeki lipit havuzuna değil tüm organizmadaki lipit havuzuna lipit giriş çıkışını kontrol eden çok karmaşık süreçlerden oluşur. Lipit metabolizması hormonların, nükleer reseptörlerin, hücre içi sinyal yollarının ve transkripsiyon faktörlerinin karmaşık etkileşimleri tarafından kontrol edilir. Lipit metabolizması ekpresyon, ekstrahepatik yollardan kaynak sağlama, oksidasyon ve sekresyon süreçleri ile hepatik lipit havuzunu sabit tutmaya çalışır. Bu süreçlerden herhangi birinde meydana gelen düzensizlik karaciğerde lipit birikimine yol açar. Etanol

lipit metabolizmasının tüm bu süreçlerini bozduğu için son derece toksik özellik gösterir (You ve Arteel 2019).

Alkol tüketimine bağlı olarak karaciğerde ilk meydana gelen ve en yaygın görülen değişiklik steatoz veya yağlı karaciğerdir. Etanol metabolizmasının kendisi direkt olarak steatoza yol açabilmektedir. Biriken lipitlerin kaynağı esas olarak diyetle alınan trigliseroller, yağ dokusu lipitleri gibi ekstrahepatik kaynaklar, karaciğerin kendisi tarafından hepatik katabolizma sonucunda ve glikolitik son ürünlerden sentezlenen lipitlerdir. Yağ birikimi makroveziküler (hepatosit başına bir büyük yağ damlacığının olması ve çekirdeğin yanal yer değiştirmesi) veya mikroveziküler olabilir (hepatosit başına çok sayıda küçük yağ damlası olması) (You ve Arteel 2019).

Etanol oksidasyonuna bağlı olarak meydana gelen lipit metabolizmasındaki bozukluklar çeşitli mekanizmalarla açıklanmaktadır. Etanolün lipit metabolizması üzerindeki en önemli etkilerinden biri yağ asidi oksidasyonunu inhibe etmesidir. Etanol metabolizması esnasında NADH/NAD^+ oranında meydana gelen artış yağ asidi β-oksidasyonunu inhibe eder ve ayrıca serbest yağ asitlerinin sentezini teşvik eder. Etanolün oksidasyonu tarafından oluşturulan H^+ eşdeğerleri sitrik asit döngüsünün NAD^+'a bağımlı basamaklarının inhibisyonuna neden olur ve yağ asidi birikiminin artmasıyla hepatositlerde trigliserit miktarında artış olur (Sun ve Wang 2021; You ve Arteel 2019; Neuberger ve DiMartini 2015, p.57; Agarwal ve Goedde 1990, p.71).

Etanolün lipit metabolizmasına etkilerinden diğeri de serbest yağ asitlerinin karaciğere alınmasında görev alan proteinler üzerindeki değişikliklere sebep olmasıdır. Etanol maruziyeti ekzojen yağ asitlerinin karaciğere alımını ve yağ asitlerinin trigliserit ve total lipite dönüştürülmesini artırır. Etanol CD36/fatty acid (yağ asidi) translokaz (CD36/FAT), yağ asidi taşıma proteini 1(fatty acid transporter protein; FATP1) ve FATP5 gibi karaciğere yağ asidi alımında önemli rol oynayan yağ asidi taşıyıcılarının upregülasyonu ile hepatik yağ asidi alımını artırır. Bunun sonucunda aşırı yağ birikimi ve steatoza neden olur (Hyun ve ark. 2021; You ve Arteel 2019).

Karaciğerde yağ asidi oksidasyonu ve sentezinde çeşitli transkripsiyon faktörleri önemli rol oynar. Etanol bu transkripsiyon faktörlerini etkileyerek karaciğeri yağ oksitleyen organ olmaktan ziyade yağ depolayan bir organa dönüştürür. Etanol ilk olarak SREBP-1 (Steroid düzenleyici element bağlayıcı protein-1-Sterol regulatory element-binding protein) aracılığıyla hepatik trigiliserit sentezinde yer alan lipojenik enzimlerin

genlerini upregüle ederek hepatik lipit sentezini artırır. İkincisi etanol AMPK (Adenozin monofosfat bağımlı protein kinaz) aktivitesini inhibe ederek lipojenik enzimlerin fosforilasyonunun azalması sonucunda aktivitesinin artmasına ve yağ asidi sentezinin artmasına neden olur. Üçüncüsü etanol yağ asidi transport ve oksidasyonunda yer alan proteinlerin transkripsiyonu kontrol eden PPAR-α'yı (Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör-α;Peroxisome proliferator-activated receptor) inhibe ederek karaciğerin yağ asitlerini karaciğerden uzaklaştırabilme ve okside edebilme yeteneğini azaltır (You ve Arteel 2019; Neuberger ve DiMartini 2015, p.57; Crabb ve Liangpunsakul 2006).

Etanol lipitlerin serum veya plazma konsantrasyonlarında, yapısında ve kompozisyonunda değişikliklere neden olur. Etanol yağ asitlerinin metaboliti olan asetatın etkisiyle yağ dokusu lipolizisini azaltır ve bu yüzden plazma serbest yağ asidi konsantrasyonu azalır. Fazla yüksek dozlarda etanol periferal dokulardan yağ mobilizasyonu ve karaciğerdeki yağ asitlerinin yıkımı sonucunda dolaşımdaki serbest yağ asitlerinin artmasına neden olur. Etanolün plazma trigliseriti üzerine etkileri dozuna, kullanma süresine, diyete, kişisel duyarlılığa, hipertrigliseridemiye olan genetik yatkınlığa göre değişir. Etanol trigliserit açısından zengin lipit moleküllerinde artışa neden olurken etanol kullanımının sınırlandırılması trigliserit seviyelerinde azalmaya neden olur. Kronik alkoliklerde muhtemelen β lipoproteinin hepatik sentezinin artmasına ve ATP'nin kullanılabilirliğinin değişmesine bağlı olarak yükselmiş plazma trigliserit seviyeleri gözlemlenmiştir.

Etanole bağlı olarak meydana gelen lipoprotein paternindeki değişiklikler orta ve ağır düzeyde etanol kullanımına göre farklılık gösterir. Serum lipoproteinlerinin artışı ile oluşan hiperlipidemi hepatik lipoprotein üretiminin artışı ve salınımından kaynaklanabilir. Etanolün indüklediği hipertrigliseridemi çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (Very Low-Density Lipoprotein; VLDL), şilomikronların, orta yoğunluklu lipoproteinlerin, bozulmuş lipolizin ve yağ dokusundan karaciğere gelen yağ asitlerinin artmasıyla ilişkilidir. Etanol tek başına plazma LDL kolesterolü düşürürken, plazma yüksek yoğunluklu lipoprotein (High-density lipoprotein; HDL) kolesterolü yükseltir. Normal karaciğer morfolojisi ve fonksiyonu olan alkolik erkeklerde lipoprotein paterni; normal veya subnormal VLDL kolesterol ve artmış HDL kolesterol şeklindedir (Agarwal ve Goedde 1990, p.71). Orta düzeyde etanol kullanımının en belirgin etkisi artmış HDL kolesterol seviyeleridir (Neuberger ve DiMartini 2015, p.71-72). HDL

kolesterolün büyük bir kısmı plazmada lipoprotein lipaz tarafından trigliseritten zengin lipoproteinlerin katabolizmasının bir ürünü olarak üretilir. Kronik alkoliklerde etanol kaynaklı HDL yükselmesinin sebebi lipoprotein lipaz aktivitesinin artmasıdır. Ayrıca etanolle ilişkili HDL lipitlerin artması hepatik lipaz tarafından yıkımının azalmasından da kaynaklanabilir. Etanol kullanımına bağlı olarak MEOS aktivitesinin artması da plazma HDL kolesterol seviyelerinin artmasına katkı sağlayabilir. Epidemiyolojik verilere göre orta düzeyde etanol alımı artmış plazma HDL kolesterol seviyelerine bağlı olarak koroner ateroskleroz derecesini ve miyokard enfarktüsü riskini azaltır. Bu yüzden kronik alkoliklerde artmış HDL ve azalmış LDL seviyeleri koroner kalp hastalıkları açısından bir risk faktörüyken orta düzeyde etanol kullanımı bu risk açısından tartışılabilir bir konudur (Agarwal ve Goedde 1990, p.71).

2.1.4. Etanolün Biyomembranlara Etkisi

Etanol alındıktan sonra suya benzer şekilde birkaç dakika içinde vücuttaki tüm organ ve hücrelerde dağılarak dengeye ulaşır. Etanolün biyomembranlarla etkileşimi sadece hücre membranı düzeyinde değildir. Hücre membranıyla bağlantılı olan hücre içi organellerin membranlarıyla da etkileşime girer. Etanolün membranlara ilk etkisi akışkanlığını artırmaktır. Etanol membrana bağlı proteinlerde konformasyonel değişikliklere yol açarak membranın akışkanlığını değiştirir. Etanolün bu etkileri proteinlerde su dolu boşlukları işgal etmesi ve onların fonksiyonunu değiştirmesi ile açıklanır. Kronik etanol varlığı ise lipit kompozisyonunu değiştirerek membranın yapısında ve fonksiyonlarında adaptif değişikliklere yol açar. Etanol ve diğer alifatik alkoller hücre membranının çift lipit tabakasının hidrofobik bölgesindeki yapısal kısımları etkiler. Etanol Na^+ bağımlı Ca^{+2} kanalları; reseptör-efektör bağlantı mekanizmaları; Ca^{+2}ATPaz ve Na^+-K^+ ATPaz gibi membrana bağlı enzimleri içeren biyokimyasal mekanizmaları ve bu mekanizmaların sayısal olarak miktarını etkileyerek hücre mebranının lipit yapısının bozulmasına sebep olur. Çeşitli çalışmalarda kronik etanol uygulamasından sonra membran lipit yapısının bozulmasından dolayı Na^+-K^+ ATPaz aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir. Etanolün bu akışkanlaştırıcı ya da düzensizleştirici etkisi nöronal membranlarda yoğun araştırma konusu olmuştur (Agarwal ve Goedde 1990, p.100-101).

Son zamanlarda öne sürülen teoriler etanolün membran akışkanlığını ve yapısını değiştirmesinin yanında bazı proteinler üzerindeki spesifik bağlanma bölgelerine

bağlanarak direkt ya da dolaylı olarak biyolojik etkiler oluşturduğunu ifade etmektedir. Etanol çok düşük konsantrasyonlarında bile bazı moleküllerin etanole duyarlı bağlanma bölgelerine bağlanır. Bunun en güzel örneği sadece beyne spesifik olmasa bile ADH'dır. Etanol mM'lık konsantrasyonlarda bile ADH'a bağlanarak biyolojik etkilere sebep olabilir (Abrahao ve ark. 2017).

2.1.5. Etanolün Merkezi Sinir Sistemi Üzerindeki Morfolojik Etkileri

Aşırı etanol maruziyeti anatomik olarak beyin hacminde azalmaya ve ventriküller ile sulkuslarda genişlemeye neden olarak atrofiye neden olmaktadır. Etanol tüketimi merkezi sinir sisteminde birçok bölgeyi etkilemekle birlikte özellikle etanole karşı daha hassas olan prefrontal korteks (PFC), hipotalamus ve serebellum gibi bölgelerde yapısal değişikliklere neden olmaktadır. Kronik etanol tüketiminin nöronal yoğunlukta %20 azalmaya neden olduğu tahmin edilmektedir (Neuberger ve DiMartini 2015, p.66). Aşırı etanol tüketimi parankimal hacimde, özellikle de sağ orta ve presentral girusta ve bilateral süperior frontal girusta gri madde ve beyaz madde oranını değiştirir. Yapılan çalışmalarda aşırı alkol tüketen adolesanlarda hipokampüs, PFC ve serebellum gri madde hacimlerinde azalma tespit edilmiştir (Jacobus ve Tapert 2013). Ayrıca beynin emosyonel ve davranışsal regülasyondan sorumlu kısımlarında anormal değişiklikler gözlemlenmiştir. Örneğin aşırı alkol tüketen bir kişide ventromediyal PFC hacminde azalma ve ödül beklerken veya ödülü alırken ventromediyal PFC'nin aktivitesinde azalma olmuştur (Waszkiewicz ve ark. 2018). Beyaz madde kortikal bölgelerin hızlı bir şekilde iletişim kurmasına ve bilgiyi etkili bir şekilde işlemlemesine olanak sağlar. Alkol kullanım bozukluğu olan ergenlerin tüm beyaz madde hacmi, özellikle de PFC'deki beyaz madde hacmi alkol kullanmayanlara göre daha küçüktür (De Bellis 2005).

Kortikal incelme ergen beyninde gelişimin ayırt edici bir özelliğidir ve kortikal kalınlığın azalması zayıf olan sinaptik bağlantıların ortadan kaldırılmasıyla ilişkilidir. Squeglia ve ark. (2012) tarafından yürütülen bir araştırmada 16 ile 19 yaş arası ergenlerde belirli aralıklarla aşırı alkol tüketiminin dört sol frontal bölgede kortikal kalınlığa etkisi incelenmiştir. Alkol tüketmeyenlere göre alkol tüketen kadınlarda kortikal kalınlığın daha fazla olduğunu, alkol tüketen erkeklerde ise daha az olduğunu bulmuşlardır. Kadın alkoliklerin sol kortikal kalınlığın daha fazla olması görsel-uzamsal performanslarının, inhibisyon performanslarının ve dikkat performanlarının daha zayıf olmasına karşılık gelmektedir.

2.1.5.1. Etanolün İyon Kanallarına Etkileri

Etanol merkezi sinir sisteminde bulunan nöronlarda ve sinapslarda çok sayıda moleküler hedefe etki eder. Etanol transmembran ve hücre dışı protein yapıları boyunca birkaç bölgeye bağlanır ve ligand kapılı kanal alt birimlerinde farklı allosterik değişikliklere neden olur. Böylece iyon kanalı aktivitesini kolaylaştırır veya inhibe eder (Eşel ve Dinç 2017; Olsen ve ark. 2014).

Etanol G protein kapılı içe doğrultucu K^+ kanallarının (GIRK) fonksiyonunu artırır. Bu kanallar aksiyon potansiyelinin son kısımlarında hücre içine K^+ girişine neden olarak membranın dinlenim zar potansiyeline daha çabuk dönmesine neden olarak repolarizasyonu hızlandırır (Akyüz ve Tiber 2017). GIRK kanalları beynin ödül devresindeki nöronal uyarılabilirliği kontrol eder.

Etanol Ca^{+2}'la aktive edilen iletkenliği büyük K^+ kanallarının (BK kanalları) fonksiyonunu artırır (Abrahao ve ark.2017). BK kanalları, merkezi sinir sisteminde nöronların plazma zarında bulunan aksiyon potansiyellerinin şeklini, sıklığını, yayılmasını ve presinaptik terminallerden nörotransmitter salınımını etkiler. Nöronların nükleer zarfında bulunan BK kanalları gen transkripsiyonunu ve nöronal morfolojiyi de doğrudan etkileyebilir (Contet ve ark. 2016). Genel olarak presinaptik BK kanalları aksiyon potansiyeli ile uyarılan depolarizasyona ve Ca^{+2} kanallarından hücre içine Ca^{+2} girişine yanıt olarak açılır. BK kanallarının açılması hücre dışına büyük bir K^+ iyon akışına yol açar. BK kanallarının açılması sonucunda negatif feedback mekanizması ile voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları inhibe olur. Böylece BK kanalları hücre membranın hiperpolarizasyonuna neden olarak nörotransmiter salınımının negatif düzenleyicileri olarak davranır (Wang, Jaffe ve ark. 2014).

2.1.5.2. Etanolün Nörotransmitterler Üzerine Etkileri

Etanol birçok nörotransmitter sistemleri arasındaki etkileşimi değiştirir. Etanol keyif verici ve pozitif pekiştirici etkiler gibi akut etkilerinin yanısıra uzun süreli kullanıldığında kalıcı nöroadaptasyonlar oluşturarak bağımlılık, tolerans ve yoksunluk belirtileri gibi kronik etkilere de yol açar (Eşel ve Dinç 2017).

2.1.5.2.1. Akut Etkiler

Akut etkiler önce uyarıcı ardından baskılayıcı yönde etki gösteren davranış değişikliklerinden oluşur. Beyindeki etanol konsantrasyonu 5-10 mM'a ulaştığı zaman (~ 3 içki) başlangıçta ruhsal anlamda kendini iyi hissetme, konuşkanlık, sosyalleşmede

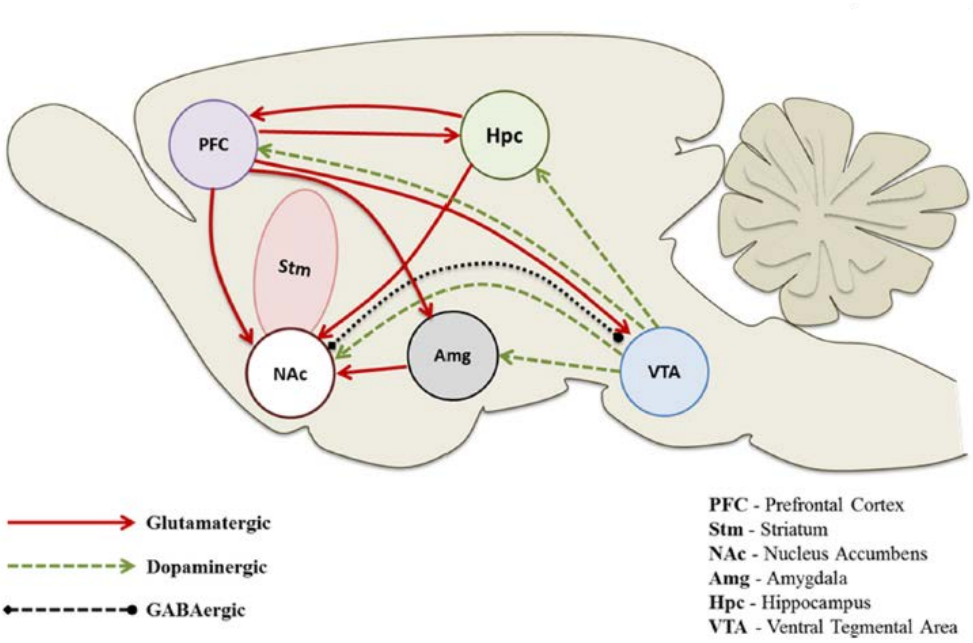
artma, utangaçlığın ortadan kalkması, sonrasında ise dikkatte azalma, karar verme becerisinde bozulma, hafızada değişiklikler, motor hareket ve koordinasyonda bozulma, duygu durum değişiklikleri ve sedasyon görülür (Abrahao ve ark. 2017). Akut etanol zehirlenmesinin erken belirtileri bulantı ve kusmadır. Ayrıca kişide ertesi gün uyandığı zaman yorgunluk, halsizlik, susuzluk, baş ağrısı ve kas ağrıları, bulantı, karın ağrısı, uyku bozuklukları, baş dönmesi, ışığa ve sese duyarlılık, dikkat ve konsantrasyon bozuklukları, kendini kötü hissetme, kaygı, sinirlilik, titreme, terleme, kan basıncında ve kalp atım hızında artış gibi etkiler görülür. Bu semptomların sebepleri etanolün antidiüretik hormonu inhibe etmesiyle ortaya çıkan dehidratasyona, elektrolit dengesizliğine, gastrointestinal sistem rahatsızlıklarına, hipoglisemiye, uyku ve biyolojik ritminin bozulmasına yol açmasına ve asealdehit, ROS gibi etanol metabolizmasının yan ürünlerini artırmasına bağlıdır (Waszkiewicz ve ark. 2018). Çok yüksek dozlarda alkol ise kişide bilinç kaybına (anestezik işlev görür) neden olur (Wallner ve Olsen 2008). İnsanda öldürücü kan etanol konsantrasyonu %0,5-0,22 w/v (50-110 mM) arasında değişir ve yaklaşık olarak 80 mM'dır (Olsen ve ark. 2007).

Etanol eksitatör ve inhibitör sinaptik iletide rol alan nörotransmitterlerin fonksiyonlarında değişiklik yaparak hızlı akut etkilere neden olur (Soderpalm ve ark. 2017). Özellikle de primer inhibe edici nörotransmitter olan GABA ve temel uyarıcı nörotransmitter olan glutamat arasındaki dengeyi bozarak beyin fonksiyonlarını etkiler. Etanolün akut etkilerine GABA-A reseptör inhibisyonunda belirgin artış ve glutamaterjik eksitasyonda azalma eşlik eder (Dahchour ve Witte 2000; Olsen ve Liang 2017). Etanol ayrıca nikotinik asetilkolin reseptörlerinin spesifik bir alt biriminin işlevini düzenler ve serotonin reseptörlerini güçlendirir (Abrahao ve ark. 2017).

Akut etanol serebellum, hipokampüs, bazolateral amigdala ve talamus gibi çeşitli beyin bölgelerindeki sinapslarda GABAerjik iletimi artırır. Etanol hem $GABA_A$ reseptörlerine direkt bağlanarak hem de GABA salınımını artırarak baskılanmış davranış etkilerine neden olur (Söderpalm ve ark. 2017).

Akut etanol genel olarak hipokampüste, frontal kortekste, santral amigdalada ve birçok beyin bölgesinde bulunan tüm glutamat reseptörlerini inhibe eder. Bazolateral amigdalada glutamatın kainat reseptörlerinin etanolle inhibisyonu bir miktar içkiden sonra kaygının hafiflemesini açıklar (Möykkynen ve Korpi 2012; Badanich ve ark. 2013).

Etanol ventral tegmental alandan (VTA) başlayan ve nukleus akümbens (NAc), PFC ve amigdalaya projekte olan mezokortikolimbik yolun dopaminerjik nöronlarını uyararak ödüllendirici etkiler yapar. Mezokortikolimbik beyin bölgeleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Alasmari ve ark. 2018). Akut alkol maruziyetini takiben VTA'daki dopaminerjik nöronal ateşlemede artış meydana gelir. Eşzamanlı olarak NAc'e projekte olan yoldaki dopamin salınımında da artış olmaktadır. NAc dopamin salınımındaki artış aracılığıyla alkole başlamadaki ilk olumlu pekiştirici etkilere neden olur (Alasmari ve ark. 2018; Bassareo ve ark 2017).



Şekil 2-2 : Mezokortikolimbik Yol-Alasmari ve ark. (2006)'dan

Ayrıca etanol maruziyetine bağlı olarak opioidler, GABA, kolinerjik ve serotonerjik ileti de VTA'daki dopamin nöronların uyarılmasını etkiler. Etanol fizyolojik olarak glutamat, GABA, asetilkolin ve serotonin iyonotrofik reseptörlerini etkileyerek dopaminerjik nöronların aktivitesini artırır ve hedef bölgelerde dopamin seviyesini artırır (Abrahao ve ark. 2017).

Etanol farklı beyin bölgelerinde glisin reseptörlerinin aktivasyonunu güçlendirmektedir. Bu bölgelerden en önemlisi PFC'tir. PFC'nin içerisinde yer alan orbitofrontal korteks duysal ve limbik girdilerin entegre edilerek uygun davranışın

seçimi, beklentilerin veya tahminlerin gelişimi dahil öğrenmenin farklı yönlerine aracılık eder (Mayfield ve ark. 2016).

2.1.5.2.2. Kronik Etkiler

Kronik etanol maruziyeti beyinde kısa süreli ve uzun süreli çeşitli nöroadaptasyonların oluşumuna neden olur. Kronik etkiler daha fazla miktarda alkol kullanımı, alkole karşı tolerans, ısrarlı bir şekilde alkol arayışı ve bağımlılık gibi davranışlara neden olur (Abrahao ve ark. 2017).

Kronik etanol kullanımında ve etanolün bırakılması durumunda dopamin nöronlarının ateşleme hızı değişkendir. NAc ve VTA opioid peptitler ve reseptörleri açısından zengindir. Kronik etanol maruziyetinde opioid peptitlerinin salınımındaki artış dopamin salınımınında artışa yol açar (Gonzales ve Weiss 1998).

Kronik etanol maruziyeti beynin çeşitli bölgelerinde GABAerjik iletimde hem artışa hem de azalışa neden olur. Örneğin uzun süreli aralıklı etanol maruziyeti GABAerjik sinaptik iletimde azalmaya yol açarken (Cuzon Carlson ve ark, 2011), santral amigdalada akut ve kronik etanol maruziyeti GABAerjik iletimde artışa neden olmaktadır (Roberto ve ark 2004).

Kronik etanol maruziyeti NMDA, α-Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA), kainat ve metabotrofik glutamat reseptörlerini etkiler. Kronik etanol maruziyetinde özellikle NMDA reseptörlerinin aracılık ettiği fonksiyonlarda kompansatuvar upregülasyon meydana gelir. Kronik etanol maruziyeti beynin çeşitli bölgelerinde glutamat seviyelerini yükseltir ve hiperglutaminerjik bir duruma yol açar (Eşel ve Dinç 2017). Artan glutaminerjik dürtü etanolle ilişkili tolerans, bağımlılık, alkolden uzak durma, etanole özlem duyma ve tekrar alkol kullanmaya başlama gibi davranışlara neden olur (Chater ve Goda 2014; Chandrasekar 2013). Uzun süreli etanol AMPA reseptörlerinde de upregülasyona neden olur.

Etanol uzun süreli depresyonu (long-term depresyon; LTD) ve uzun süreli potensiyasyonu (long-term potensiasyon; LTP) içeren sinaptik plastisiteyi etkileyerek öğrenme ve hafızayı değiştirir (Pervin ve Stephen 2021). Etanolün sinaptik plastisite üzerine etkileri ile ilgili veriler daha çok hipokampüs üzerinedir. Akut etanol NMDA reseptörlerinin inhibisyonuna bağlı olarak hipokampüste LTP'yi inhibe ederken hipokampüsün CA1 bölgesindeki LTD'yi güçlendirir. Kronik etanol maruziyeti, LTP'yi geri dönüşümlü olarak inhibe eder ve hipokampal nöronlarda LTD'yi azaltır. LTP ve

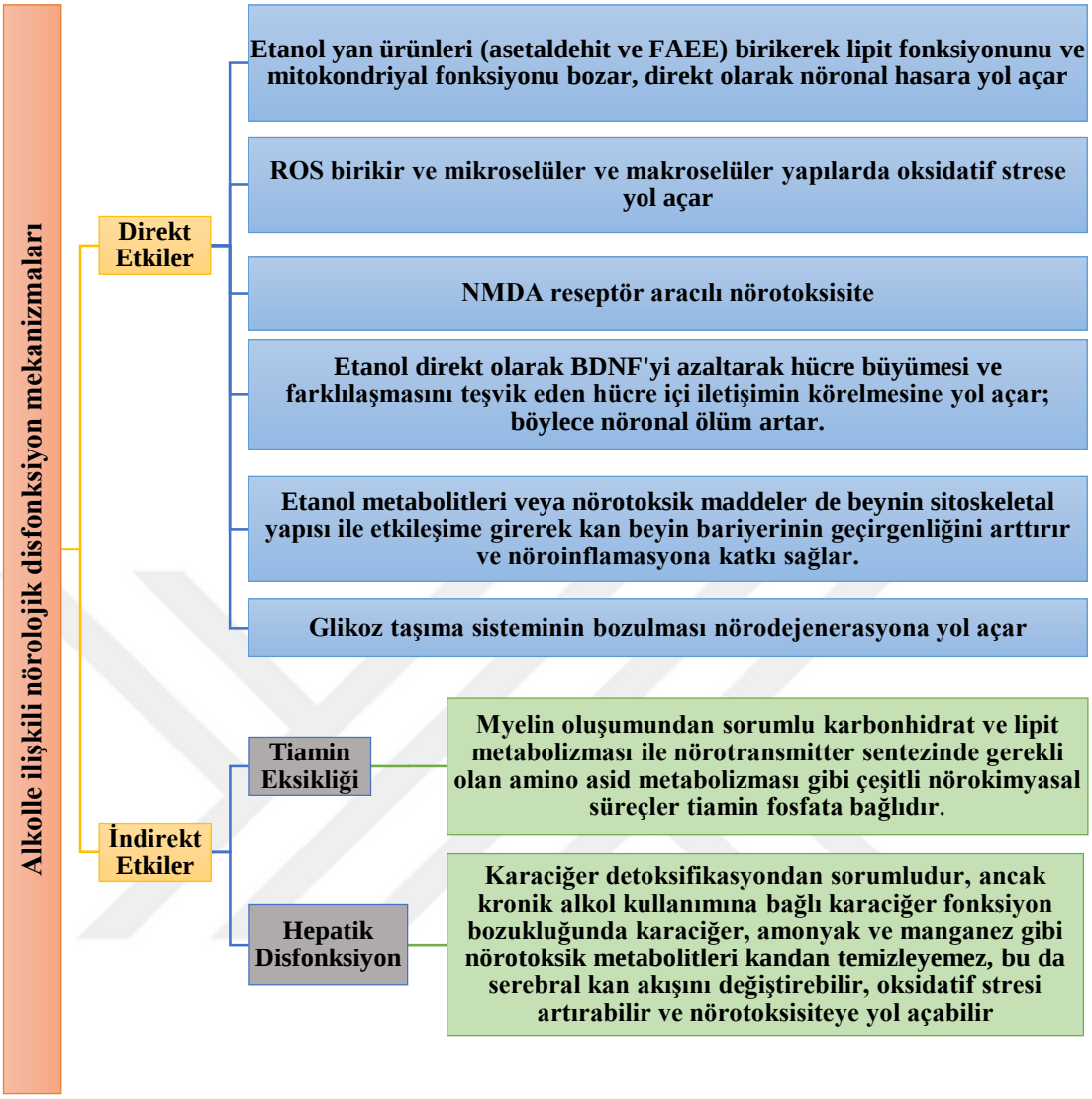
LTD üzerindeki bu etkiler glutamatın NMDA ve mGluR5 (Metabotrofik glutamat reseptörü 5) ile ilişkilidir (Abrahao ve ark. 2017; Silvestre de Ferron ve ark. 2015).

2.1.5.3. Etanolün Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Patofizyolojik Etkileri

Etanolün patofizyolojik etkileri tüketilen alkol miktarı, alkole başlama yaşı, alkolün kullanım süresi, ağır alkol kullanımı ve metabolik faktörlere bağlı olarak değişir. Etanol anormal protein birikimini, lizozomal disfonksiyonu ve DNA hasarını tetikleyerek nörodejenerasyona yol açar ve beynin yaşlanma sürecini hızlandırır. Uzun süreli alkol kullanımı direkt toksik etkilere yol açabileceği gibi indirekt olarak da beslenme eksiklikleri veya hepatik disfonksiyona yol açarak nöronal hasara neden olabilir (Pervin ve Stephen 2021; Hammoud ve Jimenez-Shahed 2019). Alkolle ilgili nörolojik disfonksiyon mekanizmaları Şekil 2-3'te ifade edilmiştir (Hammoud ve Jimenez-Shahed 2019).

Aşırı etanol maruziyetinin merkezi sinir sisteminde oluşturduğu disfonksiyonun sebeplerinden en önemlisi etanol ve onun metabolitlerinin (asetaldehit, ROS gibi) beynin metabolizmasına; membranların yapısına ve elektriksel özelliklerine; mikroglia hücrelerinin sayısı ve aktivasyonuna; lipopolisakkaritlerin immunojenitesi üzerine doğrudan etkileridir. Hem akut hem de kronik etanol maruziyetine bağlı olarak ROS'un artması mitokondriyal lipitlerin peroksidasyonunu, proteinlerin fosforilasyonunu artırabilir, bu da fosfolipit içeren hücre zarı yapısını bozarak ATP üretiminin azalmasına neden olur.

Etanol metabolizması 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi lipit peroksidasyon ürünlerinin artmasına neden olur ve sonuç olarak nöronal iskeleti oluşturan proteinler azalır. Nörona özgü nörofilamentlerin bozulması ve bunun sonucunda meydana gelen nöronal ölüm etanolle ilişkili nörodejenerasyonun ana süreçlerini başlatır. (Pervin ve Stephen 2021).



Şekil 2-3: Etanolle İlişkili Nörolojik Disfonksiyon Mekanizmaları-Pervin ve Stephen 2021; Hammoud ve Jimenez-Shahed (2019)'den

Etanol nöroglialarda stres-yanıt proteinlerinin üretimine yol açan endoplazmik retikulum stresine neden olur ve bunun sonucunda hücre ölümüne neden olan proteinlerin anormal bir şekilde fosforilasyonu başlar (Hammoud ve Jimenez-Shahed 2019). Aşırı etanol maruziyeti glutaminin, opioid sistemin, asetilkolinin ve endokannaboid mekanizma aracılığıyla dopaminin de nörotransmisyonunu etkiler. Aşırı etanol maruziyeti büyük olasılıkla serotonin ve GABA yolu anormalliklerine neden olur. Bu bozulmuş nörotransmisyon korteks, serebellum ve beyin sapındaki protein sentezinde seçici bir azalmanın olduğu anormal protein sentezine yol açar. Ayrıca etanol Nükleer Faktör Kappa B (NFKB), Cyclic AMP-Response Element Binding Protein (CREB) gibi

nörotransmitterlerinin oluşumunu regüle eden proteinleri etkiler (Waszkiewicz ve ark. 2018). Etanol ilgili DNA problarına NFKB bağlanmasını arttırarak inflamatuar süreçleri tetiklerken diğer taraftan ilgili DNA problarına CREB bağlanmasını azaltarak nöronal apopitozu artırır (Crews ve Vetreno 2014).

Glutamat hücre dışı sıvıya aşırı miktarda salındığında nöronal hasardan sorumlu olabilir ve birçok nörolojik hastalıkta, beyin iskemisini takip eden patofizyolojik olaylar zincirinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Çeşitli sebeplere bağlı olarak ekstraselüler glutamat seviyesi yükseldiği zaman NMDA reseptörleri aşırı bir şekilde stimüle edilerek hücresel dejenerasyona neden olur. Ca^{+2} kanalı olan NMDA reseptörlerinin aşırı stimüle edilmesi sitozolik Ca^{+2} miktarını artırır. Hücre içi Ca^{+2}'un yükselmesi nöropatolojik olayların ortaya çıkmasını veya onunla ilişkili olan proteaz, nükleaz ve fosfolipaz aktivitelerinin artmasını; O_2 ve nitrojen içeren serbest radikallerin oluşumunu; membran lipit peroksidasyonunu ve antioksidan savunmanın azalmasını tetikler (Collins ve Neafsey 2016). Ayrıca etanolün NMDA reseptörünü inhibe ederek glutamat eksitoksitesini bloke ettiğine dair bilgiler de mevcuttur (Crews ve Vetreno 2014). Bu nedenle, alkol kulllanım bozukluğu olan hastalarda nörodejenerasyon mekanizmasında NMDA reseptörünün rolünü belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Beyin homeostazisini düzenlemek ve sürdürmek nöron ve miyelin rejenerasyonu gibi önemli süreçlere bağlıdır. Bu süreçlerin devamı ise sinir büyüme faktörü (Nerve Growth Factor; NGF) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain derived neurotrophic factor; BDNF) gibi büyüme faktörlerini gerektirir. Alkol kullanım bozukluğunda asetaldehit ve ROS gibi etanol metabolitleri bu büyüme faktörlerinin homeostazisini olumsuz yönde etkileyerek nörodejenerasyona ve nöronal hasara yol açar (Pervin ve Stephen 2021).

Kronik alkol kullanım bozukluğu olan kişilerde etanol metabolitlerine bağlı olarak kan beyin bariyeri disfonksiyonu ile ilişkili nörobilişsel ve nörovasküler hasar görülmektedir. Kronik etanol maruziyeti etanolün difüzyonunu arttıracak şekilde kan beyin bariyerini değiştirir. Karaciğerde etanolün metabolizması sonucunda oluşan etanol metabolitleri dolaşım yoluyla beyne gelir, endotel hücrelerine girer ve kan beyin bariyerini oluşturan beynin mikrovasküler endotel hücrelerine yapışan trombosit endotel yapışma molekülü 1'in ekspresyonunu artırır. Böylece inflamatuar ürünlerin ve

lökositlerin geçişi kolaylaşır. Ağır etanol maruziyeti daha çok interlökin (IL) 1β, IL6, interferon gama (INF-γ) ve tümör nekroz faktör (TNF)-α ile oluşturulan nöroinflamasyona yol açar. Ayrıca etanol metabolitleri veya nörotoksik maddeler beynin sitoskeletal yapısı ile etkileşime girer ve kan beyin bariyerinin geçirgenliğini arttırır ve nöroinflamasyona katkı sağlar. Kronik aşırı alkol maruziyeti, kan beyin bariyerinin bütünlüğünün korunmasından sorumlu olan klaudin, okludin, zonula okludens gibi sıkı bağlantı proteinlerinin downregülasyonuna neden olur. Ayrıca etanol metabolizması sonucu artan ROS beynin endotelyal hücrelerinde vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) ve hücreler arası adezyon molekülü 1 (İntercellular Adhesion Molecule-1; ICAM-1), E-selektin, IL6 gibi inflamatuar sitokinlerin salınımını uyarmak için Rho kinaz (ROCK/JNK) sinyalini aktive eder. Bunun sonucunda nöroinflamasyonun yayılması kolaylaşır. Mikroglialar etanol maruziyeti esnasında merkezi sinir sisteminde homestazisi yeniden sağlamaya çalışırken bazı mikrogial genlerin transkripsiyonunda değişiklikler meydana gelir. Proinflamatuar belirteçlerden olan TNF-α mikroglialardan salınır ve apopitotik hücre ölümünde önemli rol oynar. TNF-α aynı zamanda nörodejeneratif durumlardan sorumlu patofizyolojik değişikliklere neden olur (Pervin ve Stephen 2021; Hammoud ve Jimenez-Shahed 2019).

Ayrıca kan beyin bariyerinin disfonksiyonun bir sonucu olarak aquaporin (AQP) kanallarının anormal ekspresyonu meydana gelir bu da beyin dokusunda ödeme neden olur. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda ROS ile indüklenen kan beyin bariyeri disfonksiyonunda su kanalı AQP4'ün anormal ekspresyonu arasındaki ilişki olduğu bulunmuştur (Tajuddin ve ark. 2014; Katada ve ark. 2012). AQP4 miyelinli liflerin yanısıra esas olarak astrositlerde ve ependimal hücrelerde bulunur (Lui ve ark. 2017; Katada 2012). AQP4 hücre dışına hızlı su transferi karşılığında belirli beyin bölgelerini aktive etmek için hücre içine fazla K^+ alarak astrositlerin iyon konsantrasyonunu korumasına yardımcı olur. Alkole bağlı oksidatif yanıt AQP4 aktivitesine müdahale eder ve beyaz cevher yollarında (korpus kallozum, optik kiazma, hipokampus, hipotalamik çekirdekler) perinodal astrositlerin ranvier düğümlerindeki hücre içi bağlantıları düzenlemede başarısız olduğu yerlerde ekstraselüler aralıkta ödeme neden olur (Katada 2012). Beyin ödemi merkezi sinir sisteminde felç, enfeksiyon ve demiyelinizan hastalıklar gibi çok çeşitli bozukluklarının patogenezinde önemli rol oynar (Pervin ve Stephen 2021).

Etanol kaynaklı nörodejenerasyonun altında yatan sebeplerden birisi de kronik alkol tüketimine bağlı olarak gelişen esansiyel besin maddesi olan B1 vitaminin (tiamin) eksikliğidir. Kronik alkol tüketen kişiler genellikle besinlerle alması gereken kalorinin çoğunu alkolden sağladıkları için yetersiz beslenmektedir ve buna bağlı olarak tiamin eksikliği meydana gelmektedir (Pervin ve Stephen 2021). Ayrıca etanol gastrointestinal sistemde tiamin taşıyıcı molekülün fosforilasyonunda görev alan tiamin difosfokinaz enziminin aktivitesini azaltarak tiamin emilimini azaltır. Nörotransmiterlerin sentezi; hücrelerin genetik materyalini oluşturan nükleik asitlerin üretimi; yağ asitleri, steroidler ve bazı karmaşık şeker moleküllerinin üretimi dahil olmak üzere vücuttaki birçok kritik biyokimyasal reaksiyon için tiamin kullanan enzimlerin düzgün çalışması gereklidir. Ayrıca tiamin kullanan enzimlerin yetersiz çalışması ROS'un neden olduğu oksidatif strese karşı vücudun savunmasını etkileyebilir. Tiamin eksikliği sinir sisteminde çeşitli mekanizmalarla mitokondriyal hasar oluşmasına ve bunun sonucunda nekroz yoluyla hücre ölümüne neden olabilir. Ayrıca karbonhidrat metabolizmasında görev alan ve kofaktör olarak tiamin kullanan bazı α ketoglutarat dehidrogenaz gibi enzimlerin yetersiz aktivitesi mitokondriyal hasara ve hücre ölümüne neden olur. Bazı hücre tiplerinde tiamin eksikliği ile ilişkili rahatsızlıklar organizmadan hasarlı hücreleri uzaklaştırmaya hizmet eden apopitoza yol açar (Martın ve ark. 2003).

2.1.5.4. Etanolün Oksidatif Stres Yoluyla Nörodejenerasyona Etkileri

Merkezi sinir sistemi normal fonksiyonunun devamlılığı için dakikada $4x10^{12}$ adet ATP molekülüne ihtiyaç duyar. Bunu sağlamak için solunan havayla alınan O_2'nin %20'sini tüketir. Tüketilen O_2'nin %5'lik kısmı ROS'un oluşumunda kullanılır. Toplam vücut ağırlığının %2'sini oluşturmasına rağmen diğer organlara kıyasla beynin tükettiği O_2 miktarı ve oluşturduğu ROS miktarı daha fazladır (Armstrong ve Stratton 2016 p. 23).

ROS'un miktarına bağlı olarak merkezi sinir sistemine hem faydalı hem de zararlı etkileri vardır. Beyin dokusunda ROS mikroglialar ve astrositler tarafından üretilir, nöronlar ve glial hücreler arasındaki sinaptik ve sinaptik olmayan iletişimi düzenler. ROS miyelin proteinine etki ederek nöronal aktiviteyi artırır. Böylece nöronal iletişim ve sinaptik LTP'yi etkiler. Ayrıca ROS gıda alımının santral kontrolü ve hipotalamik ozmoregülasyonda da gereklidir (Armstrong ve Stratton 2016 p. 24).

Etanol metabolizmasının her adımında ROS'un üretildiği ve bunların antioksidanlar tarafından uzaklaştırıldığı bilinmektedir. Beyinde serbest radikallerin

oluşumuna karşılık antioksidan sistemlerin doğru bir şekilde çalışması esastır. Beynin korteks, serebellum, hipotalamus, striatum, medulla spinalis ve diğer bölgelerinde bulunan glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), peroksiredoksin gibi antioksidan enzimlerin aktivitesi sonucunda biriken ROS miktarı azaltılarak oksidatif bir denge oluşturulur.

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) açısından zengin bir yapıdan oluşan nöronal membranlara sahip olan ve yüksek konsantrasyonda prooksidan olarak hareket edebilen demir bulunduran beyin dokusu ROS'a karşı oldukça savunmasızdır (Armstrong ve Stratton 2016 p. 24). Oksidatif denge ROS lehine bozulduğu zaman tek başına proteinler, lipitler ve DNA değil tüm hücreyi de etkileyen oksidatif stres gelişir ve nörotoksisite ya da nörodejenerasyon meydana gelir (Hernandez ve ark. 2016). ROS özellikle lipit peroksidasyonu sonucunda daha zararlı yan ürünler olan ve nöranal apopitoza yol açan aldehitlerin oluşumuna ve DNA hasarına yol açan DNA fragmantasyonuna neden olur.

Nöronal ateşleme mitokondriyal fonksiyonların normal bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. ROS beyin aktivitesi için temel enerji kaynağı olan mitokondriyi hedef alır. ROS'un artması mitokondriyal membranın geçirgenliğinin artmasına ve sonucunda mitokondriye Ca^{+2} girişi ve ardından daha fazla K^{+} akışına neden olan kaskadı başlatır. Bütün bunların sonucunda osmolarite artışı nedeniyle mitokondriye su girmeye başlar ve biyoenerjetik nöral doku yetersizliği oluşur. Mitokondri apopitoza yol açması sebebiyle oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Programlanmış nöronal hücre ölümü (nöronal apopitoz), vücuttaki diğer hücrelerde olduğu gibi aktif olarak düzenlenmiş bir hücre ölümü mekanizmasıdır ve normal doku büyümesinin korunmasında önemli bir rol oynar (Armstrong ve Stratton 2016 p. 24).

2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller olarak adlandırılan atom ya da atom grupları son yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içerirler. Eşleşmemiş elektron bir atomik ya da moleküler orbitalde tek başına bulunur. Bu yüzden eşleşmemiş elektronlar atom ya da molekülün kimyasal reaktivitesini artırır. Serbest radikaller son derece kararsız bir yapıya ve yüksek reaktiviteye sahiptirler.

Serbest radikaller; ROS, reaktif nitrojen türleri (RNS), karbon ve sülfür merkezli radikallerden oluşur (Burton ve Jauniaux 2011; Wu ve ark. 2013).

Serbest radikaller çeşitli şekillerde oluşturulabilir (Cheeseman ve Slater 1993; Gadoht ve Göbel 2011 p. 2; Halliwell ve Gutteridge 2015 p. 21) :

1. Bir molekülün kovalent bağının Denklem 2.1'de gösterildiği gibi homolitik olarak ayrılmasıyla oluşabilir. Ayrılan her bir parçada eşleşmiş elektronlardan bir tanesi kalır. Böylece oluşan her parça eşleşmemiş elektrona sahip olur.

$$A{:}\,B \rightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot} \qquad (2\text{-}1)$$

2. Radikal olmayan bir atom ya da molekül Denklem 2.2'de gösterildiği gibi tek bir elektron kaybederek ve pozitif bir yükle yüklenerek eşleşmemiş bir elektrona sahip olur.

$$A \rightarrow e^{-} + A^{\cdot +} \text{ (radikal katyon)} \qquad (2\text{-}2)$$

3. Radikal olmayan bir atom ya da molekül Denklem 2.3'de gösterildiği gibi tek bir elektron kazanarak ve negatif bir yükle yüklenerek eşleşmemiş bir elektrona sahip olur.

$$B + e^{-} \rightarrow B^{\cdot -} \text{ (radikal anyon)} \qquad (2\text{-}3)$$

Serbest radikaller radikal olmayan moleküllerle reaksiyona girdikleri zaman yeni bir radikal oluşabilir ve zincir reaksiyonlar meydana gelebilir (Halliwell ve Gutteridge 2015 p. 30) :

1. Herhangi bir radikal Denklem 2.4'de gösterildiği gibi indirgeyici olabilir ve eşleşmemiş elektronunu radikal olmayan başka bir moleküle verebilir.

$$A^{\cdot} + B \rightarrow A^{+} + B^{\cdot -} \qquad (2\text{-}4)$$

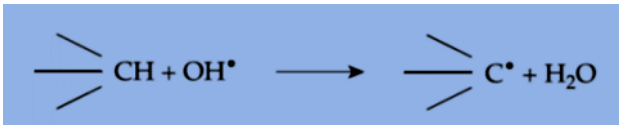
2. Herhangi bir radikal Denklem 2.5'de gösterildiği gibi oksitleyici olabilir ve kendisindeki elektronu eşleştirmek için radikal olmayan başka bir molekülden elektron koparabilir.

$$A^{\cdot} + B \rightarrow A^{-} + B^{\cdot +} \quad (2\text{-}5)$$

3. Herhangi bir radikal Denklem 2.6'de gösterildiği gibi başka bir moleküle eklenebilir ve eklenti hala eşleşmemiş elektrona sahip olarak kalır. Örneğin $OH^{\cdot}$ DNA'daki guaninin halka yapısında 8 pozisyonuna eklenir.

$$A^{\cdot} + B \rightarrow [A - B]^{\cdot} \quad (2\text{-}6)$$

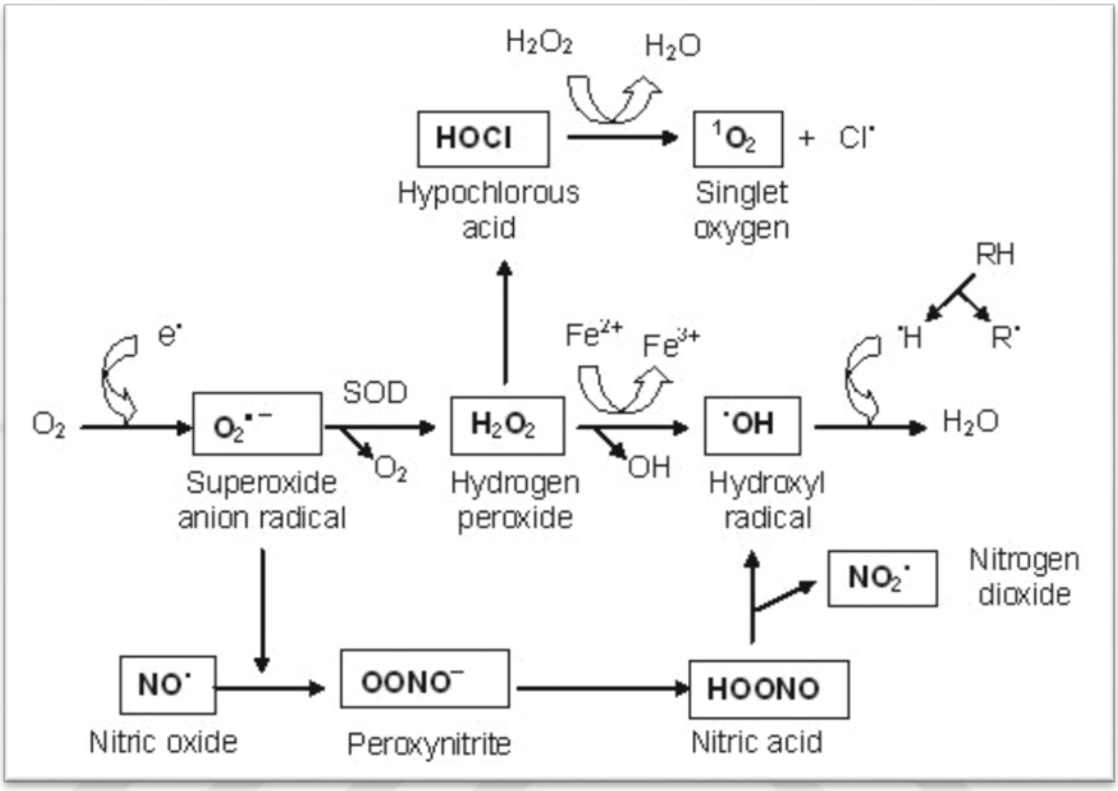
4. Herhangi bir radikal C-H veya N-H bağından bir hidrojen atomunu uzaklaştırabilir ve eşleşmemiş elektron C ya da N atomunda kalır. Halliwell ve Gutteridge (2015) Şekil 2-4'de ifade ettiği gibi $OH^{\cdot}$'ın yağ asidi rezidülerindeki hidrokarbon yan zincirinden hidrojen atomunu uzaklaştırması bu reaksiyona örnek olarak gösterilebilir.



Şekil 2-4: $OH^{\cdot}$ ın Yağ Asidi Rezidülerindeki Hidrokarbon Yan Zincirinden Hidrojen Atomunu Uzaklaştırması-Halliwell ve Gutteridge'dan (p.30 2015).

2.2.1. ROS

ROS $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$ $ROO^{\cdot}$, hidroperoksil ($HO_2^{\cdot}$) gibi oksijen radikalleri ve H_2O_2, hipokloröz asit (HOCl), O_3 gibi kolayca radikallere dönüşebilen radikal olmayan okside edici moleküllerin hepsini içine alan bir terimdir (Seymen ve ark. 1997; Seven ve ark. 1996; Bayır 2005). ROS türleri ve birbirleri arasındaki etkileşimler Şekil 2-5'de özetlenmiştir (Durackova 2014).



Şekil 2-5: ROS ve Reaktif Metabolitleri Arasındaki Karşılıklı İlişkiler-Durackova'dan (2014)

Normal hücresel metabolik süreçlerin bir parçası olarak aerobik organizmalar enzimatik veya enzimatik olmayan kimyasal işlemler yoluyla ROS gibi endojen serbest radikaller üretir. "Oksijen paradoksu" aerobik organizmaların hayatta kalmak için O_2'e ihtiyaç duyması, ancak O_2'nin de serbest radikal oluşumu ve oksidatif stres ile ilişkisi nedeniyle bu organizmalar için doğası gereği toksik olması gerçeğiyle tanımlanır. ROS'un uygun seviyelerde olduğu dengeli bir redüksiyon-oksidasyon (redox) durumu hücreyi enfeksiyonlardan koruma, kardiyak ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi, intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun düzenlenmesi, protein fosforilasyonu ve/veya defosforilasyonu, transkripsiyon faktör aktivasyonu gibi fizyolojik işlevler için gereklidir. Vücudun antioksidan mekanizmasının optimal olarak çalışmadığı durumlarda biriken aşırı miktarda ROS lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküllere doğrudan zarar verebilir veya dolaylı olarak ikincil

bir oksidatif yanıtı tetikleyen inflamatuar mediatörlerin etkin hale getirilmesiyle zararlı etkilere neden olabilir (Laher 2014 p.66; Dasgupta ve Klein 2014 p.1).

2.2.1.1. Oksijen Molekülü (O_2, Üçlü Oksijen, Dioksijen)

Dioksijen moleküler yörüngesinde eşleşmemiş iki elektrona sahiptir ve çift radikal özelliği nedeniyle birçok kimyasal reaksiyonda radikal tipte davranış sergiler (Villamena 2013 p. 4; Bayır 2005).

Aerobik organizmalarda enerji verici substratların oksidasyonu esnasında dioksijen iki elektron alır. O_2'ye bir elektronun aktarılması $O_2^{\cdot-}$ radikal anyonunu, 2 elektronun aktarılması peroksit ($O_2^{\cdot-2}$) radikal anyonu oluşturur.

2.2.1.2. Süperoksit Anyonu ($O_2^{\cdot-}$)

$O_2^{\cdot-}$ biyolojik sistemlerde oksitleyici ve redükte edici maddelerin en temel öncüsüdür. Denklem 2.9'da O_2'nin bir elektron alarak indirgenmesiyle $O_2^{\cdot-}$ oluşur.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-} \qquad (2\text{-}9)$$

$O_2^{\cdot-}$ hem redükte hem de okside olabilir. Okside olduğu zaman Denklem 2.9'daki reaksiyonun tersi gerçekleşir ve O_2'ye dönüşür. Denklem 2.10'da gösteridiği gibi redükte olduğu zaman ise H_2O_2'ye dönüşür.

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (2\text{-}10)$$

$O_2^{\cdot-}$ hidrojen radikalleri ve H_2O_2'nin önemli bir kaynağıdır. $O_2^{\cdot-}$'nin H_2O_2'ye dönüşümü bir serbest radikalin radikal olmayan bir moleküle dönüşümü şeklinde gerçekleştiği için dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir. Bu reaksiyonlar kendiliğinden (oldukça yavaş bir şekilde) ya da SOD enzimi tarafından da katalizlenir (Villamena 2013 p. 5; Cheeseman ve Slater 1993).

Fizyolojik koşullar altında en yaygın serbest oksijen radikali $O_2^{\cdot-}$ anyonudur. $O_2^{\cdot-}$ zayıf bir oksitleyici olarak hareket edebilir, fakat sitokrom C gibi demir komplekslerinin indirgeyici ajanı olarak çok daha güçlüdür (Betteridge 2000).

2.2.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

H_2O_2 bir serbest radikal değildir ve bu nedenle $O_2^{\cdot-}$'den daha az reaktiftir. Fakat serbest radikallerin üretimi ve detoksifikasyonuyla yakından ilişkili olduğu için ROS kategorisine girer. Polar olmadığı için hücre ve organel zarlarından difüze olabilir ve bu nedenle sinyal iletim yollarında ikinci haberci olarak işlev görür. H_2O_2, CAT ve GPx enzimleri tarafından suya detoksifiye edilir. $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 konsantrasyonlarında dengesizlik çok daha tehlikeli $OH^{\cdot}$ iyonlarının oluşumuyla sonuçlandığı için bu antioksidan enzimlerin uyum içinde çalışması çok önemlidir (Burton ve Jauniaux 2011; Cheeseman ve Slater 1993). H_2O_2 redox metabolizmasında önemli bir sensör görevi görür ve H_2O_2 seviyeleri oksidatif stres için kritik öneme sahiptir. H_2O_2 konsantrasyonunun 1-10 nM arasında olması oksidatif östres olarak adlandırılan fizyolojik ve adaptif süreçlerde yer alan stres yanıtına aracılık eder. Fakat H_2O_2 konsantrasyonu 100 nM'dan daha fazla olduğu zaman uyarılmış inflamatuar yanıtın hücre hasarına neden olduğu ve oksidatif distres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar (Rosa ve ark. 2021).

2.2.1.4. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

$OH^{\cdot}$ radikali metal iyonlarının H_2O_2 ile reaksiyona girmesiyle veya Denklem 2.11'de gösterildiği gibi H_2O_2'deki $O-O$ bağının ultraviyole kaynaklı homolitik fisyonuyla üretilebilir. Ayrıca O_3 ve peroksinitrit (NO_3^-)'ten de $OH^{\cdot}$ radikalleri üretilebilir (Halliwell ve Gutteridge 2015 p. 39).

$$H-O-OH \xrightarrow{uv} 2OH^{\cdot} \qquad (2\text{-}11)$$

Genel olarak, $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 sınırlı kimyasal reaktiviteye sahiptir, fakat yüksek oranda $OH^{\cdot}$ radikali üretebilirler. Denklem 2.12'de gösterildiği gibi Fenton reaksiyonu adı verilen bir reaksiyonla ferröz demir (Fe^{+2}) ve Cu^{+} gibi geçiş elementlerinin H_2O_2 ile etkileşimi sonucunda $OH^{\cdot}$ radikali oluşur. Bu reaksiyonun ardından Denklem 2.13'de gösterildiği gibi $O_2^{\cdot-}$ radikali ferrik demiri (Fe^{+3}) ve Cu^{+2}'yi indirger. Bu iki reaksiyonun toplamı denklem 2.14'de gösterildiği gibi Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılır (Bayır 2005; Kehrer 2000; Halliwell 1999).

$$Fe^{+2}/Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3}/Cu^{+2} + OH^{-} + OH^{\cdot} \text{ (Fenton Reaksiyonu)} \quad (2\text{-}12)$$

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{+3}/Cu^{+2} \rightarrow O_2 + Fe^{+2}/Cu^{+} \quad (2\text{-}13)$$

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow OH^{-} + OH^{\cdot} + O_2 \text{ (Haber-Weiss reaksiyonu)} \quad (2\text{-}14)$$

Tüm ROS arasında en reaktif olanı ve en kısa ömürlü olanı $OH^{\cdot}$ radikalidir. (Villamena 2013 p. 11; Cheeseman ve Slater 1993). $OH^{\cdot}$ radikali etrafındaki biyomoleküllerin çoğuyla difüzyon kontrollü hızlarda reaksiyona girer (Cayuela 1995). $OH^{\cdot}$ radikalleri iyonize radyasyon ve çevresel toksikolojik reraksiyonlar sonucunda meydana gelir.

2.2.1.5. Peroksil Radikali ($ROO^{\cdot}$)

Endojen olarak üretilen diğer bir serbet oksijen radikali $ROO^{\cdot}$ radikalidir. En basit $ROO^{\cdot}$ radikali $O_2^{\cdot -}$'in protonlanmasıyla oluşan perhidroksil radikali, hidroperoksi radikali veya hidroperoksil olarak da bilinen $HO_2^{\cdot}$ radikalidir. $HO_2^{\cdot}$ radikalinin lipit peroksidasyonunu başlattığı bilinmektedir (Dasgupta ve Klein 2014 p.4; Aikens ve Dix 1991).

2.2.1.6. Hipokloröz asit (HOCl)

Biyolojik sistemlerde miyeloperoksidaz enzimi, Denklem 2.15'de gösterildiği gibi fizyolojik klorür konsantrasyonu varlığında H_2O_2 ile katalitik olarak reaksiyona girerek HOCl üretir. HOCl elektrondan zengin substratları klorlama yeteneğine sahiptir. Ayrıca DNA'yı; lipitleri ve proteinlerin hem, sistein, trozin kalıntılarını oksitleyebilme yeteneğine sahip 2 elektronlu güçlü bir oksidandır (Villamena 2013 p.20).

$$H_2O_2 + Cl^{-} + H^{+} \xrightarrow{MPO} HOCl + H_2O \quad (2\text{-}15)$$

Denklem 2-16 ve denklem 2-17'de gösterildiği gibi HOCl'nin $O_2^{\cdot -}$ ve Fe^{+2} ile reaksiyonu daha fazla ROS oluşumuna yol açar (Di Meo ve ark 2016).

$$HOCl + O_2^{\cdot -} \rightarrow OH^{\cdot} + O_2 + Cl^{-} \quad (2\text{-}16)$$

$$HOCl + Fe^{+2} \rightarrow OH^{\cdot} + Fe^{+3} + Cl^{-} \quad (2\text{-}17)$$

Fagositoz çoğunlukla $O_2^{\cdot-}$ ve ayrıca H_2O_2 olmak üzere serbest radikaller üreten bağışıklık savunmasının önemli bir işlevidir. Aynı zamanda nötrofillerde yüksek oranda eksprese edilen miyeloperoksidaz enziminin etkisiyle oluşan HOCl, istilacı mikroorganizmaların öldürülmesinde önemli bir rol oynar (Dasgupta ve Klein 2014 p.4).

2.2.2. ROS'un Kaynakları

ROS'un endojen ve ekzojen olmak üzere iki temel kaynağı vardır. ROS canlı organizmalarda çeşitli reaksiyonlar sonucu endojen olarak üretilebildiği gibi iyonlaştırıcı veya ultraviyole radyasyon gibi ekzojen kaynaklarla da üretilebilir.

2.2.2.1. ROS'nin Endojen Kaynakları

Vücutta endojen kaynaklı olarak ROS oluşumuna neden olan fizyolojik süreçler Tablo 2.1'de (Dasgupta ve Klein 2014 p.3) gösterilmiştir.

Tablo 2-1: ROS'un Endojen Kaynakları-Dasgupta ve Klein'den (2014 p.3).

ENDOJEN KAYNAKLAR	
Fizyolojik süreç	**Açıklama**
Mitokondriyal solunum	$O_2^{\cdot-}$ anyonu üreten temel yaşam süreci
Otooksidasyon	İnsan vücudunda birçok biyomolekülün (hemoglobin, miyoglobin, katekolaminler vb.) otooksidasyonu serbest radikal üretir. $O_2^{\cdot-}$ oluşturulan birincil serbest radikaldir.
Enzimatik reaksiyon	Ksantin oksidaz, lipoksijenaz, aldehit oksidaz vb. enzimleri içeren birçok enzimatik reaksiyon serbest radikalleri üretebilir.
Solunum patlaması	Fagositoz sırasında fagositlerin büyük miktarda oksijen tükettiği bir süreçtir.
Metal iyonları	Bakır iyonu ve demir iyonu gibi vücut için gerekli metal iyonları hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek serbest radikalleri üretir.
Yorucu egzersiz	Ksantin oksidazı aktive ederek serbest radikalleri üretebilir.
Enfeksiyon	İmmün sistem serbet radikal patlaması ile istilacı mikroorganizmaları nötralize etmeye çalışırken oluşabilirler

Mitokondri $O_2^{\cdot-}$'in ana kaynağı olarak kabul edilir. $O_2^{\cdot-}$ radikali mitokondriyal elektron taşıma reaksiyonları sonucunda meydana gelir. Solunum zinciri esnasında elektronların transferi tamamen verimli değildir. Normal şartlar altında mitokondride tüketilen O_2'nin %2'si suya indirgenmek yerine $O_2^{\cdot-}$'e dönüştürülür. Elektronların özellikle kompleks I ve III'de moleküler O_2'ye sızması $O_2^{\cdot-}$ oluşumuyla sonuçlanır. Yükü nedeniyle $O_2^{\cdot-}$membrandan geçemez ve bu nedenle mitokondriyal matriks içinde kalır. Benzer şekilde endoplazmik retikulum içinde bulunan ve mitokondriye göre daha kısa olan elektron transport zincirinde de elektronların sızması sonucunda $O_2^{\cdot-}$ oluşur. Protein katlanması esnasında disülfit bağlarının oluşumu oksidatif bir süreçtir ve hücre içinde oluşturulan $O_2^{\cdot-}$'in %25'i endoplazmik retikulumda oluşturulur (Burton ve Jauniaux 2011). Düz endoplazmik retikulum ksenobiyotik metabolizma ve doymamış yağ asidi üretimi esnasında ROS oluşumuna neden olan elektron transport zincirine sahiptir. Endoplazmik retikulumun zarlarındaki en önemli H_2O_2 kaynağı ksenobiyotik metabolizması esnasında NADPH-sitokrom c redükdaz ve CYPP450 aracılığıyla gerçekleştirilen monooksijenaz reaksiyonlarıdır (Di Meo ve ark 2016).

Peroksizomların H_2O_2'nin hücresel metabolizmasında yer aldığı uzun zamandır bilinmektedir. Peroksizomlarda yağ asitlerinin α ve β oksidasyonu, amino asit ve glioksilat metabolizması, lipit bileşiklerinin ve katalize edici enzimlerin çoğunun sentezi gibi önemli fonsiyonlar gerçekleştirilirken ROS oluşur. Peroksizomlar ayrıca $O_2^{\cdot-}$ üreten ksantin oksidaz ve nitrik oksit radikali ($NO^{\cdot}$) üreten nitrik oksit sentazın indüklenebilir (iNOS) formunu içerir (Di Meo ve ark 2016).

Sitozolde tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler gibi çözülebilir hücresel bileşenler redox reaksiyonlarına girebildikleri için ROS üretimine katkıda bulunurlar. Gliseraldehit, indirgenmiş flavin mononüklotit ($FMNH_2$), indirgenmiş flavin anedin dinükleotit ($FADH_2$), adrenalin, nöradrenalin, L-DOPA, dopamin, tetrahidrobiopterinler ve sistein gibi tiyol bileşikleri dahil bir çok molekül O_2 tarafından oksitlenir ve oto-oksidasyon olarak adlandırılan bu reaksiyonlar sonucunda $O_2^{\cdot-}$ üretilir. (Halliwell ve Gutteridge 2015 p. 23-24).

Ayrıca NADPH oksidaz, ksantin oksidoredüktaz (XOR), miyeloperoksidaz (MPO) gibi bazı enzimler de katalitik aktiviteleri sırasında ROS üretimine neden olurlar. Özellikle fagositik hücrelerde bulunan NADPH oksidaz NADPH'tan bir elekronu alarak O_2'ye aktarır ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalini oluşturur. NADPH oksidaz ROS oluşumu

yoluyla mikroorganizmaların öldürülmesinde önemli rol oynar. XOR'un ksantin dehidrogenaz (XDH) ve ksantin oksidaz (XO) olarak birbirine dönüşebilir iki formu vardır. Her ikisi de O_2'i redükte ederek $O_2^{\cdot-}$'ye dönüştürür, fakat XDH'ın NAD'a karşı affinitesi daha fazladır. (Bayır 2005). XOR'un her iki formu da $NADP^+$'ı elektron alıcısı olarak kullanarak hipoksantini ksantine, ksantini de ürik aside dönüştürür. MPO nötrofiller ve makrofajlarda H_2O_2 varlığında klorürün son derece reaktif oksidan olan HOCl'ye oksidasyonunu katalize eder.

Hücre membranında fosfolipaz A2 aktivitesiyle membran fosofolipitlerinden salınan araşidonik asitin membranla ilişkili enzimler olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimler tarafından prostaglandinler, trombaksanlar ve lökotrienler gibi ürünlere dönüştürülmesi esnasında ROS oluşur. Ayrıca bakterilerin membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi tarafından fagositoz yoluyla öldürülmesi esnasında $O_2^{\cdot-}$ üretilir. Fagosit NADPH oksidaz aktive edildiğinde nötrofillerin, makrofajların ve mikroglialarının tükettiği toplam O_2'nin önemli bir kısmını kullanarak $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 oluşturur (Di Meo ve ark 2016).

2.2.2.2. ROS'un Ekzojen Kaynakları

Çeşitli ekzojen kaynakların serbest radikallerin oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Bu ekzojen kaynaklar Tablo 2.2'de (Dasgupta ve Klein 2014 p.5) özetlenmiştir.

Kirli havada bulunan çapı 10 μm'den küçük partiküllerin akciğer inflamasyonu ve akciğer hücrelerinde hasara yol açan serbest radikal aktiviteleri vardır. Bu partiküllerin ana bileşenleri olan organik bileşikler ve metal iyonları endüstriyel kaynaklı olabilir. Otomobil egzozundan kaynaklanan hava kirliliği, sadece serbest radikaller üretmekle kalmaz, içerdiği zararlı polisiklik aromatik hidrokarbonlar nedeniyle kanserojen olarak da hareket eder.

Sigara dumanının sağlığa zarar verme mekanizması çoğunlukla oksidatif stres yoluyla meydana gelir. Sigara dumanı oksidanlar ve ROS dahil 400'den fazla bileşik içermektedir.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, immunosupresan ilaçlar, HIV enfeksiyonu olan hastaların tedavisinde kullanılan antiretroviral ilaçlar ve hatta aspirin gibi yaygın olarak kullanılan ilaçlar oksidatif strese neden olabilir.

Tablo 2-2: ROS'un Ekzojen Kaynakları-Dasgupta ve Klein'den (2014 p.5).

EKZOJEN KAYNAKLAR	
Eksternal kaynak	**Açıklama**
Hava kirliliği	Kirli havadaki partiküllere maruz kalma önemli ölçüde oksidatif strese yol açarak astım, kardiyovasküler hastalıklar, kronik obstrüktif pulmoner hastalık (KOAH) ve akciğer kanseri riskini artırır.
Havadaki inorganik parçacıklar	Sanayide çalışan kişilerde ortamda bulunan havadaki özellikle kuvars, silika ve asbest gibi ince mineral parçacıkların yutulması oksidatif strese neden olabilir
Tütün içmek	Tütün dumanında bulunan oksidanlar akciğerlere zarar verebilir, KOAH'a neden olur ve hatta akciğer kanseri riskini artırır.
Bazı ilaçlar	Bleomisin, adriamisin sülfasalazin ve gibi ilaçlar oksidatif strese neden olabilir.
Endüstriyel solventler	Kloroform, karbon ve tetraklorür gibi bazı endüstriyel çözücülerin solunması oksidatif hasara neden olabilir
Radyasyona maruz kalma	Aşırı ultraviyole ışığa maruz kalma, uzun süreli güneşe maruz kalma (güneşlenme) ve kanser tedavisinin bir parçası olarak radyasyon oksidatif stresi artırır.

ROS oluşumuna neden olan diğer bir ekzojen kaynak ise etanol içeren içeceklerin tüketilmesidir. Aşırı miktarda alkol tüketimi ROS'un fazla miktarlarda oluşumuna yol açarak ciddi sağlık problemlerine neden olabilir.

Karbon tetraklorür, kloroform, trikloroetilen, benzen, ksilen ve toluen gibi birçok endüstriyel çözücü karaciğerde birçok ilacın metabolizmasından sorumlu olan CYP450 enzimlerini (özellikle CYP2E1) aktive ederek oksidatif stresi indüklemektedir.

320 ve 400 nm dalga boyları arasında olan ultraviyole ışınlarına fazla maruz kalmak (ultraviyole A veya UVA olarak da bilinir) hücre içi kararsız demir konsantrasyonunda artışa neden olarak oksidatif hasara neden olur. Ultraviyole ışınlarına bağlı olarak oluşan oksidatif stres katarakt oluşumunda da önemli bir rol oynar. Güneş ışığı göze girdiğinde oluşan ROS insan gözünün lensine zarar verir.

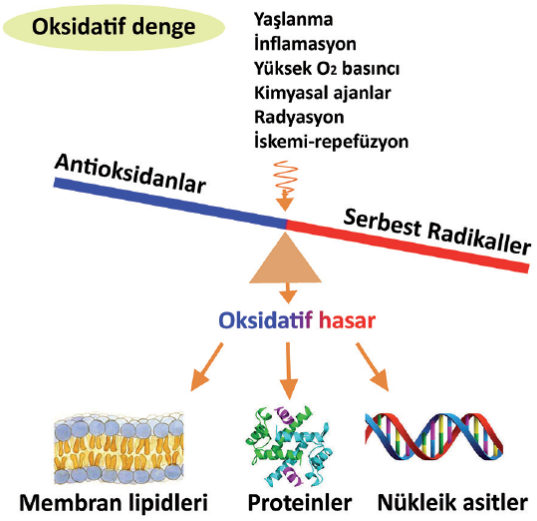
X ışınları ve diğer radyasyon da oksidatif strese neden olabilir. Özellikle kanser tedavisi esnasında kullanılan radyasyon tedavisi sırasında hastalarda ROS'un oluştuğu ve

bu ROS'un kanser hücrelerinin apoptozu için gerekli olduğu iyi bilinmektedir (Dasgupta ve Klein 2014 p.5-8).

2.3. Oksidatif Stres

1985 yılında Dr. Helmunt Sies'in "Oksidatif Stres" isimli kitabında oksidatif stresin orijinal tanımı "prooksidan-antioksidan dengesinde bir öncekinin lehine bozulma yani kararlı indirgeme-oksidasyon durumundan (redoks dengesi) sapma" olarak ifade edilmiştir. Oksidatif stres redox kontrolünün aşırı ROS üretimi lehine artması ve/veya antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği nedeniyle ROS'un ortamdan uzaklaştırılamaması sonucu meydana gelir. Oksidatif stres pozitif ve negatif etkilerine göre iki boyutta incelenir. Oksidatif östres terimiyle ifade edilen fizyolojik (düşük) seviyelerde oksidan tehdidin sürdürülmesi redoks sinyali yoluyla yaşamsal süreçleri yönetmek için gereklidir. Oksidatif distres olarak tanımlanan aşırı oksidan mücadele ise biyomoleküllere zarar verir. Fizyolojik bir redoks durumu stres yanıt sistemlerinde fizyolojik bazal bir aktivite seviyesi ile karakterize edilir. Fakat stres yanıtının aşırı aktivasyonu inflamasyon ve nihayetinde hücre ölümü gibi patofizyolojik sonuçlara yol açar (Sies 2020 p. 3-4).

Şekil 2-6'da oksidatif dengenin serbest radikaller lehine artmasıyla oluşan oksidatif hasar özetlenmiştir (Özcan ve ark. 2015).



Şekil 2-6: Oksidatif Stres-Özcan ve ark (2015) 'dan

Oksidatif stres mevcut bilgilere göre 100'den fazla hastalığın patogenezine dahil olmaktadır. Oksidatif stres öncelikle yaşlılık boyunca meydana gelen değişiklikler olmak üzere obezite, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok spesifik hastalıkla yakından ilişkilidir (Armstrong ve Stratton 2016 p.5-7).

2.3.1.1. Oksidatif DNA Hasarı

Biyomoleküller arasında DNA'nın oksidasyonu oksidatif streste merkezi bir rol oynar. Oksidatif DNA hasarı DNA baz hasarı, DNA tek sarmal kopmaları, DNA-protein çapraz bağ oluşumu ve bazsız DNA (apiriminidik veya apürinik alanların oluşumu) oluşumu gibi değişikliklere neden olur (Bayır 2005). ROS'un DNA ile etkileşimi direkt olarak DNA bazlarında veya şekerlerinde değişikliklere neden olabilir. Bunun sonucunda transkripsiyon veya translasyon hataları ve iplik kopmaları meydana gelir. Ayrıca ROS gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri veya enzimlerinde değişiklik yaparak DNA'yı dolaylı olarak da etkileyebilir. Gen ekspresyonunda meydana gelen bu değişiklikler bazen organizmanın oksidatif stres dahil stresten korunmasına yardımcı olurken bazen de toksik veya karsinojenik etkilere neden olabilir (McQueen 2018 p. 279).

DNA esas olarak $OH^{\cdot}$ radikalleri tarafından saldırıya uğrar. $OH^{\cdot}$ radikali DNA bazları veya deoksiriboz şekerleri ile reaksiyona girerek çeşitli ürünlerin oluşmasına sebep olur. Örneğin, $OH^{\cdot}$ radikali 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin üretmek için guanine eklenebilir. Şeker kısımlarına yapılan saldırılar iplik kopmalarına neden olabilirken, histon proteinleri üzerindekiler kromatin katlanmasına, DNA onarımına ve transkripsiyona müdahale eden çapraz bağlara yol açabilir. Bunların sonucunda mutasyon veya anormal gen ekspresyonu meydana gelir (Burton ve Jauniaux 2011). DNA'daki lezyonların sonucunda oluşan hasar onarılamadığı durumda doğrudan DNA replikasyonunun inhibisyonuna yol açabilir. DNA'yı kopyalama yeteneği olmayan bir hücrenin çeşitli hücre ölüm yollarına girmesi kaçınılmazdır. (Villamena 2013 p.93).

Mitokondriyal DNA elektron taşıma zincirinde O_2^{-} üretim bölgesine yakınlığı, histon korumasının olmaması ve daha az onarım mekanizmalarına sahip olması nedeniyle ROS saldırısına karşı özellikle savunmasızdır. Bu yüzden mitokondriyal DNA'daki mutasyonlar nükleer DNA'da görülen mutasyonlardan 5-10 kat daha fazla meydana gelir. Mitokondriyal DNA elektron taşıma zincirinin enzimleri de dahil olmak üzere birçok proteini kodladığı için buradaki mutasyonlar enerji üretiminin bozulmasına ve daha fazla elektron sızıntısı riskine yol açarak var olan oksidatif stresi daha da artırır (Burton ve

Jauniaux 2011). Yaşlanma sürecinde mitokondriyal DNA mutasyonlarının birikmesi ve oksidatif fosforilasyonun bozulması ve ayrıca antioksidan enzimlerin ekspresyonundaki dengesizlik ilave ROS'un üretilmesine neden olur. Mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak ROS'un aşırı üretimi yaşlanmayla ilgili mitokondriyal serbest radikal teorisinin temelini oluşturur.

2.3.1.2. Lipit Peroksidasyonu

Lipitlerin zarlarda önemli yapısal ve işlevsel rolleri vardır. Özellikle hücre zarı akışkanlığı büyük ölçüde zar fosfolipitlerinde PUFA yan zincirlerinin mevcudiyeti ile belirlenir. PUFA'lar ve onların metabolitleri enerji sağlanması; membranların yapısının, akışkanlığının, seçici geçirgenliğinin düzenlenmesi; hücre sinyalizasyonu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi fizyolojik işlevlerde görev alır (Catala 2012 p.12).

Doymuş yağ asitleri (örneğin palmitik ve stearik asit) ve tekli doymamış yağ asitleri (örneğin oleik asit) fizyolojik koşullarda peroksidasyona uğramaz. Fakat linoleik, linolenik, araşidonik, eikosapentaenoik ve dokosaheksaenoik asit gibi PUFA'lar kolayca peroksidasyona uğrar (Villamena 2013 p.49). PUFA'dan oluşan hücre zarları ve mitokondri, mikrozomlar, peroksizomlar gibi organellerin zarları reaktif oksijen saldırısı için birincil hedeftir (McQueen 2018 p. 278; Catala 2012 p.5; Bayır 2005).

Lipit peroksidasyonu hidrojen (H^+) çıkarılması veya O_2 radikali eklenmesiyle başlatılan ve PUFA'nın oksidatif hasarıyla sonuçlanan bir zincir reaksiyonudur. PUFA'nın lipit peroksidasyonu enzimatik veya enzimatik olmayan olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir. Enzimatik lipit peroksidasyonu serbest ve esterleşmiş PUFA'yı oksijenlendiren bir lipit peroksidasyon enzimleri ailesi olan lipoksijenaz ailesi tarafından katalize edilir ve bunun sonucunda $ROO^{\cdot}$ radikalleri üretilir. Enzimatik olmayan lipit peroksidasyonu ve lipit peroksitlerin ($LOO^{\cdot}$) oluşumu moleküler O_2 varlığı ile başlatılır ve Fe^{+2} iyonları tarafından kolaylaştırılır (Catala 2012 p.4-5).

Lipit peroksidasyonu başlatma, yayılma ve sonlandırma olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. ROS özellikle de $OH^{\cdot}$ radikalleri plazma membranı veya büyük miktarlarda PUFA içeren organellerin membranında lipit peroksidasyonunu başlatabilir. ROS bir yağ asidinin hidrokarbon yan zincirinden bir H^+ atomunu uzaklaştırarak karbon merkezli bir lipit radikal ($L^{\cdot}$) oluşuma neden olur. Eğer ortamda O_2 varsa bu $L^{\cdot}$ radikali $LOO^{\cdot}$ radikaline dönüşür. $LOO^{\cdot}$ radikalinin kendisi hemen yakınındaki başka bir PUFA'dan bir H^+

atomunu uzaklaştırabilir ve bir zincir reaksiyonu başlatabilir (McQueen 2018 p. 278; Catala 2012 p.4; Burton ve Jauniaux 2011). $LOO^{\cdot}$ radikallerinin oluşumu organik lipit hidroperoksitlerin (LOOH) üretimine yol açar. LOOH ise başka bir PUFA'dan H^{+}'nin uzaklaştırılmasına neden olur (Catala 2012 p.4; Aikens ve Dix 1991). Bu reaksiyon peroksidasyonu başlatıcı bir vuruşun etkisiyle çok sayıda PUFA'nın LOOH'lara dönüştürülmesiyle sonuçlandığını ifade etmek için yayılma olarak adlandırılır. $LOO^{\cdot}$ radikali DNA ve proteinler gibi moleküllerden birincil oksidasyon ürünü olan LOOH oluşturmak için bir H^{+} atomunu soyutlayabilir. LOOH'ler doymamış yağ asitleri, fosfolipitler, glikolipitler, kolesterol esterleri ve kolesterolün kendisinden türetilen radikal olmayan ara ürünlerdir (Catala 2012 p.67-68).

Serbest radikallerin neden olduğu bu zincir reaksiyonu iki serbest radikalin birbirine konjuge olarak zinciri sonlandırmasına kadar yayılır. Ayrıca reaksiyon, E vitamini (α-tokoferol) gibi bir antioksidan varlığında da sona erebilir (Catala 2012 p.5; Burton ve Jauniaux 2011).

Lipit peroksidasyon reaksiyonları kritik membran lipitlerinin yapısını ve işlevini değiştirebildiğinden hücre hasarına ve hücre ölümüne yol açabilir. Lipit peroksidasyonu kırık yağ açil zincirlerinin oluşumuna; lipit-lipit veya lipit-protein çapraz bağlarının oluşumuna; izoprostanlar ve nöroprostanların oluşumuna neden olan endosiklizasyon reaksiyonlarına yol açarak membranlarda yapısal hasara neden olur. Oluşan yapısal hasar ise membranların akışkanlığında ve bariyer fonksiyonlarında bozulmaya; membran potansiyelinde düşüşe; lizozomal hidrolitik enzimler gibi hücre ve organel içeriğinin salınmasına yol açan yırtılmalara; enzimatik inaktivasyona; hücre bölünmesi ve fonksiyonlarında toksik etkilere neden olur (Catala 2012 p.13; Packer ve Glazer 1990 p.54). Reaktif lipit oksidasyon ürünleri çeşitli reseptörler tarafından tanındığından ve dahası proteinlerle eklentiler oluşturabildiğinden dolaylı bir sinyalleşme biçimine izin vererek onların işlevini değiştirir. Böylece oksitlenmiş lipit ürünleri ikincil sinyaller olarak algılanabilir (Sies 2020 p.263). Lipit peroksidasyonunun iyi bilinen ürünleri olan malondialdehit (MDA) ve 4-HNE proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi çeşitli biyomoleküllerle reaksiyona girerek nörodejeneratif, inflamatuar, enfeksiyöz, gastrik ve beslenme ile ilgili hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar (Catala 2012 p.116).

Lipit peroksidasyonu, lipitlerin parçalanmasına ve bunun sonucunda konjuge dienler veya LOOH gibi çok çeşitli birincil oksidasyon ürünlerinin ve MDA, 4-HNE, F2-izoprostan veya pentan, etan, heksan gibi ikincil ürünlerin oluşumuna yol açar. Konjuge dienlerin ölçümü lipit peroksidasyonunun başlangıç fazında PUFA'ların moleküler olarak yeniden organizasyonunu belirler. LOOH ölçümü peroksidasyonun başlangıcındaki diğer bir belirteçtir. Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçümü genellikle oksidatif stresi belirlemek için kullanılır. LOOH'nin bozunma ürünleri arasında yer alan MDA gibi aldehitler ile etan ve etilen gibi hidrokarbonlar lipit peroksidasyonunun yaygın olarak ölçülen son ürünleridir (Catala 2012 p.118).

2.3.1.3. Proteinlerin Oksidasyonu

Proteinlerin çeşitli ROS tarafından modifikasyonunun yaşlanma ve bir dizi patolojik koşulla ilişkili olduğu bilinen bir gerçektir. ROS proteinlerde polipeptit zincirinin parçalanması, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağların oluşumu; amino asit kalıntı yan zincirlerinin doğrudan oksidasyonu; şekerler veya oksidasyon ürünleri tarafından lizin amino gruplarının indirgenerek yeni türevlerin oluşturulması (glikasyon); lipit oksidasyon ürünleri (4-HNE, MDA, 2,3 doymamış aldehitler) aracılığıyla lizin, histidin veya sistein kalıntılarının oluşturulması; tirozin kalıntılarının nitratlanması gibi modifikasyonlara neden olur (Özben 1997 p.51). Bu oksidatif modifikasyonlar proteinlerin fonksiyonlarında değişikliklere, kimyasal parçalanmaya veya proteolitik saldırıya karşı duyarlılığın artmasına neden olabilir.

2.4. Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidanlar daha az aktif radikaller oluşturarak veya proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve DNA gibi substratlara zarar veren serbest radikal zincir reaksiyonlarını engelleyerek oksidatif stresin şiddetini azaltmaya yardımcı olan maddeler olarak tanımlanır (Finaud ve ark. 2006). Antioksidanlar üç genel mekanizma ile ROS ve diğer reaktif türlerin neden olduğu hasarı engeller;

- ROS üretiminin engellenmesi
- Oluşan ROS'un temizlenmesi
- ROS kaynaklı hasarın onarımı (Villamena 2013 p.113).

Vücudumuzda antioksidan savunma sistemiyle ilgili kaynağına ya da aktivite şekline göre farklı sınıflandırmalar yapılabilir. Antioksidanlar aktivitelerine göre

antioksidan enzimler, zincir kırıcı antioksidanlar ve metal bağlayıcı proteinler olmak üzere üç kategoride sınıflandırılabilen hem endojen kaynaklı hem de diyet kaynaklı bileşiklerden oluşur. Antioksidanların kaynağına göre sınıflandırılması ise Tablo 2-3'te (Karabulut ve Gülay 2016)'de gösterilmiştir.

Tablo 2-3: Antioksidanların Sınıflandırılması- Karabulut ve Gülay'dan (2016).

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR	
ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	**NONENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR**
SOD, CAT, GPx, GR	Glutatyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10, selenyum, α-lipoik asit, transferrin, seruloplazmin
EKZOJEN ANTİOKSİDANLAR	
Vitaminler	İlaç olarak kullanılanlar
α-Tokoferol (E vitamini), β-karoten (A vitamini), askorbik asit (C vitamini), folik asit (B9 vitamini)	Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, rekombinant SOD, Trolox-C (vitamin E analoğu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), demir redoks döngüsü inhibtörleri, nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1), Barbitüratlar, demir şelatörleri

En önemli antioksidan enzimler endojen kaynaklı SOD, CAT ve peroksidazlardır. Serbest radikaller tarafından başlatılan zincir reaksiyonlarına müdahale eden antioksidanlar ise zincir kırıcı antioksidanlar olarak bilinir. Karotenoidler, flavonoidler ve antioksidan vitaminler gibi bazı zincir kırıcı antioksidanlar diyet kaynaklıdır. Bakır ve demir gibi metal iyonlarını bağlayabilen ferritin, transferrin ve seruloplazmin gibi endojen proteinler önemli antioksidan proteinlerdir. Böylece Fenton reaksiyonu yoluyla serbest radikallerin oluşumu engellenir. Genellikle antioksidan enzimler oksidatif stresin

uygun şekilde nötralizasyonu için en güçlü antioksidan savunmayı sağlar (Dasgupta ve Klein 2014 p.11).

2.4.1. Antioksidan Enzimler

2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD $O_2^{\cdot-}$'nin H_2O_2 ve moleküler O_2'ye dönüşümünü (denklem 2-18) katalize eden metalloenzim ailesine ait en önemli antioksidan enzimdir. H_2O_2 daha sonra CAT, GPx ve/veya tioredoksin (Trx) bağımlı peroksiredoksin (Prx) enzimleri tarafından suya indirgenir (Nohl ve ark. 2005 p.110)

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{\textbf{SOD}} H_2O_2 + O_2 \qquad (2\text{-}18)$$

SOD, $O_2^{\cdot-}$ radikal anyonunun kendiliğinden meydana gelen dismutasyonunu hızlandırır. SOD'un üç formu vardır. SOD1 (Cu, Zn- SOD) işlevi için hem bakır hem de çinko gerektirir; sitozolde, mitokondride ve sinaptozomlarda bulunur. Manganez (Mn)-SOD (SOD2) çoğunlukla mitokondride bulunur. Mn-SOD mitokondriyal Mn iyonlarına bağlıdır. SOD3 eksraselüler kompartmanda bulunur. SOD3 de kofaktör olarak bakır ve çinko gerektirir (Rosa ve ark. 2021; Dasgupta ve Klein 2014 p.11-12). Cu,Zn-SOD memeli dokularının toplam SOD aktivitesinin %85-90'ını oluştururken MnSOD genellikle %10-15'ini oluşturur. SOD'un bu üç formu da aynı reaksiyonu katalize etseler de çeşitli genler tarafından kodlanırlar, yapıları ve lokalizasyonları bakımından farklılık gösterirler.

SOD3 hücre dışı boşlukta $O_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2'ye katalize dismutasyonuna izin veren tek $O_2^{\cdot-}$ temizleyicisidir. SOD3 dokulardaki ekstraselüler matriks başta olmak üzere birçok hücrenin yüzeyinde, kan plazması, lenf, assit ve BOS gibi hücredışı ortamlarda bulunan bir SOD formudur. Dokulardaki SOD3 vücuttaki tüm SOD3'ün %90-99'unu oluşturur. SOD3'ün bir antioksidan olarak bir diğer önemli işlevi nitrik oksitin biyoyararlanımını korumaktır. SOD3 kan damarları, epididim, kalp, akciğer, böbrek, testis, Sertoli ve germ hücreleri ve uterusta en yüksek oranda bulunur. SOD3 ayrıca çeşitli fibroblast, glial ve endotel hücre hatları tarafından sentezlenir ve salgılanır. Vaskülar yapılarda bulunan SOD3 esas olarak vasküler düz kas hücrelerden salgılanır. Beyinde

SOD3 ekspresyonu diğer dokulardan çok daha düşüktür; fare beyninde enzim esas olarak hipokampus, striatum, suprakiazmatik çekirdeklerde lokalizedir (Nohl ve ark. 2005 p.110-111).

H_2O_2 üretimi ve uzaklaştırılmasında yer alan endojen antioksidan sistemle ilgili tüm enzimler fizyolojik ve patolojik olarak birbirleriyle bağlantılı olarak işlev görür (Sies 2020 p.192). Bu işbirliği açısından bakıldığında SOD aktivitesinin çift yönlü etkisi vardır. İlk olarak SOD aktivitesi CAT, GPx veya Prx/Trx enzimleri ile koordine edildiğinde H_2O_2'nin suya nötralize edilmesini sağlayarak birikimini önleyen bir antioksidan enzimdir. İkinci olarak H_2O_2 aşırı birikerek ROS'un aşırı üretimine ve hücre toksisitesine yol açabileceğinden SOD bir pro-oksidan gibi davranabilir (Rosa ve ark. 2021; Sies 2020 p.183).

2.4.1.2. Katalaz (CAT)

Bir diğer önemli antioksidan enzim olan CAT, H_2O_2'yi su ve O_2'ye dönüştürür (denklem 2-19) ve böylece $O_2^{\cdot-}$ radikalini tamamen nötralize eder. Her bir CAT molekülü, her saniye milyonlarca H_2O_2 molekülünü su ve O_2'ye parçalayabilir. CAT tetramerik yapıdadır ve kofaktör olarak demir gerektirir (Dasgupta ve Klein 2014 p.12).

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\mathbf{CAT}} 2H_2O + O_2 \qquad (2\text{-}19)$$

CAT hem içeren ve çoğu aerobik hücrede bulunan hücre içi bir enzimdir. Hayvan dokularında esas olarak peroksizomlarda ve sitoplazmada lokalizedir. CAT ayrıca alkoller de dahil olmak üzere bir dizi substrata karşı peroksidaz ve oksidaz aktivitelerine sahiptir. Alkolün asetaldehide dönüştürmesi CAT'ın peroksidaz aktivitesine örnektir. CAT'ın antioksidan savunmadaki rolü doku tiplerine ve oksidatif doku hasarı modellerine bağlıdır. Genel olarak CAT eksikliği olan hayvanlar, oksidatif stres aracılı doku hasarına daha duyarlıdır. Tersine farelerde CAT'ın genetik aşırı ekspresyonu bu hayvanların yaşlanma, ateroskleroz, kardiyomiyopati ve doku iskemi-reperfüzyon hasarı gibi oksidatif stresi içeren çeşitli patofizyolojik süreçlere karşı direncini artırır (Villamena 2013 p.114).

2.4.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

GPx'lar, serbest H_2O_2'yi suya indirgeme ve LOOH'leri onlara karşılık gelen alkollerine indirgeme yeteneğine sahip bir enzim ailesidir ve temel biyolojik rolleri organizmaları oksidatif stres hasarından korumaktır (Jiao ve ark 2017). Bugüne kadar tanımlanmış sekiz GPx izozimi vardır. GPx dört protein alt biriminden oluşur; her biri aktif bölgesinde bir selenyum elementi içerir. Selenyumun aktif bölgeye bir selenosistein olarak sunulduğu ve katalitik redoks merkezi olarak hizmet ettiği bilinmektedir. İnsanlarda GPx-1, -2, -3, -4 ve -6 izoformları selenosistein kalıntıları içerir ve bu grubun tüm üyeleri denklem 2-20'de gösterildiği gibi H_2O_2'nin suya indirgenmesini katalize etmek için indirgenmiş glutatyon (GSH) kullanarak onu okside glutatyona (GSSH) dönüştürür (Dasgupta ve Klein 2014 p.12; Halliwell ve Gutteridge 2015 p. 109).

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{\mathbf{GPx}} GSSH + 2H_2O \qquad (2\text{-}20)$$

GPx-5, -7 ve -8 izoformları ise selenosistein yerine sistein kullanır (Sharma ve ark. 2020; Dasgupta ve Klein 2014 p.12).

GPx seviyesinde eşzamanlı artış olmadığı durumlarda SOD'un aşırı ekspresyonu, yalnızca hücresel redoks durumunu değiştirmekle kalmayan, aynı zamanda Fenton reaksiyonuna katılan ve yüksek derecede toksik $HO^{\cdot}$ radikallerinin üretimine yol açan H_2O_2 birikimine neden olur. Bu nedenle patolojik olarak oksidatif metabolizmaya karşı GPx'in koruyucu mekanizmada rolü önemlidir. GPx, beyin dokusundaki fazla H_2O_2'yi temizlemede çok önemli bir rol oynar, çünkü beyindeki CAT aktivitesi düşüktür ve peroksizomlarla sınırlıdır (Sharma ve ark. 2021).

2.4.1.4. Glutatyon Redükdaz (GR)

GR flavoprotein enzimidir ve GSH'nin dönüşümü için gerekli olan önemli hücresel antioksidandır. GSH disülfid olarak da adlandırılan oksitlenmiş glutatyon (GSSG), GR enziminin etkisiyle GSH'ye geri indirgenir. GR bu reaksiyonda elektron alıcısı olarak NADPH'ı kullanır. GSH/GSSG oranı bir organizmanın oksidatif stresinin önemli bir genel ölçüsüdür. Çok yüksek GSSG konsantrasyonu oksidatif olarak birçok enzime zarar verebilir. Hücre içi GSH/GSSG oranı kararlı durumda 100 veya daha

fazladır ancak oksidatif stres koşullarında 10 veya altına düşer (Aoyama 2021; Sen ve Chakraborty 2011).

2.4.2. Endojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar

2.4.2.1. Glutatyon

Glutatyon sitozolde, çekirdekte ve mitokondride yüksek oranlarda bulunan, bulunduğu hücre kompartmanlarında çözünen, protein olmayan tripeptit yapıda güçlü bir antioksidandır. Glutatyon hücre içinde daha çok GSH formunda bulunur. GSH Denklem 2-21 ve 2-22'de gösterildiği gibi iki ATP'ye bağımlı enzimin ardışık etkisi ile sistein, glisin ve glutamattan sentezlenen protein olmayan tiyol bileşiğidir. Denklem 2-21 ile ifade edilen reaksiyon γ-glutamil sistein sentetaz tarafından katalize edilirken, denklem 2-22'deki reaksiyon ise 7-glutatyon sentetaz tarafından katalize edilir (Baskin ve Salem 1997 p.171-172).

L-glutamate + L-cysteine + ATP → L- γ-glutamyl-L-cysteine + ADP + P (2-21)

L-7-glutamyl-L-cysteine + Glycine + ATP → Glutathione + ADP + P (2-22)

GSH'ın canlı hücrelerde antioksidan sistemin korunması, redoks dengesi, sistein taşınması ve depolanması, hücre sinyalizasyonu, bazı enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, gen ekspresyonu, hücre farklılaşması ve çoğalması gibi çok çeşitli görevleri vardır. GSH serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stresle mücadele etmek için hücreler ve dokular tarafından kullanılan doğal olarak oluşan antioksidan savunma stratejisinin bir parçasıdır. Çekirdekteki glutatyon DNA onarımı ve ekspresyonu için gerekli olan kritik protein sülfidrillerinin redoks durumunu korur. GSH'nin başlıca biyolojik işlemlerinin tümü GSH molekülü içindeki tiyol kalıntısının redoks durumuna bağlıdır. İki GSH molekülü ROS'u veya RNS'yi ortadan kaldırmak veya hücre içi redoks homeostazını sürdürmek için oksitlenir ve bir molekül GSSG oluşur ve GSSG tekrar iki GSH'ye indirgenebilir (Aoyama 2021).

2.4.3. Ekzojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar

2.4.3.1. E Vitamini (α-Tokoferol)

E vitamini biyolojik sistemlerde serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonunun yayılma fazında zincir kırıcı olarak fonksiyon yapan yağda çözünen en önemli antioksidandır (Knight 2000). E vitamini $LOO^{\cdot}$ radikalleri ile komşu yağ asidi yan zincirleriyle reaksiyona girebileceklerinden yaklaşık dört kat daha hızlı reaksiyona girdiği için en önemli zincir kırıcı görevi görür (Catala 2012 p.5; Burton ve Jauniaux 2011).

E vitamini $LOO^{\cdot}$ radikallerini daha kararlı olan LOOH'a indirger ve tokoferol radikali oluşur (Baskin ve Salem 1997 p.95-96). Tokoferol radikali zayıf bir reaktiftir, bitişik yağ asidi zincirlerine saldırabilir, böylece zincir reaksiyonu durdurulur. Tokoferol radikali daha sonra askorbik asit, β-karoten ve glutatyon gibi diğer antioksidanlar tarafından α-tokoferole geri dönüştürülür (Villanueva ve Kross 2012; Fürst 1996).

Moleküler anlamda E vitamini biyolojik membranlarda sadece $ROO^{\cdot}$ radikalini değil $OH^{\cdot}$ ve $O_2^{\cdot-}$ radikallerini ve $^1O_2$'yi de azaltır (Baskin ve Salem 1997 p.95-96).

2.4.3.2. C Vitamini (Askorbik Asit)

C vitamini suda çözünen bir maddedir ve hücre dışı sıvılardaki en önemli antioksidandır fakat siztozolde de etkindir. C vitamini ROS üretiminin daha önemli olduğu dokularda daha fazladır. Bu durum oksidatif strese karşı bir adaptasyon olarak tanımlanır (Finaud ve ark. 2006). Bir antioksidan olarak rolü sulu $ROO^{\cdot}$ radikalleri ile reaksiyona girerek askorbil radikalleri oluşturmasına dayanmaktadır. C vitamini $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ ve sulu $ROO^{\cdot}$ radikallerinin yanı sıra H_2O_2, HOCl ve $^1O_2$ dahil olmak üzere $LOO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$ gibi diğer oksidanları temizleme yeteneğine sahiptir (Dasgupta ve Klein 2014 p.14). C vitamini hücrelerin içinde ROS ile reaksiyona girdikten sonra aktif formlarına dönüşerek E vitamini ve GSH'nin etkisini güçlendirir. C vitamini ayrıca güçlü bir oksidan etkiye sahip olan bakır iyonlarını yakalama yeteneğine de sahiptir (Finaud ve ark. 2006). C vitamininin hem kendisi antioksidandır hem de C vitamini daha önce bahsedildiği gibi E vitamini ile etkileşerek bir yardımcı antioksidan görevi görür. Askorbik asit vitamin E'yi geri dönüştürür dönüştürmez α-tokoferolden daha düşük reaktiviteye sahip olan askorbil radikaline dönüşür. Askorbik asit ayrıca GSSG'yi GSH'a ve karotenoid radikallerini karotenoidlere geri dönüştürür (Villanueva ve Kross 2012).

2.4.3.3. β-karoten

Karotenoidler bitkiler tarafından sentezlenen ve çeşitli meyve ve sebzelerin parlak renklerinden sorumlu olan sarı, turuncu ve kırmızı renkli doğal pigmentlerdir (Halliwell ve Gutteridge 2015 p. 170; Paiva ve Russell 1999). Karotenoidler yağda çözünen önemli antioksidanlardır ve en yaygın şekli β-karotendir. Karotenoidler $^1O_2$'nin yanı sıra peroksi radikallerini de nötralize edebilir (Dasgupta ve Klein 2014 p.14). β-karoten, görme için gerekli olan aktif vitamin A'ya (retinol) dönüştürülebildiği için pro-vitamin olarak kabul edilen yağda çözünen bir karotenoiddir. β-karoten güçlü bir antioksidan ve $^1O_2$'nin en iyi söndürücüsü olarak kabul edilir (Sen ve Chakraborty 2011).

2.4.3.4. Flavonoidler

Flavonoidler bitkilerde fenilalanin, tirozin ve malonat amino asitlerinden oluşan fenolik maddelerdir. Flavonoidler pro-oksidan enzimleri inhibe etme veya Fe^{+2}, Fe^{+3}, Cu^{+2} gibi prooksidan iyonlarla kompleks oluşturma yeteneğine sahiptir. Flavonoidler ayrıca doğrudan H^+ atomu bağışı yoluyla bazı ROS'ları doğrudan yakalama etkisine sahiptir. Ayrıca flavonoidler E vitamini ve β-karoten üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir. Fakat flavonoidlerin bazılarının prooksidan etkileri olabilir ve flavonoidler vücutta zayıf antioksidan etkilere sahip metabolit formları şeklinde de bulunabilirler. (Finaud ve ark. 2006).

2.5. Nöron Spesifik Enolaz (NSE)

Enolaz enzimleri 2-fosfogliseratın fosfoenolpiruvata dönüşümünü ve glukoneogenez sırasında bunun ters reaksiyonunu katalize eden iyi bilinen bir glikolitik enzim ailesidir. Enolazlar glikozu piruvata ayrıştıran, hem yüksek enerjili ATP bileşikleri hem de kofaktör NADH üreten, hücre metabolizması ve çeşitli yaşam aktiviteleri için enerji ve malzeme temeli sağlayan glikolitik yolda yer alan enzimlerdir. Omurgalı organizmalarda farklı genler tarafından ifade edilen üç enolaz izozimi mevcuttur. Enolaz α her yerde bulunur, enolaz β kasa özgüdür ve enolaz γ nörona özgüdür (Xu ve ark. 2019; Isgro ve ark. 2015).

γ enolaz olarak bilinen NSE esas olarak merkezi ve periferal sinir sistemindeki nöronların sitoplazmasında ve nöroendokrin kökenli hücrelerde bulunan 78 kD ağırlığına sahip, dimerik yapıda glikolitik bir enzimdir (Pelinka ve ark. 2004; Çeltik ve ark 2004). NSE beyindeki toplam protein kütlesinin yaklaşık %1,5'ini oluşturur (Selakovic ve ark. 2005). NSE ayrıca daha düşük konsantrasyonlarda eritrosit, trombosit, prostat, meme

dokusu ve uterus gibi nöronal olmayan ve nöroendokrin olmayan hücre veya dokularda da bulunur (Xu ve ark. 2019; Anand ve Stead 2005). NSE'nin merkezi sinir sistemindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır ancak bazı deneysel çalışmalar nöroprotektif rolüne işaret etmiştir. NSE'nin merkezi sinir sisteminin gelişimi sırasında zar yapılarının oluşumunda, enerjiye bağlı tüm hücre süreçlerinde ve onarıcı beyin süreçlerinde yer aldığı bildirilmiştir. NSE nöronal membranın uyarılabilirliğinin korunması için gereklidir. Ayrıca NSE'nin stres yanıt düzenlemesine dahil olduğu varsayılır (Selakovic ve ark. 2005).

Normal şartlarda NSE hücre dışı boşluğa aktif olarak salgılanmaz, sadece hücre yıkımı ile pasif olarak salınır. NSE sinir sistemi dışındaki dokularda düşük konsantrasyonlarda bulunduğu için sinir dokusu hasarının en yaygın olarak araştırılan biyokimyasal belirteçleridir ve beyin hasarını değerlendirmede güvenilir biyobelirteç olduğu bulunmuştur (Shaik ve ark. 2019). NSE biyolojik yarılanma ömrü 48 saat olan, doku yaralanmasından sonra BOS'a ve kana kolayca salınan oldukça çözünür bir proteindir (Selakovic ve ark. 2005). Kanda ve BOS'da ölçülen ve yaralanma şiddeti ile artmış korelasyon gösteren NSE düzeyi, nöronal sistem yaralanmalarında nöron ölümünü değerlendirmek için kullanılır ve beyin hasarını nicel olarak ortaya koyar. Hücre yüzeyi γ-enolaz ekspresyonu yaralanmadan sonra inflamatuar reaksiyonu başlatır. Yaralanmayı takiben NSE nöronlar, glial hücreler ve enflamatuar hücrelerin sitozolünden yüzeye hızla transfer olur. NSE bir yandan hücre antijen sunumunu arttırır ve yüzeyde plazminojeni konsantre ederek ekstraselüler matriksi bozar; diğer yandan inflamasyonu desteklemek için proinflamatuar sinyalleşme yoluyla ROS, NO ve TNF-α, IL-1β, INF-γ, dönüştürücü büyüme faktörü-β (Transforming Growth Factor; TGF-β) ve monosit kemoatraktan protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) gibi çeşitli sitokinlerin üretimini yönlendirebilir (Xu ve ark. 2019).

NSE'nin alzheimer hastalığı, epileptik nöbetler, multipl skleroz, kafa travması ve felç durumlarında BOS'taki seviyesi artar (Alataş ve ark. 2007). NSE düzeylerinin incelenmesi iskemik inme, intraserebral kanama, nöbetler gibi durumlarda teşhisin konulması ve tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi ile kardiyak arrest için yapılan kardiyopulmoner resusitasyon ve travmatik beyin hasarı sonrasında gelişen koma durumunun değerlendirilmesinde kullanılan oldukça ucuz ve kolay sonuç alınan bir yöntemdir (Isgro ve ark. 2015).

2.6. S100-β

S100 proteinleri hücreye özgü bir şekilde ekspresyonu olan, hem hücre içi hem de hücre dışında işlevlere sahip ve ayırt edilebilen 20'nin üzerinde sayısı olan Ca^{+2} bağlayıcı protein grubudur. S100 Ca^{+2} bağlayıcı proteinler hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre farklılaşması, hücre motilitesi ve apoptoz, membran-hücre iskeleti etkileşimlerinin modülasyonu, hücre içi Ca^{+2} sinyallerinin iletimi, öğrenme ve belleğe aracılık etme gibi hücre içi Ca^{+} bağımlı birçok fonksiyonla ilişkilendirilmiştir (Hermann, ve ark. 2012)

S100-β hücresel sentezi astroglial ve Schwann hücrelerinde lokalize olan Ca^{+2} bağlayıcı bir proteindir (Herrmann, Curio ve ark. 1999). α ve β alt birimi olmak üzere 2 alt birimi bulunan S100-β hücre içi sinyalleşme, büyüme, hücre yapısı ve enerji metabolizması gibi çeşitli süreçleri düzenler. S100-β aktif olarak fizyolojik koşullarda hücre dışı boşluğa düşük miktarlarda salgılanır. S100-β proteini sinir sisteminde nöronal farklılaşma, glial proliferasyon, aksonal büyüme, öğrenme ve hafıza modülasyonu ve Ca^{+2} homeostazı gibi süreçlerde görev alır (Mussack ve ark. 2002; Alatas ve ark. 2007).

Travmatik beyin hasarında olduğu gibi membran bütünlüğünü bozan değişiklikler glial ve nöron dokusu ile ilgili proteinlerin sitozolden hücre dışı boşluğa sızmasını sağlar. Bu nedenle normalde serum numunelerinde saptanamayan S100-β beyin hasarı durumunda yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Kafa travması sonrası beyindeki hücresel hasarı gösterme açısından S100-β'nın duyarlılığı çok yüksektir. Örneğin normal bir bilgisayarlı tomografi nedeniyle oluşan küçük bir travmadan sonra bile serum S100-β seviyeleri yükselir (Alatas ve ark. 2007; Herrmann, Curio ve ark. 1999).

S100-β proteini glikoz yoksunluğu sırasında nöronlar için koruyucudur fakat aşırı eksprese edildiği zaman apoptozu tetiklediği için nöronlar üzerinde toksik etki gösterir. Aşırı S100-β astrositlerde inflamatuar süreçlerle ilgili IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinleri ve iNOS gibi inflamatuar stresle ilişkili enzimleri artırarak ve ayrıca NFKB yolunun aktivasyonunu artırarak nöronal ölüme neden olur (Alatas ve ark. 2007; McNutt 1998).

2.7. Darbepoetin Alfa (DA)

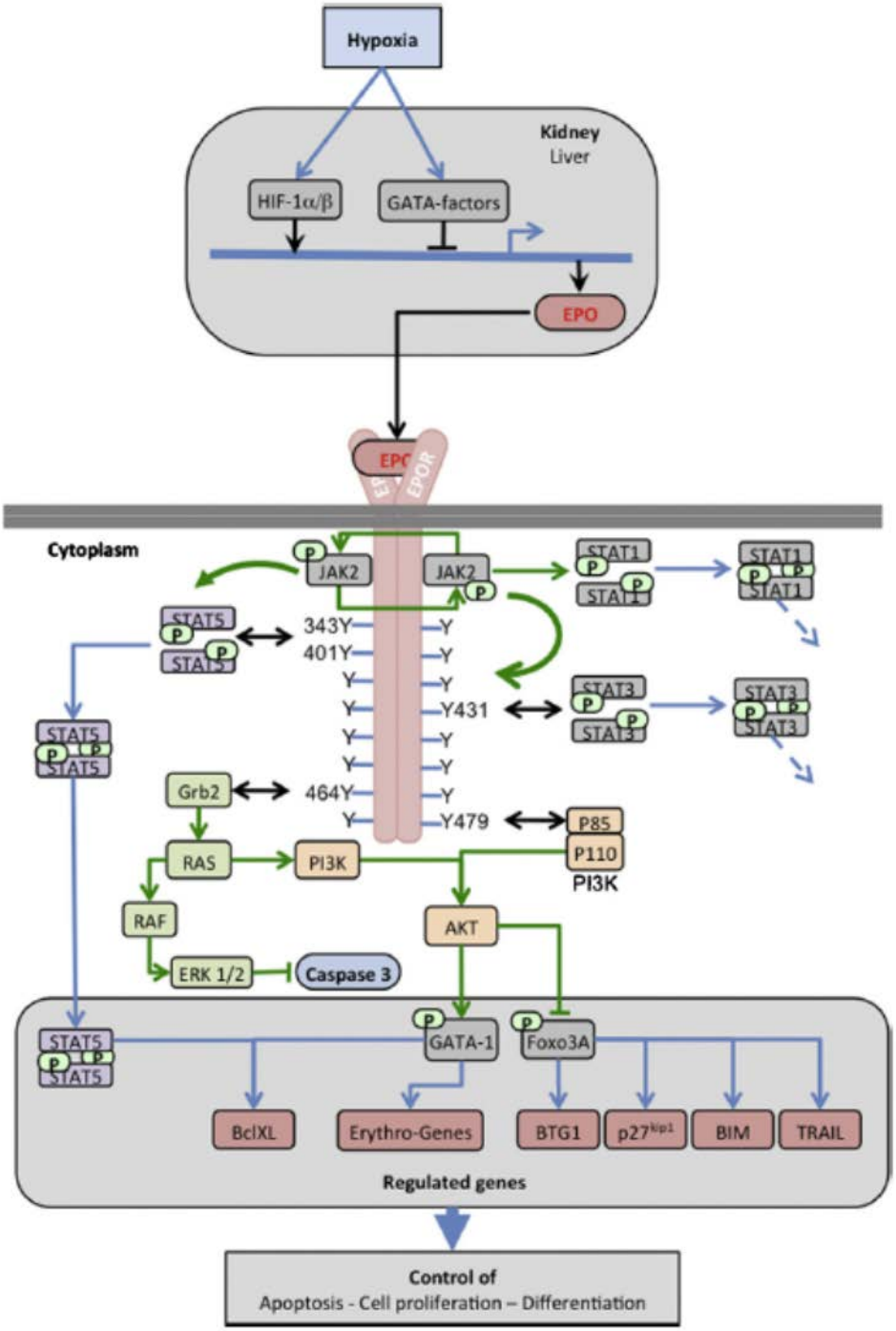
EPO eritropoezin birincil düzenleyicisi olan glikoprotein yapıda bir hormondur. EPO 165 amino asit içeren tek bir polipeptitten oluşur ve içerdiği karbonhidrat miktarına bağlı olarak 30-34 kDa ağırlığına sahiptir. EPO böbreklerden ve fetal karaciğerden

salınan hematopoietik büyüme faktörüdür ve eritrosit öncü hücre apopitozunu engelleyerek eritrosit üretiminde primer regülatör olarak görev yapar (Haase 2013; Thome 2008). EPO büyüme hormonu, IL-2,-3,-4,-6, granülosit-koloni stimüle edici faktör, trombopoietin, prolaktin, onkostatin M, siliyer nörotrofik faktör ve lökosit inhibitör faktör gibi hematopoietik sınıf 1 sitokin süper ailesinin diğer üyeleriyle yapısal benzerlikler taşır (Alnaeeli ve ark. 2012). EPO kan plazmasında sürekli olarak düşük konsantrasyonlarda bulunur (0,1-0,3 U/ml) ve salgılanması yaşlı eritrositlerin ölümünü veya hipoksiyi takiben böbreğin doku oksijenlenmesinin azalmasıyla uyarılır (Thome 2008). EPO kemik iliğindeki kırmızı kan hücresi öncüllerinin hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak kırmızı kan hücrelerinin proliferasyonlarını, farklılaşmalarını, hayatta kalmalarını sağlar ve dolaşımdaki kırmızı kan hücresi kütlesinin artışına sebep olur (Belayev ve ark. 2005). Bir hematopoietik sitokin olan EPO hematopoietik hücrelerdeki EPO-R aracılığıyla kemik iliğinde antiapoptotik protein BCL-xL'nin upregülasyonu nedeniyle kanda eritrosit konsantrasyonunda artışa neden olur (Brendt ve ark. 2009).

EPO üretimi hipoksi ile indüklenebilir. Bu nedenle anemi ve hipoksik stres sırasında miktarı artar. Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) EPO'nun hipoksik indüksiyonu için birincil düzenleyici faktördür ve EPO üretimin 150 kat veya daha fazla artmasına neden olur (Alnaeeli ve ark. 2012). HIF O_2'ye duyarlı bir α-alt birimden ve aynı zamanda aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokatör (ARNT) olarak da bilinen yapısal olarak eksprese edilmiş bir β-alt biriminden oluşur. HIF-lα, HIF-2α ve HIF-3α olmak üzere üç HIF α-alt birimi bilinmektedir. İnvitro yaklaşımlar HIF-1'i EPO'nun hipoksik indüksiyonundan sorumlu transkripsiyon faktörü olarak tanımlamasına rağmen, HIF-2 artık invivo EPO üretiminin ana düzenleyicisi olduğu ortaya çıkmıştır. HIF-1α HIF-2α ile birlikte anjiyogenez, anaerobik glikoz metabolizması, mitokondriyal biyogenez ve diğer birçok biyolojik süreçleri uyararak O_2'nin dokulara iletimini ve hipoksiye hücresel adaptasyonu kolaylaştırır (Haase 2013).

Eritroid sisteminde EPO-R, koloni oluşturan birim-eritroidden (CFU-E) bazofilik eritroblast aşamasına kadar hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir (Chateauvieux ve ark. 2011). EPO-R'nin intrinsik katalitik alanları yoktur ve sitoplazmik bölgelerinde EPO sinyali için JAK2 gibi Janus kinazlar (JAK) ile bağlantılıdır. Hipoksi koşullarında artan

EPO sentezi sonucunda meydana gelen EPO/EPO-R etkileşimi ve hücre içi sinyal yolakları Şekil 2-8'de gösterilmiştir (Chateauvieux ve ark. 2011).



Şekil 2-7:EPO/EPO-R Etkileşimi ve Hücre İçi Sinyal Yolağı- Chateauvieux ve ark. (2011)'dan

EPO/EPO-R etkileşimi reseptörün hücre dışı alanındaki konformasyonel değişiklikleri ve sonuç olarak otofosforilasyon yoluyla EPO-R ile ilişkili JAK2'nin aktivasyonunu tetikler. JAK2 aktivasyonu EPO-R'nin sitoplazmik bölgesinde sekiz tirozin kalıntısının fosforilasyonu ile sonuçlanır. Bu fosfotirozin kalıntıları sayesinde EPO-R çeşitli sinyal yollarını başlatan proteinlerin SH2 bölgelerine bağlanır. EPO-R'de sinyal iletimi sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) 5, fosfatidilinositol-3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/AKT), mitojenle ilişkili protein kinaz/hücre dışı sinyal ilişkili kinaz (MAPK/ERK) ve protein kinaz C gibi birçok yolak aracılığıyla gerçekleşir (Haase 2013). EPO memelilerde bilinen STAT ailesinin yedi üyesi arasından EPO-R'nin fosforile edilmiş tirozinlerinin yerleştirme bölgelerine bağlanan STAT1, STAT3 ve STAT5a/b'yi aktive eder. Daha sonra JAK2 tarafından fosforile edilen STAT'lar dimerizasyona uğrar ve transkripsiyon faktörleri olmak üzere aktive olurlar. JAK2/STAT5 eritroid hücrelerde EPO tarafından aktive edilen klasik yoldur. Özellikle JAK2/STAT5'in EPO aracılı aktivasyonu antiapoptotik Bcl-xL geninin upregülasyonuna yol açar ve bu nedenle proeritroblastları apopitozdan korur. Burada aktive edilen ana sinyal yolaklarından birisi de PI3K/AKT yoludur. Bu yol da eritroit hücreyi apopitozdan koruyarak hayatta kalmasını sağlayan çok önemli bir yoldur ve eritropoezin düzenlenmesinde yer alan proteinleri aktive eder. Eritroid hücrelerde PI3K/AKT sinyal yolu GATA-1 transkripsiyon faktörünü fosforile ederek onun aktivitesini arttırır. GATA-1 eritro-spesifik genlerin yanı sıra antiapoptotik Bcl-xL gen transkripsiyonunun regülasyonu için anahtar bir transkripsiyon faktörüdür. Forkhead box O3A (Foxo3A) eritropoez için AKT aracılı fosforilasyonla ilgili başka bir transkripsiyon faktörüdür. Foxo3A'nın fosforilasyonu transkripsiyonel aktivitesinin inhibe olmasına neden olur. Bunun sonucunda hücre döngüsü inhibitörü proteini p27Kip1/CDK (/sikline bağımlı kinaz inhibitörü) gibi Foxo3A hedef genleri downregüle olur. Ayrıca Foxo3A'nın hedef genleri arasında antiproliferatif veya proapoptotik fonksiyonlara sahip olan BTG1 (B hücre translokasyon geni 1), Bcl2 ailesi üyesi BIM ve TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand) genlerinin aktive edilmesi engellenmiş olur. PI3K/AKT'nin EPO aracılı aktivasyonu Grb2 gibi adaptör proteinler aracılığıyla da meydana gelebilir. Grb2, G-protein RAS'ın aktivasyonunu ve ardından PI3K fosforilasyonunu tetikler. Benzer bir mekanizma da diğer EPO aracılı sinyal yolu olan RAS/RAF/MAPK/MEK/ERK1/2 yolu adaptör proteinler aracılığıyla aktive edilir. RAF1 aktivasyonu hücre proliferasyonu ile ilişkilidir ve daha da önemlisi RAF1 hücre

farklılaşmasının durmasına yol açan kaspaz-3 aktivitesini inhibe eder (Chateauvieux ve ark. 2011).

EPO-R yalnızca eritroid öncü hücreler üzerinde değildir. EPO-R beyin, omurilik, kalp ve testis dahil olmak üzere diğer birçok dokuda bulunmuştur. EPO'nun reseptörlerinin bulunduğu dokularda doku koruyucu etkiler sağlayan antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuar ve anjiyojenik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Kertmen ve ark. 2015). EPO endoteliyal hücre kültürlerinde BCL-xL indüksiyonu aracılığıyla hücrelerin hayatta kalmasını destekler (Brendt ve ark. 2009).

Normal beyin gelişimi için EPO-R sinyali gereklidir (Kumral ve ark. 2005). EPO gelişmekte olan ve olgun merkezi sinir sistemi hücrelerinin nöronlarında, astrositlerinde ve immün hücrelerinde hücre canlılığına ve proliferasyonuna aracılık eder (Schober ve diğ. 2018). EPO hücre kültürü ortamında nöral progenitör hücrelerin proliferasyonunu uyarır. EPO tedavisi orta düzeyde hipokside görülen hücre proliferasyonu artışına benzer şekilde proliferasyonu artırır (Alnaeeli ve ark. 2012).

EPO nöronal hücrelerde hücrenin hayatta kalması için sinyalleşme kaskadlarının desteklenmesinde, antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunun upregülasyonunda, hücre içi kalsiyum metabolizmasının modülasyonunda, nitrik oksit üretiminin zayıflamasında, glutamat salınımının inhibisyonunda rol oynar ve antiapoptotik, antioksidan ve antiinflamatuar etkilere sahiptir (Kumral ve ark. 2005). Nöronal hücrelerin EPO ile uyarımı JAK2, STAT5, AKT ve MAPK sinyal yollarını aktive eder. İskemik hasar sırasında transgen ekspresyonu ile beyinde artan EPO üretimi EPO aracılı nöroproteksiyon için gerekli olan JAK2, ERK1/2 ve AKT'nin aktivasyonu ile sonuçlanmıştır (Alnaeeli ve ark. 2012). Ayrıca EPO'nun sialik asit içeren oligosakkarit zincirleri tarafından ROS'u temizleyerek doğrudan bir antioksidan olarak etkili olduğu gösterilmiştir (Kertmen 2015).

Rekombinant insan EPO'su (rHuEPO) anemi tedavisi için uzun süredir kullanılan son derece güvenli bir ilaçtır. Hayvan modellerini kullanan bir çok çalışmada EPO'nun nöronal hücre apoptozunu inhibe ederek; hücrelerin hayatta kalmasını ve farklılaşmasını uyararak; nörojenez ve nörotrofik fonksiyonları destekleyerek nöroprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Alnaeeli ve ark. 2012).

EPO'nun beyin yaralanmalarından sonra beyin fonksiyonlarının iyileşmesinde ve anatomik yıkımın azalmasında rol aldığı bildirilmektedir (Oshima ve diğ. 2018). Yapılan

bir çalışmada biyotinlenmiş rEPO'nun sağlıklı yetişkin sıçanlarda intraperitoneal uygulamadan 5 saat sonra sıçan beyninde kılcal damarların lümeninin etrafında bulunduğu, kan beyin bariyerini geçtiği, fokal iskemik inmede nöroprotektif etkilerinin olduğu, künt travmanın oluşturduğu hasarı azalttığı, kainat tarafından indüklenen nöbetlerin süresini ve şiddetini azalttığı, deneysel otoimmün ensefalomiyelitisin klinik şiddetini azalttığı gösterilmiştir (Brines ve ark. 2000).

EPO'nun glikozilasyonundaki değişiklikler onun invivo farmakokinetik ve farmakodinamik profillerini değiştirir. EPO'nun sahip olduğu dört glikozilasyon bölgesi onun invivo yarı ömrünü ve EPO-R üzerindeki etki gücünü düzenler. Sentetik rHuEPO epoetin alfa ve onun yakından ilişkili analogu DA olarak pazarlanmaktadır. Reseptör affinitesi epoetin alfaya göre düşük olmasına rağmen DA'nın göreceli etkinliği eşdeğer epoetin alfa ve DA dozları karşılaştırıldığında 3-4 kat daha fazladır (Thome 2008).

DA EPO'nun hipersialile edilmiş bir analoğudur ve EPO-R'lerini aktive ederek benzer fizyolojik etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. DA, EPO ile karşılaştırıldığında ek sialik asit içeren oligosakkaritlere sahip olan ve daha fazla invivo biyolojik aktivite gösteren eritropoezi uyarıcı bir ajandır. rHuEPO ile aynı reseptörü kullanan DA'nın içerdiği ek sialik asit parçası onun serumdaki yarı ömrünü rHuEPO'ya göre 3 kat uzatır. (Yılmaz ve ark. 2012). DA kronik böbrek yetmezliği, kemoterapi ve HIV enfeksiyonu ile ilişkili anemiyi tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kertmen ve ark. 2015; Belayev ve ark. 2005). Bilimsel çalışmalarda DA'nın da EPO gibi beyinde nörotrofik ve nöroprotektör olarak işlev gördüğüne dair ikna edici sonuçlar mevcuttur. Banks ve arkadaşları (2004) DA'nın nöroprotektif etkiden sorumlu olabilecek miktarlarda ekstraselüler yollar aracılığıyla kan-beyin bariyerinden geçtiğini bildirmiştir. EPO'nun hayvan modellerinde künt travma, hipoglisemi, deneysel alerjik ensefalomiyelit, kainat kaynaklı nöbetler, nöronal depolarizasyon, subaraknoid kanama ve düşük ATP seviyelerine neden olan koşullar tarafından indüklenen yaralanmalara karşı invivo olarak nöroprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Banks ve ark. 2004).

2.8. Asprosin

Dolaşıma salınan hepatik glikoz beyin fonksiyonları için ve özellikle de açlık durumunda hayatta kalma için gereklidir. Karaciğerden glikoz salınımı plazma glikoz seviyesini regüle eden bazı hormonlar tarafından belirlenir. Bu hormonlardan birisi olan

asprosin, salınımı açlıkta indüklenen glikojenik ve oreksijenik bir hormondur (Romere ve ark. 2016).

Romere ve ark. 2016 yılında Neonatal Progeroid Sendrom (NPS) üzerine yaptıkları genetik çalışma esnasında bu hormonu keşfetmişlerdir. İki NPS hastasında glikoz ve insülin homeostazisini incelediklerinde bu hastalarda öglisemi sürdürülürken, insülinin azaldığı gözlemlenmiştir. NPS'li hastalarda gece boyu aç kalmanın ardından ölçülen plazma insülin değerleri normal kişilere göre 2 kat düşük bulunmuştur. Genetik teşhis için bu 2 hasta ile daha önce NPS tanısı alan literatürdeki benzer 5 vakanın karşılaştırmasını yapmışlar; 7 hastanın hepsinde fibrillin 1 proteinini kodlayan genin (FBN1) 3' kısmına yakın bölümünde mutasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Tüm mutasyonlarda profibrillinin C terminal klivaj ürününün olmadığını (asprosin) gözlemlemişlerdir. Kaynağının beyaz adipoz doku olduğu ortaya çıkanca Grekçe beyaz (aspros) kelimesine benzeyen asprosin adını vermişlerdir. Asprosin profibrillin'in C-terminal bölünme ürünüdür ve FBN1'in son iki eksonu tarafından kodlanır. Toplamda 140 amino asitten oluşan asprosinin 11 amino asidini ekson 65, 129 amino asidini ise ekson 66 kodlar. Tüm insan dokularının FBN1 mRNA profili incelendiğinde mRNA ekspresyonunun en fazla adipoz dokuda olduğu bulunmuştur (Romere ve ark. 2016).

İnsan plazmasında, fare embriyonik fibroblastlarının ortamında, kültüre edilmiş adiposit hücre lizatında ve fare beyaz adipoz doku lizatında asprosinin molekül ağırlığı 30 kDA'dur. Bakteriyal rekombinant asprosini insandaki asprosinden farklı olarak 3 tane N bağımlı glikolizasyon alanı bulundurmadığı için 17 kDA ağırlığındadır. Asprosinin plazma seviyesi insan, fare ve ratlarda nM düzeylerdedir. Dolaşımdaki asprosin seviyesi açlık durumunda artar ve yemekten sonra azalır. Kan glikozu negatif feedback yoluyla plazma asprosin düzeyi üzerinde baskılayıcı bir role sahiptir. Gece boyunca aç kalma insanlarda, farelerde ve sıçanlarda dolaşımdaki asprosin seviyesinde artışa neden olur. Asprosinin yarı ömrü yaklaşık 20 dk, peak seviyesi 20 dk sonra 50 nM'dır (Romere ve ark. 2016).

Asprosin hepatositlerde olfaktör reseptöre (OLFR734) bağlandıktan sonra (Li ve ark. 2019) G-protein-cAMP-PKA yolunu aktive ederek hücre içi cAMP seviyelerini artırır ve glikozun hızlı bir şekilde dolaşıma salınmasına neden olur (Romero ve ark. 2016). Dolaşımdaki asprosin kan-beyin bariyerini geçerek cAMP yoluyla oreksijenik AgRP nöronlarını doğrudan aktive eder. Böylece anoreksijenik POMC nöronları inhibe

olur. Bu da iştah uyarımına ve adiposite ve vücut ağırlığını biriktirme hareketine yol açar (Duerrschmid ve ark. 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 11.11.2019 tarihli, T2019-360 sayılı toplantıda 6 nolu karar ile onaylanmıştır. Çalışma boyunca etik kurulun belirlediği etik kurallara uyulmuştur.

3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi

Çalışmamız Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde üretilen 10 haftalık Wistar-Albino cinsi 50 adet erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Deney boyunca tüm sıçanlar 22±2 °C oda ısısında, % 60±10 nem ortamında, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda ve sıçanlara özel olarak kullanılan kafeslerde barındırıldı. Tüm sıçanlar 30 günlük deney esnasında sıçanların beslenmesi için üretilen hazır standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendi. Hergün düzenli olarak kafeslerin temizliğinin yapılmasına dikkat edilerek yem ve suları değiştirildi.

3.2. Gruplar ve Deney Protokolü

Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip sıçanlar her bir gruptaki sıçanların ağırlıklarının ortalaması birbirine yakın olacak şekilde gruplandırıldı. Çalışmamızdaki bütün sıçanların vücut ağırlıkları deneyin başında, deney boyunca haftada bir ve deneyin sonunda tartıldı. Çalışmamızda rastgele seçilen 10'ar adet sıçandan 5 grup oluşturuldu.. Deney protokolü Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

1) Kontrol Grubu (n=10): 3,15 ml/kg serum fizyolojik (%0,9'luk NaCl) intragastrik gavaj (16 gauge'lık eğik modelde çelik besleme iğnesi kullanılarak) ile ardışık olarak 2 gün üst üste uygulama 2 gün ara verilecek şekilde periyodik olarak verildi. Ayrıca 1 ml/kg serum fizyolojik (DA grubu ile eşit miktarda ve aynı uygulama yoluyla) intraperitoneal olarak 3 günde 1 verildi.

2) Glikoz Grubu (n=10): Etanolle izokalorik miktarda 1,06 g/kg toz glikoz 3,15 ml distile su ile çözülerek glikoz çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 3,15 ml/kg dozunda intragastrik gavaj ile ardışık olarak 2 gün üst üste uygulama 2 gün ara verilecek şekilde periyodik olarak verildi. Ayrıca 1 ml/kg serum fizyolojik (DA grubu ile eşit miktarda ve aynı uygulama yoluyla) intraperitoneal olarak 3 günde 1 verildi.

3) Darbepoetin Alfa (DA) Grubu (n=10): 0,25 µg/kg DA (Aranesp 10µg) 1ml/kg serum fizyolojik solüsyonu içinde intraperitoneal olarak 3 günde 1 verildi (Özkurt ve diğ. 2018). 3,15 ml/kg serum fizyolojik (etanolle eşit hacimde ve aynı uygulama

yoluyla) intragastrik gavaj ile ardışık olarak 2 gün üst üste uygulama 2 gün ara verilmek suretiyle periyodik olarak verildi.

4) Etanol Grubu (n=10): %20'lik etanol çözeltisi, distile su ile etanolün (Merck Absolute Ethyl Alcohol, Purity ≥ %99,9. Darmstadt, Germany) karıştırılmasıyla elde edildi. 3 g/kg %20'lik etanol çözeltisi (3,15 ml/kg) intragastrik gavaj ile ardışık olarak 2 gün üst üste uygulama 2 gün ara verilecek şekilde periyodik olarak verildi. Ayrıca 1 ml/kg serum fizyolojik intraperitoneal olarak 3 günde 1 verildi.

5) Etanol + DA Grubu (n=10): 3 g/kg, % 20'lik etanol çözeltisi (3,15 ml/kg) intragastrik gavaj ile ardışık olarak 2 gün üst üste uygulama 2 gün ara verilecek şekilde periyodik olarak verildi. 0,25 µg/kg DA 1ml/kg serum fizyolojik solüsyonu içinde intraperitoneal olarak 3 günde 1 verildi.

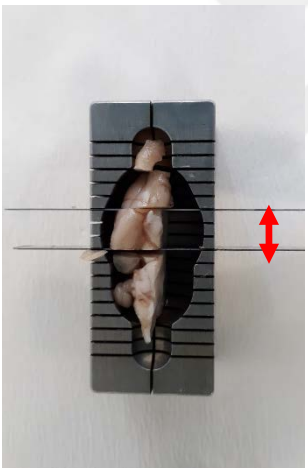
Tablo 3-1: Deney Protokolü

Gruplar	Madde	Doz	Yöntem	Verilme Sıklığı
Kontrol	Serum fizyolojik	3,15 ml/kg	İntragastrik Gavaj	2 gün uygulama, 2 gün ara
		1 ml/kg	İntraperitoneal Enjeksiyon	3 günde 1
Glikoz	Glikoz Çözeltisi	3,15 ml/kg	İntragastrik Gavaj	2 gün uygulama, 2 gün ara
	Serum fizyolojik	1 ml/kg	İntraperitoneal Enjeksiyon	3 günde 1
DA	Darbepoetin alfa	0,25 µg/kg	İntraperitoneal Enjeksiyon	3 günde 1
	Serum fizyolojik	3,15 ml/kg	İntragastrik Gavaj	2 gün uygulama, 2 gün ara
Etanol	Etanol	3,15 ml/kg	İntragastrik Gavaj	2 gün uygulama, 2 gün ara
	Serum fizyolojik	1 ml/kg	İntraperitoneal Enjeksiyon	3 günde 1
Etanol + DA	Etanol	3,15 ml/kg	İntragastrik Gavaj	2 gün uygulama, 2 gün ara
	Darbepoetin alfa	0,25 µg/kg	İntraperitoneal Enjeksiyon	3 günde 1

Deneyin 30. gününde intraperitoneal olarak uygulan 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altında intrakardiyak ponksiyon ile kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 10 dk 1000 RPM'de soğutmalı santrifüj cihazında (Hettich, Tuttlingen/ Germany) santrifüj edildikten sonra serum/plazma ayrılarak biyokimyasal analizleri yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Beyin dokusu çıkartılarak sağ ve sol hemisfer olmak

üzere ikiye ayrıldı. Sol hemisfer biyokimyasal incelemelerde kullanılmak üzere alüminyum folyoya sarılarak homojenizasyon yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Sağ hemisfer ise histopatolojik incelemede kullanılmak üzere %10'luk nötral tamponlu formaldehit içinde fikse edildi. Bir gün sonra tüm sıçanların sağ hemisferlerinden yetişkin sıçan beyni için tasarlanan 2 mm'lik aralıklara sahip çelik slicer kullanılarak (Şekil 3-1) yaklaşık olarak interaural 9 mm (anterior) ile interaural 3 mm (posterior) koordinatları arasına denk gelecek şekilde koronal kesitler alındı (Paxinos ve Watson 2007, 6. Edisyon, p.98, p.198). Dokular histopatolojik inceleme yapılana kadar tekrar %10'luk nötral tamponlu formaldehit içinde fikse edilmeye devam edildi.

Alınan karaciğer dokusu da %10'luk nötral tamponlu formaldehit içinde fikse edilerek işlemlendirildi.



Şekil 3-1: Makroskobik Olarak Koronal Kesit Alınan Bölgeler

3.3. Biyokimyasal Analizler

Glukometre cihazı (eBsensor, Visgeneer Inc., Hsinchu, Taiwan) ile deneyin başlangıcında, 15. günde ve 30. günde uygun test çubukları kullanılarak sıçanların kuyruk veninden uygun koşullarda alınan kanda açlık kan glikozu ölçümleri yapıldı.

Elde edilen serum örneklerinden nöronal dokudaki hasarı gösteren S100-β, NSE düzeyleri; lipit profilini göstermek için total kolestrol, trigliserit, HDL düzeyleri; kan glikozunun düzenlenmesinde rol alan insülin düzeyleri, CAT, GR seviyeleri ve GPx

enzim aktivitleri incelendi. Plazma örneklerinden ise kan glikozunu yükselten bir hormon olan asprosin düzeyleri incelendi.

Elde edilen beyin dokusu örneklerinden SOD ve GPx enzim aktiviteleri; CAT ve GR seviyeleri ile lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA düzeyleri incelendi. Ayrıca beyin dokusu örneklerinden S100-β, NSE, asprosin seviyeleri incelendi.

Homeostatik model değerlendirmesi-insülin rezistansı (Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance; HOMA-IR) değerleri "açlık kan glikozu (mg/dL) X açlık insülini (mIU/mL) /405" formülü ile hesaplandı. Hesaplamada açlık kan glikozu olarak deney sonunda ölçülen değerler kullanıldı. HOMA-IR skorunun ≥2,7 olması insülin direncinin pozitif olduğunu göstermektedir (Bilge ve ark. 2015).

3.3.1. Dokuların Homojenizasyonu ve Numunelerin Hazırlanması

Dondurucudan çıkarılan beyin dokuları çözdürüldükten sonra serum fizyolojik ile yıkandı ve yaş ağırlıkları tartıldı. 100 ml distile su içerisinde 1 tablet Phosphate buffered saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific) çözdürülerek 10 mM fosfat, 150 mM sodyum klorür içeren PBS tamponu (pH 7,4) hazırlandı. Mikrosantrifüj tüplerine alınan beyin dokularının üzerine PBS tamponu (100 mg doku örneği için 0,2 ml PBS tamponu) eklendi. Doku örnekleri homojenizatör cihazının (Next Avance Bullet Blender, Troy/ New York/USA) hızı 8'e, süresi 3 dakikaya ayarlanarak 2 defa homojenize edildi. Doku homojenatları +4 °C'de 10000 RPM'de 10 dk soğutmalı santrifüj cihazında (Sigma 3-18KS, An der Unteren Söse/Osterode am Harz/Germany) santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanlar daha önceden isimlendirilmiş tüplerin içerisine alındı.

3.3.2. ELİSA Yöntemi ile Yapılan Analizler

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELİSA) yöntemi ile yapılan analizlerde Bioassay Technology Laboratory (Zhejiang/China) firmasından temin edilen kitler kullanıldı. ELİSA yöntemi ile;

a) Serum örneklerinden S100-β, NSE, total kolestrol, trigliserit, HDL, insülin, CAT, GR seviyeleri ve GPx enzim aktivitesi incelendi.

b) Plazma örneklerinden asprosin seviyeleri incelendi.

c) Doku homejenatı örneklerinden CAT, GR, S100-β, NSE, asprosin seviyeleri ve GPx enzim aktivitesi incelendi.

Analizler sandwich ELİSA yöntemine göre yapılmıştır. Bu yönteme göre yapılacak olan analize uygun antikorla (yakalama antikoru) kaplanmış kuyucukların olduğu plakalar kullanılır. Kuyucuklara numune eklendikten sonra eklenen numunede bulunan antijen ile kuyucukta bulunan yakalama antikoru biribirine bağlanır. Analize uygun biyotinlenmiş antikor (işaretlenmiş deteksiyon antikoru) kuyucuğa eklenir. Deteksiyon antikoru yakalama antikoruna bağlanmış antijene farklı bir epitopundan bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş antikora bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama solüsyonu ile yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra substrat solüsyonu eklenir ve numunede bulunan antijen miktarı ile orantılı olarak mavi renk gelişir. Reaksiyon asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır ve 450 nm'de absorbans ölçülür.

ELİSA analizlerinde aşağıda listelenen işlemler sırasıyla uygulandı ve sonuçlar Biotek Elx800 (Santa Clara/California /ABD) marka ELİSA cihazı kullanılarak elde edildi:

1) Tüm reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.

2) Standart 120 µl orijinal standart solüsyonu 120 µl standart sulandırıcı (standart dilüent = standart 0) ile karıştırılarak her bir analiz için uygun standart stok (standart 5) solüsyonu hazırlandı.

3) Standart stok solüsyonu 1:2 oranında seri dilüsyon yapılarak sırayla her bir analiz için uygun konsantrasyonlarda standart 4 (120 µl standart 5 solüsyonu + 120 µl standart dilüent solüsyonu), standart 3 (120 µl standart 4 solüsyonu + 120 µl standart dilüent solüsyonu), standart 2 (120 µl standart 3 solüsyonu + 120 µl standart dilüent solüsyonu) ve standart 1 (120 µl standart 2 solüsyonu + 120 µl standart dilüent solüsyonu) solüsyonları hazırlandı.

4) Yıkama tamponunun hazırlanması: 500 ml 1x (1 defa yıkama için) yıkama tamponu elde etmek için 20 ml yıkama tamponu konsantresi 25 kat deiyonize su ile seyreltildi.

5) ELİSA plakası üzerindeki önceden yeri belirlenen standart kuyucuklarından herbirine sırayla orjinal standart solüsyonü ve hazırlanan standartlardan 50'şer µl eklendi. Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuklarına ayrıca antikor eklenmedi.

6) Önceden yerleri planlanmış şekilde her bir kuyucuğa serum/plazma veya doku homejenatı numunelerinden sırayla 40'ar µl pipetlendi.

7) Numune kuyucuklarına çalışılacak her bir analiz için uygun olan 10 µl antikor eklendi.

8) Numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50'şer µl streptavidin-HRP eklendi.

9) ELİSA plakasının üzeri kapatıcı ile kapatıldı ve 37°C'de 60 dk inkübe edildi.

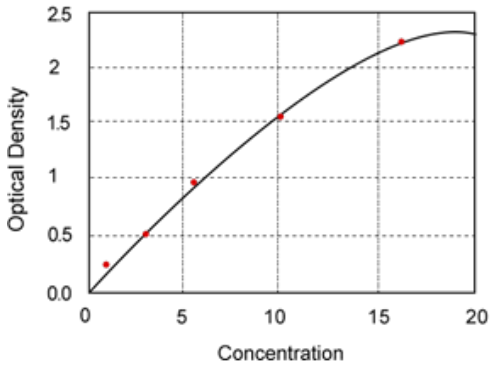
10) Plakanın üzeri açıldı ve her yıkamada kuyucuklar en az 0,35 ml yıkama tamponu ile 30 sn-1dk arasında ıslanacak şekilde plaka yıkama tamponu ile mikroplaka yıkayıcısı (Biotek Elx50, Santa Clara/California /ABD) kullanılarak 5 kez yıkandı.

11) Her bir kuyucuğa 50 µl substrat A solüsyonu ve ardından her kuyucuğa 50 µl substrat B solüsyonu eklendi. Plaka yeni bir kapatıcı ile kaplandı ve karanlıkta 37°C'de 10 dk inkübe edildi.

12) Her kuyucuğa 50 µl sonlandırma (stop) solüsyonu eklendi.

13) Stop solüsyonu ekledikten sonra 10 dk içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroplaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluk (OD) değeri belirlendi.

14) Y ekseninde her standart için ortalama OD'yi X ekseninde konsantrasyonun yer aldığı aşağıdaki örnek şekilde gösterildiği gibi standart eğri oluşturuldu ve herbir analiz için numune kuyucuklarından okunan OD değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplandı.



Şekil 3-2: ELİSA Analizleri İçin Çizilen Standart Eğri Örneği

3.3.3. Spektofotometrik Yöntemle Yapılan Analizler

Spektofotometrik yöntem kullanılarak doku homojenatı örneklerinden SOD enzim aktivitesi ve MDA düzeyleri belirlendi.

3.3.3.1. SOD Enzim Aktivitesi

SOD enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının 1988 yılında yayınladıkları makalede yer alan metoda göre ve Durak ve arkadaşlarının 1993 yılında yayınladıkları makalede ifade ettikleri modifikasyona göre belirlendi. Bu metoda göre ksantin-ksantin oksidaz sistemi aracılığıyla oluşturulan $O_2^{\cdot-}$ radikali SOD enziminin bulunmadığı veya aktivitesinin düşük olduğu bir ortamda nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek mavi-mor renkli bileşiklerin oluşumuna neden olur. Oluşan bu renkli formazon 560 nm'de maksimum düzeyde absorbans verir.

Reaktiflerin hazırlanışı;

pH'sı 10,2 olarak ayarlanan 40 ml ksantin çözeltisi (0,3 mmol/L), 20 ml Na_2EDTA çözeltisi (0,6 mmol/L), 20 ml NBT (150 µmol/L), 12 ml Na_2CO_3 (400 mmol/L), 6 ml bovine serum albümin (1 g/L) karıştırlarak 98 ml substrat çözeltisi elde edildi. 3 ml 2M'lık $(NH_4)_2SO_4$ ile 18 µl XO (167 U/l) enzimi eklenerek XO çözeltisi hazırlandı.

Kör tüpünün (SOD aktivitesi olmayan tüp) hazırlanışı;

1 ml subsrat çözeltisine 100 µl su ve 50 µl XO çözeltisi eklendi. Karışım 25 °C'de 20 dk karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı. Sonra reaksiyonu durdurmak için ortama 50 µl $CuCl_2$ eklendi ve suya karşı 560 nm dalga boyunda absorbansı okundu.

Örneklerin çalışılması;

100 µl örneğin üzerine 1 ml substrat çözeltisi ve 50 µl XO çözeltisi eklendi. Karışım 25 °C'de 20 dk karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı. Sonra reaksiyonu durdurmak için ortama 50 µl $CuCl_2$ eklendi ve reaktif körüne karşı 560 nm dalga boyunda absorbansı okundu. Absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki formülden elde edilen inhibisyon oranına göre SOD aktivitesi hesaplandı. NBT'nin indirgenmesini %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi bir SOD ünitesi olarak kabul edildi.

İnhibisyon oranı =Ablank- Aörnek/Ablank

Ablank: Körün absorbansı

Aörnek: Örneğin absorbansı

3.3.3.2. MDA Düzeyleri

Beyin dokusunda MDA düzeyleri Buege ve Aust'un (1978) metoduna göre belirlendi. Bu metod lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532-535 nm'de maksimum absorbans veren pembe renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. 250 µl örneğin üzerine 1,5 ml %0,75'lik TBA çözeltisi, 1 ml %30'luk trikloroasetik asit ve 0,2 ml 5 M'lık HCl çözeltisi eklenerek 95 °C'de 15 dk kaynatıldı ve soğutuldu. Spektrofotometrede 532 nm'de ölçüm yapıldıktan sonra MDA-TBA kompleksinin absorbans katsayısı ($1,56 \times 10^5$ cm^{-1} M^{-1}) kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı.

3.4. Histopatolojik İncelemeler

Işık mikroskobunda yapılan incelemeler için %10'luk nötral tamponlu formaldehit içinde fikse edilen sıçan beyni sağ hemisferleri ve karaciğer dokusu kullanıldı. Doku örnekleri 1 gece boyunca akan çeşme suyunun altında tutuldu. Daha sonra dokular sırayla derecesi artan alkol serilerinden (%70x1 saat, %90x1 saat, %96x1 saat, %100x2 saat) geçirilerek dehidrate edildi. Dokular saydamlaştırma aşaması için 3 defa 15'er dk toluende bekletildi. Dokular 1 gece yumuşak parafinde, daha sonra 1 saat sıvı sert parafinde tutulduktan sonra parafine gömüldü.

Beyin dokusunda boyama işleminden önce hipokampüsün dentat girusunu (yaklaşık olarak interaural 6,48-6,00 mm aralığına ulaşıldı) (Paxinos ve Watson 2007, 6. Edisyon, p.140, p.148) bulmak için mikrotomda trimlemeler yapıldı. Sonra 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan beyin dokusu kesitlerine iki farklı boya kombinasyonu [hematoksilen-eozin (H-E) ve luxol fast blue- cresyl violet] uygulandı. Karaciğer dokusundan 5 µm kalınlığında alınan kesitlere ise H-E boya kombinasyonu uygulandı. Boyanmış preparatlar ışık mikroskobunda (Olympus CX41-Japan) incelendi. Preparatların 20X ve 40X büyütmede fotoğrafları çekildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatiksel analizlerin yapılmasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilgi İşlem Daire Başkanlığı'nın web sayfasında yer alan IBM.SPSS Version 21 programı (SPSS, Chicago, IL, USA) kullanıldı. Gruplar arasındaki değişiminin incelenmesi için önce One Way Anova varyans analizi testi yapıldı. Anlamlı çıkan sonuçlar için gruplar arasındaki

karşılaştırmalar ise Student-t testi ile değerlendirildi. Pearson korelasyon analiziyle değerler arasındaki ilişkiler hesaplandı. “p” değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. SOD, MDA, CAT, GR ve GPx Değerleri

Tüm gruplara ait SOD, MDA, CAT, GR ve GPx değerleri Tablo 4-1 ve Tablo 4-2'de, dağılımları Şekil 4-1 ve Şekil 4-2'de gösterilmiştir.

Beyin dokusunda SOD enzim aktiviteleri etanol grubunda kontrol ve glikoz gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). Etanol+DA grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0,05$).

Beyin dokusunda MDA düzeyleri etanol grubunda kontrol, glikoz ve DA gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p<0,001$). Etanol+DA grubunda ise kontrol ($p<0,001$) ve glikoz ($p<0,01$) grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek; etanol grubuna ($p<0,001$) göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu.

Beyin dokusunda CAT düzeyleri etanol grubunda kontrol ($p<0,05$) ve glikoz ($p<0,01$) gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Serum CAT düzeyleri etanol grubunda kontrol ($p<0,001$), glikoz ($p<0,01$) ve DA ($p<0,01$) gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Serum CAT düzeyleri glikoz ve DA gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). Serum CAT düzeyleri etanol+DA grubunda kontrol ($p<0,001$) ve glikoz ($p<0,05$) grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük; etanol grubuna ($p<0,05$) göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu.

Beyin dokusunda GR düzeyleri etanol grubunda kontrol ($p<0,01$), glikoz ($p<0,01$) ve DA ($p<0,05$) gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Etanol+DA grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). Serum GR düzeyleri etanol ve etanol+DA gruplarında kontrol, glikoz ve DA gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0,001$).

Beyin dokusunda GPx aktiviteleri etanol grubunda kontrol ($p<0,001$), glikoz ($p<0,01$) ve DA ($p<0,01$) gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Etanol+DA grubunda ise kontrol grubuna ($p<0,05$) göre anlamlı bir şekilde düşük, etanol grubuna ($p<0,05$) göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Serum GPx aktiviteleri etanol grubunda kontrol ve glikoz gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0,05$).

Tablo 4-1: SOD, MDA ve CAT Değerleri

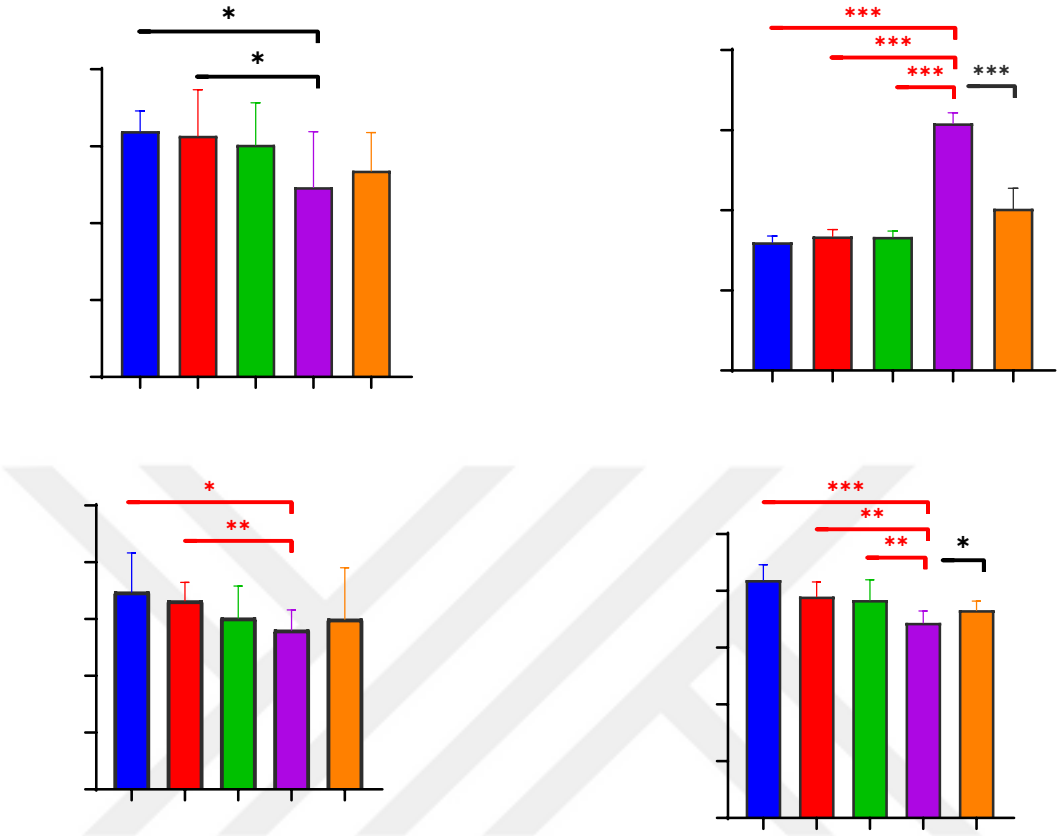
	Kontrol (K)	Glikoz (G)	DA	Etanol (E)	Etanol+DA
Doku SOD (U/ml/ıslak ağırlık)	1,60± 0,19	1,57± 0,30	1,51± 0,28	1,23± 0,36*•	1,34± 0,25*
Doku MDA (µmol/L/ıslak ağırlık)	16,00±0,80	16,73±0,87	16,69±0,71	30,87±1,32***•••▲▲▲	20,20±2,56***•••♦♦♦▲▲▲
Doku CAT (ng/ml/ıslak ağırlık)	17,38± 3,45	16,60± 1,62	15,08± 2,83	14,02± 1,78*••	15,00± 4,52
Serum CAT (ng/ml)	20,96±1,35	19,50±1,29*	19,20±1,78*	17,19±1,03***••▲▲	18,31±0,80***•♦

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)*, (p<0,01)**, (p<0,001)***
G grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)•, (p<0,01)••, (p<0,001)•••
E grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)♦, (p<0,001) ♦♦♦
DA grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)▲, (p<0,01)▲▲, (p<0,01)▲▲▲

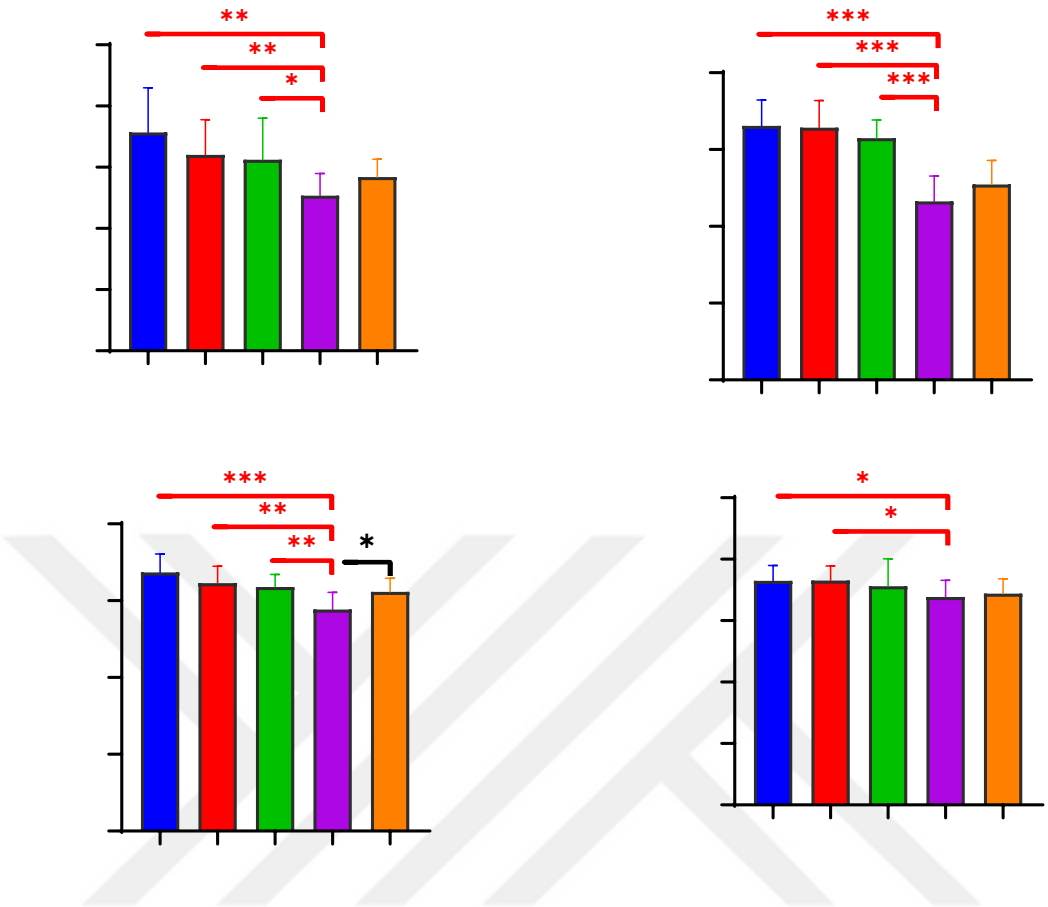
Tablo 4-2: GR ve GPx Değerleri

	Kontrol (K)	Glikoz (G)	DA	Etanol (E)	Etanol+DA
Doku GR (ng/ml/ıslak ağırlık)	17,84± 3,65	16,00±2,89	15,61± 3,40	12,67±1,81**••▲	14,21± 1,44*
Serum GR (ng/ml)	16,55± 1,69	16,43±1,76	15,74±1,18	11,62±1,66***•••▲▲▲	12,72±1,58***•••▲▲▲
Doku GPx (U/ml/ıslak ağırlık)	168,37±12,07	161,36±11,01	158,96±8,12	144,27±11,14***••▲▲	155,69±8,90*♦
Serum GPx (U/ml)	182,39± 12,54	182,65±11,73	177,95±22,42	169,25± 13,58*•	172,01± 12,10

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)*, (p<0,01)**, (p<0,001)***
G grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)•, (p<0,01)••, (p<0,001)•••
E grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)♦
DA grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)▲, (p<0,01)▲▲, (p<0,001)▲▲▲



Şekil 4-1: SOD, MDA ve CAT Dağılımları (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)



Şekil 4-2: GR ve GPx Dağılımları (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

4.1.2. NSE ve S100-β Değerleri

Tüm gruplara ait NSE ve S100-β değerleri Tablo 4-3'te, dağılımları Şekil 4-3'te gösterilmiştir.

Beyin dokusunda NSE düzeyleri etanol grubunda kontrol ve glikoz gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu (p<0,05). Serum NSE düzeyleri etanol grubunda kontrol (p<0,01), glikoz (p<0,01) ve DA (p<0,05) gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Serum NSE düzeyleri etanol+DA grubunda etanol grubuna (p<0,05) göre anlamlı bir şekilde düşük, kontrol grubuna (p<0,01) göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu.

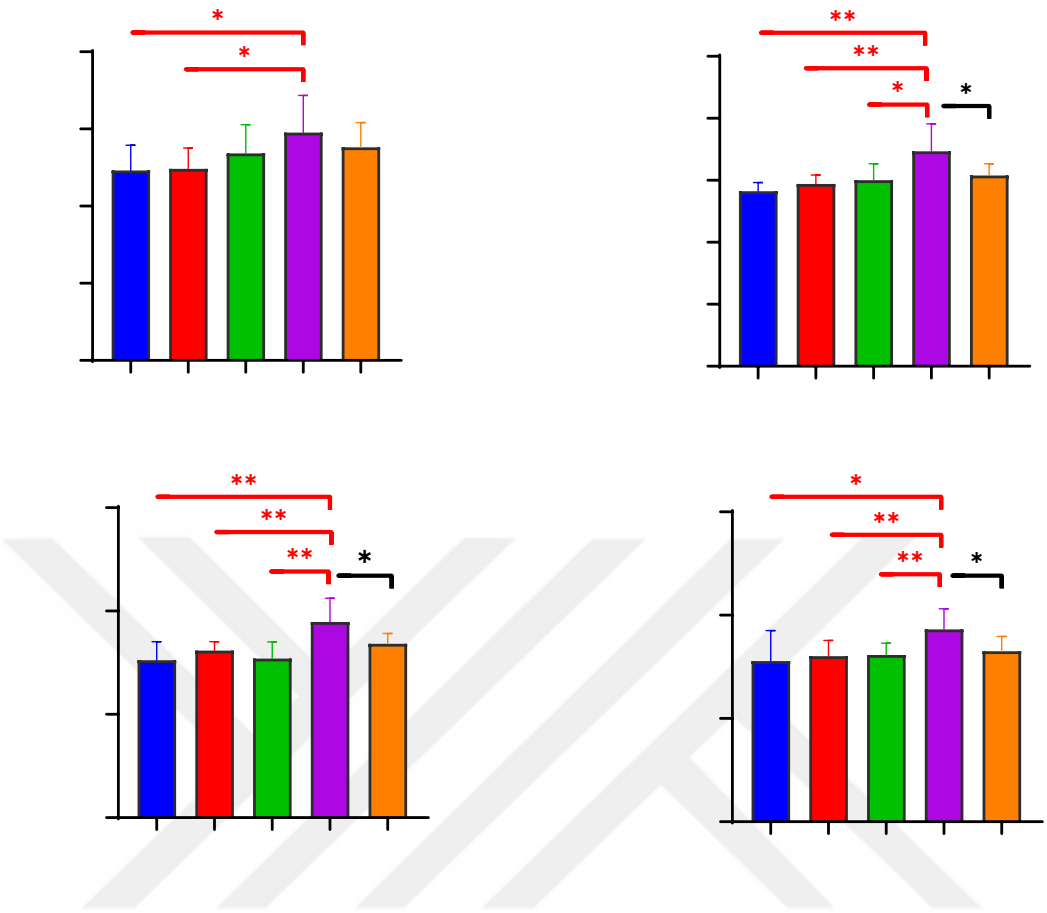
Beyin dokusunda S100-β düzeyleri etanol grubunda kontrol, glikoz ve DA gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu (p<0,01). Beyin dokusunda S100-β düzeyleri etanol+DA grubunda etanol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük, DA ve

kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu (p<0,05). Serum S100-β düzeyleri etanol grubunda kontrol (p<0,05), glikoz (p<0,01) ve DA (p<0,01) gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Serum S100-β düzeyleri etanol+DA grubunda etanol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu (p<0,05).

Tablo 4-3: NSE ve S100-β Değerleri

	Kontrol (K)	Glikoz (G)	DA	Etanol (E)	Etanol+DA
Doku NSE (mmol/L/ıslak ağırlık)	4,93± 0,65	4,97± 0,54	5,37± 0,75	5,90± 0,96*•	5,52± 0,64
Serum NSE (mmol/L)	5,65± 0,28	5,88± 0,29	6,01 ± 0,53	6,94±0,88**••▲	6,15±0,38**♦
Doku S100-β (pg/ml/ıslak ağırlık)	76,16± 9,00	80,86±4,31	76,97±8,11	94,72±11,41**••▲▲	84,17±4,97*♦▲
Serum S100-β (pg/ml)	77,76±14,81	80,18±7,60	80,76±5,67	93,08±10,05*••▲▲	82,61±7,13♦

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)*, (p<0,01)**
G grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)•, (p<0,01)••
E grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)♦
DA grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)▲, (p<0,01)▲▲



Şekil 4-3: NSE ve S100-β Dağılımları (*p<0,05, **p<0,01)

4.1.3. Açlık Kan Glikozu, İnsülin ve HOMA-IR Değerleri

Tüm gruplara ait açlık kan glikozu, insülin ve HOMA-IR değerleri Tablo 4-4'de, dağılımları Şekil 4-4'de gösterilmiştir.

Deneyin ilk günü, 15. ve 30. gününde sıçanların kuyruk veninden alınan kan örneğinden kan glikozu ölçümleri yapıldı. Grupların 1. günde ölçülen kan glikozu düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$). Açlık kan glikozunun 15. günde DA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0,05$). Açlık kan glikozunun 30. günde ise etanol+DA grubunda glikoz grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0,05$).

Serum insülin seviyeleri DA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). Serum insülin seviyeleri etanol+DA grubunda ise kontrol

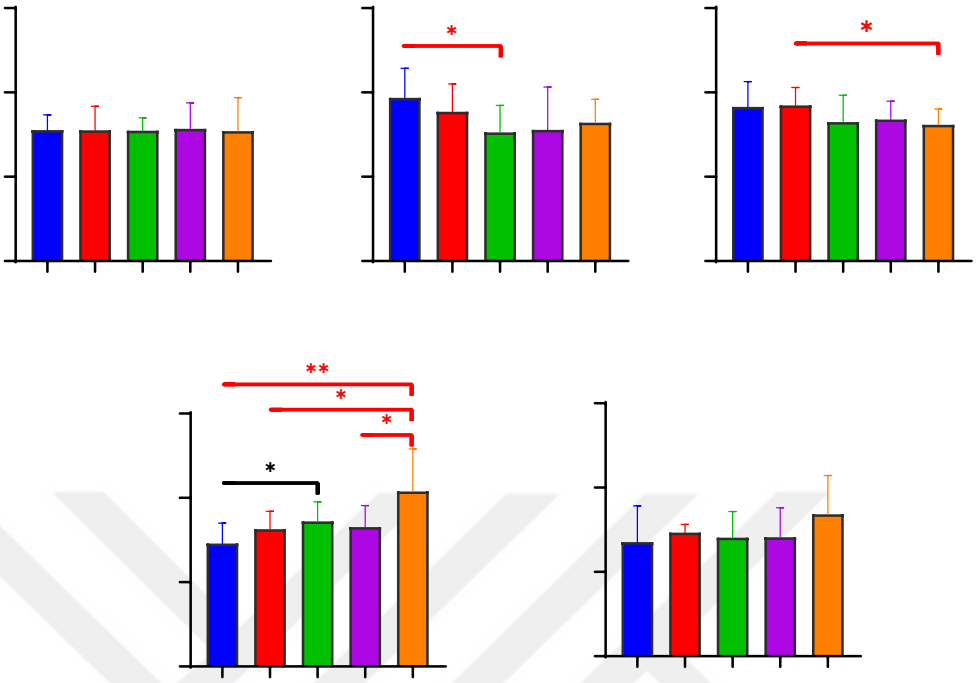
(p<0,01), glikoz (p<0,05) ve etanol (p<0,05) gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu.

Tüm gruplarda HOMA-IR değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (p>0,05).

Tablo 4-4: Açlık Kan Glikozu, İnsülin ve HOMA-IR Değerleri

	Kontrol (K)	Glikoz (G)	DA	Etanol (E)	Etanol+DA
1. Gün Açlık Kan Glikozu (mg/dl)	77,70± 8,96	77,60± 14,25	77,30± 7,69	78,40± 15,41	77,10± 19,80
15. Gün Açlık Kan Glikozu (mg/dl)	96,80±17,54	88,60±16,51	76,30±15,99*	77,80±25,36	82,00±13,98
30. Gün Açlık Kan Glikozu (mg/dl)	91,40±15,03	92,30±10,63	82,40±15,88	83,90±10,96	80,80±9,45•
Serum İnsülin (mIU/L)	2,92 ±0,48	3,26±0,43	3,44±0,47*	3,31±0,51	4,15±1,01**•♦
HOMA-IR	0,68± 0,22	0,73±0,17	0,70±016	0,70±0,17	0,84±0,23

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)*, (p<0,01)**
G grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır (p<0,05)•
E grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. (p<0,05)♦



Şekil 4-4: Açlık Kan Glikozu, İnsülin ve HOMA-IR Dağılımları (*p<0,05, **p<0,01)

4.1.4. Asprosin, İnsülin, HDL, Total Kolesterol ve Trigliserit Değerleri

Tüm gruplara ait asprosin, insülin, HDL, total kolesterol ve trigliserit değerleri Tablo 4-5'te, dağılımlar Şekil 4-5'te gösterilmiştir.

Tüm gruplarda plazmada ve beyin dokusunda asprosin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$).

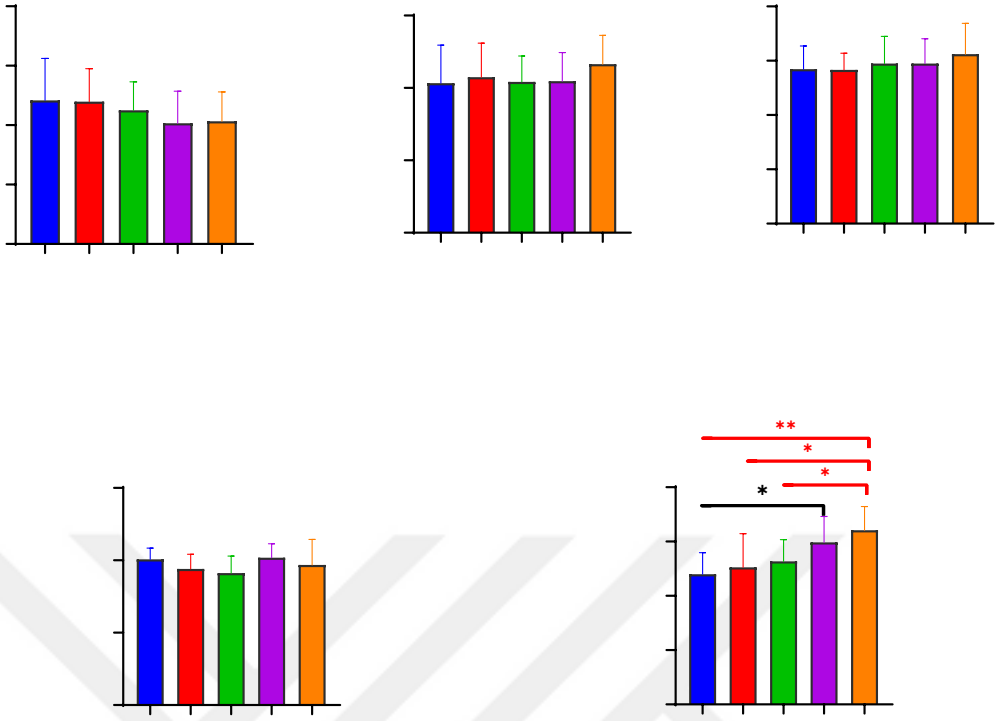
Tüm grupların serum HDL ve total kolesterol düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Serum trigliserit seviyeleri DA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). Serum trigliserit seviyeleri etanol+DA grubunda kontrol ($p<0,01$), glikoz ($p<0,05$) ve etanol ($p<0,05$) gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu.

Tablo 4-5: Asprosin, HDL, Total Kolesterol ve Trigliserit Değerleri

	Kontrol (K)	Glikoz (G)	DA	Etanol (E)	Etanol+DA
Doku Asprosin (ng/ml/ıslak ağırlık)	1,21 ± 0,35	1,20 ± 0,28	1,13 ± 0,24	1,02 ± 0,27	1,03 ± 0,25
Plazma Asprosin (ng/ml)	1,03 ± 0,26	1,07 ± 0,23	1,04 ± 0,18	1,05 ± 0,20	1,16 ± 0,20
Serum HDL (mmol/L)	0,57±0,09	0,57±0,06	0,59±0,10	0,59±0,09	0,62±0,11
Serum Total kolesterol (mmol/L)	1,01±0,08	0,94±0,10	0,91±0,12	1,02±0,10	0,97±0,18
Serum Trigliserit (mmol/L)	479,79±79,19	504,70±124,06	596,87±95,25*	526,78±79,97	641,47±87,28**♦♦

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. ($p<0,05$)*, ($p<0,01$)**
G grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. ($p<0,05$)●
E grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. ($p<0,05$)♦



Şekil 4-5:Asprosin, İnsülin, HDL, Total Kolesterol ve Trigliserit Dağılımları (*p<0,05, **p<0,01)

4.1.5. Asprosin ile Kan Glikozu, İnsülin, HDL, Total Kolesterol ve Trigliserit Değerleri Arasındaki Korelasyonlar

Tüm gruplara ait asprosin ile kan glikozu, insülin, HDL, total kolesterol ve trigliserit değerleri arasındaki korelasyonlar Tablo 4-6'da gösterilmiştir.

Tüm grupların plazma asprosin seviyeleri ile deneyin 1. günü, 15. günü ve 30. gününde ölçülen kan glikozu seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir korelasyon olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Tüm grupların plazma asprosin seviyeleri ile serum insülin, HDL ve total kolesterol düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir korelasyon olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Etanol+DA grubunda plazma asprosin seviyeleri ile serum trigliserit seviyeleri arasında yüksek düzeyde pozitif bir korelasyon olduğu görüldü ($p<0,05$; $r=0,835$).

Tablo 4-6:Asprosin ile Kan Glikozu, İnsülin, HDL, Total Kolesterol veTrigliserit Değerleri Arasındaki Korelasyonlar

	Kontrol		Glikoz		DA		Etanol		Etanol+DA	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Kan Glikozu 1	0,359	AD	0,506	AD	-0,486	AD	0,200	AD	0,629	AD
Kan Glikozu 2	0,361	AD	0,390	AD	0,306	AD	-0,181	AD	0,501	AD
Kan Glikozu 3	0,418	AD	-0,193	AD	-0,012	AD	0,338	AD	-0,187	AD
İnsülin (serum)	-0,175	AD	0,315	AD	0,360	AD	-0,025	AD	0,630	AD
HDL (serum)	0,171	AD	0,114	AD	-0,055	AD	0,116	AD	-0,570	AD
Total kolesterol (serum)	-0,068	AD	-0,184	AD	-0,489	AD	-0,687	AD	0,530	AD
Trigliserit (serum)	-0,232	AD	0,108	AD	0,004	AD	-0,311	AD	0,835	0,039

AD: Anlamlı değil

4.2. Histopatolojik Bulgular

4.2.1. Beyin Dokusuna Ait Histopatolojik Bulgular

Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde beyin dokusunda hiperkromazinin varlığı, piknotik değişiklikler, nükleolus yokluğu ve nükleer sınırın belirgin bir şekilde kaybolması gibi değişikliklerin bulunması hücreyi ölüme götüren süreçleri ifade etmektedir. Değerlendirmeler gruplar hakkında önceden bilgisi olmayan bir patolog tarafından yapıldı. Seçilen boyanmış kesitler ikinci bir uzman tarafından incelendi. Piknotik nöronlar, kromatin yoğunlaşması olan ve genellikle hafif düzensiz konturlu nöronlar olarak tanımlandı. Granüler hücrelerde bu değişikliklerin %40'ın üzerinde

olması ağır düzeyde, %20-30 oranında olması orta düzeyde, %20'nin altında olması hafif düzeyde nörodejenerasyon olarak ifade edildi.

Histopatolojik değişiklikler asağıdaki gösterildiği gibi derecelendirildi.

0: Histopatolojik değişiklik yok.

1: Hafif düzeyde histopatolojik değişiklik var.

2: Orta düzeyde histopatolojik değişiklik var.

3: Ağır düzeyde histopatolojik değişiklik var.

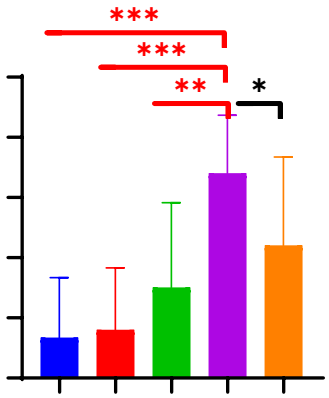
Tüm gruplarda hipokampüsün dentat gyrusuna ait kesitlerin nörodejenerasyon skorları Tablo 4-7'de ve Şekil 4-6'da gösterilmiştir.

Sıçanların hipokampüslerinin dentat gyrusunda oluşan nörodejenerasyonun etanol grubunda kontrol ($p<0,001$), glikoz ($p<0,001$) ve DA ($p<0,01$) gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü. Etanol+DA grubunda dentat gyrustaki nörodejenerasyonun etanol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük ($p<0,05$) olduğu, kontrol ve glikoz gruplarına göre ise anlamlı bir şekilde yüksek ($p<0,05$) olduğu görüldü.

Tablo 4-7: Dentat Gyrus'a Ait Nörodejenerasyon Skorları

	Kontrol (K)	**Glikoz (G)**	**DA**	**Etanol (E)**	**Etanol+DA**
Nörodejenerasyon	0,33±0,5	0,4±0,52	0,75±0,70	1,7±0,48***●●●▲▲	1,1±0,73*●♦

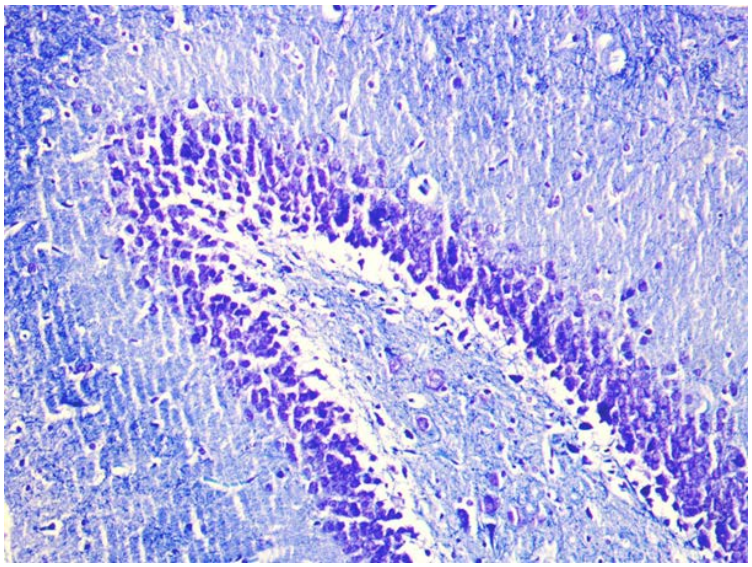
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. ($p<0,05$)*, ($p<0,01$)**, ($p<0,001$)***
G grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. ($p<0,05$)●, ($p<0,01$)●●, ($p<0,001$)●●●
E grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. ($p<0,05$)♦
DA grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklıdır. ($p<0,05$)▲, ($p<0,01$)▲▲



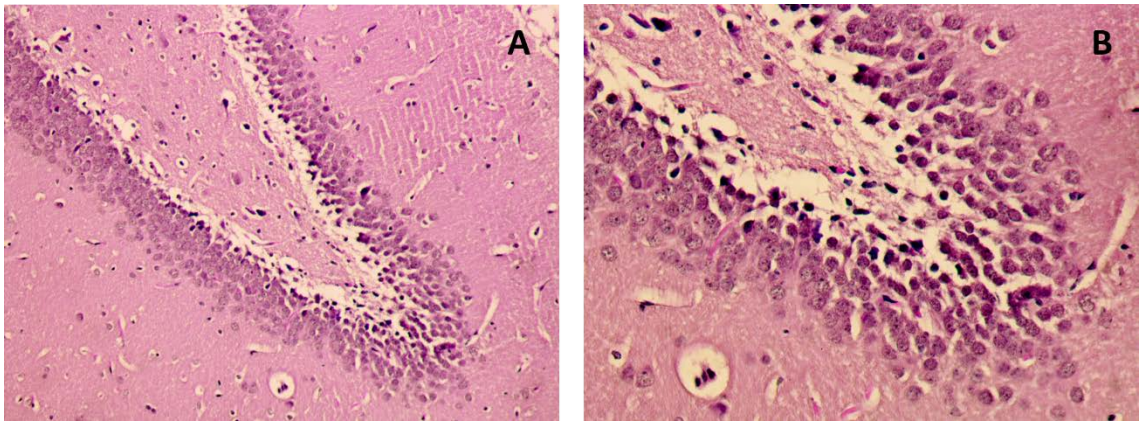
Şekil 4-6: Dentat Gyrus Nörodejenerasyon Skoru (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

4.2.1.1. Kontrol Grubunun Histopatolojik Bulguları

Şekil 4-7'de kontrol grubundaki sıçanların beyin dokularında hipokampüsün gyrus dentatus kısmının granüler tabakasına ait luxol fast blue-cresyl violet boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. Şekil 4-8'de ise kontrol grubundaki sıçanların beyin dokularında hipokampüsün gyrus dentatus kısmının granüler tabakasına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. Kontrol grubuna ait kesitlerin normal histolojik yapıda olduğu, ancak yine de çok az sayıda piknotik hücrelerin bulunduğu gözlemlendi.



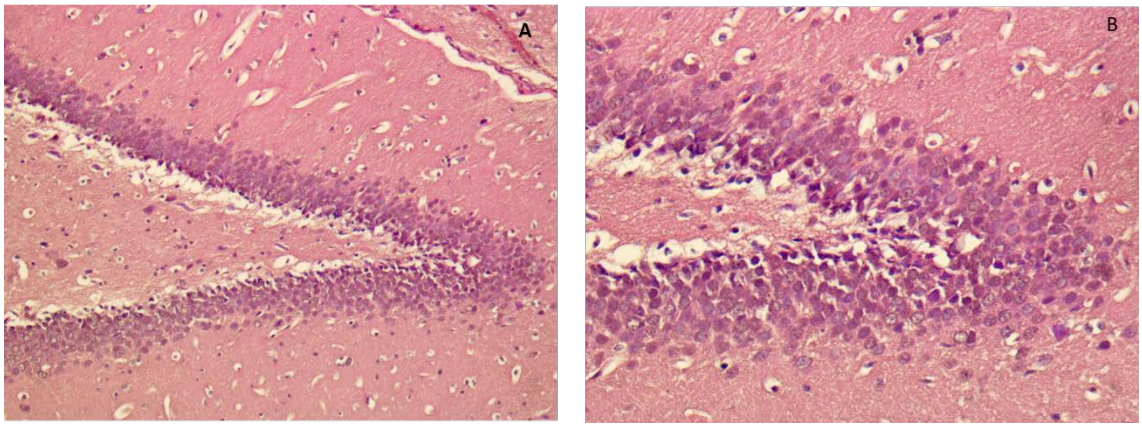
Şekil 4-7: Kontrol Grubuna Ait Luxol Fast Blue-Cresyl Violet Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (x200).



Şekil 4-8: Kontrol Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400).

4.2.1.2. Glikoz Grubunun Histopatolojik Bulguları

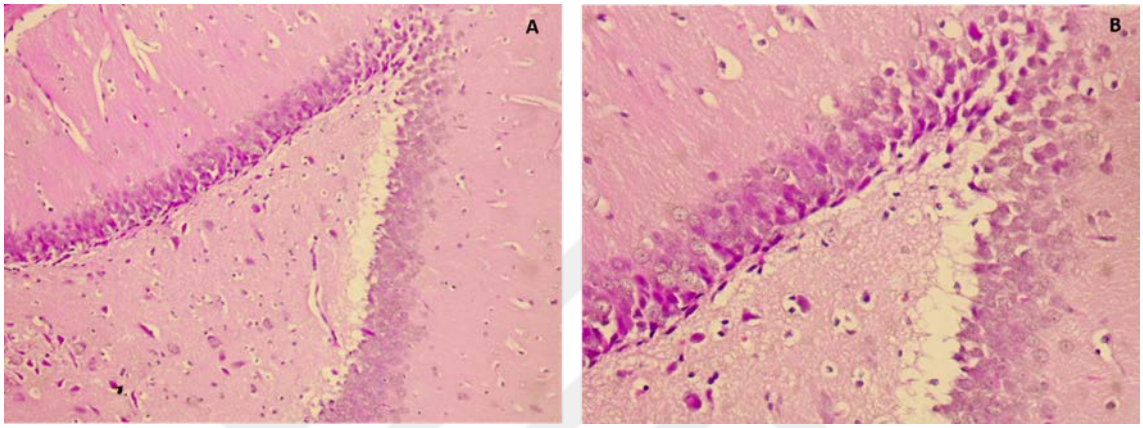
Şekil 4-9'da glikoz grubundaki sıçanların beyin dokularında hipokampüsün gyrus dentatus kısmının granüler tabakasına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. Glikoz grubuna ait kesitlerin normal histolojik yapıda olduğu, ancak yine de çok az sayıda piknotik hücrelerin bulunduğu gözlemlendi.



Şekil 4-9: Glikoz Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400).

4.2.1.3. DA Grubunun Histopatolojik Bulguları

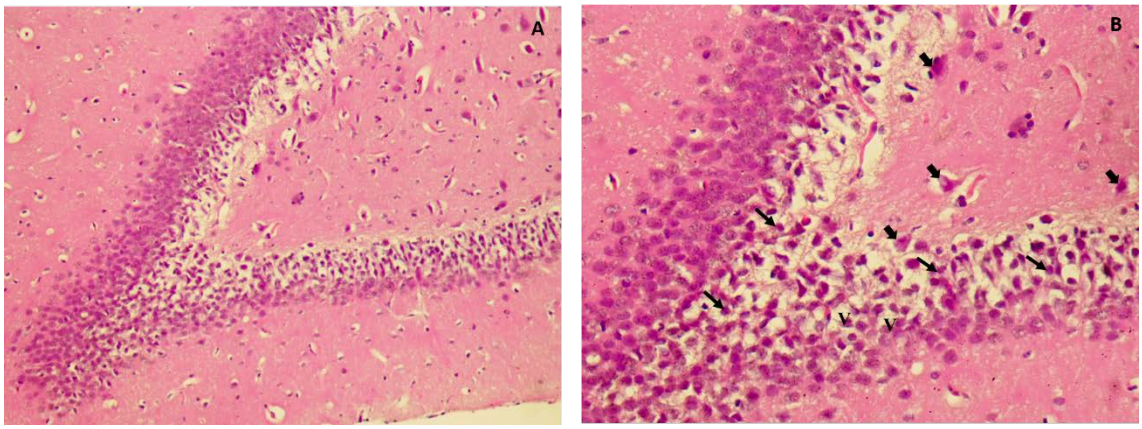
Şekil 4-10'da DA grubundaki sıçanların beyin dokularında hipokampüsün gyrus dentatus kısmının granüler tabakasına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. DA grubuna ait kesitlerin normal histolojik yapıda olduğu, ancak yine de çok az sayıda piknotik hücrelerin bulunduğu gözlemlendi.



Şekil 4-10: DA Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400).

4.2.1.4. Etanol Grubunun Histopatolojik Bulguları

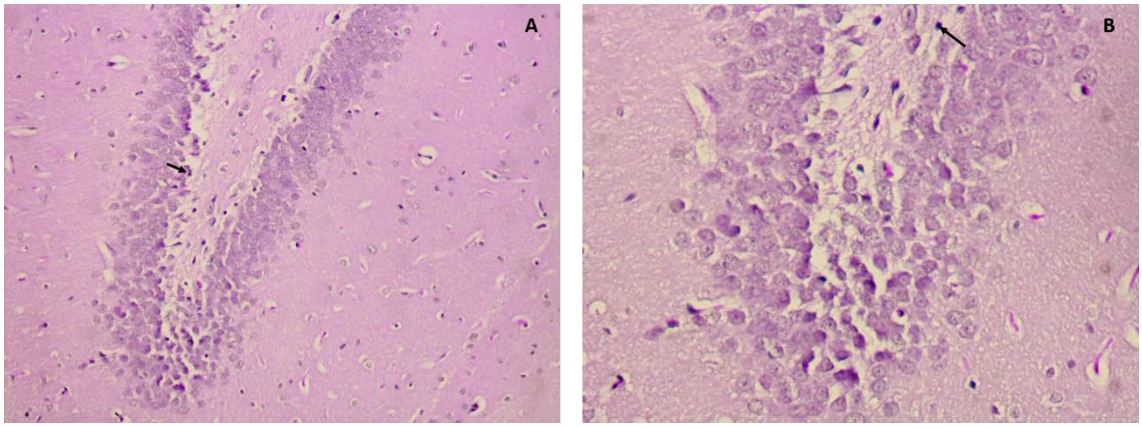
Şekil 4-11'de etanol grubundaki sıçanların beyin dokularında hipokampüsün gyrus dentatus kısmının granüler tabakasına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. Yapılan değerlendirmeye göre etanol grubunda çok sayıda piknotik nöron, iskemik kırmızı nöron ve vakuollerin bulunduğu orta düzeyde nörodejenerasyon olduğu gözlemlendi.



Şekil 4-11: Etanol Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400). ⟶ : Pignotik hücre, ➡ : İskemik kırmızı nöron, V: Vakuol

4.2.1.5. Etanol+DA Grubunun Histopatolojik Bulguları

Şekil 4-12'de etanol+DA grubundaki sıçanların beyin dokularında hipokampüsün gyrus dentatus kısmının granüler tabakasına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. Etanol+DA grubunda etanol grubuyla kıyaslandığında az sayıda piknotik hücrelerin bulunduğu hafif düzeyde nörodejenerasyonun olduğu gözlemlendi.



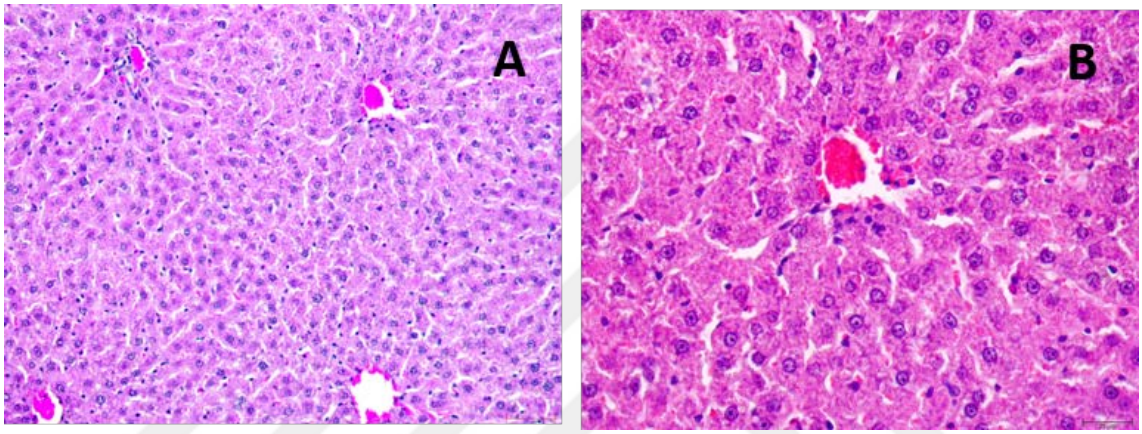
Şekil 4-12: Etanol+DA Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Gyrus Dentatus'un Granüler Tabakası (A:X200, B:X400). ⟶ : Piknotik hücre

4.2.2. Karaciğer Dokusuna Ait Histopatolojik Bulgular

Karaciğer kesitlerinde hasarlı hepatositler, sinüzoidal dilatasyon, kanama ve ayrıca inflamatuar hücre infiltrasyonu değerlendirildi.

4.2.2.1. Kontrol Grubunun Histopatolojik Bulguları

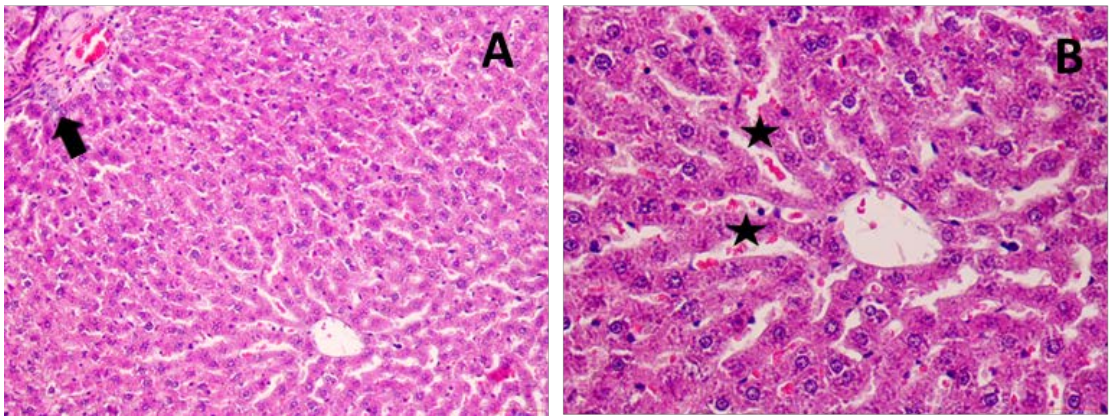
Şekil 4-13'te kontrol grubunun karaciğer dokularına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. Kontrol grubuna ait karaciğer dokuları incelendiğinde normal histolojik yapıda olduğu tespit edildi.



Şekil 4-13:Kontrol Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400).

4.2.2.2. Glikoz Grubunun Histopatolojik Bulguları

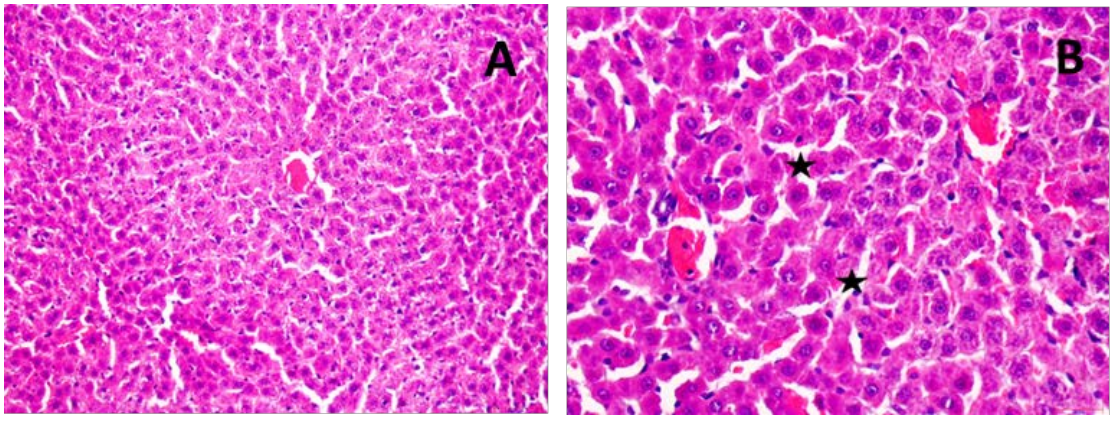
Şekil 4-14'de glikoz grubunun karaciğer dokularına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. Glikoz grubunda yer alan sıçanların karaciğer dokusuna ait kesitlerde portal alanda inflamatuar hücre infiltrasyonu gözlenirken periasiner bölgedeki sinüzoidlerde dilatasyon ve yer yer hiperemi gözlendi.



Şekil 4-14: Glikoz Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400). ➡: inflamatuar hücre infiltrasyonu, ★: Dilatasyon

4.2.2.3. DA Grubunun Histopatolojik Bulguları

Şekil 4-15'te DA grubunun karaciğer dokularına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. DA grubunda yer alan sıçanların karaciğer dokusuna ait kesitlerde hücresel parankim kontrol grubuna yakın özellikler göstermesine rağmen yer yer sinüzoidal dilatasyonlar görüldü. Vena sentralis çevresinde hafif düzeyde mikroveziküler yağ birikimleri izlendi.

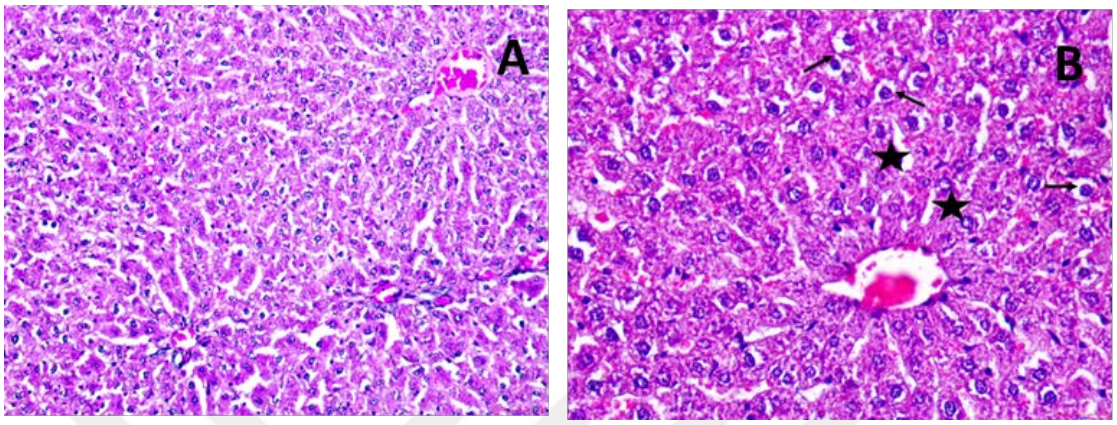


Şekil 4-15: DA Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400). ★: Dilatasyon

4.2.2.4. Etanol Grubunun Histopatolojik Bulguları

Şekil 4-16'da etanol grubunun karaciğer dokularına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. Etanol grubunda bulunan sıçanların karaciğer

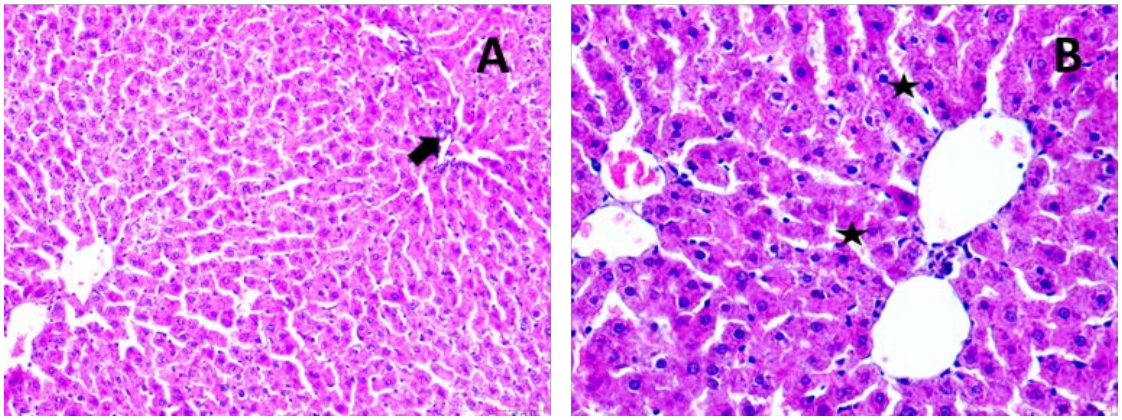
dokularında sinüzoidlerde belirgin dilatasyon ve hiperemi izlendi. Hepatositlerde ise yaygın şekilde mikroveziküler yağ birikimleri gözlendi. Ayrıca az sayıda şeffaf sitoplazmalı hepatositlere rastlandı.



Şekil 4-16: Etanol Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400). ⟶ :Şeffaf stoplazmalı hücre, ★: Dilatasyon

4.2.2.5. Etanol+DA Grubunun Histopatolojik Bulguları

Şekil 4-17'de etanol+DA grubunun karaciğer dokularına ait H-E boyaması yapılan kesitlerin histopatolojik görüntüleri verildi. Etanol+DA grubunda yer alan sıçanların karaciğer kesitlerinde portal alanda inflamatuar hücre infiltrasyonu, sinüzoidlerde orta düzeyde dilatasyon izlendi. Hafif düzeyde hasarlı hepatositlere rastlandı.



Şekil 4-17: Etanol+DA Grubuna Ait H&E Boyaması Görüntüleri-Karaciğer (A:X200, B:X400). ➡: inflamatuar hücre infiltrasyonu, ★: Dilatasyon

5. TARTIŞMA

Araştırmamızda sıçanlarda uzun süreli aralıklı etanol maruziyetinin beyin dokusunda oluşturduğu dejenerasyona karşı DA'nın nöroprotektif etkileri ve asprosin hormonunun plazma seviyeleri üzerine etkileri incelendi. Çalışmamızda %20'lik 3 g/kg etanol çözeltisinin 30 gün boyunca 2 gün maruziyet, 2 gün ara verilerek uygulandığı aralıklı etanol maruziyeti modeline karşı 3 günde bir 0,25 µg/kg dozda DA tedavisi uygulandı.

Alkol tüketimi kültürel olarak en eski insan alışkanlıklarından biridir. Etanol çeşitli nörotransmitterleri ve onların reseptörlerini etkileyerek akut davranışsal değişikliklere neden olmakla birlikte uzun süreli kullanımda bağımlılığa giden süreçlere neden olmaktadır (Fernandes ve ark 2018; Fan ve ark 2018). Kronik etanol tüketimi karaciğer, pankreas, kalp ve beyin olmak üzere vücutta birçok organda zararlı etkiler gösterir. Alınan etanolün büyük bir kısmının karaciğerde metabolize edilmesine rağmen etanol beyin üzerinde toksik etkilere sahiptir ve kronik etanol tüketimi merkezi sinir sistemindeki çeşitli dejeneratif ve inflamatuar süreçlerle ilişkilidir (Cui ve ark. 2019; Das ve ark. 2007) Etanolün zararlı etkileri çeşitli çalışmalarda ortaya konmuş olmasına rağmen alkol günümüzde gençlik çağından itibaren giderek artan miktarlarda tüketilmektedir (Coleman ve ark. 2014; De Bellis ve ark. 2005). Yetişkin alkol kötüye kullanımı ve alkol bağımlılığı modelleri genellikle uzun süreli alkol maruziyetini içerir ancak adolesanlarda alkol kötüye kullanımı tipik olarak sürekli günlük içme şeklinde değildir. Genellikle sosyal yaşam tarzına bağlı olarak hafta sonları veya tatil günlerinde yoğunlaşan alkollü içki içme modeli yoksunluk dönemleriyle bölünen ağır düzeyde aşırı içki içme şeklindedir (Lerma-Cabrera ve ark. 2019). Memeli türleri arasındaki benzerliklerden dolayı ağır düzeyde aşırı içki içmenin beyin üzerindeki etkilerini araştırmak için özellikle kemirgenlerin tercih edildiği hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır (Crews ve ark. 2016). Etanolün yetişkinlerde ve özellikle de ergenlerde beyin gelişimine etkileri, davranışsal etkileri ve nörodejeneratif etkileri üzerine yapılan çalışmalarda ergen aşırı içki içme şekline uyan aralıklı etanol maruziyeti modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Aralıklı etanol maruziyetinde 2 gün etanol maruziyetinin ardından 2 gün ara verilmesi (maruziyetsiz) şeklinde uygulanan model birçok çalışmada tercih edilen modeldir (Alaux-Cantin ve ark. 2013; Ehlers ve ark. 2013; Vetreno ve Crews 2012; Pascual ve ark. 2007). Sıçanlarda intragastrik gavaj uygulaması ile %20 (v/v)'lik 2

g/kg ve 3 g/kg dozlarda verilen etanol çözeltileri ile kan etanol konsantrasyonunun 0,08 g/dl'den daha fazla olduğu değerlere ulaşılmıştır (Granholm ve ark. 2018; Fernandes ve ark. 2018). Bu değerler NIAAA 2004 yılında tanımladığı aşırı içme kriterlerine uymaktadır (NIAAA, 2004). Çalışmamızda literatürde yer alan aralıklı etanol maruziyeti modellerine uygun olarak ve yukarıda açıklandığı gibi NIAAA'ın belirlediği aşırı içme kriterlerini karşılayan dozlar dikkate alınarak sıçanlara intragastrik gavaj uygulaması ile %20 (v/v)'lik 3 g/kg dozda etanol çözeltisi 2 gün etanol maruziyetinin ardından 2 gün maruziyetsiz bırakacak şekilde 30 gün boyunca verildi. Etanol çok çeşitli nedenlere bağlı olarak nöronal hasara ve ölüme yol açar. Bunlardan en önemlisi asetaldehit gibi etanol metabolitlerinin ve etanol metabolizması sonucunda oluşan ROS'un lipit fonksiyonlarını ve mitokondriyal fonksiyonları bozarak nöronal ölüme yol açmasıdır. Bunların dışında etanolün metabolitleri beynin hücre iskeleti sistemiyle etkileşime girerek nöroinflamasyona neden olur. Etanol BDNF'yi azaltarak nöronal hücre büyümesi ve farklılaşmasını engeller. Ayrıca aşırı glutamat salınımına bağlı olarak NMDA aracılı eksitoksite sonucunda da nöronal ölüme neden olabilir. Etanol kaynaklı olarak karaciğerde meydana gelen hasar sonucunda yeterince detoksifiye edilemeyen nörotoksik metabolitler serebral kan akımını değiştirerek ve oksidadif stresi artırarak indirekt yolla nörotoksisiteye neden olabilir (Hammoud ve Jimenez-Shahed 2019). Hem akut hem de kronik etanol maruziyeti insanlar dahil çeşitli sistemlerde, hücrelerde ve türlerde ROS üretimini artırabilir ve çeşitli yollarla oksidatif strese yol açarak lipit, protein ve DNA peroksidasyonuna neden olur (Wu ve Cederbaum 2003). Etanolün metabolize edilmesi karaciğerde oksijen defisitlerinin oluşumuna, hücresel bileşenlere zarar verebilen oldukça yüksek reaktif oksijen içeren moleküllerin oluşumuna, $NADH/NAD^{+}$ oranında değişikliklere ve etanolün yan ürünleri ile diğer hücresel bileşenlerin etkileşimi sonucunda zararlı bileşiklerin oluşumuna neden olur (Guo ve Ren 2010; Zakhari 2006). Etanolün neden olduğu aşırı ROS önemli miktarda Ca^{+2} depolayan mitokondride disfonksiyona yol açabilir. Bunun sonucunda geçirgenliği artan mitokondriyal zardan sitoplazmaya çıkan Ca^{+2} ve sitokrom C apoptozda rol oynayan kaspazları aktive edebilir. Ayrıca mitokondriyal disfonksiyon nekrozda da önemli bir rol oynar ve alkolün neden olduğu oksidatif stresin zararlı sonuçlarına katkıda bulunur (Goodlett ve Horn 2001). Hücre zarları oksitleyici radikaller tarafından kolayca saldırıya uğrayan zengin PUFA içeriğine sahiptir (Dasgupta ve Klein 2014 p.8; Cheeseman ve Slater 1993). Merkezi sinir sistemi beynin yüksek düzeyde O_2 tüketimi, bol miktarda lipit içeriği ve diğer dokulara

kıyasla antioksidan enzimlerin görece azlığı nedeniyle serbest radikal hasarına karşı savunmasızdır (Das ve ark 2007). Patolojik durumlarda bir sinyal işlevine sahip olan oksitlenmiş lipitler proinflamatuar agonistlerdir ve membran lipit peroksidasyonunun meydana geldiği koşullar altında nöronal ölüme katkıda bulunurlar (Catala 2012 p.6). Lipit peroksidasyonu hücresel oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılır (Martinez-Cayuela 1995). Lipit peroksidasyonu membran akışkanlığında ve membranların bariyer fonksiyonlarında azalmaya neden olur. Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan hidroperoksitler ve MDA, akrolein ve 4-HNE gibi aldehit türevleri protein sentezini, kan makrofaj hareketlerini inhibe eder, kemotaktik sinyalleri ve enzim aktivitesini değiştirir (Catala 2012 p.4-8). Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA'nın doku düzeyinde değerlendirilmesi hem klinik hem de toksikolojik araştırmalarda maksimum öneme sahiptir. ROS birçok metabolik süreç sırasında doğal olarak oluştuğundan hücreler ROS oluşumunu önlemek veya ROS'u detoksifiye etmek için çeşitli koruyucu mekanizmalar geliştirmiştir. Dokularda üretilen ROS enzimatik antioksidan sistem (SOD, CAT, GPx ve GR) ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından etkili bir şekilde temizlenir. Biriken ROS miktarı ve antioksidan enzimlerin aktiviteleri arasında oksidatif denge söz konusudur (Hernandez ve ark. 2016). Oksidatif stres artan oksidanlar veya azalan antioksidanlar ile bir dengesizlik durumu olarak tanımlanmaktadır (Catala 2012 p.3). Akut veya kronik alkol maruziyeti gibi belirli koşullar altında ROS üretimi artar ve/veya antioksidanların seviyesi veya aktivitesi azalır (Wu ve Cederbaum 2003). Normal beyin fonksiyonlarının devamlılığı için ve özellikle de nöronların korunması açısından bir tehlike söz konusu olduğunda yüksek miktarlarda antioksidan enzim aktivitesinin sürdürülmesi gereklidir. Azalan antioksidan enzim aktivitesi nöronal hasarı şiddetlendirir (Augustyniak ve Skrzydlewska 2010). Özellikle bir toksik madde tarafından antioksidan ve prooksidan mekanizmalar arasındaki fizyolojik denge değiştirildiğinde merkezi sinir sistemi oksidatif strese karşı hassastır (Das ve ark 2007).

Literatürde hem akut hem de kronik etanol maruziyetinin oksidatif stres üzerine etkileriyle ilgili çok fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. SOD, GPx, GR ve CAT gibi antioksidan enzim aktiviteleriyle veya seviyeleriyle ilgili sonuçlar kullanılan etanolün dozu, verilme şekli ve süresine göre birbirinden farklılık göstermektedir. Schlorff ve ark. (1999) akut etanol uygulamasının doza bağlı olarak oksidatif stres üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında sıçanlara %30-40'lık etanol çözeltisini oragastrik tüp yoluyla 2 g/kg, 4 g/kg ve 6 g/kg dozlarında uyguladıktan 1 saat sonra plazma SOD aktivitesinin

kontrol grubuna göre sırasıyla %41, %56 ve %71 oranında azaldığını, plazma GR aktivitesinin ise sırasıyla %55, %66 ve %71 oranlarında azaldığını, plazma CAT ve GPx aktivitesinde ise önemli bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Husain ve Somani (1997) yapmış oldukları çalışmada sıçanlara 6,5 hafta boyunca oragastrik tüp yoluyla 2 g/kg %20'lik etanol çözeltisinin verilmesi sonucunda plazma MDA seviyelerinin ve CAT enzim aktivitesinin etanol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığını; SOD miktarının, GPx enzim aktivitesinin ve GR enzim aktivitesinin etanol grubunda kontrol grubuna göre değişmediğini bulmuşlardır. Macit (2009) yapmış olduğu çalışmada sıçanlarda 21 günlük etanol içeren sıvı diyet protokolü ile etanol bağımlılığı oluşturmuştur. Etanol bağımlılığı sonucunda beyin hasarı oluşan kontrol grubunda herhangi bir uygulama yapılmayan sham grubuna göre beyin dokusunda MDA seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı, SOD ve GPx aktivitelerinin ise azaldığı bulunmuştur. Augustyniak ve Skrzydlewska (2010) yaptıkları çalışmada sıçanlara intragastrik olarak 2 g/kg ile 6 g/kg dozlarında 1,8 ml etanolün 4 hafta boyunca her gün verilmesi sonucunda her iki dozun da uygulandığı gruplarda SOD, GPx, CAT ve GR enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığını bulmuşlardır. MDA seviyelerinin ise hem beyin dokusunda hem de serumda kontrol grubunda anlamlı bir şekilde arttığını bulmuşlardır. Literatürde etanolün özellikle karaciğer ve glikoz metabolizması üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda etanolün etkilerini karşılaştırmak için serum fizyolojik verilen kontrol grupların yerine genellikle etanolle izokalorik olarak eşdeğer miktarda glikoz içeren çözeltilerin verildiği gruplar kullanılmaktadır (Mani ve ark. 2016; Sathiavelu ve ark. 2009; Oh ve ark. 2002; Jayaraman ve ark. 2008). Çalışmamızda bu yüzden serum fizyolojik verilen kontrol grubunun yanısıra etanolle izokalorik glikoz çözeltisi verilen glikoz grubu da kullanıldı. Mani ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada etanol verilen grupta SOD, CAT, GPx ve GR enzim aktivitelerinin hem plazmada hem de karaciğer ve böbrek dokusunda izokalorik glikoz çözeltisi verilen kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük olduğunu, lipit peroksidasyonunu gösteren TBARS'ın hem plazma hem de karaciğer ve böbrek dokusundaki seviyelerinin etanol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Mani ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada etanol verilen grupta hem plazmada hem de karaciğer ve böbrek dokusunda izokalorik glikoz çözeltisi verilen kontrol grubuna göre SOD, CAT, GPx ve GR enzim aktivitelerinin anlamlı bir şekilde düşük olduğunu, lipit peroksidasyonunu gösteren TBARS'ın seviyelerinin ise

yüksek olduğunu bulmuşlardır. Jayaraman ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada sıçanlarda etanol verilen grupta izokalorik glikoz çözeltisi verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında beynin korteks, serebellum, striatum, hipokampüs ve hipotalamus bölgelerinde SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinin anlamlı bir şekilde düşük olduğunu, lipit peroksidasyonunu gösteren TBARS seviyelerinin ise anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Literatürdeki birçok çalışmaya uygun olarak çalışmamızda beyin dokusu SOD enzim aktivitesinin, beyin dokusu ve serum CAT, GPx ve GR seviyelerinin etanol grubunda kontrol ve izokalorik glikoz gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşük olduğu bulundu ($p<0,05$). Beyin dokusu MDA seviyelerinin etanol grubunda kontrol ve izokalorik glikoz gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu bulundu ($p<0,001$).

Vücut sıvılarındaki yüksek NSE veya S100-β konsantrasyonları bu iki proteinden herhangi birini eksprese eden hücrelerin hasarını gösterir. S100-β ve NSE proteinlerinin her ikisi de sitoplazmik proteinlerdir. NSE esas olarak nöronların sitoplazmasında ve nöroendokrin kökenli hücrelerde bulunan glikolitik bir enzimdir (Anand ve Stead 2005). S100-β ağırlıklı olarak astroglialarda ve Schwann hücrelerinde lokalize Ca^{+2} bağlayıcı bir proteindir. S100-β fizyolojik koşullarda aktif olarak hücre dışı boşluğa düşük miktarlarda salgılanırken NSE hücre dışı boşluğa aktif olarak salgılanmaz, sadece hücre yıkımı ile serbest bırakılır. S100-β'nın bulunduğu hücreler yapısal veya kimyasal olarak hasar görürse BOS'a sızarak salınır ve ikincil olarak kan-BOS bariyerini geçerek dolaşıma girer. NSE konsantrasyonu da nöronal hasar ve hemolizden sonra artarak BOS'ta ve periferik kanda ölçülebilir miktarlara ulaşır (Mussack ve ark. 2002). Yapılan çalışmalar hem serum ve plazmada hem de BOS'ta yüksek NSE ve S100-β düzeylerinin intraserebral kanama, iskemik inme ve beyin hasarı vakalarında parankimal beyin hasarı için duyarlı ve nicel nörobiyokimyasal bir belirteç olduğu önerisini desteklemiştir (Selakovic ve ark. 2005; Herrmann, Crio ve ark. 1999; Herrmann, Ebert ve ark. 1999). Ayrıca NSE'nin beyin hasarının ciddiyeti ve klinik durum ile korele olduğu bulunmuştur (Schoerkhuber ve ark. 1999). S100-β Glasgow koma skoru ile negatif korelasyon, Ulusal Sağlık Enstitüsü İnme Ölçeği skoru ile pozitif korelasyon göstermiştir (Alataş 2015). Bu nedenle nöronal hasarın bir parametresi olan S100-β ve NSE düzeyleri nöroyoğun bakımda tanısal, prognostik ve monitörizasyon yardımcıları olarak önerilmektedir (Kochanek ve ark. 2008). Seymen ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada sıçanlara akut olarak etanol uygulanan grupta beyin dokusu S100-β ve NSE seviyelerinin kontrol

grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Benzer şekilde Baydaş ve Tüzcü (2005) yaptıkları çalışmada 45 günlük etanol maruziyeti sonucunda 3 aylık genç ve 19 aylık yaşlı sıçanlarda beyin dokusu S100-β seviyelerinin etanol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Etanol maruziyetinin beyin dokusu NSE seviyelerinde sadece genç sıçanlarda anlamlı bir artışa yol açtığını, yaşlı sıçanlarda ise anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını bulmuşlardır. Çalışmamızda beyin dokusunda ve serumda NSE ve S100-β seviyelerinin etanol grubunda kontrol ve glikoz gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu bulundu. Çalışmamızda bulduğumuz yüksek NSE ve S100-β seviyeleri literatürdeki bilgilerle tutarlı olarak etanolün nöronal hasara neden olduğu bilgisini desteklemektedir ($p<0,05$).

Etanol PFC, korpus kallozum, beyincik ve hipokampus gibi çeşitli beyin bölgelerini etkiler. Beyindeki etanol toksisitesinin ana hedeflerinden en önemlisi hipokampüstür (Mira ve ark. 2020). Kemirgenlerde yapılan araştırmalarda etanol maruziyetinin insan beyninde oluşturduğu patolojik değişiklikleri açıklayabilmemiz için önemli kanıtlar sunan farklı hipokampal değişikliklerin meydana geldiği bildirilmiştir (Tarelo-Acuna ve ark. 2000, Morris ve ark. 2010, Zhao ve ark. 2013). Motaghinejad ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada etanol verilen sıçanların hipokampüslerinden alınan kesitlere H-E boyaması yapmışlardır. Etanol verilen grupta kontrol grubuna göre CA1 alanlarında piramidal hücrelerin ve dentat girusun granüler hücrelerinin sayısında azalma ile birlikte çekirdekçiğin olmadığı, hiperkromatik ve piknotik çekirdek yapısının bulunduğu hücrelerin olduğunu gözlemlemişlerdir. Kumral ve ark. (2005) etanol verdikleri farelerde cresyl violet boyaması yapılan kesitler üzerinde yapılan hücre sayımı sonuçlarına göre etanol grubunda hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve dentat girus bölgelerinin nöron sayısının kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha az olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca etanol grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki TUNEL+ nöronlarının sayısının daha fazla olduğu bulunmuştur. Seymen ve ark. (2013) sıçanlarda yaptıkları çalışmada akut etanol uygulaması yapılan grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dentat girusun granüler tabakasında histopatolojik olarak iskemik kırmızı nöron oluşumunun bulunduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda H-E ve luxol fast blue-cresyl violet boyaması yapılan sıçan beyni doku kesitlerinde kontrol ve izokalorik glikoz grubunda hipokampüsün dentat girusunda çok az sayıda piknotik hücre ile beraber normal görünümdeki hücre sayısının daha fazla olduğu gözlemlendi. Ayrıca literatürdeki bilgilerle tutarlı olarak etanol

grubuyla kontrol ve izokalorik glikoz grubu karşılaştırıldığında etanol grubunda çok sayıda piknotik hücre, iskemik kırmızı nöron ve vakuollerin bulunduğu ve normal görünümlü hücre sayısının daha az olduğu orta düzeyde nörodejenerasyon gözlemlendi ($p<0,001$).

EPO eritropoezin birincil düzenleyicisi olan glikoprotein yapıda bir hormondur. EPO son zamanlarda sinir sisteminde eksprese edildiği gösterilen bir hematopoietik sitokindir. Hem EPO hem de EPO-R hipokampüs, kapsüla interna, korteks ve orta beyin bölgelerinde bulunmaktadır (Kumral ve ark. 2005; Dıgıcaylıoğlu ve ark. 1995; Morishita ve ark. 1997; Morishita ve ark. 1996). EPO invitro olarak astrositler ve nöronlar tarafından sentezlenmektetir. EPO ve reseptörlerinin sinir sistemindeki ekspresyonu hipoksi ve metabolik hasar ile modüle edilmektedir (Kumral ve ark. 2005; Masuda ve ark. 1997; Masuda ve ark. 1994). Rekombinant insan EPO'su (rHuEPO) anemi tedavisi için uzun süredir kullanılan son derece güvenli bir ilaçtır. DA, rHuEPO ile aynı reseptörü kullanan ve rHuEPO'ya kıyasla daha uzun dolaşım yarı ömrü ve artan invivo biyolojik aktiviteye sahip olan eritropoezi uyarıcı bir ajandır (Grasso ve ark. 2009). Beyin hasarı oluşturulan deneysel hayvan modellerinde hem rHuEPO'nun hem de DA'nın nöroprotektif etkilere sahip olduğu çeşitli yöntemler kullanılarak gösterilmiştir (Kertmen ve ark. 2015; Grasso ve ark. 2009; Kumral ve ark. 2005). rHuEPO'nun çeşitli kemirgen modellerinde doğrudan beyne verildiğinde veya sistemik olarak verildiğinde hipoksik/iskemik merkezi sinir sistemi bozukluklarında nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Belayev ve ark. 2005). Sıçanlarda kalıcı medial serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan iskemik inme modelinin kullanıldığı bir çalışmada rHuEPO'nun serebral ventriküllere doğrudan infüzyonunun kortikal enfarktüsleri azaltarak ve hayatta kalan talamik nöronların sayısını artırarak nöroprotektif etki gösterdiği ve sıçanların Morris su labirenti testi sonuçlarına göre bilişsel performansını artırdığı bildirilmiştir (Sadamoto ve ark. 1998). Benzer şekilde karotis arterleri tıkalı olan gerbillerin lateral ventrikülüne rEPO infüzyonunun iskemiye bağlı öğrenme bozukluğunu önlediği ve hipokampal CA1 nöronlarını ölümcül hasardan kurtardığı bulunmuştur (Sakanaka ve ark. 1998). Grasso ve ark. (2009) sıçanlarda beynin sağ striatum bölgesinde intraserebral hemoraji oluşturduktan sonra uyguladıkları rHuEPO ve DA tedavisi sonucunda tedavi almayan grupla karşılaştırıldığında rHuEPO ve DA ile tedavi edilen grupların histolojik olarak neredeyse normal bir hücresel görünüme sahip olduğunu, hayatta kalan NeuN (nöronal nükleer protein)-pozitif nöronların sayısının daha yüksek olduğunu; kantitatif olarak

hasarlı doku oranının tedavi yapılmayan grupta rHuEPO ve DA gruplarına göre oldukça yüksek olduğunu; rHuEPO ve DA grupları arasında ise tedavi açısından anlamlı bir fark olmadığını bulmuşlardır. Kertmen ve ark. (2015) travmatik beyin yaralanması oluşturdukları sıçan modellerinde DA tedavisi sonucunda histopatolojik olarak nöronal yaralanmayı gösteren nükleer hiperkromazi, nükleer piknozis, sitoplazmik eozinofilik dejenerasyon ve akson ödemine göre yapılan skorlama değerlerinin tedavi edilmeyen gruba göre daha düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Kumral ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada fare beyninde akut etanol uygulamasının neden olduğu nörotoksisiteye karşı rHuEPO tedavisi uygulamışlardır. Histopatolojik değerlendirmeye göre rHuEPO'nun gelişmekte olan serebellum, PFC ve hipokampusta apopitozu önemli ölçüde azalttığını ve ayrıca hipokampal CA1, CA2 ve CA3 nöronlarını koruduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızda etanol grubuyla karşılaştırıldığında etanol+DA grubunda hipokampüsün dentat girusunun granüler hücre tabakasının az sayıda piknotik nöron içerdiği ve normal görünüme sahip hücrelerin daha fazla olduğu hafif düzeyde nörodejenerasyon görülmektedir ($p<0,05$). Çalışmamızın sonuçları uzun süreli etanol maruziyetinin oluşturduğu nörodejenerasyona karşı uzun süreli DA uygulamasının nöroptotektif etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

Hayvan çalışmalarında DA'nın global ve fokal iskemi tedavisinde, sinir sistemi inflamasyonunu azaltmada, nörodejenerasyonu ve oksidatif stresi azaltmada faydalı olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark. 2012; Seymen ve ark. 2009; Belayev ve ark 2005). Kertmen ve ark. (2013) sıçanlarda travmatik beyin hasarı oluşturduktan sonra tek doz DA uygulamasının GPx ve SOD antioksidan enzimlerinin aktivitelerinde artış ve lipid peroksidasyonu gösteren MDA düzeylerinde azalmaya sebep olduğunu göstererek DA'nın antioksidan etkilere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Seymen ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada sıçanlara akut etanol uygulamasından sonra verilen tek doz DA'nın beyin dokusunda etanol kaynaklı oksidatif strese karşı oksidanları azalttığını ve antioksidanları artırdığını bulmuşlardır. Literatürde uzun süreli DA tedavisinin nöroprotektif etkilerine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Akut dozlarda DA'nın nöroprotektif etkilerinin gösterildiği çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda uzun süreli DA tedavisi uygulanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada 30 gün boyunca uygulanan aralıklı etanol maruziyeti modelinde 3 günde bir uygulanan DA'nın beyin dokusunda MDA seviyelerini anlamlı bir şekilde azalttığı, serum CAT seviyelerini ve beyin dokusunda GPx aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırdığı bulundu. Ayrıca

çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemesine rağmen DA'nın beyin dokusunda SOD aktivitesini, CAT seviyesini ve GR seviyesini; serumda ise GR seviyesini ve GPx aktivitesini arttırdığı bulundu ($p<0,05$) .

NSE ve S100-β, hem rHuEPO'nun hem de DA'nın kullanıldığı bazı çalışmalarda nöronal hasara karşı EPO'nun nöroprotektif etkilerini göstermek için belirteç olarak kullanılmıştır. Kraniyoserebral hasara sahip 78 hasta üzerinde yapılan çalışmada 7 günlük ve 14 günlük rHuEPO tedavisi alan hastalarda NSE ve S100-β seviyelerinin tedavi öncesine göre düşük olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca NSE ve S100-β seviyelerinin 7 günlük ve 14 günlük rHuEPO tedavisi alan gruplarda sadece konvansiyonel tedavi alan kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında da daha düşük olduğu bulunmuştur (Lu ve Long 2017). Bian ve ark. (2010) travmatik beyin yaralanması oluşturdukları sıçanlarda 3 farklı dozda rHuEPO ile tedavi ettikleri grupların hepsinde S100-β'nın tedavi almayan gruba göre daha düşük olduğunu doza bağlı olarak S100-β'nın daha da düştüğünü bulmuşlardır. Seymen ve ark. (2013) sıçanlarda akut etanol maruziyeti ile oluşturulan nöronal hasara karşı uygulanan tek doz DA tedavisi sonucunda plazma NSE seviyelerinin anlamlı bir şekilde düştüğünü bulmuşlardır. Çalışmamızda da yukarıdaki sonuçlarla uyumlu olarak sıçanlarda 30 gün süre boyunca 2 gün uygulamanın olduğu, 2 gün uygulamanın olmadığı aralıklı etanol maruziyetine karşı 3 günde 1 uygulanan DA tedavisi sonucunda doku ve serum S100-β seviyeleri ile serum NSE seviyelerinin anlamlı bir şekilde düştüğü bulundu ($p<0,05$).

Glikoz homeostazı merkezi sinir sisteminin ve bu metabolik substrata zorunlu olarak ihtiyaç duyan hücrelerin normal çalışması için kritik öneme sahiptir. Alkol tüketimi glikoz metabolizmasını etkileyen çeşitli metabolik süreçlerle ilişkilidir. Akut etanol maruziyetinin hepatik glikoneogenezi inhibe ederek hipoglisemiye neden olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (Lanng ve ark. 2019; Field ve ark. 1963; Krebs 1968, Kaynak: Sumida ve ark. 2004; Arky ve Freinkel 1969, Kaynak: Sumida ve ark. 2004; Krebs ve ark. 1969, Kaynak: Sumida ve ark. 2004). Fakat insanlarda ve sıçanlarda akut etanol uygulamasının dolaşımdaki glikoz konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu veya hiç bir değişikliğe yol açmadığı da bildirilmiştir (Steiner ve ark. 2015; Mokuda ve ark. 2004; Siler ve ark. 1998). Alkolik karaciğer hastalığının gelişimi sırasındaki kilit olaylardan biri alkolün karaciğerde insülin sinyal yolunu inhibe etmesi ve glikoz metabolizması bozukluklarına yol açmasıdır (Cheng ve ark. 2019). Kronik etanol

kullanımı hepatik glikoz depoları yeterli olduğunda hiperglisemiye neden olurken hepatik glikoz depoları yeterli olmadığında hipoglisemiye neden olur (Kim S. ve Kim D. 2012; Sumida ve ark. 2007). İnsülinin miktarı ve işlevi glisemik dengenin korunmasında çok önemlidir. Alkol pankreatik β-hücre apoptozisine (Dembele ve ark. 2009) ve disfonksiyona neden olarak insülin sekresyonunun ve dolaşımdaki insülin düzeylerinin azalmasına neden olabilir (Kim ve ark. 2010; Crandall ve ark. 2009). Ağır düzeyde alkol tüketimi pankreas β-hücre fonksiyonunu ve insülin sinyal yollarını bozarak Tip 2 diyabet (T2 DM) gelişimine katkıda bulunmaktadır (Yang ve ark. 2020; Jang ve ark. 2019). Daha önceki çalışmalarda hafif ve orta düzeyde alkol tüketenlerde daha düşük insülin seviyelerinin görülmesinin glisemik homeostazın korunmasına yardımcı olarak T2 DM riskini azalttığı görüşünün hakim olduğu görülmektedir (Schrieks ve ark. 2015; Wang, Luo ve ark. 2014; Davies ve ark. 2002). Fakat Miyagi ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada Doğu Asyalılarda hafif ve orta düzeyde alkol tüketiminin HOMA-IR değerinde bir değişikliğe neden olmamasına rağmen açlık insülin salgılama kapasitesinde azalmaya, HOMA-B (β hücre fonksiyonu) değerinde azalmaya ve bozulmuş açlık kan glikozuna neden olduğunu belirtmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak hafif ve orta düzeyde alkol tüketiminin de T2 DM gelişimine katkısı olup olmadığı konusunda daha fazla çalışmanın yapılması gerektiğini vurgulamışlardır. Yapılan bir çalışmada sıçanlarda açlık kan glikozu değerlerinin 30 gün boyunca %20'lik 7,9 g/kg etanol çözeltisi verilen etanol grubunda glikoz içeren izokalorik solüsyon verilen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde düştüğü bulunmuştur (Saravanan ve Pugalendi 2004). Brito-Filho ve ark. (2016) 4 ay boyunca %6 (v/v) oranında etanol solüsyonu verilen farelerde sadece içme suyu verilen grupla karşılaştırıldığında açlık kan glikozu değerleri açısından anlamlı bir fark olmadığını bulmuşlardır. Yang ve ark. (2020) çalışmalarında etanol grubundaki farelere 1 hafta, 2 hafta ve 3 hafta boyunca gavaj ile günlük 3,5 g/kg dozda %30'luk etanol çözeltisi vermişlerdir. Etanol uygulamasının sonunda 6 saat aç bırakılan farelere 2 g/kg glikoz gavaj ile verildikten sonra 1 hafta etanol alan grupta salin verilen kontrol grubuna göre açlık kan glikozu ve insülin zirve değerlerinin değişmediğini, 2 ve 3 hafta etanol alan gruplarda ise kontrol grubuna göre kan glikozunun zirve değerlerinin değişmediğini fakat insülinin zirve değerlerinin azaldığını bulmuşlardır. Carr ve ark. (2013) 2, 4 ve 8 haftalık olmak üzere 3 farklı zamansal etanol içeren diyet protokolü uygulanan farelerde etanol grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 2, 4 ve 8 haftalık diyet gruplarının hepsinde açlık kan glikozu ve insülin değerleri açısından bir fark

olmadığını bulmuşlardır. Fakat etanol diyeti ile beslenen farelerin 2 hafta kadar kısa bir sürede glikoz intoleransı geliştirdiğini ve bu durumun 4 ve 8 hafta boyunca devam ettiğini bulmuşlardır. Ren ve ark. (2012) hem insanlarda hem de sıçanlarda etanolün glikoz homeostazisi üzerine etkilerini incelemişlerdir. 3 yıldan fazla süredir günlük 15 g etanol tüketen düşük doz grubu, günlük 15-47,9 g arasında etanol tüketen ılımlı doz grubu ve günlük 48 g üzerinde tüketen yüksek doz grubundaki bireylerin HOMA-IR değerleri incelendiğinde yüksek doz etanol alan grupta etanol tüketmeyen kontrol grubu, düşük doz grubu ve ılımlı doz grubuna göre anlamlı bir şekilde artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Sıçanlarda ise 22 hafta boyunca günlük %50 (v/v) etanol çözeltisinden 0,5 g/kg dozda verilen düşük doz etanol grubu, 2,5 g/kg dozda verilen ılımlı doz etanol grubu ve 5 g/kg dozda verilen yüksek doz etanol grubu olmak üzere 3 ayrı etanol grubu oluşturmuşlardır. Sıçanlara verilen bu dozlar vücut yüzey alanına göre hesaplandığında miktar olarak insanlardaki düşük, ılımlı ve yüksek doz sınıflamasına uymaktadır. Sıçanlarda 3 farklı dozda verilen etanol grupları ile distile su verilen kontrol grubunun HOMA-IR değerleri karşılaştırıldığında sadece yüksek doz etanol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğunu, kontrol grubu ile düşük doz ve ılımlı doz grubu arasında anlamlı bir fark olmadığını bulmuşlardır (Ren ve ark. 2012). %20'lik 3 g/kg etanol çözeltisinin 30 gün boyunca 2 gün maruziyet, 2 gün ara verilerek uygulandığı aralıklı etanol maruziyeti modelini kullandığımız çalışmamızda etanol grubunda kontrol ve izokalorik glikoz grubuna göre deneyin başlangıcında, 15. gününde ve deneyin sonunda ölçülen açlık kan glikozu değerlerinin, deneyin sonunda ölçülen insülin değerlerinin ve HOMA-IR değerlerinin anlamlı olarak bir farklılık göstermediği bulunmuştur. Çalışmamızda Ren ve ark. (2012) belirttiği ılımlı doz etanol sınıflamasına benzer şekilde etanol dozu kullanıldığı dikkate alındığında ve etanol uygulama süresine bağlı olarak literatürdeki daha uzun süre etanol uygulanan çalışmaların sonuçlarına göre değerlendirildiğinde etanolün HOMA-IR değerleri açısından farklılık oluşturmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Bu sonuçlarla çalışmamızda etanolün pankreatik β hücre disfonksiyonunda, insülin sekresyonunda, sinyal yolaklarında ve glikoz metabolizmasında bozukluklara neden olmadığı görülmektedir.

Alkolün oluşturduğu lipid metabolizması bozukluklarından en yaygın olanı karaciğerde yağ birikmesidir. Alkolik yağlı karaciğer ise genellikle hiperlipidemi ile ilişkilidir. Kronik alkol tüketiminin sebep olduğu lipit anormalliklerinden en yaygın olanları hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemidir (Baraona ve Lieber 1979). Genel

olarak insan ve sıçan çalışmalarında kronik etanol maruziyetinin serum trigiliseridini arttırdığı gösterilmiş olsa da bazı araştırmalarda tüketilen alkol miktarına ve tüketim süresine; ırk, yaşam tarzı ve fiziksel aktivite düzeyi gibi faktörlere bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir (Radic ve ark. 2018; Szary ve ark. 2015; Kovar ve Zemankova 2015; Saravanan ve Pugalendi 2004). Genellikle alınan alkol miktarı düşük olduğunda ancak günlük olarak devamlı tüketildiği zaman kan biyokimyasal analizlerinde herhangi bir karaciğer toksisitesi belirtisi gösterebilir fakat bu durumun ortaya çıkması zaman alır (Radic ve ark. 2018). Ilımlı miktarlarda alkol tüketenlerde HDL seviyelerinde artış meydana gelir. Aynı zamanda toplam HDL protein kütlesinin %70'ini oluşturan apoprotein A-I seviyelerinin yükselmesi ve paraoksonaz aktivitesinin artması sonucunda antioksidan özelliklerinin artması kardiyovasküler hastalıklar açısından riskin azalmasına neden olur (Sun ve Wang 2021). Ağır düzeyde alkol tüketenlerde ise HDL seviyeleri farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalar, ağır düzeyde alkol tüketenlerde HDL-kolesterol düzeylerinin ve kolesterolün dışa akış potansiyelinin arttığını gözlemlerken (Millwood ve ark. 2019; Makela ve ark. 2008) diğer çalışmalar alkole bağlı karaciğer fibrozisi ve sirozu olan hastalarda HDL düzeylerinin düştüğünü (Naveau ve ark. 2013; Marmillot ve ark. 2007) göstermiştir. Yapılan bir çalışmada 30 gün boyunca intragastrik yolla günlük olarak 5 ml/100 g vücut ağırlığı (yaklaşık olarak 7,9 g/kg) dozunda %20'lik etanol çözeltisi verilen sıçanlarda glikoz içeren izokalorik solüsyon verilen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında serum kolesterol ve trigliserit değerlerinin yükseldiği bulunmuştur (Saravanan ve Pugalendi 2004). Arulmozhi ve ark. (2009) 30 gün boyunca %20'lik 7,9 g/kg/gün dozda etanol çözeltisi verdikleri sıçanlarda kontrol grubuna göre plazma total kolesterol ve trigliserit seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığını, HDL seviyelerinin ise anlamlı bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Yine yapılan bir çalışmada 4 hafta boyunca oral yolla günlük olarak %25'lik 3 g/kg etanol çözeltisi verilen gruptaki sıçanlarda serum trigliserit seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur (Lee ve ark. 2020). Kim ve ark. (2015) sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada 5 hafta süre ile %36 oranında etanol içeren sıvı diyetle beslenen etanol grubu ile etanol içermeyen diyetle beslenen kontrol grubu arasında total kolesterol ve trigliserit seviyeleri açısından anlamlı bir fark olmadığını, HDL seviyelerinin ise anlamlı bir şekilde arttığını bulmuşlardır. Okita ve ark. (1996) yaptıkları çalışmada sıçanlara 14 gün boyunca intragastrik gavaj yoluyla günlük 3 g/kg etanol verilen grup ile etanol yerine izokalorik sükroz verilen kontrol grubunu karşılaştırdıklarında serum trigliserit ve total kolesterol

seviyeleri arasında anlamlı bir fark olmadığını bulmuşlardır. Çalışmamızda sıçanlarda 30 gün boyunca 2 gün uygulama 2 gün ara verilerek aralıklı olarak %20'lik 3 g/kg etanol çözeltisi verilen etanol grubu ile kontrol grubu (serum fizyolojik) ve glikoz (izokalorik glikoz çözeltisi) grupları karşılaştırıldığında serum total kolesterol, trigliserit ve HDL seviyeleri açısından anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$). Bu sonuçlar çalışmamızda etanol dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak serum lipit profilinin etkilenmediğini göstermektedir.

Etanolün miktara ve kullanım süresine göre karaciğerde yağlı karaciğer (steatoz), hepatit, siroz ve karaciğer kanseri dahil olmak üzere geniş bir hastalık yelpazesini kapsayan alkolik karaciğer hastalığına neden olduğu bilinmektedir (Hyun ve ark. 2021; Gu ve ark. 2015; Arteel 2011). Şahin (2015) etanolün karaciğer üzerine etkisini incelediği çalışmasında etanolün histolojik olarak hepatositlerde vakuolleşmeye ve dejenerasyona neden olduğunu gözlemlemiştir. Anbu ve Padma (2017) yaptıkları bir çalışmada 45 gün boyunca %30'luk etanol çözeltisinden 6 g/kg dozda günde iki kez etanol verdikleri sıçanların karaciğerlerinden alınan kesitleri histopatolojik olarak değerlendirmişlerdir. Etanol grubu ile kontrol grubu (izokalorik glikoz) karşılaştırıldığında kontrol grubunda portal triad ve hepatositlerin normal göründüğü; etanol verilen grupta ise portal triadın aşınmış ve inflamatuar hücrelerle infiltre olduğunu, hepatositlerin çoğunda mikroveziküler tipte yağ değişiklikleri gösterdiğini ve az miktarda da makroveziküler tipte yağ değişiklikleri gösterdiğini ifade etmişlerdir. Arulmozhi ve ark. (2022) 30 gün boyunca %20'lik 7,9 g/kg dozda etanol uyguladıkları sıçanların karaciğer dokusundaki hepatositlerde makroveziküler ve mikroveziküler tipte lipid birikimi gösterdiğini, periportal fibroz ve vasküler konjesyon gözlendiğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda literatürdeki etanolün karaciğer dokusu üzerinde oluşturduğu histopatolojik değişikleri inceleyen bir çok çalışmada kullanılan etanol dozlarından daha düşük etanol dozu kullanmamıza rağmen histopalojik olarak hepatositlerde yaygın şekilde mikroveziküler tipte yağ birikimi sinüzoidlerde belirgin dilatasyon ve hiperemi izlenmiştir. Ayrıca az sayıda şeffaf sitoplazmalı hepatosite rastlanmıştır. Çalışmamızda liretatürdeki bilgilerle uyumlu olarak etanolün karaciğer dokusunda dejenerasyona neden olduğu görülmektedir. Çalışmamızda etanol+DA grubundaki sıçanların karaciğerinde sinüzoidlerde meydana gelen dilatasyonun etanol grubuna göre daha hafif düzeyde olması, portal alanda inflamatuar hücre infiltrasyonu ve hafif düzeyde hasarlı hepatositlerin görülmesi etanol

maruziyeti sonucunda oluşan dejenerasyona karşı DA'nın tedavi edici etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

Beyaz yağ dokusu adipositleri trigliseritler gibi fazla enerjinin depolanması için özelleşmiştir. Ayrıca beyaz yağ dokusunun enerji homeostazında ve sistemik metabolizmada merkezi bir rol oynayabileceği kabul edilmektedir (Wang ve ark. 2013). EPO-R geni beyaz yağ dokusunda yüksek oranda ekspere edilmektedir. Dolaşımdaki EPO periferik yağ dokusunda JAK2-STAT5 sinyalleşmesini aktive ederek lipid katabolizmasıyla ilgili genleri upregüle eder ve lidip katabolizması uyarılır (Li ve ark. 2019). Li ve ark. (2019) EPO uygulamasının hem kontrol grubundaki farelerde hem de kronik böbrek hastalığı olan farelerde yağ dokusunda lipid katabolizmasını güçlendirerek serumda trigliseriti baskıladığını bildirmiştir. Tsuma ve ark. (2019) EPO'nun yağ dokusunda adipoz trigliserit lipazı (ATGL) upregüle ederek veya en önemli hız kısıtlayıcı enzim olan hormona duyarlı lipazı (HSL) fosforile ederek lipolizi artırdığını ifade etmektedir. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde EPO uygulamasının lipolizi artırmasına rağmen karaciğerde yağ birikiminin azaldığını bunun sebebinin de EPO'nun karaciğerde SREBP-1, ACC1 (Asetil koenzim A karboksilaz) ve FAS (Yağ asidi sentaz; fatty acid synthase) gibi lipojenik faktörlerin ekspresyonunu azaltmasına bağlı olduğunu ifade etmektedirler. Özdemir ve ark. (2017) farelerde ilk evre aterosklerozda uygulanan uzun süreli DA tedavisinin trigliserit seviyelerini yükselttiğini fakat ilerlemiş aterosklerozda trigliserit seviyelerini değiştirmediğini bulmuşlardır. Baek ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen rHuEPO transgenik domuzlarda sadece yüksek yağlı diyetle beslenen normal domuzlara göre trigliserit seviyelerinin anlamlı olarak daha düşük olduğunu fakat normal diyetle beslenen rHuEPO transgenik domuzlarda normal diyetle beslenen kontrol grubuna göre trigliserit seviyesinin anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu domuzlarda aynı diyet modeli uygulanan transgenik olmayan gruplarla karşılaştırıldığında yüksek yağlı diyetle beslenen rHuEPO transgenik domuzlardaki plazmadaki EPO artış oranının normal diyetle beslenen rHuEPO transgenik domuzlara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda trigliserit seviyelerinin etanol+DA grubunda kontrol, glikoz ve etanol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu ve bu grupta plazma asprosin seviyeleri ile trigliserit seviyeleri arasında güçlü bir şekilde pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışmamızda DA uygulaması ile serum trigliserit seviyelerindeki artışın Bae ve ark.

(2019) çalışmasında da görüldüğü gibi EPO'nun düşük konsantrasyonlardaki etkisine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

EPO'nun birincil hedefinin kemik iliği olduğu bilinmektedir. Ayrıca diğer dokularda da reseptörü olan EPO'nun eritropoez dışında birçok biyolojik rolü bulunmaktadır (Baek ve ark. 2019). EPO/EPO-R sinyali in vitro ve in vivo olarak adipositlerde PI3K/AKT yolunun aktivasyonu yoluyla glikoz alımını artırarak glikoz metabolizmasını modüle etmektedir (Wang ve ark. 2013; Pan ve ark. 2013). EPO uygulamasının sağlıklı farelerin yanı sıra murin diyabet ve obezite modellerinde kan glikoz seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (Meng ve ark. 2012; Choi ve ark. 2012; Foskett ve ark. 2011; Katz ve ark. 2010). Baek ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada rHuEPO üreten transgenik domuzlarda kan glikozunun normal vahşi tip domuzlardan oluşan kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Fare modellerinde EPO'nun açlık kan glikozu düzeylerini ve vücut kütlesini azaltarak ve β hücrelerini kimyasal ve otoimmün toksisiteden koruyarak antidiyabetik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Drueke ve ark 2006; Choi ve ark. 2010; Katz ve ark. 2010). Foskett ve ark. (2011) yüksek yağ içeren diyetle beslenen obez farelerde glikoz tolerans testi ile yüksek, orta ve düşük dozlarda verilen EPO'nun artmış olan kan glikozu ve serum insülin seviyelerini düşürdüğünü ifade etmişlerdir. Choi ve ark. (2010) rHuEPO ile tedavi edilen diyabetik farelerde kan glikozunun düştüğünü, pankreas alanı başına düşen β hücre alanında artış olduğunu, TUNEL pozitif β hücrelerinde azalma olduğunu bildirmiştir. Ayrıca diyabetik farelerde kontrollerle karşılaştırıldığında glikozla uyarılan insülin sekresyonunun rHuEPO tedavisi ile arttığını, bunun sebebinin ise EPO'nun β hücre canlılığını teşvik ederek β-hücre fonksiyonunu güçlendirmesinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda 15. günde DA grubunda kontrol grubuna göre 30. günde ise etanol+DA grubunda glikoz grubuna göre açlık kan glikozu değerlerinde anlamlı bir azalma görüldü. Etanol+DA grubunda serum insülin seviyelerinde kontrol, glikoz ve etanol gruplarına göre anlamlı bir artış görüldü. Literatürde yer alan obezite ve diyabet çalışmalarıyla karşılaştırıldığında çalışmamızda patolojik süreçlerden bağımsız olarak fizyolojik sınırlar içerisinde EPO'nun kan glikozunu düşürdüğü ve serum insülin seviyelerini arttırdığı görüldü. Çalışmamızda EPO'nun kan glikozunu düşürücü etkilere sahip olduğu görüldü ($p<0,05$). EPO'nun β hücre canlılığını ve fonksiyonunu artırmasına bağlı olarak insülin seviyelerini arttırdığı söylenebilir.

İlk olarak 2016 yılında tanımlanan asprosin glikoz homeostazında, gıda alımı ve enerji homeostazının düzenlenmesinde rol oynayan beyaz yağ dokusundan salınan bir hormondur. Asprosinin serumdaki konsantrasyonu açlık koşullarında artar ve yeniden beslenme ile hızla azalır. Asprosin G protein-cAMP-PKA yoluyla karaciğerden kana glikoz salınımına neden olur. Bu nedenle asprosin hepatik glikoz salınımını baskılayan insülin sekresyonunda dolaylı olarak artışa yol açar (Romere ve ark. 2016). Asprosin ile glikoz ve lipit homeostazı arasındaki ilişki üzerine yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Obez ve T2 DM'li bireylerde yağ dokusu artışına paralel olarak asprosinin de arttığı bilinmektedir (Hekim ve ark. 2021). Diyabet adipokin salgılanmasını bozarak ve hepatik glikoz salınımını teşvik ederek insülin direncini kötüleştirir, insülin direncine (Duwaerts ve Maher 2019) ve asprosin salgısının artmasına neden olur (Romere ve ark. 2016). Hayvan modellerindeki çalışmalar da yine insanlardakine benzer şekilde asprosinin obezite ve diyabetle olan ilişkisini ortaya koymaktadır. Ma ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada monosodyum glutamat ile indüklenen obez farelerde kontrol grubuna göre serum asprosin seviyelerinin iki kat yükseldiğini bulmuşlardır. Ayrıca obez farelerin hipertrigliseridemi, artan toplam kolesterol, FFA ve düşük HDL dahil olmak üzere belirgin dislipidemi sergilediğini bulmuşlardır. Yüksek düzeyde ve kronik etanol tüketimi bozulmuş β-hücre fonksiyonu ve insülin direnci ile karakterize T2 DM için bir risk faktörüdür (Yang ve ark. 2020; Jang ve ark. 2019; Kim S. ve Kim D. 2012; Dembele ve ark. 2008). Fakat bazı çalışmalarda orta ve makul düzeyde alkol kullanımının daha düşük insülin seviyelerine bağlı olarak T2 DM riskini azalttığı (Schrieks ve ark. 2015; Wang, Luo ve ark. 2014; Koppes ve ark. 2005; Davies ve ark. 2002) bazı çalışmalarda da hiçbir etkisinin olmadığı (Kao ve ark. 2001) öne sürülmüştür. Çalışmamızda tüm gruplarda hem beyin dokusunda ve hem de plazmada asprosin seviyeleri açısından anlamlı bir fark olmadığı bulundu. Ayrıca açlık kan glikozu, insülin direnci, total kolesterol, HDL seviyelerinin etanol ve diğer gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik göstermediği görüldü. Tüm gruplarda asprosin ile açlık kan glikozu, insülin, HDL, total kolesterol seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı bulundu. Çalışmamızın sonuçlarına göre uyguladığımız etanolün doza ve uygulama süresine bağlı olarak glikoz homeostazisi ve lipit profili açısından patolojik düzeylerde bir bozulma görülmedi. Bu yüzden dolaylı olarak etanolün plazma asprosin seviyelerinde de bir değişiklik oluşturmadığı söylenebilir. Adipositler primer olarak karaciğer üzerinde etkili olan adipokinler olarak bilinen çok çeşitli biyolojik olarak aktif moleküller salgılar. Etanol yağ

dokusunun hem depolama hem de salgılama işlevini etkilemektedir. Örneğin etanol tarafından uyarılan yağ dokusu lipolizi kronik alkol kaynaklı karaciğer yağlanmasına katkıda bulunur. Ayrıca etanol ile beslenen farelerin yağ dokusunda etanolü metabolize edici enzimlerin özellikle de CYP2E1'in seviyesinin yükseldiği ve bunun da yağ dokusunda oksidatif stresi ve/veya inflamasyonu artırdığı ifade edilmiştir. Bu nedenle etanol artan yağ dokusu lipolizi ve serbest yağ asidi mobilizasyonu ve değişen adipokin salgılanması ile karakterize edilen yağ dokusu işlev bozukluğuna neden olmaktadır (Gopal ve ark. 2021). Fakat literatürde etanolün yağ dokusundan salınan asprosin hormonu üzerine etkisi olup olmadığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden etanolün asprosin salgılanması üzerine doğrudan ya da dolaylı olarak etkili olup olmadığı konusunda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Obezite ve diyabetle ilgili çalışmalarda obez ve diyabet olan insan ve hayvanlarda asprosin ve trigliserit seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu ayrıca asprosin ile insülin direnci, açlık kan glikozu, trigliserit seviyeleri arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (Li ve ark. 2018; Zhang ve ark. 2019; Wang ve ark. 2018). Çalışmamızda trigliserit seviyelerinin etanol+DA grubunda kontrol, glikoz ve etanol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu, plazma asprosin seviyesinde diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olmasa da bir artışın olduğu ve bu grupta plazma asprosin seviyeleri ile trigliserit seviyeleri arasında güçlü bir şekilde pozitif korelasyon olduğu bulundu ($p<0,05$). Çalışmamızda her ne kadar glikoz homeostazisini ve lipid profilini etkileyen obezite ya da diyabet gibi patolojik bir durum ortaya çıkmasa da kontrol grubuna göre DA ve etanol+DA gruplarındaki trigliserit yüksekliği dikkat çekmektedir ($p<0,05$). Çalışmamızdaki trigliserit ve asprosin seviyeleri arasında görülen pozitif korelasyonun yükselmiş olan trigliserit seviyelerinden kaynaklandığı söylenebilir. Bu konunun aydınlatılması için hem asprosinle ilgili hem de DA ile ilgili daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Sonuç ve öneriler;

Etanolün neden olduğu değişikliklerin altında yatan mekanizmalar çoğu zaman maruz kalma süresine ve alınan miktara bağlıdır.

Uzun süreli aralıklı etanol maruziyetine karşı uzun süreli DA'nın oksidatif stresi azaltarak nöroprotektif etkisinin olduğu görüldü.

Etanolün dozuna ve süresine bağlı olarak glikoz homeostazisi ve lipid profili üzerinde ve plazma asprosin seviyeleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna ulaşıldı.

Düşük dozlarda DA'nın serum trigliserit seviyelerinde artışa neden olduğu görüldü.

DA'nın fizyolojik sınırlar içerisinde kan glikozunda azalmaya ve insülin seviyesinde artışa neden olduğu görüldü.

Asprosin sekresyonunun düzenlenmesi ve glikoz homeostazısı ile lipit metabolizması üzerindeki etkileri konusunda hala bilinmeyen bir çok konu bulunmaktadır.

Bu yüzden etanolün plazma asprosin seviyeleri üzerine etkileri konusunda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Abrahao, K.P., Salinas, A.G., Lovinger, D.M. (2017). Alcohol and the brain: Neuronal molecular targets, synapses, and circuits. *Neuron*, ***96(6),*** 1223-1238.

Aikens, J., Dix, T. A. (1991). Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *The Journal of Biological Chemistry,* ***266(23),*** 15091-15098.

Agarwal, D. P., Goedde H. W. (1990). *Alcohol Metabolism, Alcohol Intolerance and Alcoholism* (*Biochemical and Pharmacogenetic Approaches).* (1st ed.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Akyüz, E., Tiber, P. M. (2017). İçeri doğrultucu potasyum kanalları ve epilepsi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, ***14(2),*** 141-149.

Alasmari, F., Goodwani, S., McCullumsmith, R.E., Sari, Y. (2018). Role of glutamatergic system and mesocorticolimbic circuits in alcohol dependence. Progress in Neurobiology, ***171,*** 32-49.

Alatas, Ö. D., Gurger, M., Atescelik, M., Yildiz, M., Demir, C. F., Ekingen, E., Kalayci, M., Ilhan, N., Acar, E. (2015). Neuron-Specific Enolase, S100 Calcium-Binding Protein B, and Heat Shock Protein 70 Levels in Patients with Intracranial Hemorrhage. *Medicine*, ***94(45),*** e2007.

Alaux-Cantin, S., Warnault, V., Legastelois, R., Botia, B., Pierrefiche, O., Vilpoux, C., Naassila, M. (2013). Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, ***67,*** 521-531.

Alnaeeli, M., Wang, L., Piknova, B., Rogers, H., Li, X., Noguchi, C. T. (2012). Erythropoietin in brain development and beyond. *Anatomy Research International*, ***2012,*** 953264.

Anand, N., Stead, L. G. (2005). Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovascular Diseases*, ***20(4),*** 213-219.

Aoyama K. (2021). Glutathione in the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, ***22(9),*** 5010.

Armstrong, D., Stratton, R. D. (Ed.). (2016). *Oxidative Stress and Antioxidant Protection (The Science of Free RadicalBiology and Disease).* Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.

Augustyniak, A., Skrzydlewska, E. (2010). The influence of L-carnitine suplementation on the antioxidative abilities of serum and the central nervous system of ethanol-induced rats. *Metabolic Brain Disease, **25(4),*** 381-389.

Badanich, K.A., Mulholland, P.J., Beckley, J.T., Trantham-Davidson, H., Woodward, J.J. (2013). Ethanol reduces neuronal excitability of lateral orbitofrontal cortex neurons via a glycine receptor dependent mechanism. *Neuropsychopharmacology, **38(7),*** 1176-1188.

Bagley, S.M., Levy, S., Schoenberger, S.F. (2019). Alcohol use disorders in adolescents. *Pediatric Clinics of North America, **66(6),*** 1063-1074.

Banks, W. A., Jumbe, N. L., Farrell, C. L., Niehoff, M. L., Heatherington, A. C. (2004). Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. *European Journal of Pharmacology, **505(1-3),*** 93-101.

Baraona, E., & Lieber, C. S. (1979). Effects of ethanol on lipid metabolism. *Journal of Lipid Research, **20(3),*** 289-315.

Baskin, S., Salem, H. (1997). *Oxidants, Antioxidants and Free Radicals.* New York: Taylor and Francis.

Bassareo, V., Cucca, F., Frau, R., Di Chiara, G. (2017). Changes in dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core during ethanol and sucrose self-administration. *Frontiers in Behavioral Neuroscience, **11,*** 71.

Baydaş, G., Tüzcü, M. (2005). Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Experimental Neurology, **194(1),*** 175-181.

Bayır, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine, **33(12),*** 498-501.

Belayev, L., Khoutorova, L., Zhao, W., Vigdorchik, A., Belayev, A., Busto, R., Magal, E., Ginsberg, M.D. (2005). Neuroprotective effect of darbepoetin alfa, a novel

recombinant erythropoietic protein, in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, ***36(5),*** 1071-1076.

Betteridge, D. J. (2000). What is Oxidative Stress?. *Metabolism*, ***49(2),*** 3-8.

Bian, X. X., Yuan, X. S., Qi, C. P. (2010). Effect of recombinant human erythropoietin on serum S100B protein and interleukin-6 levels after traumatic brain injury in the rat. *Neurologia Medico-Chirurgica*, ***50(5),*** 361-366.

Bilge, U., Gültekin, G., Bilgin, M., Ünlüoğlu, İ. (2015). Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance (HOMA-IR) Değerleri ile Glomerüler Filtrasyon Hızları Arasındaki İlişki: Retrospektif Bir Çalışma. *Ankara Medical Journal*, ***15(4),*** 220-225.

Brendt, P., Frey, U., Adamzik, M., Schäfer, S. T., Peters, J. (2009). Darbepoetin alpha, a long-acting erythropoeitin derivate, does not alter LPS evoked myocardial depression and gene expression of Bax, Bcl-Xs, Bcl-XL, Bcl-2, and TNF-alpha. *Shock,* ***31(1),*** 50-54.

Brines, M. L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N. C., Cerami, C., Itri, L. M., Cerami, A. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, ***97*****(19),** 10526-10531.

Brito-Filho, S.B., Moura, E.G., Santos, O.J., Sauaia-Filho, E.N., Amorim, E., Santana, E.E., Barros-Filho, A.K., Santos, R.A. (2016). Effect of chronic ingestion of wine on the glycemic, lipid and body weight homeostasis in mice. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, ***29(3),*** 146-150.

Burton, G. J., Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice and Research. Clinical Obstetrics and Gynaecology*, ***25(3),*** 287–299.

Canadillas, S., Ortega, R., Estepa, J.C., Egea, J., Gonzalez-Menchen, A., Perez-Seoane, C., Lopez-Andreu, M., Ramirez, R., Tetta, C., Rodriguez, M., Martin-Malo, A., Aljama, P. (2010). Darbepoetin-α treatment enhances glomerular regenerative process in the Thy-1 glomerulonephritis model. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, ***299(6),*** F1278-1287.

Catala, A. (2012). *Lipid Peroxidation*. Rijeka (Croatia): InTech

Cederbaum, A.I. (2012). Alcohol metabolism. *Clinical Liver Disease, **16(4),*** 667-685.

Chandrasekar, R. (2013). Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. *Frontiers in Molecular Neuroscience, **6,*** 14.

Chateauvieux, S., Grigorakaki, C., Morceau, F., Dicato, M., Diederich, M. (2011). Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochemical Pharmacology, **82(10),*** 1291-1303.

Chater, T.E., Goda, Y. (2014). The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience, **8,*** 401.

Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin, **49(3),*** 481-493.

Cheng, Q., Li, Y. W., Yang, C. F., Zhong, Y. J., Li, L. (2019). Ethanol-Induced Hepatic Insulin Resistance is Ameliorated by Methyl Ferulic Acid Through the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Frontiers in Pharmacology, **10,*** 949.

Choi, D.W., Koh, J.Y., Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. The Journal of Neuroscience, ***8(1),*** 185-196.

Coleman, L. G., Jr, Liu, W., Oguz, I., Styner, M., Crews, F. T. (2014). Adolescent binge ethanol treatment alters adult brain regional volumes, cortical extracellular matrix protein and behavioral flexibility. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior, **116,*** 142-151.

Collins, M.A., Neafsey, E.J. (2016). Alcohol, excitotoxicity and adult brain damage: an experimentally unproven chain-of-events. *Frontiers in Molecular Neuroscience, **9**,* 8.

Contet, C., Goulding, S.P., Kuljis, D.A., Barth, A.L. (2016). BK channels in the central nervous system. *International Review of Neurobiology, **128,*** 281-342.

Crabb, D.W., Liangpunsakul, S. (2006). Alcohol and lipid metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology, **21(3),*** 56-60.

Crandall, J. P., Polsky, S., Howard, A. A., Perreault, L., Bray, G. A., Barrett-Connor, E., Brown-Friday, J., Whittington, T., Foo, S., Ma, Y., Edelstein, S. L., Diabetes

Prevention Program Research Group (2009). Alcohol consumption and diabetes risk in the Diabetes Prevention Program. *The American Journal of Clinical Nutrition*, ***90(3),*** 595-601.

Crews, F.T., Vetreno, R.P. (2014). Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *International Review of Neurobiology*, ***118,*** 315-357.

Crews, F.T., Vetreno, R.P., Broadwater, M.A., Robinson, D.L. (2016). Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behavior. *Pharmacological Reviews*, ***68(4),*** 1074-1109.

Cui, J., Liu, Y., Chang, X., Gou, W., Zhou, X., Liu, Z., Li, Z., Wu, Y., Zuo, D. (2019). Acetaldehyde induces neurotoxicity in vitro via oxidative stress- and Ca^{2+} imbalance-mediated endoplasmic reticulum stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, ***2019,*** 2593742.

Cuzon Carlson, V.C., Seabold, G.K., Helms, C.M., Garg, N., Odagiri, M., Rau, A.R., Daunais, J., Alvarez, V.A., Lovinger, D.M., Grant, K.A. (2011). Synaptic and morphological neuroadaptations in the putamen associated with long-term, relapsing alcohol drinking in primates. *Neuropsychopharmacology*, ***36(12),*** 2513-2528.

Çeltik, C., Acunaş, B., Öner, N., & Pala, Ö. (2004). Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain and Development*, ***26(6),*** 398-402.

Dahchour, A., De Witte, P. (2000). Ethanol and amino acids in the central nervous system: assessment of the pharmacological actions of acamprosate. Progress in Neurobiology, ***60(4),*** 343-362.

Das, S. K., Hiran, K. R., Mukherjee, S., Vasudevan, D. M. (2007). Oxidative stress is the primary event: Effects of ethanol consumption in brain. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, ***22(1),*** 99-104.

Dasgupta, A., Klein, K. (2014). *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment of Disease*. San Diego: Elsevier Inc.

Davies, M. J., Baer, D. J., Judd, J. T., Brown, E. D., Campbell, W. S., Taylor, P. R. (2002). Effects of moderate alcohol intake on fasting insulin and glucose

concentrations and insulin sensitivity in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association, **287(19),*** 2559-2562.

De Bellis, M.D., Narasimhan, A., Thatcher, D.L., Keshavan, M.S., Soloff, P., Clark, D.B. (2005). Prefrontal cortex, thalamus, and cerebellar volumes in adolescents and young adults with adolescent-onset alcohol use disorders and comorbid mental disorders. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research, **29(9),*** 1590-600.

Dembele, K., Nguyen, K. H., Hernandez, T. A., Nyomba, B. L. (2009). Effects of ethanol on pancreatic beta-cell death: interaction with glucose and fatty acids. *Cell Biology and Toxicology, **25(2),*** 141-152.

Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, **2016,*** 1245049.

Duerrschmid, C., He, Y., Wang, C., Li, C., Bournat, J.C., Romere, C., Saha, P.K., Lee, M.E., Phillips, K.J., Jain, M., Jia, P., Zhao, Z., Farias, M., Wu, Q., Milewicz, D.M., Sutton, V.R., Moore, D.D., Butte, N.F., Krashes, M.J., Xu, Y., Chopra, A.R. (2017). Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nature Medicine, **23,*** 1444-1453.

Durackova, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research, **59,*** 459-469.

Ehlers, C. L., Liu, W., Wills, D. N., Crews, F. T. (2013). Periadolescent ethanol vapor exposure persistently reduces measures of hippocampal neurogenesis that are associated with behavioral outcomes in adulthood. *Neuroscience, **244,*** 1-15.

Eşel, E., Dinç, K. (2017). Alkol bağımlılığının nörobiyolojisi ve tedaviye yansımaları. *Türk Psikiyatri Dergisi, **28(1),*** 51-60.

Fan, Y., Ya-E, Z., Ji-Dong, W., Yu-Fan, L., Ying, Z., Ya-Lun, S., Meng-Yu, M., Rui-Ling, Z. (2018). Comparison of Microbial Diversity and Composition in Jejunum and Colon of the Alcohol-dependent Rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology, **28(11),*** 1883-1895.

Fernandes, L., Cartagenes, S. C., Barros, M. A., Carvalheiro, T., Castro, N., Schamne, M. G., Lima, R. R., Prediger, R. D., Monteiro, M. C., Fontes-Jünior, E. A., Cunha, R. A., Maia, C. (2018). Repeated cycles of binge-like ethanol exposure induce

immediate and delayed neurobehavioral changes and hippocampal dysfunction in adolescent female rats. *Behavioural Brain Research*, ***350,*** 99-108.

Field, J. B., Williams, H. E., Mortimore, G. E. (1963). Studies on the mechanism of ethanol-induced hypoglycemia. *The Journal of Clinical Investigation*, ***42(4),*** 497-506.

Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress. *Sports Medicine*, ***36(4),*** 327-358.

Fürst P. (1996). The role of antioxidants in nutritional support. *The Proceedings of the Nutrition Society*, ***55(3),*** 945-961.

Gonzales, R.A., Weiss, F. (1998). Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. *The Journal of Neuroscience*, ***18(24),*** 10663-10671.

Goodlett, C. R., Horn, K. H. (2001). Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Research and Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, ***25(3),*** 175-184.

Gopal, T., Ai, W., Casey, C. A., Donohue, T. M., Jr, Saraswathi, V. (2021). A review of the role of ethanol-induced adipose tissue dysfunction in alcohol-associated liver disease. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, ***45(10),*** 1927-1939.

Granholm, L., Segerström, L., & Nylander, I. (2018). Episodic ethanol exposure in adolescent rats causes residual alterations in endogenous opioid peptides. *Frontiers in Psychiatry*, ***425.***

Grasso, G., Graziano, F., Sfacteria, A., Carletti, F., Meli, F., Maugeri, R., Passalacqua, M., Certo, F., Fazio, M., Buemi, M., Iacopino, D. G. (2009). Neuroprotective effect of erythropoietin and darbepoetin alfa after experimental intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery*, ***65(4),*** 763-770.

Guo, R., Ren, J. (2010). Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, ***7(4),*** 1285-1301.

Haase V. H. (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews*, ***27(1),*** 41-53.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: CPI Group (UK) Ltd.

Hammoud, N., Jimenez-Shahed, J. (2019). Chronic neurologic effects of alcohol. *Clinical Liver Disease,* ***23(1),*** 141-155.

Heier, C., Xie, H., Zimmermann, R. (2016). Nonoxidative ethanol metabolism in humans-from biomarkers to bioactive lipids. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, ***68(12)***, 916-923.

Hermann, A., Donato, R., Weiger, T. M., Chazin, W. J. (2012). S100 calcium binding proteins and ion channels. *Frontiers in Pharmacology*, ***3,*** 67.

Herrmann, M., Curio, N., Jost, S., Wunderlich, M. T., Synowitz, H., & Wallesch, C. W. (1999). Protein S-100B and neuron specific enolase as early neurobiochemical markers of the severity of traumatic brain injury. *Restorative Neurology and Neuroscience*, ***14(2-3),*** 109-114.

Herrmann, M., Ebert, A. D., Tober, D., Hann, J., Huth, C. (1999). A contrastive analysis of release patterns of biochemical markers of brain damage after coronary artery bypass grafting and valve replacement and their association with the neurobehavioral outcome after cardiac surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery,* ***16(5),*** 513-518.

Hernandez, J.A., Lopez-Sanchez, R.C., Rendon-Ramirez, A. (2016). Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, ***2016***, 1543809.

Holt, S. (1981). Observations on the relation between alcohol absorption and the rate of gastric emptying. *Canadian Medical Association Journal*, ***124(3),*** 267-277, 297.

Husain, K., Somani, S. M. (1997). Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on hepatic and plasma antioxidant system in rat. *Journal of Applied Toxicology,* ***17(3),*** 189-194.

Hyun, J., Han, J., Lee, C., Yoon, M., Jung, Y. (2021). Pathophysiological aspects of alcohol metabolism in the liver. *International Journal of Molecular Sciences,* ***22(11),*** 5717.

Isgro, M. A., Bottoni, P., Scatena, R. (2015). Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, ***867,*** 125-143.

Jacobus, J., Tapert, S.F. (2013). Neurotoxic effects of alcohol in adolescence. *Annual Review of Clinical Psychology,* ***9,*** 703-721.

Jang, H. B., Go, M. J., Park, S. I., Lee, H. J., Cho, S. B. (2019). Chronic heavy alcohol consumption influences the association between genetic variants of GCK or INSR and the development of diabetes in men: A 12-year follow-up study. *Scientific Reports*, ***9(1),*** 20029.

Jayaraman, T., Kannappan, S., Ravichandran, M. K., Anuradha, C. V. (2008). Impact of Essentiale L on ethanol-induced changes in rat brain and erythrocytes. *Singapore Medical Journal*, ***49(4),*** 320-327.

Jiao, Y., Wang, Y., Guo, S., Wang, G. (2017). Glutathione peroxidases as oncotargets. *Oncotarget*, ***8(45),*** 80093-80102.

Kao, W. H., Puddey, I. B., Boland, L. L., Watson, R. L., Brancati, F. L. (2001). Alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes mellitus: atherosclerosis risk in communities study. *American Journal of Epidemiology*, ***154(8),*** 748-757.

Katada, R., Nishitani, Y., Honmou, O., Mizuo, K., Okazaki, S., Tateda, K., Watanabe, S., Matsumoto, H. (2012). Expression of aquaporin-4 augments cytotoxic brain edema after traumatic brain injury during acute ethanol exposure. *The American journal of pathology*, ***180(1),*** 17-23.

Kehrer J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, ***149(1),*** 43-50.

Kertmen, H., Gürer, B., Yılmaz, E. R., Kanat, M. A., Arıkök, A. T., Ergüder, B. I., Hastürk, A.E., Ergil, J., Şekerci, Z. (2015). Antioxidant and antiapoptotic effects of darbepoetin-α against traumatic brain injury in rats. *Archives of Medical Science: AMS*, ***11*****(5),** 1119.

Kim, S. J., Kim, D. J. (2012). Alcoholism and diabetes mellitus. *Diabetes and Metabolism Journal*, ***36(2),*** 108-115.

Kim, J. Y., Song, E. H., Lee, H. J., Oh, Y. K., Park, Y. S., Park, J. W., Kim, B. J., Kim, D. J., Lee, I., Song, J., Kim, W. H. (2010). Chronic ethanol consumption-induced pancreatic {beta}-cell dysfunction and apoptosis through glucokinase nitration and its down-regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, ***285(48),*** 37251-37262.

Knight J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, ***30(2),*** 145-158.

Kochanek, P. M., Berger, R. P., Bayir, H., Wagner, A. K., Jenkins, L. W., Clark, R. S. (2008). Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain

injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. *Current Opinion in Critical Care*, ***14(2),*** 135-141.

Koppes, L. L., Dekker, J. M., Hendriks, H. F., Bouter, L. M., Heine, R. J. (2005). Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care*, ***28(3),*** 719-725.

Kumral, A., Tugyan, K., Gonenc, S., Genc, K., Genc, S., Sonmez, U., Yilmaz, O., Duman, N., Uysal, N., Ozkan, H. (2005). Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegenaration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Research. Developmental Brain Research*, ***160(2),*** 146-56.

Laher, I. (2014). *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin/Heidelberg (Germany): Springer-Verlag.

Lanng, A.R., Gasbjerg, L.S., Bergmann, N.C., Bergmann, S., Helsted, M.M., Gillum, M.P., Hartmann, B., Holst, J.J., Vilsboll, T., Knop, F.K. (2019). Gluco-metabolic effects of oral and intravenous alcohol administration in men. *Endocrine Connections*, ***8(10),*** 1372-1382.

Lerma-Cabrera, J. M., Arevalo-Romero, C. A., Cortés-Toledo, G. A., Adriasola-Carrasco, A. A., Carvajal, F. (2019). Emotional Reactivity to Incentive Downshift in Adult Rats Exposed to Binge-Like Ethanol Exposure During Adolescence. *Frontiers in Psychology*, ***10,*** 315.

Li, E., Shan, H., Chen, L., Long, A., Zhang, Y., Liu, Y., Jia, L., Wei, F., Han, J., Li, T., Liu, X., Deng, H., Wang, Y. (2019). OLFR734 Mediates Glucose Metabolism as a Receptor of Asprosin. *Cell Metabolism*, ***30(2),*** 319-328.

Li, X., Liao, M., Shen, R., Zhang, L., Hu, H., Wu, J., Wang, X., Qu, H., Guo, S., Long, M., Zheng, H. (2018). Plasma Asprosin Levels Are Associated with Glucose Metabolism, Lipid, and Sex Hormone Profiles in Females with Metabolic-Related Diseases. *Mediators of Inflammation*, ***2018,*** 7375294.

Lu, Z., Long, Z. H. (2017). Effect of adjuvant recombinant EPO therapy on neural functional recovery, inflammation and erythrocyte glucose metabolism in patients with severe craniocerebral injury. *Journal of Hainan Medical University*, ***23(2),*** 78-82.

Macit, E (2009). *Kronik Etanol Maruziyetinin İndüklediği Beyin Hasari Üzerine Antioksidanlarin Koruyucu Etkileri* (Doktora tezi. Gülhane Askeri Tip Akademisi Sağlik Bilimleri Enstitüsü).

Mani, V., Arivalagan, S., Siddique, A. I., Namasivayam, N. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory role of zingerone in ethanol-induced hepatotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, ***421(1-2),*** 169-181.

Martin, P. R., Singleton, C. K., Hiller-Sturmhöfel, S. (2003). The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Research and Health*, ***27(2),*** 134.

Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, ***77(3),*** 147-161.

Masuda, S., Chikuma, M., Sasaki, R. (1997). Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Research*, ***746(1-2),*** 63-70.

Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M., Sasaki, R. (1994). A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, ***269(30),*** 19488-19493.

Mayfield, J., Arends, M.A., Harris, R.A., Blednov, Y.A. (2016). Genes and alcohol consumption: Studies with mutant mice. *International Review of Neurobiology*, ***126,*** 293-355.

McCool, B.A. (2011). Ethanol modulation of synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, ***61(7),*** 1097-1108.

McNutt N. S. (1998). The S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. *Journal of Cutaneous Pathology*, ***25(10),*** 521-529.

McQueen, C. (2018). *Comprehensive Toxicology*. (3rd ed.) Amsterdam: Elsevier Ltd.

Mira, R. G., Lira, M., Tapia-Rojas, C., Rebolledo, D. L., Quintanilla, R. A., Cerpa, W. (2020). Effect of Alcohol on Hippocampal-Dependent Plasticity and Behavior: Role of Glutamatergic Synaptic Transmission. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, ***13,*** 288.

Miyagi, S., Takamura, T., Nguyen, T., Tsujiguchi, H., Hara, A., Nakamura, H., Suzuki, K., Tajima, A., Kannon, T., Toyama, T., Kambayashi, Y., Nakamura, H. (2021). Moderate alcohol consumption is associated with impaired insulin secretion and fasting glucose in non-obese non-diabetic men. *Journal of Diabetes Investigation*, ***12(5),*** 869-876.

Mokuda, O., Tanaka, H., Hayashi, T., Ooka, H., Okazaki, R., Sakamoto, Y. (2004). Ethanol stimulates glycogenolysis and inhibits both glycogenesis via

gluconeogenesis and from exogenous glucose in perfused rat liver. *Annals of Nutrition and Metabolism*, ***48(4),*** 276-280

Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y., Sasaki, R. (1997). Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*, ***76(1),*** 105-116.

Morishita, E., Narita, H., Nishida, M., Kawashima, N., Yamagishi, K., Masuda, S., Nagao, M., Hatta, H., Sasaki, R. (1996). Anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody: epitope mapping, quantification of the soluble receptor, and detection of the solubilized transmembrane receptor and the receptor-expressing cells. *Blood*, ***88(2),*** 465-471.

Morris, S. A., Eaves, D. W., Smith, A. R., Nixon, K. (2010). Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. *Hippocampus*, ***20(5),*** 596-607.

Motaghinejad, M., Mashayekh, R., Motevalian, M., Safari, S. (2021). The possible role of CREB-BDNF signaling pathway in neuroprotective effects of minocycline against alcohol-induced neurodegeneration: molecular and behavioral evidences. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, ***35(1),*** 113-130.

Möykkynen, T., Korpi, E.R. (2012). Acute effects of ethanol on glutamate receptors. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, ***111(1),*** 4-13.

Mussack, T., Biberthaler, P., Kanz, K. G., Heckl, U., Gruber, R., Linsenmaier, U., Mutschler, W., Jochum, M. (2002). Immediate S-100B and neuron-specific enolase plasma measurements for rapid evaluation of primary brain damage in alcohol-intoxicated, minor head-injured patients. *Shock*, ***18(5),*** 395-400.

Neuberger, J., DiMartini, A. (2015). *Alcohol Abuse and Liver Disease.* (1st ed.). West Sussex (UK): John Wiley and Sons, Ltd.

NIAAA (2004), Department of Health and Human Services; National Institutes of Health NIAAA Newsletter, *Featuring İnformation from the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. Erişim 28.01.2022, https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter_Number3.pdf

Nohl, H., Kozlov, A. V., Gille, L., Staniek, K. (2005). Endogenous *Oxidant-Generating Systems.* Berlin: Springer-Verlag.

Oh, S. I., Lee, M. S., Kim, C. I., Song, K. Y., Park, S. C. (2002). Aspartate modulates the ethanol-induced oxidative stress and glutathione utilizing enzymes in rat testes. *Experimental and Molecular Medicine, **34(1),*** 47-52.

Olsen, R.W., Hanchar, H.J., Meera, P., Wallner, M. (2007). GABAA receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. *Alcohol, **41(3),*** 201-209.

Olsen, R.W., Li, G.D., Wallner, M., Trudell, J.R., Bertaccini, E.J., Lindahl, E., Miller, K.W., Alkana, R.L., Davies, D.L. (2014). Structural models of ligand-gated ion channels: sites of action for anesthetics and ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research, **38(3),*** 595-603.

Olsen, R.W., Liang, J. (2017). Role of GABAA receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model. *Molecular Brain, **10(1),*** 45.

Oshima, N., Onimaru, H., Yamagata, A., Itoh, S., Matsubara, H., Imakiire, T., Nishida, Y., Kumagai, H. (2018). Erythropoietin, a putative neurotransmitter during hypoxia, is produced in RVLM neurons and activates them in neonatal Wistar rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, **314(5),*** R700-R708.

Özben, T. (1998). *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Pathological and Physiological Significance.* New York: Springer Science and Business Media, LLC.

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations, **6(3),*** 331-336.

Packer, L., Glazer, A. N. (1990). *Oxygen Radicals in Biological Systems: Oxygen Radicals and Antioxidants.* California: Academic Press, Inc.

Paiva, S. A., Russell, R. M. (1999). Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition, **18(5),*** 426-433.

Pascual, M., Blanco, A. M., Cauli, O., Miñarro, J., Guerri, C. (2007). Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *The European Journal of Neuroscience, **25(2),*** 541-550.

Paxinos, G., Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* (6th ed.) London: Elsevier Inc.

Pelinka, L. E., Jafarmadar, M., Redl, H., Bahrami, S. (2004). Neuron-specific-enolase is increased in plasma after hemorrhagic shock and after bilateral femur fracture without traumatic brain injury in the rat. *Shock, **22(1),*** 88-91.

Pervin, Z., Stephen, J.M. (2021). Effect of alcohol on the central nervous system to develop neurological disorder: pathophysiological and lifestyle modulation can be potential therapeutic options for alcohol-induced neurotoxication. *AIMS Neuroscience, **8(3),*** 390-413.

Pizon, A.F., Becker, C.E., Bikin, D. (2007) The clinical significance of variations in ethanol toxicokinetics. *Journal of Medical Toxicology, **3(2),*** 63-72.

Roberto, M., Madamba, S.G., Stouffer, D.G., Parsons, L.H., Siggins, G.R. (2004). Increased GABA release in the central amygdala of ethanol-dependent rats. *The Journal of Neuroscience, **24(45),*** 10159-10166.

Romere, C., Duerrschmid, C., Bournat, J., Constable, P., Jain, M., Xia, F., Saha, P. K., Del Solar, M., Zhu, B., York, B., Sarkar, P., Rendon, D. A., Gaber, M. W., LeMaire, S. A., Coselli, J. S., Milewicz, D. M., Sutton, V. R., Butte, N. F., Moore, D. D., Chopra, A. R. (2016). Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell, **165(3),*** 566-579.

Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S., Masuda, S., Sasaki, R. (1998). Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochemical and Biophysical Research Communications, **253(1),*** 26-32.

Sakanaka, M., Wen, T. C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., Sasaki, R. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **95(8),*** 4635-4640.

Sathiavelu, J., Senapathy, G. J., Devaraj, R., Namasivayam, N. (2009). Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology, **61(6),*** 809-817.

Schlorff, E. C., Husain, K., Somani, S. M. (1999). Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol, **17(2),*** 97-105.

Schober, M.E., Requena, D.F., Rodesch, C.K. (2018). EPO improved neurologic outcome in rat pups late after traumatic brain injury. *Brain and Development*, ***40(5),*** 367-375.

Schoerkhuber, W., Kittler, H., Sterz, F., Behringer, W., Holzer, M., Frossard, M., Spitzauer, S., Laggner, A. N. (1999). Time course of serum neuron-specific enolase. A predictor of neurological outcome in patients resuscitated from cardiac arrest. *Stroke*, ***30(8),*** 1598-1603.

Schrieks, I. C., Heil, A. L., Hendriks, H. F., Mukamal, K. J., Beulens, J. W. (2015). The effect of alcohol consumption on insulin sensitivity and glycemic status: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Diabetes Care*, ***38(4),*** 723-732.

Sen, S., Chakraborty, R. (2011). *The Role of Antioxidants in Human Health. in Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*. Washington, DC: American Chemical Society.

Selakovic, V., Raicevic, R., Radenovic, L. (2005). The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *Journal of Clinical Neuroscience*, ***12(5),*** 542-547.

Seven, A., Seymen, O., Hatemi, S., Hatemi, H., Yiğit, G., Candan, G. (1996). Antioxidant status in experimental hyperthyrodism: effect of vitamin E supplementation. *Clinica Chimica Acta*, ***256(1),*** 65-74.

Seymen, O., Seven, A., Candan, G., Yigit, G., Hatemi, S., Hatemi, H. (1997). The effect of iron supplementation on GSH levels, GSH-Px, and SOD activities of erythrocytes in L-thyroxine administration. *Acta Medica Okayama*, ***51(3),*** 129-133.

Seymen, P., Aytac, E., Esen, F., Tel, C., Demir, F., Genc, H., Uzun, H., Oz, B., Altug, T., Seymen, H. O. (2013). Darbepoetin α ameliorates neuronal damage in a rat model of acute ethanol intoxication. *The International Journal of Neuroscience*, ***123(2),*** 99-103.

Seymen, P., Aytaç, E., Bölükbaşı, F., Demir, F., Genç, H., Uzun, H., Seymen, H. O. (2009). Effects of darbepoetin alpha on brain tissue oxidative stress in experimental ethanol administration. *The Balkan Medical Journal*, ***26(2),*** 95-99.

Shaik, A. J., Reddy, K., Mohammed, N., Tandra, S. R., Rukmini Mridula Kandadai, Baba Kss, S. (2019). Neuron specific enolase as a marker of seizure related neuronal injury. *Neurochemistry International*, ***131,*** 104509.

Sharma, G., Shin, E. J., Sharma, N., Nah, S. Y., Mai, H. N., Nguyen, B. T., Jeong, J. H., Lei, X. G., Kim, H. C. (2021). Glutathione peroxidase-1 and neuromodulation: Novel potentials of an old enzyme. *Food and Chemical Toxicology*, ***148,*** 111945.

Sies, H. (2020). *Oxidative Stress: Eustress and Distress*. London: Academic Press is an imprint of Elsevier.

Siler, S. Q., Neese, R. A., Christiansen, M. P., Hellerstein, M. K. (1998). The inhibition of gluconeogenesis following alcohol in humans. *The American Journal of Physiology*, ***275(5),*** E897-E907.

Silva-Pena, D., Rivera, P., Alen, F., Vargas, A., Rubio, L., Garcia-Marchena, N., Pavon, F.J., Serrano, A., Rodriguez de Fonseca, F., Suarez, J. (2019). Oleoylethanolamide modulates BDNF-ERK signaling and neurogenesis in the hippocampi of rats exposed to Δ9-THC and ethanol binge drinking during adolescence. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, ***12,*** 96.

Silvestre de Ferron, B., Bennouar, K.E., Kervern, M., Alaux-Cantin, S., Robert, A., Rabiant, K., Antol, J., Naassila, M., Pierrefiche, O. (2015). Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: key role for GLUN2B subunit. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, ***19(1),*** pyv087.

Söderpalm, B., Lidö, H.H., Ericson, M. (2017). The glycine receptor-A functionally important primary brain target of ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, ***41(11),*** 1816-1830.

Squeglia, L.M., Sorg, S.F., Schweinsburg, A.D., Wetherill, R.R., Pulido, C., Tapert, S.F. (2012). Binge drinking differentially affects adolescent male and female brain morphometry. *Psychopharmacology (Berl)*, ***220(3),*** 529-539.

Steiner, J. L., Crowell, K. T., Lang, C. H. (2015). Impact of Alcohol on Glycemic Control and Insulin Action. *Biomolecules*, ***5(4),*** 2223-2246.

Sumida, K. D., Hill, J. M., Matveyenko, A. V. (2007). Sex differences in hepatic gluconeogenic capacity after chronic alcohol consumption. *Clinical Medicine and Research*, ***5(3),*** 193-202.

Sumida, K.D., Qureshi, T., Catanzaro, M.J., Arimoto, S.M., Hill, J.M. (2004). Chronic alcohol consumption yields sex differences in whole-body glucose production in rats. *Alcohol and Alcoholism*, ***39(5),*** 418-426.

Sun, F. R., Wang, B. Y. (2021). Alcohol and Metabolic-associated Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, ***9(5),*** 719-730.

Tajuddin, N., Moon, K. H., Marshall, S. A., Nixon, K., Neafsey, E. J., Kim, H. Y., Collins, M. A. (2014). Neuroinflammation and Neurodegeneration in Adult Rat Brain from Binge Ethanol Exposure: Abrogation by Docosahexaenoic Acid. *PloS one*, ***9(7),*** e101223.

Tarelo-Acuna, L., Olvera-Cortes, E., Gonzalez-Burgos, I. (2000). Prenatal and postnatal exposure to ethanol induces changes in the shape of the dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal neurons of the rat. *Neuroscience Letters*, ***286(1),*** 13-16.

Thome, M. W. D. (2009). *Beneficial Effects of Darbepoetin Alfa in Mouse Models of Multiple Sclerosis and Schizophrenia*. Library and Archives Canada.

Vetreno, R. P., Crews, F. T. (2012). Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience*, ***226,*** 475-488.

Villamena, F. A. (2013). *Molecular Basis of Oxidative Stress: Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

Villanueva, C., Kross, R. D. (2012). Antioxidant-induced stress. *International Journal of Molecular Sciences*, ***13(2),*** 2091-2109.

Wang, B., Jaffe, D.B., Brenner. R. (2014). Current understanding of iberiotoxin-resistant BK channels in the nervous system. *Frontiers in Physiology*, ***5,*** 382.

Wang, L., Teng, R., Di, L., Rogers, H., Wu, H., Kopp, J. B., Noguchi, C. T. (2013). PPARα and Sirt1 mediate erythropoietin action in increasing metabolic activity and browning of white adipocytes to protect against obesity and metabolic disorders. *Diabetes*, ***62(12),*** 4122-4131.

Wang, S., Luo, Y., Feng, A., Li, T., Yang, X., Nofech-Mozes, R., Yu, M., Wang, C., Li, Z., Yi, F., Liu, C., Lu, W. Y. (2014). Ethanol induced impairment of glucose metabolism involves alterations of GABAergic signaling in pancreatic β-cells. *Toxicology*, **326,** 44-52.

Wang, Y., Qu, H., Xiong, X., Qiu, Y., Liao, Y., Chen, Y., Zheng, Y., Zheng, H. (2018). Plasma asprosin concentrations are increased in individuals with glucose dysregulation and correlated with insulin resistance and first-phase insulin secretion. *Mediators of Inflammation*, ***2018,*** 9471583.

Waszkiewicz, N., Galinska-Skok, B., Nestsiarovich, A., Kulak-Bejda, A., Wilczynska, K., Simonienko, K., Kwiatkowski, M., Konarzewska, B. (2018).

Neurobiological effects of binge drinking help in its detection and differential diagnosis from alcohol dependence. *Disease Markers*, ***2018,*** 5623683.

WHO (2014) *Global Status Report on Alcohol and Health*. WHO Situation Reports. Erişim 20.04.2021, https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112736/9789240692763_eng.pdf;jsessionid=63BEB26A5511CAF194E00C6F66DEBD0D?sequence=1

Wu, D., Cederbaum, A. I. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research and Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, ***27(4),*** 277-284.

Wu, J. Q., Kosten, T. R., Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, ***46,*** 200-206.

Xu, C. M., Luo, Y. L., Li, S., Li, Z. X., Jiang, L., Zhang, G. X., Owusu, L., Chen, H. L. (2019). Multifunctional neuron-specific enolase: its role in lung diseases. *Bioscience Reports*, ***39(11),*** BSR20192732.

Yang, B. C., Wu, S. Y., Leung, P. S. (2020). Alcohol ingestion induces pancreatic islet dysfunction and apoptosis via mediation of FGF21 resistance. *Annals of Translational Medicine*, ***8(6),*** 310.

Yeomans, M.R., Caton, S., Hetherington, M.M. (2003). Alcohol and food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, ***6(6),*** 639-644.

Yılmaz, E. R., Kertmen, H., Dolgun, H., Gürer, B., Sanli, A. M., Kanat, M. A., Arikok, A. T., Bahsi, S. Y., Ergüder, B. I., Sekerci, Z. (2012). Effects of darbepoetin-α in spinal cord ischemia-reperfusion injury in the rabbit. *Acta Neurochirurgica*, ***154(6),*** 1037-1044.

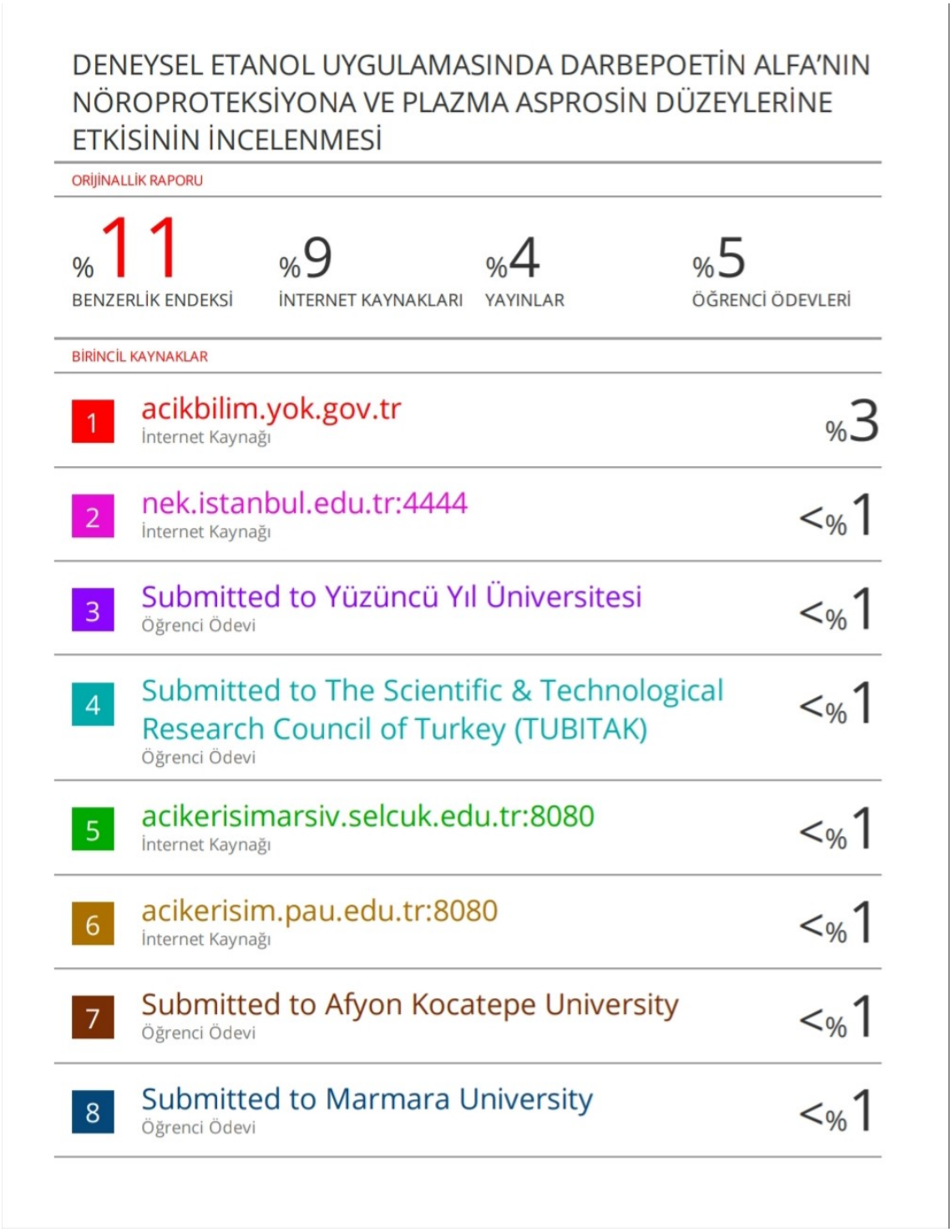
You, M., Arteel, G.E. (2019). Effect of ethanol on lipid metabolism. *Journal of Hepatology*, ***70(2),*** 237-248.

Zakhari, S. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research and Health*, ***29(4),*** 245-254.

Zhang, L., Chen, C., Zhou, N., Fu, Y., Cheng, X. (2019). Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride. *Clinica Chimica Acta*, ***489,*** 183-188.

Zhao, Q., Fritz, M., Pfefferbaum, A., Sullivan, E. V., Pohl, K. M., Zahr, N. M. (2018). Jacobian Maps Reveal Under-reported Brain Regions Sensitive to Extreme Binge Ethanol Intoxication in the Rat. *Frontiers in Neuroanatomy*, ***12,*** 108.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



DENEYSEL ETANOL UYGULAMASINDA DARBEPOETİN ALFA'NIN NÖROPROTEKSİYONA VE PLAZMA ASPROSİN DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%11	%9	%4	%5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Yüzüncü Yıl Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
5	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Afyon Kocatepe University Öğrenci Ödevi	<%1
8	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1