



**RATLARDA AKRİLAMİD İLE İNDÜKLENEN ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ, NÖROİNFLAMASYON VE NÖRONAL
APOPTOZİS ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİLERİ**

Yusuf DAĞ

Fizyoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Dursunali ÇINAR**

Doktora Tezi-2022

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA AKRİLAMİD İLE İNDÜKLENEN
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ,
NÖROİNFLAMASYON VE NÖRONAL APOPTOZİS
ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİLERİ**

Yusuf DAĞ

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Dursunali ÇINAR**

**ERZURUM
2022**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	III
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
TABLolar DİZİNİ.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Sinir Sistemi.....	5
2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi	7
2.1.1.1. Tüm Beyin (Encephalon).....	8
2.1.1.1.1. Beyin Sapı (Truncus Encephali).....	9
2.1.1.1.2. Beyin (Cerebrum)	10
2.1.1.1.3. Ara Beyin (Diencephalon)	12
2.1.1.1.4. Beyincik (Cerebellum).....	14
2.1.1.1.5. Limbik Sistem.....	14
2.1.1.2. Omurilik (Medulla spinalis).....	15
2.1.2. Perifer Sinir Sistemi.....	15
2.1.2.1. Oniki Çift Kraniyal Sinirler	16
2.1.2.2. Omurilik Sinirleri.....	16
2.1.2.3. Otonom Sinir Sistemi.....	17
2.1.2.3.1. Sempatik Sinir Sistemi.....	17

2.1.2.3.2. Parasempatik Sinir Sistemi	18
2.2. Nörotoksisite	18
2.2.1. Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)	19
2.2.2. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Monoamin Oksidaz (MAO)	21
2.3. Akrilamid (ACR)	21
2.3.1. ACR'nin Genel Özellikleri	21
2.3.2. ACR'nin Kullanım Alanları ve Besinlerde Bulunuşu	22
2.3.3. ACR'nin Kimyasal Olarak Oluşumu	23
2.3.4. ACR'nin Metabolizması	24
2.3.5. ACR Nörotoksitesi	26
2.4. Lokomotor Aktivite (LMA).....	28
2.5. Oksidatif Stres ve 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG).....	31
2.5.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	32
2.5.2. Antioksidan Sistemi	33
2.5.2.1. Enzim Yapısında Olan Antioksidanlar	34
2.5.2.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar	34
2.5.3. Lipid Peroksidasyon	35
2.5.4. 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG)	35
2.6. Nöroinflamasyon ve Neuronal Nitrik Oksit Sentaz	36
2.7. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Nöronal Apoptozis.....	39
2.7.1. Endoplazmik Retikulum Stresi	39
2.7.1.1. PERK Sinyal Yolağı	41
2.7.1.2. ATF6 Sinyal Yolağı.....	42
2.7.1.3. IRE1 Sinyal Yolağı.....	43
2.7.1.4. CHOP Aktivasyonu	43

2.7.2. Nöronal Apoptozis	44
2.8. Melatonin (MEL)	47
3. MATERYAL VE METOT.....	52
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	52
3.2. Deney Hayvanları ve Gruplarının Oluşturulması	53
3.3. Deney Gruplarında ACR ve MEL Uygulaması	54
3.4. Lokomotor Aktivite Testi	54
3.5. Biyokimyasal Analizler	55
3.6. Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi (Real Time PCR)	57
3.6.1. Total RNA İzolasyonu	58
3.6.2. cDNA Sentezi	59
3.6.3. SYBR Green Master Mix Reaksiyon Hazırlama.....	60
3.7. Histopatolojik İncelemeler.....	61
3.8. İmmunohistokimyasal İncelemeler.....	61
3.9. İmmunfloresans İncelemeler.....	62
3.10. İstatiksel Analiz	62
4. BULGULAR.....	63
4.1. Vücut ve Beyin Ağırlıkları Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri	63
4.2. Lokomotor Aktivite Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri	63
4.3. MDA ve GSH Seviyeleri ile SOD, GPx ve KAT Aktiviteleri Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri	70
4.4. TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve nNOS Seviyeleri Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkisi	72
4.5. ACR ve MEL Uygulamalarının AChE ve MAO Seviyelerine Etkileri.....	75

4.6. GRP78, ATF4, ATF6, sXBP1 ve CHOP Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri	76
4.7. Bax, Bcl-2 ve Cas-3 Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri	80
4.8. Beyin Dokusu Histopatolojisi Üzerine ACR ve MEL Uygulamasının Etkileri	82
4.9. Beyin Dokusu 8-OHdG Ekspresyonu Üzerine ACR ve MEL Uygulamasının Etkileri	85
4.10. Beyin Dokusu GFAP Ekspresyonu Üzerine ACR ve MEL Uygulamasının Etkileri	89
5. TARTIŞMA	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	117
KAYNAKLAR	119
EKLER	136
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	136
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	137
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	138

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Dursunali ÇINAR'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım

Tez kapsamı boyunca bize öncülük eden Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ'ye (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), tezin her alanında yardımlarını esirgemeyen her konuda bize öncülük eden Doç. Dr. Emin ŞENGÜL'e (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), patolojik bulgular ve bulguların değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Serkan YILDIRIM'a (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), moleküler çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Selçuk ÖZDEMİR'e (Atatürk Üniversitesi, Erzurum) ve bu çalışmayı 2020/8687 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen Anneme, Babama ve kardeşlerime teşekkür ederim..

Yusuf DAĞ

ÖZET

Ratlarda Akrilamid ile İndüklenen Endoplazmik Retikulum Stresi, Nöroinflamasyon ve Nöronal Apoptozis Üzerine Melatoninin Etkileri

Amaç: Endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan ACR bileşiği gıdasal ürünlerin yüksek sıcaklıklara maruz kalması sonucu oluştuğu bilinmektedir. ACR, çoklu organ hasarına neden olan nörotoksik bir ajandır. Bu çalışmada; ACR nörotoksisitesinde lokomotor aktivite, oksidatif stres, ER stresi, nöroinflamasyon ve nöronal apoptozis mekanizmaları üzerine MEL'in antioksidan, antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot: Bu tez çalışmasında 220-250 g ağırlığında 12 haftalık yetişkin Sprague Dawley cinsi 50 adet erkek rat kullanıldı. Her bir grupta 10 tane rat kullanılarak 5 grup oluşturuldu. Deney grupları Grup 1: Kontrol, Grup 2: ACR, Grup 3: MEL10+ACR, Grup 4: MEL20+ACR ve Grup 5: MEL20 olacak şekilde oluşturuldu. Deneysel uygulamalar MEL 10 ve 20 mg/kg i.p. dozları ile ACR'nin 50 mg/kg i.p., dozu şeklinde 14 gün süre ile uygulandı. ACR ve MEL enjeksiyonu yapıldıktan sonra 15. gün lokomotor aktivite ölçümleri yapılarak deneysel çalışma sonlandırıldı. Ratlardan alınan beyin dokularında biyokimyasal, moleküler ve histopatolojik incelemeler yapıldı.

Bulgular: Locomotor aktivite düzeyleri ACR grubunda, kontrole göre bir azalma gösterdi. Beyin dokularında MDA ve GSH seviyelerinin ACR grubunda arttığı, SOD, GPx ve KAT aktivitelerinin ise azaldığı tespit edildi. MEL20+ACR grubunda, lipid peroksidasyonunun azaldığı ve antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı belirlendi. TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve nNOS seviyelerinin ACR grubunda yükseldiği ve MEL'in yüksek dozunun bu artışları önlediği tespit edildi. Beyinde sinirsel aktivitelerde görev alan AChE-MAO seviyelerinin de ACR grubunda diğer gruplara göre önemli düzeyde arttığı belirlendi. ACR grubunda ER stresinin oluştuğu ve beyin dokusunda GRP78, ATF4, ATF6, sXBP1 ve CHOP gen ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi. Bax ve Cas-3 gen ekspresyon seviyelerinin ACR gruplarında arttığı, özellikle MEL'in yüksek dozunun bu artışları önlediği görüldü. 8-OHdG ve GFAP ekspresyonlarının ACR grubunda kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 gruplarına göre önemli düzeyde arttığı belirlendi.

Sonuç: Bu çalışmanın sonucunda ratlara protektif amaçla uygulanan MEL bileşiğinin ACR kaynaklı nörotoksisiteyi önemli düzeyde önlediği saptandı.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, Apoptozis, Endoplazmik retikulum stresi, Locomotor aktivite, Melatonin, Nöroinflamasyon

ABSTRACT

Effects of Melatonin on Acrylamide-Induced Endoplasmic Reticulum Stress, Neuroinflammation and Neuronal Apoptosis in Rats

Aim: It is known that the ACR compound, which is widely used in the industrial field, is formed as a result of exposure of food products to high temperatures. ACR is a neurotoxic agent that causes multiple organ damage. In this study; it was aimed to investigate the antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects of MEL on locomotor activity, oxidative stress, ER stress, neuroinflammation and neuronal apoptosis mechanisms in ACR neurotoxicity.

Material and method: In this thesis study, 50 male Sprague Dawley rats that is 12 weeks old and weight is 220-250 g were used. By using 10 rats for each group, 5 groups were formed. Experimental groups were formed as Group 1: Control, Group 2: ACR, Group 3: MEL10+ACR, Group 4: MEL20+ACR and Group 5: MEL20. Experimental applications were applied as 10 and 20 mg/kg i.p. doses of MEL and 50 mg/kg i.p. dose of ACR for 14 days. Experimental study was terminated by measuring locomotor activity on the 15th day after ACR and MEL injection. Biochemical, molecular and histopathological examinations were performed on brain tissues that were taken from rats.

Results: Locomotor activity levels showed a decrease in the ACR group compared to the control group. It was determined that MDA and GSH levels in brain tissues increased in the ACR group, while SOD, GPx and KAT activities were decreased. In the MEL 20+ACR group, it was determined that lipid peroxidation decreased and the activities of antioxidant enzymes increased. It was determined that TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nNOS levels were increased in the ACR group and the high dose of MEL prevented these increases. It was determined that AChE-MAO levels, which are involved in neural activities in the brain, increased significantly in the ACR group compared to the other groups. It was determined that ER stress occurred in the ACR group and GRP78, ATF4, ATF6, sXBP1 and CHOP gene expression levels in the brain tissue increased significantly compared to the other groups. It was observed that Bax and Cas-3 gene expression levels increased in the ACR groups, especially the high dose of MEL prevented these increases. It was determined that 8-OHdG and GFAP expressions were significantly increased in the ACR group compared to the control, MEL20+ACR and MEL20 groups.

Conclusion: As a result of this study, it was determined that MEL compound, which was applied to rats for protective purposes, significantly prevented ACR-induced neurotoxicity.

Key Words: Acrylamide, Apoptosis, Endoplasmic reticulum stress, Locomotor activity, Melatonin, Neuroinflammation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	:	Asetilkolin
AChE	:	Asetilkolinesteraz
ACR	:	Akrilamid
ADH	:	Antidiüretik hormon
ALS	:	Amyotrofik lateral skleroz
ASK1	:	Apoptosis sinyal düzenleyici kinaz 1
ATF4	:	Aktive transkripsiyon faktör-4
ATF6	:	Aktive transkripsiyon faktör-6
ATP	:	Adenozin trifosfat
Bax	:	Bcl-2 ile ilişkili X protein
Bcl-2	:	B-cell lymphoma 2
Ca²⁺	:	Kalsiyum
cDNA	:	Komplamenter DNA
CHOP	:	C/EBP homolog protein
Cas-3	:	Kaspaz 3
COX-1	:	Siklooksijenaz 1
COX-2	:	Siklooksijenaz 2
CYP2E1	:	Sitokrom P450 2E1
DAG	:	Diaçilgliserol
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
eIF2α	:	Ökaryotik başlatıcı faktör-2 α
eNOS	:	Endotelyal nitrik oksit
ER	:	Endoplazmik retikulum
ERO1α	:	ER oksidoreduktin 1

ERSE	:	ER stres yanıt elemanı
FAD	:	Flavin adenin dinükleotit
GFAP	:	Gliyal fibriller asidik protein
GPx	:	Glutasyon peroksidaz
GRP78	:	Glikoz düzenleyici faktör-78
GSH	:	Glutasyon
GST	:	Glutasyon-S-transferaz
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HSP40	:	Heat shock protein 40
IL-1β	:	İnterleukin-1 beta
IL-6	:	İnterleukin-6
IP3	:	İnositol 3 fosfat
IRE1	:	İnozitol gerektiren enzim-1
i.g.	:	İntra gastrik
iNOS	:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
i.p.	:	İntra peritoneal
JNK	:	C-jun-N-terminal kinaz
KAT	:	Katalaz
LMA	:	Lokomotor aktivite
MAO	:	Monoaminoksidaz
MDA	:	Malonaldehit
MSS	:	Merkezi sinir sistemi
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	:	Nükleer faktör kappa B
NO	:	Nitrik oksit

NOS	:	Nitrik oksit sentaz
nNOS	:	Nöronal nitrik oksit sentaz
O₂	:	Oksijen
O₂⁻	:	Süperoksit anyonu
OH⁻	:	Hidroksil iyonu
PERK	:	Pankreatik ER kinaz (PKR) benzeri ER kinaz
PKC	:	Protein kinaz C
PSS	:	Perifer sinir sistemi
PVC	:	Polivinil klorür
RNA	:	Ribonükleik asit
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
TNF-α	:	Tümör nekroz faktör- α
TRB3	:	Tribbles ile ilgili protein 3
SOD	:	Süperoksit dismutaz
UPR	:	Katlanmamış protein yanıtı
XBP1	:	X-box-binding protein
8-OHdG	:	8-hidroksi-2-deoksiguanozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Beynin anatomik olarak bölümleri ve lobları.....	11
Şekil 2.2. Akrilamidin yapısal formülü	22
Şekil 2.3. Maillard reaksiyonu sonucu ACR oluşumu	24
Şekil 2.4. CYP2E1 oksidasyonu sonucu ACR'nin Glycidamide metabolize olması.....	26
Şekil 2.5. Lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranışları ölçmek için kullanılan açık alan testi.....	29
Şekil 2.6. Endoplazmik retikulum stresi ve UPR yanıtı	42
Şekil 2.7. Melatoninin kimyasal yapısı	49
Şekil 3.1. Lokomotor aktivite ölçüm cihazı	55
Şekil 4.1. ACR ile indüklenen nörotoksisitede lokomotor aktivite parametreleri üzerine MEL'in etkileri	66
Şekil 4.2. Kontrol grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler	67
Şekil 4.3. ACR grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler	68
Şekil 4.4. MEL10+ACR grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler.....	68
Şekil 4.5. MEL20+ACR grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler.....	69
Şekil 4.6. MEL20 grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler	69
Şekil 4.7. Deney gruplarında beyin MDA ve GSH seviyeleri.....	70
Şekil 4.8. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında SOD, GPx ve KAT aktiviteleri	72
Şekil 4.9. Deney gruplarında beyin TNF- α ve IL-1 β düzeyleri	73
Şekil 4.10. Deney gruplarında beyin IL-6 ve nNOS düzeyleri	74
Şekil 4.11. Deney gruplarında beyin AChE ve MAO enzim aktivite düzeyleri	75

Şekil 4.12. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında GRP78 gen ekspresyon düzeyleri.....	76
Şekil 4.13. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında ATF4 gen ekspresyon düzeyleri.....	77
Şekil 4.14. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında ATF6 gen ekspresyon düzeyleri.....	78
Şekil 4.15. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında sXBP1 gen ekspresyon düzeyleri.....	79
Şekil 4.16. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında CHOP gen ekspresyon düzeyleri.....	80
Şekil 4.17. Deney gruplarında beyin Bax, Bcl2 ve Cas-3 düzeyleri	81
Şekil 4.18. Kontrol grup, beyin dokusu, normal histolojik görünüm, H&E, Bar: 50µm	83
Şekil 4.19. ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon (oklar) ve nekroz (ok başları), H&E, Bar: 50µm.....	83
Şekil 4.20. MEL10+ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda orta düzeyde dejenerasyon (oklar), hafif düzeyde nekroz (okbaşı), H&E, Bar: 50µm	84
Şekil 4.21. MEL20+ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda hafif düzeyde dejenerasyon, H&E, Bar: 50µm.....	84
Şekil 4.22. MEL20 grup, beyin dokusu, normal histolojik görünüm, H&E, Bar: 50µm	85
Şekil 4.23. Kontrol grup, beyin dokusu, negatif 8-OHdG ekspresyonu, IHC-P, Bar: 20µm	86
Şekil 4.24. ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda şiddetli düzeyde 8-OHdG ekspresyonu (okbaşıları), IHC-P, Bar: 20µm.....	87
Şekil 4.25. MEL10+ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda orta düzeyde 8-OHdG ekspresyonu (okbaşıları), H&E, Bar: 20µm.....	87

- Şekil 4.26.** MEL20+ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda hafif düzeyde sitoplazmik 8-OHdG ekspresyonu, H&E, Bar: 20µm 88
- Şekil 4.27.** MEL20 grup, beyin dokusu, normal histolojik görünüm, H&E, Bar: 50µm88
- Şekil 4.28.** Beyin dokusu, astrositlerde GFAP ekspresyonu (okbaşları), IF, Bar: 50µm90



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözücüler.....	53
Tablo 3.2. Deney grupları ve gruplardaki hayvan sayıları.....	53
Tablo 3.3. cDNA reaksiyon hazırlanışı.....	59
Tablo 3.4. cDNA reaksiyonu için PCR süre ve basamakları	59
Tablo 3.5. Primer sekansları.....	60
Tablo 4.1. Deneyisel gruplarda ratların vücut ve beyin ağırlıkları (n=10)	63
Tablo 4.2. Deneyisel grupların beyin dokularında gözlenen histopatolojik, immunhistokimyasal ve immunfloresan bulguların skorlanması	91

1. GİRİŞ

Akrilamid (ACR), endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan suda çözünür vinil bir monomerdir. ACR özellikle atık suların saflaştırılmasında, bazı inşaat malzemelerinin üretiminde, jel kromatografisi için moleküler laboratuvarlarda, kalıcı pres kumaşların yapımında, kağıt ve kozmetik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.^{1, 2} Ayrıca sigara filtrelerinin yapısında da bulunduğu bilinmektedir. Yaygın olarak kullanılmasından dolayı özellikle inşaat ve diğer sektörlerde çalışan işçilerde de ACR'ye maruziyeti görülmektedir.³ İsveç'te yapılan bir araştırmada bir tünel inşaatında çalışan işçilerin ve sigara içmeyen kontrol grubu kişilerin kanlarında beklenmedik bir şekilde yüksek düzeyde ACR tespit edilmiştir. İnsanlarda ACR maruziyetine sanayi alanları ve ürünlerinin üretiminde çalışanlarının yanı sıra gıdalarla da bulaşma riskinin olabildiği belirlenmiştir.^{3, 4} Bilim insanları yaptıkları çalışmalar sonucunda, karbonhidratça zengin besinlerin 120°C ve üzeri sıcaklıklara maruz kalması sonucu ACR'nin ortaya çıktığını belirtmişlerdir.^{4, 5} ACR cilde temas ya da solunum sonucu mukoza yoluyla emilerek vücuda yayılabildiği gibi besinlerle gastrointestinal yolla da vücuda kolaylıkla geçebilmektedir. Ayrıca plasental bariyeri geçerek fötüste anomalilere sebep olabilmektedir.^{6, 7} ACR'nin kanserojen etkili olduğu⁸ ve diyet ile alınan ACR'nin meme kanserini indüklediği belirlenmiştir.⁹ ACR'nin böbrek, mesane ve prostat kanserini tetiklediği¹⁰, üreme organları üzerinde toksik etkiye¹¹ ve nöropatiye¹² neden olduğu araştırmalarla rapor edilmiştir. ACR küçük ve hidrofilik bir moleküler yapıya sahiptir⁶ ve bu yüzden de tüm dokulara kolayca geçebilmekte, bu şekilde tüm vücuda yayılabilmektedir.¹³ Yine bu nedenle kan beyin bariyerini geçebilmekte ve beyin dokusunda oksidatif stresi tetikleyerek nörotoksik etki yapmaktadır.^{14, 15} ACR'nin hem insanlarda hem de deney hayvanlarında iskelet kası zayıflığı, kilo kaybı ve anormal yürüyüş gibi bazı olumsuzluklar oluşturabilecek nöropatik etkileri vardır.^{16, 17} Merkezi

sinir sisteminde astrositler ve mikroglia hücreleri nörotrofik destek, taşıyıcı regülasyon ve bağışıklık modülasyonu gibi yapıların oluşumunu sağlayarak beyin dokusunda temel düzenleyici bir rol oynayabilmektedirler.¹⁸ Glial hücrelerinin hasarlanması beyin dokusunda hasara ve nörotoksositeye sebep olmaktadır.¹⁹ Nörodejenerasyon ya da beyin dokusundaki herhangi bir toksik etki reaktif oksijen türlerini (ROS) ve sitokinleri de aktifleştirir. Pre-inflamatuar öncülerin salgılanmasını sağlar.²⁰ ACR'nin nörotoksitesinin kimyasal ve biyokimyasal mekanizmaları kapsamlı bir şekilde incelenmesine rağmen^{6, 21}, ACR nörotoksitesinin gelişmesine yol açan hücre içi stres sinyal yolları belirsizliğini korumaktadır.²¹

Endoplazmik retikulum (ER), protein sentezi, katlanması, translasyon sonrası modifikasyon gibi çeşitli biyolojik olayların kontrolünü yapan hücre içi organelidir.²² Hücreler ekstraselüler strese maruz kaldığında, katlanmamış proteinler ER lümeninde birikmekte ve bu biriken proteinler ER'da strese neden olmaktadır. Daha sonra katlanmamış proteinler; hücrede katlanmamış protein yanıtı (Unfolding protein response: UPR) adı verilen bir sinyal yolunu aktif hale getirir ve hücreyi stresten kurtarmak için bu uyarlanabilir programı indüklemektedir.²³ UPR sinyal yolları; pankreatik ER kinaz (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), aktive transkripsiyon faktör 6 (AFT6) ve inozitol gerektiren enzim 1 (IRE1) olmak üzere üç önemli ER stres sinyal yolağından oluşmaktadır.²⁴ Hücre dinlenme halinde iken ER şaperonları ile bağlantılı olduğu düşünülen bu üç sinyal yolu temel olarak inaktiftir. Glukoz düzenleyici protein 78 (GRP78) bu yolların inaktif halde tutulmasında en önemli şaperonlardan birisidir. Katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucu ER'da stres meydana gelirse GRP78 hızlı bir şekilde ER zarından ayrılır ve ER stres reseptörlerinin aktivasyonunu sağlayarak UPR reaksiyonunu tetikler.²⁴ UPR'nin temel amacı ise, hücrelerde meydana gelen çevresel değişikliklere adaptasyonu kolaylaştırmak, ER'de protein sentezini azaltarak ER'ye daha

fazla katlanmamış proteinin girişine engel olarak normal ER fonksiyonlarının yeniden oluşumunu ve devamını sağlamaktır. Bununla birlikte UPR, ER’de aşırı katlanmamış protein birikimini çözemezse, bu üç sinyal yolağından ER şaperonlarının ekspresyonunda artışa neden olarak hücrede inflamasyon ve apoptotik yolları etkinleştirir.²⁵ UPR oluşturmada önemli bir sinyal yolu olan PERK-eIF2 α (ökaryotik başlatıcı faktör 2 α) yolağının transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteini (CHOP) ekspresyonunu arttırması hem in-vitro hem de in-vivo nöronal apoptotik hücre ölümünde önemli bir rol oynamaktadır.²⁶ Ayrıca IRE1 yolağından C-jun N-terminal kinaz (JNK)’nın aktivasyonu ile inflamasyon uyarılır ve ATF6 yolağından da CHOP aracılı apoptozisi uyardığı bilinmektedir.²⁷

ER stresinin genellikle alzheimer, parkinson, amiotrofik lateral skleroz (ALS), poli glutamin hastalıkları, iskemi, ateroskleroz, bipolar bozukluk, prion hastalıkları, kanser, diyabet, otoimmün ve kardiyovasküler bozukluklar gibi hastalıklarda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir.²⁸⁻³⁴ Ayrıca hücrel enerji seviyesinde ki azalma, hücredeki redoks reaksiyon seviyesi ve kalsiyum (Ca²⁺) konsantrasyonunun azalması da ER stresinin oluşumuna neden olmaktadır.

Nörotoksik ajanlar, kemoterapik ilaçlar ve gıda kaynaklı birçok kimyasal bileşik ER stresinin oluşmasına sebep olurlar. Bu ajanların oksidatif stresi tetikleyip nörotoksisite oluşturduğu³⁵, oksidatif stresin ise ER stresini indüklediği³⁶ ve inflamasyon²⁷ oluşturarak hücreyi apoptozise³⁷ götürdüğü yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu da ER stresi ile ilişkili yukarıda belirtilen birçok patofizyolojik durumların oluşmasına neden olmaktadır. Hücrede ER stresini uyararak inflamasyon ve apoptozisi indükleyen ajanlardan birisi de ACR’dır. Yapılan bazı araştırmalarda ACR ile indüklenen nöronal ER stresi, nöroinflamasyon ve nöronal apoptozisin uyarıldığı tespit edilmiştir.³⁸ ACR ile indüklenen nörotoksisitede bazı antioksidan ve antiinflamatuvar

bileşikler protektif amaçlı kullanılmaktadır.^{39, 40} Farklı kimyasal bileşiklerle indüklenen organ toksisitesi çalışmalarında protektif veya terapötik amaçlı antioksidan, antiinflamatuvar, hormon ve hormon benzeri bileşikler de kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan hormon/bileşiklerden birisi de Melatonin (MEL)'dir.⁴¹⁻⁴³

MEL başlangıçta kurbağa ve balık melanositlerine etki eden cilt aydınlatıcı bir molekül olarak keşfedilmiştir.⁴⁴ Daha sonra, epifiz bezi tarafından ritmik olarak salgılanan, sirkadiyen ritminin düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir hormon olduğu bulunmuştur.⁴⁵ MEL'in birçok omurgalı canlıda görüldüğü ve bakterilerden protozoalara, bitkilerden mantarlara ve omurgasızlara kadar neredeyse her canlıda sentezlendiği bilinmektedir.⁴⁶ MEL, uyku-uyanıklık döngüsünü düzenleyen bir immünostimülatör ve sitoprotektif ajan olarak işlev görmektedir. Ayrıca MEL; T ve B lenfositlerin, natural killer hücrelerinin ve monositlerin aktivasyonunu uyarmaktadır ve timosit proliferasyonunu ve sitokinlerin salınımını indüklemektedir. Bununla birlikte antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser ve antiapoptotik etkisi de bildirilmiştir.^{47, 48} MEL aynı zamanda nöroprotektif etkilere sahiptir ve oksidatif stres kaynaklı nöronal apoptoziste ve nöronal dejenerasyonda protektif etkileri rapor edilmiştir.^{49, 50}

Tüm bu bilgiler ışığında, yaptığımız literatür taramalarında ACR uygulanan ratların beyin dokularında ER stresi, nöroinflasyon ve nöronal apoptozis üzerine MEL'in etkileri ile alakalı herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Buradan hareketle, bu araştırmada ratlarda ACR ile indüklenen nörotoksisitede ER stresi, nöroinflasyon ve nöronal apoptozis üzerine MEL'in etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Nörodejeneratif bozuklukların büyük bir bölümü toksisite ve protein agregasyonu sonucunda meydana geldiği bilinmektedir. Bu nöronal bozukluklar için genler tanımlandıkça ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar ile bu genlerdeki mutasyonların önemli bir bölümünün etkisi, nöronal kapanımlar ve plaklardaki yanlış katlanmış proteinlerin anormal işlenmesi ve birikmesine bağlı olduğu netlik kazanmıştır. Anormal proteinlerin atılmasına yönelik hücresel mekanizmaların ve toksik protein birikiminin nöronal hayatta kalma üzerindeki etkilerinin daha fazla anlaşılması, bu bozukluklar için etkili ve hızlı tedavi geliştirmesine olanak sağlayacaktır.

Alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı, prion hastalıkları, huntington hastalığı, frontotemporal demans ve motor nöron hastalığı gibi çok çeşitli nörodejeneratif bozukluklar gibi tüm nörodejeneratif hastalıklar, anormal protein birikimi ve agregasyonu gibi belirgin bir ortak özelliği paylaşırlar. Yanlış katlanmaya karşı ilk savunma hattı doğru katlanmayı destekleyen, hücrelerin hayatta kalması için sinyal yollarını aktive eden ve yanlış katlanmayı önleyen moleküler şaperonlardır. Merkezi sinir sistemindeki hücresel mekanizmalar ve bu mekanizmaların işlevlerinin hasara uğraması, bunların tamiri ve düzeltilmesini daha iyi anlamamız için öncelikle merkezi sinir sistemi, bölümleri ve fonksiyonları hakkında bilgi sahibi olmamız gerekmektedir.⁵¹

2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi (systema nervosum) diğer sistemlere göre daha karmaşık olup, sinir hücreleri ve sinir liflerinden oluşan bir sistemdir. Vücudun değişik duyu organlarından gelen binlerce bilgiyi, bu sistem ile taşır, işler ve bu uyarılara doğru cevaplar oluştururlar. Hücrelerin ve organların yaşamlarını sürdürebilmeleri için, iç ortamın sıcaklık ve kimyasal içeriği sürekli olarak değişmez tutulması gerekmektedir. Bu şekilde iç ortamın dengesinin muhafaza edilmesine homeostasis denir.⁵²

Organizmada dolaşım, boşaltım, sindirim ve solunum gibi sistemlerin homeostasisi sağlamak için sürekli çalışır vaziyettedirler. Homeostasisin sağlanması amacı ile bu sistemlerin uyum içinde beraber çalışmaları şarttır. Ayrıca bu sistemlerin aktiviteleri, organların gereksinimi doğrultusunda farklılık ta göstermesi gerekir. Örneğin egzersizde solunum ve dolaşımın hızının artması, yemek yendikten sonra mide ve bağırsak etkinliğinin artması farklılık gösterebilir. Sinir sistemi, endokrin sistem ve diğer sistemler organizmada homeostasisin sağlanmasında iç ve dış ortamda oluşan değişikliklere karşı çok fazla sayıda düzenleyici olarak yanıtlar oluştururlar. Sinir sistemi hem iç ortamda hemde dış ortamda oluşan değişikliklere karşı ani yanıt oluşturur. Bu sistem iskelet kaslarına gönderdiği emirlerle organizmanın dış ortamda gelişen değişikliklerini, düz kas, kalp kası ve salgı bezlerine gönderdiği emirlerle de iç ortamda oluşan değişiklikleri düzenleyip kontrol etme kabiliyetine sahiptir.⁵² Örneğin aniden bir köpek ile karşılaştığımızda kaçmak, elimizi yakacak derecede bir sıcaklıktan hızla çekmek dış ortamda oluşan değişiklere karşı yanıt iken, kan basıncı düştüğü zaman damarların çaplarının daralıp, aynı zamanda kalp atım hızının artması, dokularda oksijen azalmasına bağlı olarak solunumun hızlanması ve kan şekerinin düşüşüne bağlı olarak açlığın hissedilmesi iç ortamda oluşan değişikliklere bir yanıt olarak homeostasisin düzenleyici fonksiyonudur. Endokrin sistem ise organizmadaki kimyasal değişikliklere karşı yavaş başlayan ve uzun süren yanıtları oluşturur.⁵³

Sinir sistemi vücudun elektiriksel ve kişmyasal iltişim ağıdır. Beynin çeşitli bölgelerinde bulunan, basit ve karmaşık olarak her türlü davranışı sinir hücrelerinin etkinliği ile oluşturan birim nöron olarak adlandırılmaktadır. Bu nöronlardaki iletişim sayesinde beyin ile vücut arasında kontrol meydana gelmektedir. Nöronlar arasında iletişim, aksiyon potansiyeli denilen kimyasal iletimin elektiriksel iletiye dönüşümü sayesinde oluşmaktadır. Bu aksiyon potansiyellerin oluşabilmesi için iç ve dış

ortamlardaki değişikliklerin bir reseptör aracılığı ile algılanması gerekmektedir. Sinir hücreleri ile bağlantıları olan bu reseptörler sayesinde çevresel değişiklikler ile oluşan enerji (ısı, ışık, mekanik gibi) tipleri, sinir hücresinde aksiyon potansiyeline dönüştürebilmektedir.

Sinir sisteminin özelliklerinde ise uyarılabilme (irritabilite), organizmada iç ve dış ortamda oluşan değişiklikler duyu sinirlerinin uçlarındaki reseptörler tarafından algılanır, reseptör fonksiyonudur. İletilebilme (conductive), sinir uçlarındaki reseptörler tarafından alınan uyarılar afferent sinirler vasıtası ile ilgili merkeze taşır, nöron fonksiyonudur. Merkeze gelen uyarının değerlendirilmesi ve organizmanın kendisi ile uyarı arasında bir ilişkinin kurulması yani duyuları algılama (correlation), sinir merkezleri fonksiyonudur. Uyarılara cevap verilmesi (reaction), efektör fonksiyonudur yani motor sinirlerle kas ve bezlere uyarının iletilmesi gibi fonksiyonlar yer almaktadır.⁵²

⁵³ Sinir sistemi morfolojik ve fonksiyonel olarak ikiye ayrılır. Merkezi sinir sistemi (MSS) nöral tüp, perifer sinir sistemi ise (PSS) crista neuralis olmak üzere farklı kökenlerden gelişimlerini tamamlarlar. MSS beyin, beyincik, beyin kökü ve omurilikten, PSS ise somatik ve otonom sinir sistemini içeren sempatik, parasempatik sinirler gangliyonlar, perifer sinirler, perifer sinir sonlanmalarından meydana gelmektedir.⁵⁴

2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sistemi, sinir sisteminin en büyük bölümünü oluşturmakta, beyin ve omurilikten meydana gelmektedir. Santaral sinir sistemi olarakta adlandırılmaktadır. MSS gelişimi ise primer beyin veziküllerinden gelişen sekonder veziküllerden beyin farklı bölümleri ve beyincik oluşmaktadır (Telencephalon, diencephalon, mesencephalon vb.). Bu bölümler önden arkaya doğru telencephalondan gelişen bulbus olfactorius, cerebral cortex, hippocampus ve bazal gangliyonlar ile diencephalon'dan gelişen epithalamus, thalamus, hypothalamus nörohipofiz ve retina olarak sayılabilir.

Mesenchelon ise tectum ve tegmentuma farklılaşmaktadır. Mesencephalon kısmından pons ve beyincik farklılaşırken, myelencephalon kısmından medulla oblongata farklılaşır ve onu da medulla spinalis (omurilik) izler. Mesencephalon, pons ve medulla oblongata beyin sapı olarak ta adlandırılmaktadır.

MSS'ne ait yapılar genelde iki ana madde içermektedir. Bunlardan ilki substantia grisea olarak adlandırılan boz madde ya da gri cevher'dir. Diğeri ise substantia alba olarak adlandırılan ak madde ya da beyaz cevher'dir. Substantia grisea, sinir hücrelerinin ve glial hücrelerinin yapısında bulunan ayrıca bunların uzantıları ile birlikte bol miktarda kan kapılları taşımaktadır. MSS'de glia hücrelerinin tüm tipleri bulunsada en yaygın olarak astrositler ve oligodentrositler bulunmaktadır. Substansiya albada ise çoğunluğu miyelinli sinir telleri ve bu sinir telleri arasında ki glia hücreleri ile bunların uzantıları yer almaktadır.^{53, 54}

2.1.1.1. Tüm Beyin (Encephalon)

Beyin billateral simetrik olarak iki loba sahip, yumuşak, jelatimsi yapıda olup, bebeklerde yaklaşık 400 gr yetişkinlerde ise 1250-1450 gram (gr) ağırlığında vücudun önemli bir organıdır. Beyinde yaklaşık olarak 100 milyar nöron ve trilyonlarca glia hücreleri bulunmaktadır. Beyin, anatomik olarak fonksiyonları ile alakalı çeşitli işlevsel alanlara ayrılmıştır. 1800'lü yıllarda anatomiye dayalı karakterize edilen beyinin işlevsel alanlarının ortaya çıkarılması için çalışma yürüten ilk nöroanatomist Franz Josef Gall'dir. Daha sonra insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar ile beyin fizyolojik işlevselliği yani uyarılabilme ve cevap oluşturabilme yetenekleri keşfedilmiştir.

Beyin buruşuk ve pembemsi gri renkli bir yapıya, üzerinde girinti ve çıkıtlardan oluşan yumaşak bir dokuya sahiptir. Beyin sert bir kafatası kemiği ile çevrelenmiştir, aynı zamanda üç ince membrandan (dura mater, arachnoid mater ve pia mater)oluşan meninks

ve beyin omurilik sıvısı tarafından korunmaktadır. Meninks beynin kan damarlarını ve venöz sinüslerinin etrafını çevreyelen yapıları korur.⁵⁵

Sinir dokusu nöron adı verilen sinir tellerinden oluşmuştur. Nöronların arasında destek görevi gören ve nöronların iletişimde rol alan glia veya nörogliya adı verilen sinir hücreleri de bulunur. Merkezi sinir sisteminde üç tip gliya hücresi vardır:

- 1- Microglia: kandan sinir dokusuna geçen savunma hücreleridir.
- 2- Oligodentrogia: sinir tellerinin myelin tabakasını meydana getirirler.
- 3- Astrositler: beyinde bol miktarda bulunurlar. Kan damarlarına birtakım uzantılarla tutunurlar. Kan beyin bariyerinden de sorumludurlar.⁵²

2.1.1.1.1. Beyin Sapı (Truncus Encephali)

Beyin sapı anatomik olarak medulla spinalisi beyne bağlayan bir köprü görevi görmektedir. Beynin yüksek merkezleri ile omurilik arasında bilgi taşıyan sinir tellerinin geçtiği bölgedir. I ve II. kranial sinirler dışında diğer tüm sinirler bu merkezden çıkarlar. Beyin sapı medulla oblongata, pons ve mezensefalon (orta beyin) olmak üzere üç kısımdan oluşur.

Birincisi Medulla oblangata, Bulbus ya da Soğanilik olarak adlandırılır. Beyin sapının en alt kısmında medulla spinalisin devamı niteliğinde, birinci boyun atlası ön kemerinden başlar pons ile biter. Medulla spinalisin üst kısmı ile ponsun arasında beyinciğin alt tarafında bulunur. Medulla oblangata üzerinde medulla spinalise giden ve gelen motor ve sensitif yollar vardır. IX, X, XI, XII. kranial sinirlerin çekerekleri medulla oblangatada yer alır. Ayrıca dolaşım ve solunum gibi hayati merkezler, yutma çiğneme, öksürme, hapsırma, kan damarlarının büzülmesi ve kusma gibi refleksleride kontrol eden merkezlerde burda bulunur.

Beyin sapında bulunan bölümün ikincisi olarak Köprü veya Pons vardır. Beyin sapının orta kısmında köprü gibi durmaktadır. Medulla oblangata ile orta beyni

birleştirdiği için bu ismi almaktadır. V, VI, VII ve VIII. kranial sinirlerin çekirdekleri burada bulunmaktadır. Solunum merkezinin kontrolünde önemli rolü vardır. Afferent ve efferent sinir yolları ponsan geçerek merkezi sinir sisteminin paçalarını birbirine bağlar.

Son olarak mezensefalon veya orta beyin ise, pons ve ara beyin arasında bulunan beyin sapının en küçük ve kısa bölümünü oluşturur. III ve IV. kranial sinirlerin çekirdekleri burada yer alır. Burası pupilla refleksi ile yürüme ve canlının yer değiştirme merkezini içerir. Beyin sapından beynin daha üst merkezlerine uyarıları taşırlar. Özellikle dopamin salgılayan merkezlerde burada bulunur. Bu merkezin hasarı sonucu dopamin eksikliği olursa Parkinson hastalığı, fazlalığında ise şizofreni görülebilir. Orta beyinde ayrıca retiküler formasyon alanında bulunur. Bu alan aynı zamanda omurilik ve diencephalon içinde yayılmıştır. Retiküler formasyon alanı hem duysal hemde motor fonksiyonları vardır. İskelet kaslarının tonusunun ayarlanmasında ve uyku uyanıklık durumunun düzenlenmesinde, bilincin açılması ve devamlılığını sağlayan önemli bir merkezdir.⁵²⁻⁵⁴

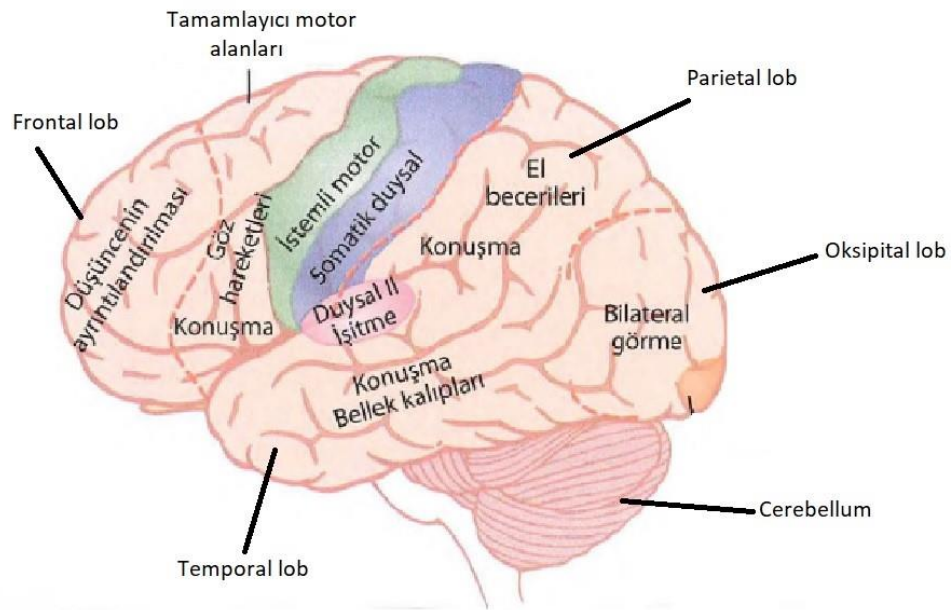
2.1.1.1.2. Beyin (Cerebrum)

Beyin, anatomik olarak üzerinde girinti ve çıkıntılar bulunan kompleks bir organdır. Beyin önden arkaya doğru derin bir yarıkla iki hemisfere ayrılmıştır. Bu iki hemisfer arasındaki yarığa fissura longitudinalis cerebri denir. Her iki hemisferi birbirine bağlayan yapıya da corpus callosum adı verilir. Cerebrumun sağ hemisferi bedenin sol tarafını, sol hemisferi ise vücudun sağ tarafını kontrol eder.

Beynin gri cevherden oluşan en dış tabakasına cerebral korteks denilir. Korteksin yaklaşık kalınlığı 2-6 mm arasındadır. Cerebral korteksin yüzeyi çok fazla girinti ve çıkıntılarla kaplıdır. Bu çıkıntılara gyrus, girintilere ise sulcus denilmektedir. Beynin en yüksek sinir aktivitesinin gerçekleştiği yerdir. Cerebral kortekte motor alanları ve duyu merkezi bulunmaktadır. Beynin bu alanları afferent sinirlerin son bulduğu ve efferent

sinirlerinin başladığı yerleri oluşturur. Sağ ve sol hemisferlerin iç kısımları beyaz cevherden meydana gelmiştir. Beyaz cevher içinde miyelinli sinir tellerinden başka bazal gangliyonlar adı verilen nükleuslar da bulunur. Bazan gangliyonların, beyincik ve korteks ile birlikte iskelet kaslarının motor fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Bazal gangliyonlar genellikle istekle başlatılan bir kas hareketinin otomatik olarak düzenlenmesinde ve devam etmesinde rol alan nükleuslardır.

Beyin hemisferlerinin dış yüzeyinde sulcus centralis, sulcus parietal-occipitalis, sulcus calcarinus, sulcus lateralis, ve sulcus cinguli gibi önemli oluklar yer alır. Hemisferler dört ana loba ayrılmıştır. Frontal, parietal, temporal ve oksipital olmak üzere her lobun farklı işlevler yerine getirdiği ve bunların isimlerini bulunduğu bölgenin komşu kafa kemiklerinden aldığı bilinmektedir.⁵⁵



Şekil 2.1. Beynin anatomik olarak bölümleri ve lobları

Frontal lob, Şekil.2.1’de⁵³ de görüldüğü gibi diğer üç loba göre en fazla alana sahip beyin bölgesidir. Lobus frontalis üzerinde motor ve duyu merkezleri ile konuşma alanı da bulunmaktadır. Frontal lobun 6. motor alanın da (premotor alan) karışık kas

hareketlerinin koordine edilmesinde görev alan sinir yolları bulunur. Ayrıca frontal göz alanı heriki gözün koordineli ve aynı anda aşağı yukarı sağa sola hareketlerini sağlar. Bu alan istekle yapılan göz hareketlerini düzenleyen merkezleride taşımaktadır.

Parietal lob, önünde sulcus centralis aşağısında sylvius, arkasında ise sulcus parietooccipitalis ile sınırlanır. Öğrenme, mantık ve hafıza gibi duyuların değerlendirildiği ve duysal merkezlerin bulunduğu lobtur.

Temporal lob, sulcus lateralis ile parietal lobdan ve occipital çentiğe inen yerden sınırlandırılır. Sulcus lateralis ve derinliklerinde ise insula ile komşudur. Gyri temporales primer işitme merkezidir ve işitme merkezinin düzenlenmesi ile ilgili temel işitme bölümleri de burada bulunur. Ayrıca koku ve tat merkezleri de temporal lobda yer almaktadır.

Oksipital lob, hemisferin arka kısmında bulunan cerebral korteksin dört lobundan biri olan bu lob piramit şeklinde bir yapıya sahip olup diğer loblara göre küçük bir hacmi vardır. Görme ve farklı görsel işlevleri olan alanlara ayrılır. Bu alanların hasarı sonucu görme defektleri ortaya çıkmaktadır.⁵⁶

2.1.1.1.3. Ara Beyin (Diencephalon)

3. ventrikül içinde yer alan ara beyin, orta beyin ile beyin yarım küresi arsındadır. Ara beyin talamus, hipotalamus ve epitalamustan meydana gelir.

Talamus, beynin üçüncü ventrikulus duvarı boyunca yer alan gri cevher kitlesinden oluşmuş bir yapıdır. Bu ventrikulus sağ ve sol talamusun arasında yer alıp ve massa intermedia iki talamusu birbirine bağlamaktadır. Talamus bütün duyu alanlarından gelen afferent sinirlerin toplandığı yerdir. İsteğimizle, idrak edilerek yapılan davranışlar, bu sistem aracılığı ile yapılmaktadır. Otuz kadar olan talamus nükleuslarını dört ana grup altında inceleyebiliriz;

1- Spesifik talamus nükleusları

- 2- Nonspesifik talamus nükleusları
- 3- Motor fonksiyonlarla ilgili nükleuslar
- 4- Assosiyatif fonksiyonu olan n kleuslardır.

Hipotalamus, hem sinirsel aktivitelere hem de hormonal işlevlerde önemli bir role sahiptir. Otonom sinir sistemi ve endokrin sistem ile ilişkili olduğu kadar, somatik reaksiyonların kontrolünde de görev almaktadır. Kısaca bütün organların veya organ sistemlerinin fonksiyonlarında düzenleyici görevlerinin yanı sıra homeostasisin sağlanmasıya yönelik g revleride vardır. Kısaca hipotalamusun fonksiyonlarını şöyle sıralayabiliriz;

- ✓ Somatomotor-visseromotor aktivitelerin koordinasyonunu,
- ✓ Hipofiz bezinden hormonların salgılanmasını,
- ✓ Vücudun su dengesi ve susamanın kontrolünü,
- ✓ Açlık, tokluk merkezi ve iştah ile ilgili reseptörler burada bulunur. Vücut ağırlığının kontrolünü,
- ✓ Reprodüksiyon ve seksüel davranışların kontrolünü,
- ✓ Vücut sıcaklığının düzenleyen merkezler burada bulunur. İlgili reseptörlerden gelen uyarılara göre sıcaklık dengesinin kontrolünü,
- ✓ Retiküler formasyondan gelen ve beyin korteksine giden sinir yolları hipotalamustan geçtiği için uyku ve uyanıklık hallerinin düzenlenmesini,
- ✓ Heyecan, korku, acı, ağrı ve kızgınlık gibi hislerin kontrolünü sağlar.

Epitalamus, burada epifiz (pineal) bezi bulunmaktadır. Epifiz bezi beyin 3. ventrikulusun tavanına bir sap ile bağlanmışır. Bu bezde sinir yapıları gözün retinesinden başlar, buradan da hipotalamusta bulunan supraşizmatik nükleuslara, daha sonra paraventr k ler nükleuslara gelerek buradan mediyen  nbeyin demeti, retiküler formasyon, medulla spinalis yoluyla süperiyor servikal gangliyon ve en son da sempatik

impluslar pineal beze ulaşırlar. Servikal gangliyonlardan çıkan sinirler kan damarları ile kafatasına oradan da beyine gelip doğrudan pineal bez hücreleri ile bağlantı kurarlar.

Epifiz bezi hücreleri MEL hormonu salgırlar. MEL, memelilerde reproduksiyon olaylarını kordine eden bir sinyal aracı olarak görev yapar. Bu hormon iki tane enzimin etkisi ile seratoninden sentezlenmektedir. Pineal bezde seratonin miktarı gündüz artarken gece ise MEL sentezi artmaktadır. Bunun nedeni ise ışık süresi ve miktarına bağlı olarak MEL salgılanmasıdır.

MEL'in salgılanması ise, gece gözü etkileyen ışık enerjisi miktarı değıştikçe sempatik sinirler aktive olmaktadır. Sempatik sinir uçlarından norepinefrin salınarak pineal bez hücrelerini etkilemektedir. Bu hücreler beta adrenerjik reseptörler yolu ile MEL'in sentezini başlatmaktadır. Gece karanlıkta melatonin seviyesi giderek artmaktadır.⁵²

2.1.1.1.4. Beyincik (Cerebellum)

Beynin ikinci büyük parçasını cerebellum oluşturmaktadır. İki yarım küreden oluşmakta ve dış kısmı gri madde iç kısmında ise ak madde içermektedir. Cerebelluma gelen sinir telleri talamusa oradan da cerebral cortekse geçmektedir. Motor fonksiyonlarının düzenlenmesi ile ilgili görevleri vardır. Eklem, kas-tendon mekiği ve kas reseptörlerinden gelen bilgiler doğrultusunda motor koordinasyonlarını ayarlarlar. Özellikle corteks cerebri ve bazal gangliyonlarla beraber kas hareketlerini düzenler. Koşma, yazı yazma, klavye kullanma ve piyano çalma gibi hızlı kas aktivitelerini kontrol eder. Ayrıca iç kulaktaki denge merkezinden de sinirler alarak vücudun antigravite kas koordinasyonunda ve dengenin muhafazasında görev alır.⁵⁴

2.1.1.1.5. Limbik Sistem

Beyin kabuğunun hemen altında diensefelonu halka şeklinde saran bir yapıdır. Limbik sistem daha çok içgüdü ile alakalı davranışları, heyecan olayları, şahsın hayatını

devam ettirebilmesi için gerekli davranışları ve seksüel dürtüleri kontrol eder. Kısaca limbik sistem;

- ✓ Şahsın hayatını sürdürebilmesi için gerekli olan davranışları, yeme içme, düşmanı ile karşılaştığında kızma, hiddet, kavga veya kaçma gibi reaksiyonları,
- ✓ Şahsın ve türünün devamını sağlaması için çiftleşme, yavru yapma ve yavruların bakımı ve büyütülmesi ile ilgili davranışları,
- ✓ Bu davranışlar ile ilgili olarak iç organların aktivitelerini ayarlar ve özellikle bunları hipotalamus ile gerçekleştirir. Kızma ve hiddet sırasında taşikardi ve kan basıncının yükselmesi gibi visseral aktivitenin düzenlenmesini de limbik sistem kontrol eder.⁵²

2.1.1.2. Omurilik (Medulla spinalis)

Omurilik gri ve beyaz cevherden oluşmaktadır. Omurilik pia mater adı verilen kan damarlarınca zengin bir zar ile çevrelenmiştir. Reseptörlerden gelen tüm afferent sinirler gri cevherin posterior (dorsal) kolonuna girerler. Bu sinir hücrelerinin gövdeleri ise medulla spinalis dışında posterior gangliyonu içinde bulunurlar. Anterior ve lateral kolondaki motor nöronların akzonları anterior (ventral) kökten omuriliğini terkederler. Omuriliğinin esas iki fonksiyonu vardır: birincisi gövde ve ekstremit kaslarını kontrol eden refleks merkezi olarak işlev yapmakta, ikincisi ise bu refleks merkezleri ile beyinin ve daha yüksek merkezleri arasında koordineli bağlantıyı sağlayan yollar olarak görev almaktadır.^{55, 56}

2.1.2. Perifer Sinir Sistemi

Periferik sinir sistemi 12 çift kraniyal kafa siniri ve 31 çift omurilik sinirlerinden meydana gelmektedir. Perifer sinirler merkezi sinir sistemi ile duyu organları, kas sistemi, bezler ve diğer organlar arasında bağlantıları sağlayan yapılardır. Bu organlardan merkezi

sinir sistemine implusları taşıyan sensorik ve duysal sinirlerdir. Merkezi sinir sisteminden organlara implus ileten sinirlere ise motor sinirler denilmektedir.⁵⁶

2.1.2.1. Oniki Çift Kraniyal Sinirler

Kraniyal sinirler veya kafa sinirleri 12 çifttir. İlk ikisi dışında hepsinin nükeusları yani merkezleri beyin kökünde bulunmaktadır. Bu sinirlerin numaralandırılması beyin köküne bağlanış sırasına göre numaralandırılmıştır. I. N. Olfactorius koku alma siniridir. II. N. Opticus görme siniridir. III. N. Occulomotorius, IV. N. Trochlearis ve VI. N. Abdunces göz kaslarına giderler ve gözün ritmik olarak hareketinden sorumludur. V. N. Trigemini yüzdeki ve ağız boşluğundaki ağrı, ısı, temas ve basınç duyularını ponsa ileten sinirlerdir. VII. N. Facialis motorik ve sensorik kısımları vardır. Yüzün mimik hareketlerini kontrol eden ve yüzün ter bezlerini innerve eden sinirdir. VIII. N. Acusticus işitme ve denge merkezi ile ilgili siniridir. IX. N. Glossopharyngeus farinks ve yutma bölgesini sinirlendirir. Parotis bezini ve dilin gerisindeki lezzet reseptörlerini sinirlendirir. X. N. Vagus vejetatif fonksiyonlarda çok önemli bir sinirdir. Mide bağırsak kaslarının hareketini arttır, kalp hareketlerini inhibe eder, mide bezleri ve pankreas salgısını da arttır. XI. N. Accesorius bu sinirin eksternal kolları başın öne, arkaya, geriye ve yana çeken kaslarını innerve ederler. İnternal kolları ise n.vagus ile birleşerek motor sinirlerini oluştururlar. XII. N. Hypoglossusun tüm sinirleri motoriktir. Dilin iç kaslarını sinirlendirir.⁵²

2.1.2.2. Omurilik Sinirleri

Merkezi sinir sisteminin omurilik bölümünden 31 çift sinir çıkmaktadır. Bu sinirler medulla spinalisten çıkan radiks anterior (ön kök) ve radiks posterior (arka kök) omurlar arası delikler hizasında birleşmesinden oluşmaktadır. Radiks anterior kökünden duyu, radiks posteriordan ise motor sinireler çıkar. Bu spinal sinirler omurlararası yerlerinden çıkınca ön ve arka iki dala ayrılmaktadır. Arka dallara giden sinirler vücudun

sırt derisine duyu sinirlerini, kaslara ise motor sinirleri taşımaktadır. Spinal sinirlerin ön dalları ise birbirlerine bağlanarak pleksuslar oluşturmaktadır.⁵³

2.1.2.3. Otonom Sinir Sistemi

Vücutta düz kaslar, kan damarları, kalp ve bezlerin aktivitelerini kontrol eden sinir sistemine otonom ya da vejetatif sinir sistemi denilmektedir. Özellikle homeostasisin sağlanması, strese karşı vücudun reaksiyonunun ayarlanması, adaptasyon mekanizmalarını sağlarlar. Genel olarak sinir sisteminde motorik aktivitelerde görevli iki farklı bölümü vardır. Somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olarak ikiye ayrılır. Otonom sinir sistemi sempatik ve parasempatik sistemlerden oluşmaktadır. Bu sempatik ve parasempatik sistemler bir birlerinin antagonisti olarak görev yaparlar. Bazı refleksler vardır ki her iki sistemde de görev alır. Bazı refleks merkezleri ve yolları bu iki sistemin aktivitelerinin birbirine uygun biçimde yapılmasını kontrol eder.^{56, 57}

2.1.2.3.1. Sempatik Sinir Sistemi

Sempatik sinir sisteminin sinirleri medulla spinalisin ilk torasik segmentinden üçüncü lumbal segmentine kadar olan sinir köklerinden çıkarlar. Genellikle duyuyla hareketi sağlayan kısım sempatik sinir sistemidir. Stres, korku ve üzüntüde aktiviteleri artar, kalp atışları hızlanır ve sindirim aktiviteleri de yavaşlar. Sempatik sistemin aktivasyonu ile kısaca;

- ✓ Göz bebekleri ya da pupillalarda genişleme gözlenir.
- ✓ Kan basıncını yükseltir ve kalp atım sayısının artar.
- ✓ Dolaşım sistemindeki kanın hayati organlara gitmesini sağlar.
- ✓ Tükürük sekresyonunun azalmasına neden olur.
- ✓ Solunumu hızlandırır ve solunum yollarını açarak genişletir.
- ✓ Kan glikoz düzeyini artırır.
- ✓ Mide hareketlerini azaltır.

- ✓ Sindirim ve üriner sistemdeki sfinkterleri kapatır.⁵⁷

2.1.2.3.2. Parasempatik Sinir Sistemi

Bu sistemin sinirlerinden bir kısmı beyin kökünden çıkan kraniyal sinirlerden (N. Oculomotorius, N. Glossopharyngeus, N. Facialis ve N. Vagus) diğer bir kısmı ise medulla spinalisin ikinci, üçüncü ve dördüncü sakral segmentlerinden çıkarak, anterior kökler içinde omuriliğini terkederler. N. Pelvicus adı altında kolon, rektum, anüs ve idrar kesesine girerek bu organların aktivitesini artırıcı motorik etkili bir sinirdir. Parasempatik sistemin organlar üzerinde ekileri ise kısaca;

- ✓ Kalp atım hızını yavaşlatırlar.
- ✓ Solunum yollarında daralma ve solunumun yavaşlamasını sağlarlar.
- ✓ Göz pupillalarını daraltırlar.
- ✓ Tükürük sekresyonunu arttırırlar.
- ✓ Mide hareketlerinde artışa neden olurlar.
- ✓ Bağırsak salgılarını ve bağırsak hareketlerini arttırırlar.
- ✓ Kalbi besleyen koroner damarları daraltırlar.⁵⁷

2.2. Nörotoksisite

Genellikle belirli bir nöral sinir grubunu (örn. dopaminerjik sinirler) veya ortak özelliklere sahip nöronların alt kümesini (reseptörleri) lezyona uğratmak için uygulanan eksojen maddelere nörotoksinler denilmektedir. Bu terim daha sonra nöronal hücre ölümüne yol açan apoptotik ve nekrotik olayları başlatabilen endojen maddeleri ve metabolitleri de kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Nöronal hücre ölümünü veya hücre hasarını tetikleyebilen birçok farklı aşama ve yol vardır. Bu şekilde oluşan hasar normal hücresel süreçlerin bozulmasına neden olarak anormal sinir fonksiyonuna yol açmaktadır. Fonksiyonel sinirlerde oluşan lezyonlar ise çeşitli nörodejeneratif hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır. Alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı ve prion

hastalıkları gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklar sinir sisteminde oluşan bu lezyonların tamir edilememesi sonucu ortaya çıkmaktadır.⁵⁸

Fizyolojik olarak hücre ölümü; dokuların organ boyutlarını ve işlevlerini korumak için gerekli olan oldukça düzenlenmiş ve programlanmış önemli bir homeostatik mekanizmadır. Sinir sisteminde aşırı çoğalan nöronların uzaklaştırılması fonksiyonel devre oluşumu için gerekliken, anormal nöron ölümü, akut ve kronik nörodejeneratif hastalığın temel nedenlerinden biridir. Nörotoksinler hücrelerde ölüm ya da hayatta kalım yollarını aktifleştirerek nörodejeneratif hastalıklara karşı bir koruma reaksiyonu şekillendirirler. Nöronal hücrelerde biriken nörotoksinler, katlanmamış protein agregasyonu ve yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi sonucu hücrelerde nöroinflamasyon ve apoptozisi uyararak hayatta kalım ya da ölüm kaskadlarını aktif hale getirmektedir. Bu yolların aktivasyonu ile glial hücreler, astrositler ya da farklı sinir hücrelerinin etkileşimi ile mitokondriyal yolların aktivasyonu ve en son olarak da apoptozis ile hücre ortadan kaldırılır. Eğer nörotoksinler, katlanmamış proteinler ya da yanlış katlanmış proteinler hücrel mekanizmalar ile uzaklaştırılmazsa sinir sisteminde hasar oluşarak çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda sinir sisteminde hasara neden olan, inflamasyonu ve apoptozisi uyaran birçok bileşik gösterilmiştir.⁵⁹ Yapılan bu çalışmada ise pekçok organda hasara neden olan özellikle sinir sistemini etkilediği bilinen ACR bileşiği ele alınmıştır.

2.2.1. Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)

Astroglialarda bulunan Tip III ara filament olarak bilinen bir proteindir. Ara filament proteinleri, ökaryotlarda bulunan 8-10 nm'lik sıkı fibröz proteinlerdir. Bu proteinler hücre iskeletinin oluşması, mitoz, sitoplazmik alan düzenlenmesi ve hücre hareketinin sağlanmasında önemli rol oynar. İnsanlarda onyedinci kromozomun uzun kolu üzerinde eksprese edilir, küçük ve asidik bir proteindir. Hücrelerin şekil ve mekanik

dayanıklılığını sağlamaktadır.⁶⁰ Beyinde astrositler dışında da bulunmaktadır. Gözde Müller hücresinde, testiküler leydig hücresinde, pankreas ve karaciğerdeki stellat hücrelerde, podosit, kondrosit ve mezengial hücrelerde de bir kısım farklı izoformlarda sentezlendiği saptanmıştır.⁶¹ Hücrelerde yapı iskeletini ve hareketi, sinyal iletimini, mitoz olaylarını, kan-beyin bariyerinin işlevlerinin fonksiyonel olması gibi birçok hücresel olayda görevlidir. Bu asidik proteinler astrositlerin şekil ve mekanik olarak dayanıklılıklarını sağlamaktadır. Olgunlaşmış hücrelerde gen knockout çalışmalarında GFAP'ın foksiyonları ortaya konmuştur. Bu tip farelerde spinal kord ve hipocampusta beyaz madde oluşmamaktadır. Astrositlerin fonksiyonları dejeneredir, miyelinizasyon anormal derecede ve kan-beyin bariyeri bozulmuştur.⁶² Bazı RNA çalışmalarında GFAP içermeyen astrositlerin nöronlar ile bağlantı oluşturmamaları ve GFAP'ın purkinje hücre iletiminin devamlılığında önemli olduğu bildirilmiştir.⁶³

Santral sinir sisteminde travma, hastalık, genetik bozukluklar veya çeşitli kimyasal bileşiklerin hasarı sonucu astrositler reaktif hale gelir. Mikroglia ve astrositlerin aktive fenotipleri yaralanmaya veya hasara bağlı transformasyonu genellikle reaktif gliosis veya basitçe gliosis olarak adlandırılır. Gliosis oluştuğunda hücre çekirdeğinde bulunan DNA'dan GFAP gen ekspresyonunun arttığı ve hücrede hasar sonucu ölüm kaskadlarının aktifleştiği bilinmektedir. Bu yüzden hasarlı hücrelerde yıkım gerçekleşmektedir. Nöronal hücrelerde hasar sonucunda GFAP regülasyonunda bozulmalar meydana gelmektedir. Akut cerebral hasar sonrası kan-beyin bariyerinde hasar oluşmakta ve buna bağlı olarak GFAP'ın arttığı da bilinmektedir. Travma, iskemi, bulaşıcı ve nörolojik hastalıklar ve kimyasal bileşiklere maruziyetlerin hepsinin gliozise neden olduğu bilinmektedir.⁶⁴

2.2.2. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Monoamin Oksidaz (MAO)

Asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolinin ve nörotransmitter olarak işlev gören diğer bazı kolin esterlerinin parçalanmasını katalize eden bir enzimdir. AChE esas olarak nöromusküler kavşaklarda sinaptik iletimi sonlandırmaya hizmet ettiği kolinerjik tipteki kimyasal sinapslarda bulunur. Nörotransmisyon sırasında, ACh presinaptik nörondan sinaptik aralığa salınır ve sinaptik sonrası zardaki ACh reseptörlerine bağlanarak sinirden gelen sinyali iletir. Post-sinaptik zarda da bulunan AChE, ACh'ı hidrolize ederek sinyal iletimini sonlandırır. Serbest kalan kolin tekrar pre-sinaptik nöron tarafından alınır ve kolin asetiltransferazın etkisiyle asetil-CoA ile birleşerek ACh sentezlenir.⁶⁵

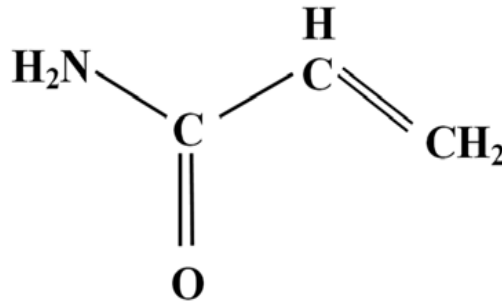
Monoamin oksidazlar (MAO), amin gruplarını kesmek için oksijen kullanarak monoaminlerin oksidasyonunu katalize eden enzimdir. Serotonin, dopamin ve norepinefrin gibi monoaminlerin parçalanmasını sağlar. Vücudun çoğu hücre tipinde mitokondrinin dış zarına bağlı olarak bulunurlar.⁶⁶ MAO'lar, flavin içeren amin oksidoredüktazların protein ailesine aittir. Monoamin oksidazlar, monoaminlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eder.⁶⁷ Oksijen, bir molekülden bir amin grubunu (artı bitişik hidrojen atomunu) çıkarmak için kullanılır, bu da karşılık gelen keton (veya aldehit) ve amonyak ile sonuçlanır. Monoamin oksidazlar, kovalent olarak bağlı kofaktör flavin adenin dinükleotidi (FAD) içerir ve bu nedenle flavoproteinler olarak sınıflandırılır.⁶⁸

2.3. Akrilamid (ACR)

2.3.1. ACR'nin Genel Özellikleri

Akrilamid (ACR), ya da akrilik amid olarak adlandırılan bu bileşik özellikle oda sıcaklığında beyaz kıristalli, kokusuz ve katı bir maddedir. ACR'nin açık kimyasal formülü Şekil 2.2.⁶⁹'de görüldüğü gibidir. Moleküler formu ve ağırlığı ise $C_3H_5NO/71,08$ olarak bilinmektedir. ACR 125°C, 25 mm Hg kaynama noktasına, 84.5°C erime

noktasına ve 1.27 g/ml (25 °C) yoğunluğa sahiptir. ACR oda sıcaklığında suda kolaylıkla çözünür ayrıca aseton, metanol ve etanol gibi diğer polar çözücülerde de çözünmektedir. Karbon tetraklorür gibi polar olmayan çözücülerde ise neredeyse çözünmez. ACR ilk defa 1893 yılında Almanya’da Christian Moureau tarafından kimyasal bir bileşik olarak bulunmuştur. ACR, kimyasal olarak sentezlenebilen oldukça toksik, doymamış çift bağ içeren bir amid olup; tekstil, kâğıt, kozmetik üretimi, içme sularının iyileştirilmesi gibi çok farklı endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. ACR endüstriyel olarak üretilmiş konjuge reaktif bir bileşik olup, poliakrilamid sentezlemek için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır.⁷⁰



Şekil 2.2. Akrilamidin yapısal formülü

2.3.2. ACR’nin Kullanım Alanları ve Besinlerde Bulunuşu

ACR birçok endüstriyel alanda kullanılan suda çözünür vinil bir monomerdır. ACR’nin birincil kullanımı, polimerlerin ve kopolimerlerin üretimidir. Poliakrilamidin en fazla kanalizasyon ve atık su arıtma tesislerinde topaklaştırıcı olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda içme suyunun pıhtılaştırıcı olarak arıtılmasında da kullanılır. Ayrıca kâğıt ve karton ürünlerinin kalitesini güçlendirmek ve iyileştirmek için poliakrilamid kullanılmaktadır. Suda çözünür poliakrilamid petrol endüstrisi tarafından petrol geri kazanımını artırmak için bir katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Son yıllarda ise ACR, inşaat sektörü, kozmetik, tekstil endüstrisi, moleküler laboratuvarlarda elektroforez

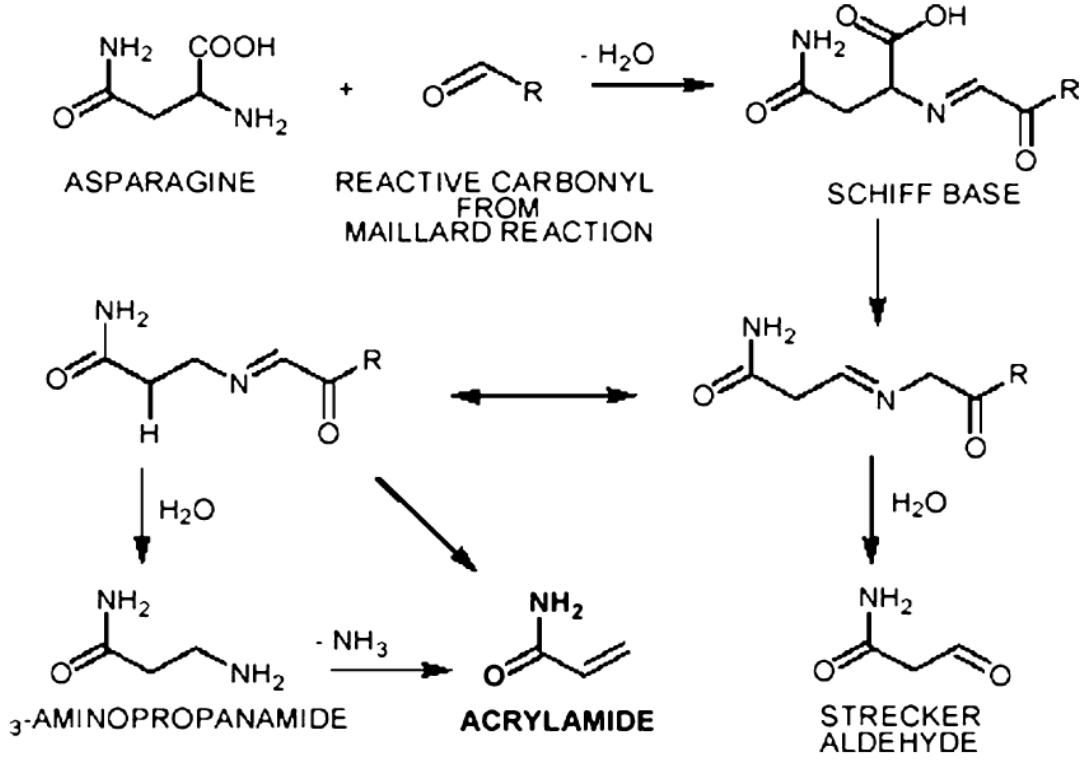
ve jel kromotografilerinde, deneysel araştırmalarda proteinlerin ayrılması için katı bir destek olarak çok sayıda uygulama alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.^{70, 71} Ayrıca sigara filtrelerinin yapısında ve siğara ürünlerinde de bulunduğu bilinmektedir. Yaygın olarak kullanılmasından dolayı özellikle inşaat sektöründe ve diğerk sektörlerde çalışan işçilerde de ACR'ye maruziyet görülmektedir. İsveç'te yapılan bir araştırmada bir tünel inşaatında çalışan işçilerde ve sigara içmeyen kontrol grubu kişilerin kanlarında da beklenmedik bir şekilde yüksek düzeyde ACR tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmalarda ACR'nin sadece dış faktörlere bağlı olarak değil aynı zamanda gıdasal ürünler ile de vcoda bulaşabildiği fikri ortaya çıkmıştır. Yapılan bir çalışmada besinlerin yüksek sıcaklıklara maruz kalması sonucu ACR'nin oluştuğu gözlemlenmiştir. Genel olarak 120  C ve üzerinde yüksek ısıya maruz kalan ekmek, kızartma, patates cipsi, kavrulmuş kahve, bisküvi, kraker ve ızgara gibi besinlerde ACR meydana gelebilmektedir. Bu oluşum hızı ve miktarı çeşitli faktörlere bağlı olmakla birlikte ısı miktarına göre sıcaklık arttıkça logaritmik olarak artmaktadır. Özellikle karbonhidrat bakımından zengin besinlerde, asparajin aminoasitlerince zengin besinlerde daha fazla miktarda toksik ACR bileşiği oluştuğu bilinmektedir.¹⁻³

2.3.3. ACR'nin Kimyasal Olarak Oluşumu

Pışirme sırasında çeşitli gıdalardaki potansiyel kansere neden olan ajan ACR'nin keşfi büyük bir ilgi uyandırmıştır. Gıda kaynaklı ACR özellikle 120  C ve üzeri sıcaklıklarda glikoz ve fruktoz gibi indirgeyici şekerlerden ve çeşitli aminoasitlerden örneğin; asparajin aminoasiti arasında oluşan Maillard esmerleşme reaksiyonu sonucu yapılarındaki reaktif karbonillerden spontan olarak oluştuğu bilinmektedir. ACR oluşumu şekil 2.3.'de³ gösterildiği gibi Maillard reaksiyonu sonucu oluşmaktadır.⁷²

Proteinlerin yapısında bulunan 20 aminoasitten biri olan Asparajin'in yüksek ısı ile ACR oluşturma yeteneği, diğerk aminoasitlerden veya glikoz ve frktozdan daha fazla

etkili olduğu bilinmektedir. Asparajin aminoasitinin yanısıra alanin, arginin, aspartik asit, sistein, glutamin, metiyonin, treonin ve valininde yüksek sıcaklıklarda ACR oluşturduğu bilinmektedir.^{72, 73}



Şekil 2.3. Maillard reaksiyonu sonucu ACR oluşumu

2.3.4. ACR'nin Metabolizması

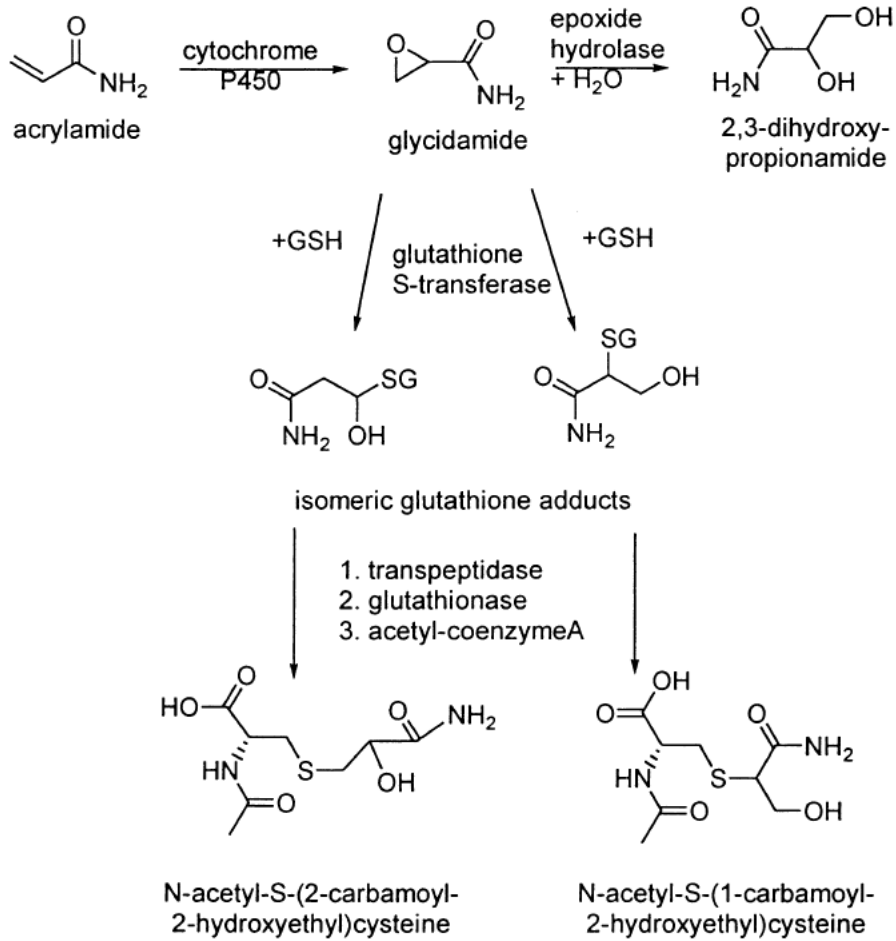
İnşaat ve kozmetik sektörü gibi alanlarda çalışanlarda yüksek düzeyde ACR maruziyeti görülmektedir. ACR maruziyetinin gıdalar aracılığıyla da gerçekleşebildiği bilinmektedir. Daha önceki toksikinetik çalışmalar ACR'nin hızlı bir şekilde yan etkisinin ortaya çıktığı ve ACR'ye maruz kalan dokuda hasar meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu şekilde hızlı etkisinin olması metabolizmasından ileri gelmektedir. Yapılan çalışmalarda intraperitoneal (i.p.) ve intragastrik (i.g.) uygulamalardan sonra emilen ACR, kanda özellikle hemoglobine bağlı olarak, kas dokusunda, karaciğerde, beyin ve testis gibi dokularda birikerek toksik etki göstermektedir.⁷⁴ ACR'nin absorpsiyonu ve

metabolizması sonucu vücutta oksidasyon enzimleri vasıtasıyla metabolize olduğu bildirilmektedir. Sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) vücutta biriken birçok toksik, kanserojen ve yabancı bileşiklerin parçalanmasından sorumlu oksidaz sisteminin bir üyesidir. Aynı zamanda CYP2E1 yağ asitlerinin oksidasyonları gibi temel metabolik reaksiyonlarda da görev almaktadır. CYP2E1, özellikle yoğun olarak karaciğerde eksprese edilen bir membran proteinidir. Bu yüzden karaciğerde CYP2E1 aracılığı ile vücuda giren yabancı toksinlerin deaktivasyonu sağlanarak uzaklaştırıldığı yerdir.^{70, 74, 75}

Yapılan çalışmalarda ACR'nin absorpsiyonundan sonra metabolizması için özellikle iki yol olduğu gösterilmiştir. Birincisi glutatyon-S-transferaz (GST) enziminin aktivitesi ile glutatyon (GSH) birleşerek metabolize olmaktadır. İkinci yol olarak ta CYP2E1'in oksidasyonu ile Glycidamid bileşiğine dönüştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 2.4.⁶). Daha sonra glycidamid yine transferaz enziminin aktivitesi sonucunda GSH ile birleşerek veya epoksi hidrolaz enzimleri ile N-asetil-S sistein konjuge türevine dönüştürülerek vücut dışına atılmaktadır. Bu olay en çok hemoglobin, karaciğer, böbrek ve beyin gibi organlarda gerçekleşmektedir. Yapılan başka çalışmalarda ise ACR'nin GST enzimini inhibe ettiği ve bunun sonucu olarak CYP2E1 yolu ile glycidamid metabolizmasının arttığı gözlemlenmiştir. ACR en çok karaciğerde glycidamide metabolize olmaktadır. Glycidamid bileşiği ACR gibi toksik etkili ve aynı zamanda DNA'ya bağlanarak genotoksisiteye neden olmaktadır. ACR'nin metabolizması kısaca Şekil 2.4'de gösterilmiştir.⁷⁵⁻⁷⁸

Hem ACR hem de glycidamid sülfhidril ve amino grupları gibi nükleofilik bölgelere karşı reaktiftirler. Bu bileşiklerin özellikle ACR'nin farklı organlarda mikronükleusları indükleyerek kanserojen etki yaptığı, plasental bariyeri geçerek anomalilere neden olduğu, yüksek dozlarda genetik mutasyonlara ve özellikle sinirsel nöropatilere sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca ACR maruziyetinin germ hücre

mutajenitesinden dolayı reproduktif toksisiteye, gelişim bozukluklarına ve farklı organlar üzerinde etkili olduğu ve diyet ile ACR maruziyetinin meme kanserini indüklediği rapor edilmiştir.⁷⁹⁻⁸²



Şekil 2.4. CYP2E1 oksidasyonu sonucu ACR'nin Glycidamide metabolize olması

2.3.5. ACR Nörotoksitesi

ACR monomerlerinin endüstrilerde yaygın olarak kullanılmasından dolayı maruz kalan kişilerde ataksi (açık alanda yürüme anormallikleri), iskelet kası zayıflığı (ön ve arka bacak kavrama gücünde azalma), hind limb paralizis (arka bacak felci), bilişsel bozukluk ve ekstremitelerde uyuşma ile karakterize benzer nörotoksik belirtilerin görüldüğü ve mesleki maruziyetin sonucunda oluştuğu kanısına varılmıştır. ACR

monomerleri ile yapılan deneysel çalışmalar sonucu laboratuvar hayvanlarında görülen belirtilerin insanlar ile aynı nörotoksik septomlara sahip olduğu bildirilmiştir.^{12, 75}

Yapılan morfolojik çalışmalar sonucunda ACR nrotoksisitesinin cerebellar purkinje hücre ölümü, distal akzonların ve sinir terminallerinin dejenerasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. ACR bileşiğinin hasara neden olan birinci bölgesi sinir terminalleri olduğunu, nrotoksisitenin MSS ve PSS’de bozulmuş sinaptik iletimin bir sonucu olarak geliştiği bilinmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda ACR’nin spesifik proteinler üzerinde sistein kalıntılar ile seçici eklentiler oluşturarak presinaptik nörotransmitter salınımını, membrana yeniden alımını ve veziküler depolamayı bozduğu gösterilmiştir.^{21, 75} ACR, birçok kimyasal veya kimyasalların metabolitleri gibi, biyolojik makromoleküller (rneğin enzimler, DNA) zerinde elektronca zengin (nükleofilik) kalıntılarla kovalent bağlar oluşturarak sitotoksisiteye neden olduğu bilinmektedir.⁸³ ACR ile yapılan elektrofizyolojik çalışmalar sonucunda deney hayvanlarının omurilik birincil afferent sinir terminallerinde, perifer nöromüsküler bağlantılarında ve otonom sinapslarında nörotransmisyonun bozluduğu gösterilmiştir.^{84, 85} özellikle ACR nrotoksisitesinin oluşumuna neden olan iki yol olduğu çalışmalarda bildirilmektedir. Birincisi, kinesin bazlı hızlı akzonal transportun inhibisyonu, ikincisi ise nörotransmisyonun doğrudan inhibisyonudur.⁶ ACR nrotoksisitesinin mekanizmaları hala araştırma konusudur. Beyin hücrelerinde gelişen sitotoksisitenin ve hücresel hasarın mekanizmaları üzerine birçok çalışma ele alınmıştır. Özellikle gıdalardan kaynaklanan ACR’nin toksik ve kanserojen etkili olması nedeniyle bu konu üzerinde çalışılması daha da önem kazanmaktadır. ACR’nin ilk klinik septomları el ve ayaklarda uyuşma, yorgunluk, kas zayıflığı ve motor hareketlerde düzensizlik ile ilişkili olduğu için davranışsal, lokomotor aktivite ve açık alan testleri de ACR maruziyeti sonucu yapılan analizler arasındadır. Araştırmacılar açık alan değerlendirmelerinde, yürüme analizinde, kavrama kuvvetinde, arka bacaklarda

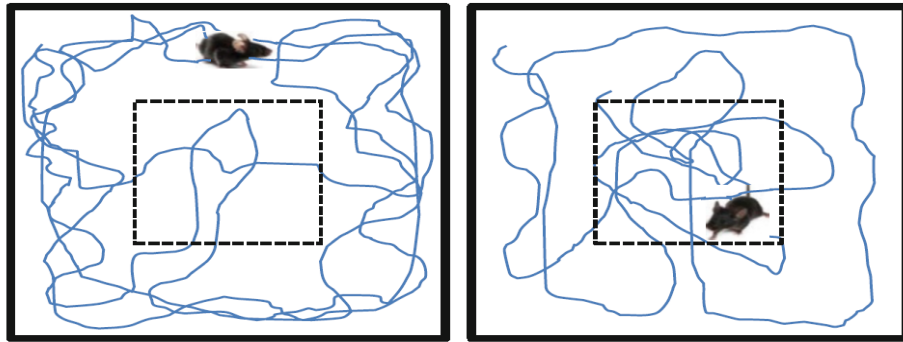
oyunmada ve koordinasyonda ataksiyi ölçmek için davranış analizlerini kullanmaktadırlar.^{86, 87} Araştırmamızda, ACR uygulanması sonucu gelişen motor aktivitelerindeki değişimin lokomotor aktivite üzerindeki etkisi, ayrıca nörotransmitter düzenleyici enzimler olan AChE, MAO enzimlerindeki artış, özellikle MSS’de hasar sonucu artan GFAP ekspresyonları araştırıldı. Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve ROS artışı ile gelişen oksidatif stres parametrelerinin artışı, ayrıca DNA hasarı ile ilişkili mekanizmalar üzerindeki etkileri de ele alındı. Oksidatif stres, nöroinflamasyon ve ER’de gelişen stress sonucu oluşan apoptozisin; ACR’nin hücrel mekanizmaları üzerinde ne denli etkili olduğu ve bu hasarı azaltmak için MEL hormonunun etkileri incelendi.

2.4. Locomotor Aktivite (LMA)

Metodolojik farklılıklara göre belirlenmiş anksiyete ve nörodejeneratif bozukluklarının küresel yaygınlığı oldukça yüksektir. Dünya çapında çalışma yöntemlerinde önemli farklılıklar olmasına rağmen, anksiyete benzeri bozuklukların yaygınlığı Afrika’da en düşük ve Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Asya ve Batı Pasifik’te daha yüksektir. Tüm bölgelerde kadınlarda erkeklere göre prevalans yaklaşık 1,75 kat daha yüksektir. Anksiyete bozuklukları, dünya çapında ölümcül olmayan sağlık kayıplarına en çok katkıda bulunan hastalık grubu arasındadır. Bu nedenle yeni ve etkili terapötiklerin geliştirilmesi ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkili çalışmalar da artmaktadır.⁸⁸ Deneysel çalışmalarda gözlemlenen stresin, beyin işlevi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu ve hem kısa hem de uzun vadeli davranış değişikliklerine yol açabildiği bilinmektedir.⁸⁹ Bu şekilde gelişen streslere hücrel ve davranışsal yanıt her zaman içeriğe bağlıdır ve çeşitli çevresel faktörler bireyin strese tepkisini şekillendirebilir.⁹⁰ Deney hayvanlarında en sık kullanılan davranışsal testlerden biri, yeni çevreleri keşfetmeye ve parlak/açık alanlardan korkuyla kapalı koyu alanlara kaçmak ve sinme şeklinde olan açık alan testidir. Açık alan testi ilk olarak Calvin Hall tarafından

1930’larda kemirgenlerde bir hastalık indeksi olarak dışkılamayı ölçmek için geliştirilmiştir.⁹¹

Açık alan testi, kemirgenlerde hareket, kaygı ve tımarlama ve yetiştirme gibi önemli davranışları analiz etmek için kullanılır. Ratlar için, test alanı normalde 42x42 cm² bir polivinil klorür (PVC) kutusundan oluşur ve kutunun merkezi ve çevresel alanlarının içini ve etrafındaki hareketi izlemek için bir kamera kullanılır. Hareketteki değişiklikler, değişen nörolojik süreçlerin göstergesi olabilir ve bu nedenle anormal beyin işlevini yansıtabilir. Ek olarak, bu test bir hayvanın genel sağlığını ve refahını değerlendirmek için de kullanılabilir. Sağlıklı olmayan hayvanlar bölge içinde daha az hareket etme eğilimindedir. Stresli ratlar açık alanda daha az aktivite ve artmış stereotipik davranış gösterir. Bu tür davranışlar, tekrarlayan, değişmeyen ve görünüşte amaçsız olanları içerebilir. Duvarlara yakın durmayı ve çevrede daha çok seyahat etmeyi tercih eden ratlar, anksiyete benzeri davranış belirtileri gösteren tigmotaksi (katı bir nesneye doğru hareket) olarak tanımlanabilir. Daha düşük kaygılı ratlar, kutunun merkezi, açık alanında daha fazla zaman geçirme eğiliminde olduğu şekilde de gösterilmiştir. Şekil 2.5’te⁸⁸ gösterildiği gibi sol taraftaki kafeste bulunan rat daha çok strese maruz kaldığı için katı bir nesneye doğru yönelerek zaman geçirmiştir. Sağ kafesteki rat ise açık alanda daha fazla zaman geçirmektedir. Bu göstergeler bize hayvanlarda genel motor aktivite ya da lokomotor aktivite hakkında önemli bilgiler vermektedir.^{88, 91}



Şekil 2.5. Locomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranışları ölçmek için kullanılan açık alan testi

Genel motor aktivite ve davranış üzerindeki etkilerinin analizi, bilimsel çalışma alanlarının merkezinde yer almıştır. Aslında, belirli açılardan motor aktivite çalışmaları, ilaçların veya bileşiklerin davranış üzerindeki etkilerine ilişkin bilginin temelini oluşturur. Son yirmi yılda uyarıcılar, opiatlar, benzodiazepinler ve diğer ilaç sınıfları hakkındaki bilgilerin çoğu, bu tekniklerin kullanımıyla elde edilmiştir. Motor aktivite veya keşif araştırmasının bazen basit veya bilgilendirici olmadığı düşünülse de, bu davranışlardaki değişiklikler, öğrenme ve hafıza, ödül veya korku tepkileri gibi daha spesifik süreçleri incelemeyi amaçlayan paradigmlar için önemli sonuçlara sahip olabilir. Bu nedenle, incelenen bileşiğin genel motor aktiviteyi nasıl etkilediğinin farkında olunması zorunludur. Kemirgenlerin spontan motor aktivitesini ve keşfini etkileyen birçok faktör vardır ve bu davranışları ölçmenin birçok yolu vardır. Lokomotor terimi, bir konumdan diğerine hareket anlamına gelir. Kemirgenlerde, uzaysal araştırmanın önemli bir bileşeni harekettir (ambulasyon olarak da adlandırılır) ve açıkça bu aktivite, ratların spontan davranış repertuarında en belirgin olanlardan biridir. Bununla birlikte hareketin, bir hayvanın çevresinin keşfi ile ilişkilendirilebilmesine rağmen, bu davranışın mutlaka gerçek keşfi yansıtmayabileceğini belirtmek önemlidir. Başka bir deyişle, lokomotor aktivite, keşfetme dürtüsünün yanı sıra çeşitli faktörlerden de etkilenebilir. Bileşiklerin veya ilaçların spontan motor davranışlar üzerindeki etkilerini test ederken, bu ilk noktanın farkında olmak önemlidir. Keşif, duyuşal süreçleri, araştırmayı ve yeni uyaranlara yanıt vermeyi ve bilgi toplamayı içeren karmaşık bir bilişsel süreçtir. Örneğin, meraklı bir hayvan olan rat aktivite monitörüne ilk kez yerleştirildiğinde, çevresini keşfedecektir. Hayvanın çevresel uyaranlarla temasa geçmesine hizmet eden hareket, yetiştirme, koklama ve kafayı dürtücü tepkilerle meşgul olacaktır. Motor aktivite keşif dürtüsü, donma veya diğer korkuyla ilgili davranışlar, hastalık, sirkadiyen döngüdeki göreceli zamandan ve diğer birçok değişkenden etkilenebilir. Açık alan testi ayrıca

bileşiklerin yatıştırıcı, toksik veya uyarıcı etkilerini değerlendirmek için kullanılan çok yaygın bir testtir.^{91, 92}

Geniş endüstriyel, farmasötik ve tarımsal uygulamaları olan birçok kimyasal bileşik, insanlarda ve deney hayvanlarında kilo kaybı, iskelet kası zayıflığı ve ataksi (açık alanda yürüme anormallikleri) gibi bir çok nörotoksik sendrom oluşturmaktadır. Çok yaygın olarak kullanılan bir bileşik olan ACR maruziyetinde, ataksi, iskelet kası zayıflığı (ön ve arka bacak kavrama gücünde azalma), hind limb paralizis (arka bacak felci), bilişsel bozukluk ve ekstremitelerde uyuşma ile karakterize benzer nörotoksik belirtiler görülür. ACR'nin sinirlerde distal akson yaralanması, merkezi ve perifer sinir sistemleri ile ilişkili hasar oluşturduğu bilinmektedir. Bu tip toksik nöropatiler, distal akson bölgelerinin çok odaklı şişmesi ve daha proksimal bölümlerin dejenerasyonu ile karakterize edilir. Ataksi ve iskelet kası zayıflığı, aksonopatilere neden olan kimyasalların ürettiği ayırt edici nörolojik kusurlar gibi görünmektedir. ACR, distal aksonopati üreten kimyasallar arasında prototipik olarak kabul edilir.^{86, 93, 94} Çalışmamızda ACR'den kaynaklı nöropatinin biyokimyasal ve moleküler parametrelerdeki değişiklikler ile ilişkili nörolojik dejenerasyonun, lokomotor aktivite üzerindeki etkileri ve bu parametreler üzerine MEL'nin uygulamasının olası protektif etkileri araştırıldı.

2.5. Oksidatif Stres ve 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG)

Biyolojik sistemler için hem olumlu yararları hem de potansiyel olarak zararlı yan etkileri olduğu için oksijen genellikle Janus gazı olarak adlandırılır. Reaktivite, oksijenin yüksek enerjili elektron transferlerine katılmasına izin verir ve dolayısıyla oksidatif fosforilasyon yoluyla büyük miktarlarda Adenozin trifosfat (ATP) oluşumunu destekler. Çok hücreli organizmalarda gerçekleşen bu reaktivite protein, lipid veya DNA gibi herhangi bir biyolojik moleküle saldırmayı da yatkın hale getirir. DNA'ya saldırması sonucu 8-OHdG miktarında artışa neden olmaktadır. Sonuç olarak, vücudumuz ROS'un

sürekli oksidatif saldırısı altındadır. Bu saldırıyı genellikle dengede tutan karmaşık bir antioksidan savunma sistemi gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda bu denge bozulabilir ve oksidatif strese neden olabilir. Bu antioksidan sisteminin üyeleri süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT), glutatyon (GSH) enzimleri olabildiği gibi endojen ve ekzojen moleküller (E vitamini, glutatyon, ürat, bilirubin) de olabilmektedir. Oksijen toksisitesinin oluşturduğu oksidatif stres, prooksidan-antioksidan dengesinde bir bozulma ile potansiyel hasara yol açan değişiklik olarak tanımlanır. Oksidatif stresin birçok doku hasarında, pekçok farklı bozukluğun patofizyolojisinde merkezi bir rol oynadığı artık kabul edilmektedir.⁹⁵

Oksidatif stresin anlaşılmasında prooksidan-antioksidan dengesi kavramı çok önemlidir. Bu dengenin her iki tarafındaki değişiklikler sonucu oksidatif stresin oluştuğu yani anormal derecede yüksek ROS üretimi veya antioksidan savunmasındaki eksiklikler sonucunda geliştiği bildirilmektedir. ROS, aerobik metabolizmanın potansiyel olarak zararlı yan ürünleri olarak ilk kez dikkatleri çekmiş olsa da, artık birçok hücre içi sinyal yolağında ikincil haberciler olarak önemli roller oynadıkları kabul edilmektedir. Bu nedenle prooksidan-antioksidan dengesindeki küçük değişiklikler hücre içi veya hücre dışında değişikliklere yanıt olarak homeostatik adaptasyonlara yol açabilir. Eğer daha büyük değişimler gözlemlenirse ve hasar onarılamaz ise fizyolojik olarak hücrenin ölümüne yol açabilir.⁹⁶

2.5.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren türler olarak tanımlanır ve yüksek reaktivitelerini veren bu eksik elektron kabuğudur. Serbest radikaller birçok elementten üretilebilir, ancak biyolojik sistemlerde en önemlileri oksijen ve nitrojen içerenlerdir. Fizyolojik koşullar altında, en yaygın oksijensiz radikal süperoksit anyondur (O_2^-) ve mitokondri ana kaynağı olarak kabul edilmektedir. Oluşum

hızı, zincirde bulunan elektronların sayısı ile belirlenir ve bu nedenle, diyabette olduğu gibi hiperoksi ve yüksek glikoz koşulları altında yükselir. Normal koşullar altında, tüketilen oksijenin % 2'si suya indirgenmek yerine mitokondride O_2^- 'ye dönüştürülür. Yükünden dolayı O_2^- membran geçirimsizdir ve bu nedenle mitokondriyal matriks içinde kalır.⁹⁷ ROS miktarı nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimleri, sitokrom P450 ve diğer oksido-redüktazlar yoluyla da artabilir. Bu nedenle, çeşitli büyüme faktörleri, ilaçlar ve toksinler artan ROS oluşumuna neden olur.⁹⁸

SOD enzimleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2) detoksifiye edilmektedir. H_2O_2 serbest bir radikal değildir ve dolayısıyla O_2 radikalinden daha az reaktiftir. Polar olmadığından, hücre ve organel zarlarından geçebilir ve bu nedenle sinyal iletim yollarında ikinci bir haberci olarak geniş çapta hareket eder. Hidrojen peroksit, KAT ve GPx enzimleri tarafından suya detoksifiye edilir. O_2 radikali ve H_2O_2 konsantrasyonlarındaki bir dengesizlik çok daha tehlikeli hidroksil iyonunun (OH^- radikali) oluşumuna neden olabileceğinden, antioksidan enzimlerin birlikte hareket etmesi önemlidir. Bu reaksiyon, Fenton reaksiyonunda serbest demir iyonları tarafından katalize edilir. Hidroksil iyonunun tahmini ömrü 10^{-9} saniyedir ve hemen yakınındaki herhangi bir biyolojik molekülle difüzyonla sınırlı bir şekilde reaksiyona girer. Çok reaktif olduğu için, OH^- radikalinin bilinen bir süpürücüsü yoktur.⁹⁹

2.5.2. Antioksidan Sistemi

Antioksidan sistem, enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sisteminin oksidan saldırısını engeller. Enzimatik savunmaların hepsinin çekirdeğinde, detoksifikasyon işlemi sırasında elektronları aktarırken farklı değerler alabilen bir geçiş metali vardır. SOD'un iki izoformu, O_2 radikalini H_2O_2 , mitokondri ile sınırlı manganez formuna ve sitozolde bulunan bakır ve çinko formuna dönüştürür. H_2O_2 daha sonra, tetramerik bir selenoprotein olan KAT veya GPx hareketleriyle suya parçalanır. Enzimatik olmayan

savunmalar arasında askorbat (C vitamini) ve a-tokoferol (E vitamini) bulunur. Seruloplazmin ve transferrin ayrıca serbest demir iyonlarını tutup, böylece Fenton reaksiyonunu ve OH⁻ radikali üretimini inhibe ederek önemli roller oynar.¹⁰⁰

2.5.2.1. Enzim Yapısında Olan Antioksidanlar

GPx, hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumludur. Molekül ağırlıkları 85000 daltondur. Genellikle H₂O₂'in redüksiyonu ile meydana gelen GSSG, glutatyon reduktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür. SOD, iki süperoksid radikali hidrojen perokside dönüştürmektedir. SOD'un sitozolik ve mitokondriyal olmak üzere iki formu vardır. KAT, dört adet hem grubuna sahip hemoproteindir. KAT, H₂O₂'i oksijen ve H₂O'ya ayırmaktadır. Bunların yanı sıra Glutatyon-S-Transferanslar (GST) ve Mitokondriyal Sitokrom Oksidazlar'da bulunmaktadır. GST sitozolde bulunan yabancı maddelerin biyotransformasyonunda çok önemli rolleri vardır. Mitokondriyal sitokrom oksidazlar ise solunum zincirinin en son enzimi görevini yaparak buradaki reaksiyonları katalize eder.¹⁰¹

2.5.2.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

GSH glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan birçok önemli fonksiyona sahip düşük molekül ağırlığında bir tripeptittir. Birçok organizmada bulunan GSH sitozolde bulunur ve en çoğunda tiyoldur. GSH hücrelerde ROS temizleyici olarak görev yaptığından güçlü bir antioksidandır. Genellikle detoksifikasyon reaksiyonlarında GST için kofaktör ve ayrıca gamaglutamil transpeptidazlar için substrat olma özelliğine sahiptir. Bunun yanında askorbik asit (vitamin C), E vitamini, karotenoidler, MEL ve çeşitli flavonoidler de enzim yapısında olmayan antioksidanlar sınıfında yer almaktadırlar.¹⁰¹

2.5.3. Lipid Peroksidasyon

Lipid peroksidasyonu redoks homeostasisindeki bozulmalar, ROS'un aşırı üretimi veya hücrel yanıt olarak azaltma kabiliyetinin kaybı nedeniyle oksitleyici moleküllerin birikmesinden kaynaklanır. Her iki durumda da, biriken oksitleyici maddeler DNA'yı, proteinleri ve lipidleri oksitleyebilir, böylece yapılarını, aktivitelerini ve fiziksel özelliklerini değiştirebilirler.

Lipitler, hücrel yapıyı koruyan ve hücrelerin işlevini kontrol eden hücre zarlarının temel bileşenleridir. Oksijen serbest radikalleri gibi ROS saldırısının birincil hedefleridir ve lipidin oksidasyonu çeşitli patolojik durumlarla ilişkilidir. Lipitler, hücrel zarların bütünlüğünün korunmasından sorumlu olduklarından, lipidlerin yoğun peroksidasyonu, lipid zarların birleşimini, yapısını ve dinamiklerini değiştirir. Oldukça reaktif bileşikler olarak, lipid peroksitler ayrıca daha fazla ROS'u arttırabilirler.¹⁰² Lipid peroksidasyonu, lipidlerin parçalanması ile konjuge dienler ve lipid hidroperoksitler gibi çok çeşitli birincil oksidasyon ürünlerinin oluşumuna neden olur. Ayrıca malondialdehit (MDA), F2-izoprostan gibi ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşmasına da yol açar.^{101, 102}

ACR toksisitesi hem deney hayvanlarında hem de insanlarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Serbest radikallerin ve ROS'un üretimi ve uzaklaştırılması arasındaki dengesizlik, bazı nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynayan oksidatif stres artırır. Ayrıca ACR ile indüklenen nörotoksisite çalışmalarında, sinir sisteminde lipid peroksidasyonunu indüklediği ve antioksidan kapasiteyi düşürdüğü bildirilmiştir. Bu nedenle oksidatif stres, ACR ile indüklenen toksisitede önemli rol oynar. ACR'nin in vitro nörotoksisite modellerinde de ROS üretimini indüklediği gösterilmiştir.¹⁰³⁻¹⁰⁵

2.5.4. 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG)

Genetik materyalin moleküler yapısında meydana gelen her türlü değişikliklere DNA hasarı adı verilmektedir. Bu DNA hasarı ya endojen ya da ekzojen kaynaklı

gelişebilmektedir. Bu yüzden DNA sürekli çevresel olarak bir tehdit altındadır. Hücresel yaşam döngüsünde meydana gelen mutasyonlar, yaşlanma ve kanser gibi etkiler hücre ölümlerine neden olmaktadır. Özellikle ROS'tan kaynaklı DNA hasarında oluşmaktadır. ROS kaynaklı 20'den fazla bazın hasarı sonucu DNA hasarı oluşmaktadır. Bu bazların en önemlisi 8-OHdG, oldukça hassas ve oksidatif stres artışı sonucu paralel olarak artan ve yarılanma ömrü oldukça kısa olan oksidatif DNA hasarı parametresidir. Guanin bazı DNA bazları içerisinde yapısal olarak zayıf ve oksidasyona eğilimli baz tipidir. 8-OHdG, DNA yapısında ROS'un oluşturduğu 20'den fazla oksidatif baz hasarlanma ürünlerinden bir tanesi olup; guanine ait sekizinci karbon atomuna bağlı hidroksil radikalının yaptığı indüksayonlar sonucu meydana gelen oksidatif DNA hasarının en önemli belirteçlerindendir. Hidroksil radikeli ile reaksiyona girerek DNA ürün radikali olan 8-OHdG'e okside olmaktadır. DNA replikasyonları meydana geldiğinde baz değişimleri sırasında mutasyon olasılığını arttırmaktadır.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Bu yüzden DNA'da meydana gelen hasarın belirlenmesinde en çok çalışılan yöntemlerden biri olmuştur. Çeşitli kimyasal maddelerin 8-OHdG seviyelerinde artışa neden olduğu da bilinmektedir. Etil alkol, asbest, sigara ve kadmiyum gibi maddelerinde deneysel olarak uygulanması 8-OHdG düzeyinde artışa neden olmaktadır.¹¹⁰

2.6. Nöroinflamasyon ve Neuronal Nitrik Oksit Sentaz

Mikroglialar, bir organizmanın savunmasında ve doku onarımında kritik bir rol oynayan yerleşik beyin makrofajlarıdır. Beyin inflamasyonunda ve inflamasyonlu nörodejeneratif hastalıklarda anahtar hücrelerdir. Nöroinflamasyon, multipl skleroz, alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı ve narkolepsi gibi birçok nörodejeneratif hastalığın önemli bir özelliğidir. Nöroinflamasyonun ilk belirtisi mikroglia aktivasyonudur. Mikroglia patojenler, doku hasarı, anormal stimülasyon, nörotoksinler, enfeksiyon veya yaralanma varlığında aktive olurlar. Bu durumda, sağlıklı nöronlara

fiziksel olarak, fagositoz yoluyla veya salgılanan apoptoz faktörleri yoluyla bile saldırabilirler. Aktive olduktan sonra mikroglialar toplanır, çoğalır, göç ederler. İnterleukin 1-beta (IL-1 β), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), siklooksijenaz-1 (COX-1), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve ROS potansiyel olarak nöronal disfonksiyona, hücre ölümlerine neden olan nörotoksik bileşikler gibi çeşitli oksidanları indüklemektedir. Aktive olmuş bir mikroglia hücresi nöronları öldürebilir (nörodejeneratif rol), aynı zamanda patojenleride öldürebilir veya ortadan kaldırabilir (nöroprotektif rol). Tüm ökaryotik hücrelerde enfeksiyonlar, enflamatuar sitokinler ve çoklu stres durumları dahil olmak üzere hücre dışı sinyallerin çoğu nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'yi aktive edebilir. NF- κ B, inflamasyon, apoptoz, immünite, hücre sağkalımı ve kanser dahil olmak üzere birçok süreci kontrol eder. İmmün ve inflammatuar yanıt genlerinin indüklenebilir ekspresyonunu düzenler. Nöronlarda NF- κ B'nin aktivasyonu, hücrelerin hayatta kalmasını desteklemektedir. Öte yandan, glial hücreleride NF- κ B aktivasyonu ve nörodejeneratif olan inflammatuar süreçlerde önemli bir rol oynar.¹¹¹

Aynı hücrede bulunan bir sitokin, hem poliferasyonu sağlayabilirken hemde hücrenin ölüm yollarını ve hayatta kalma sinyallerini verebilir. Mikroglialar TNF- α sinyalleşmesi ve bunun hem inflamasyon hemde apoptozisin düzenlenmesi ile ilişkilidir. Hipokampal nöron apoptozunun derecesinin TNF- α mRNA seviyeleri ile ilişkili olduğu ve apoptotik yolların başlaması için TNF- α konsantrasyonu için bir eşik gerekmesi ihtimali olduğu bilinmektedir. Nöronal hasar oluştuğunda IL-1 β ve TNF- α seviyelerinde bir artışa neden olmaktadır. Başlangıçta inflamasyon genellikle TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflammatuar sitokinler ve ayrıca adezyon moleküllerinin salınmasıyla başlamaktadır. Buda kan beyin bariyerinde bozulma ile adezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenleme ve nitro oksit (NO) gibi toksik maddelerin difüzyonunu arttırabilmektedir. TNF- α , hücre içi bir ölüm kaskadını tanımlayan homolog bir

sitoplazmik sekans içeren reseptörlerin aktivasyonu yoluyla apoptozu indükleyebilen çok potansiyelli, enflamatuar bir sitokindir. IL-1 β için ise IL-1 β reseptörü olan IL-1R1 aracılık etmektedir. TNFR1 aktivasyonu, moleküler bir mekanizma sağlayarak, kaspaz 3 (Cas-3) aracılı bir yolla nöronların hızlı apoptozuna neden olabilir. Nöronal ölümde yer alan apoptozun membran reseptör mekanizmaları, ER stresi yolları, NF- κ B ve kaspazlar gibi hücre içi ölüm sinyali komplekslerini içeren kompleks bir mekanizmaya sahiptir. Beyindeki protein yükünün homeostatik dengesini korumak ve nörodejenerasyon gelişimini önlemek için fagositoz ve anormal veya fazla proteinlerin temizlenmesi için etkili, aktif bir işlem gereklidir. Birçok proapoptotik yolla, nöroinflamasyon sırasında aşırı miktarda üretilen sinyal molekülleri aracılık eder, bu da nöroinflamasyonun nöronal apoptozu doğrudan etkileyebileceğini ve mikrogliaı etkinleştirebileceğini düşündürür.¹¹²⁻¹¹⁵

Serbest gaz halindeki bir sinyal molekülü olan nirtik oksit (NO), sinir ve bağışıklık sistemini düzenler. NO öncü L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından sentezlenmektedir. NOS'un üç izoformu vardır; NO üretimini açıklayan NOS, yani nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) dır. Nöroinflamasyonun, nöronal apoptozu doğrudan etkilemesinin başka bir yolu da NO reaksiyonunu katalize eden iNOS tarafından indüklenmesidir. Artan NO seviyeleri alzheimer, parkinson ve ALS dâhil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklara neden olan proteinlerin nitrasyonu sonucu gelişebilmektedir. Patolojik koşullar altında ve nörotoksik ajanlara maruz kaldıktan sonra, artan miktarlarda süperoksit anyonu ve NO görülebilir. Bu da beyinde nitroksidatif strese neden olur. NO ve süperoksit anyonun bir arada bulunması, nöronal hücre ölümünün daha fazla gerçekleştiği ve sitotoksik ajanların buna neden olduğu bilinmektedir.¹¹⁶⁻¹¹⁸

2.7. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Nöronal Apoptozis

2.7.1. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER) hücrede bulunan, ağ benzeri bir yapıya sahip, tüpler, veziküller ve sisternalardan oluşmuş bir organeldir. Bu organelin çeşitli fonksiyonları vardır. Membran proteinlerinin veya bir membran içinden geçerek salgılanacak olan proteinlerin çevrimi yani işlenmesi, katlanması ve taşınması gibi; kalsiyum, bazı lipid ve makromoleküllerin depolanması şeklinde çok önemli görevleri vardır. Keith R. Porter, Albert Claude ve Ernest F. Fullam tarafından 1945 yılında elektron mikroskobu ile yaptıkları çalışmalarda hücrenin sitoplazmasında dantel görünümünde bir ağ yapısına sahip olduğunu saptamışlardır. Bu yapının hücrede ektoplazmada gözükmediğinden dolayı buna araştırmacılar ER adını vermişlerdir. ER üzerinde taşıdıkları ribozom yapılarına göre isimlendirilmektedir. Ribozom taşıyan ER'ye granüllü ER, ribozom taşımayan ER ise granülsüz ER adı verilmektedir.¹¹⁹

Hücre çekirdeğinden gelen genetik şifre ile ER üzerinde bulunan ribozomlarda üretilen proteinler sentezlendikten sonra birçok amaç için kullanılırlar. Proteinler ribozomlarda sentezlendikten sonra fonksiyon kazanabilmeleri için ER'da üç boyutlu yapılara katlanması gerekmektedir. Fakat hücre içerisinde yeni sentezlenen proteinler potansiyel olarak toksik olabilecek anormal katlanma ve agregasyon riski taşımaktadırlar. Bu yanlış katlanmayı önlemek ve agregasyonu azaltmak için çeşitli mekanizmalar geliştirilmiştir. ER'da bulunan şaperonların artışı ve üç sinyal yolağının aktivasyonu yoluyla yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler ortadan kaldırılmaya çalışılır. Eğer bu önlenemezse ER'da stres meydana gelerek bu şaperonlar yardımıyla hücre apoptozise götürülür. Bu şekilde sürekli bir denetim mekanizması ile protein homeostasisi sağlanmaya çalışılmaktadır.¹²⁰

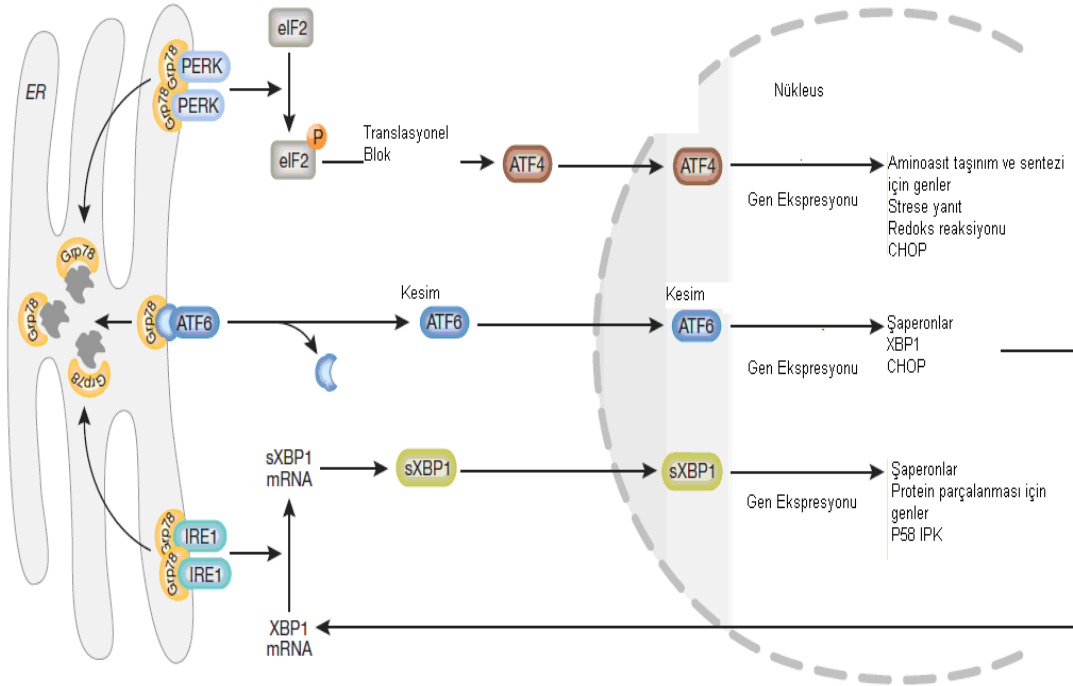
Optimum protein katlanması için ATP, Ca^{2+} ve disülfid bağı oluşumuna izin veren oksitleyici bir ortam dahil olmak üzere çeşitli faktörler gereklidir. Bu özel ortamın bir sonucu olarak, ER hücresel enerji seviyelerini, redoks durumunu veya Ca^{2+} konsantrasyonunu bozan streslere karşı oldukça hassastır. Bu tür stresler, ER stresi olarak adlandırılan katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olurlar. Bu nedenle ER'nin protein katlama kapasitesinde bir azalma meydana gelir. Protein agregasyonu hücreler için toksiktir ve sonuç olarak iskemi, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet dahil olmak üzere çok sayıda patofizyolojik durum ER stresi ile ilişkilidir.¹²¹

ER stresinin zararlı etkilerini azaltmak için UPR olarak adlandırılan bir mekanizma aktifleşmektedir. Bu uyumlu ve karmaşık hücresel tepkiye, üç ER transmembran reseptörü aracılık eder: PERK, ATF6 ve IRE1' dir. Normal hücrelerde, üç ER stres reseptörü, ER şaperonu GRP78 aracılığıyla aktif olmayan bir durumda tutulur. Katlanmamış proteinlerin birikmesi üzerine, GRP78 bu reseptörlerden ayrılarak aktivasyonlarına yol açar ve UPR aktif hale gelir. Şekil 2.6.' da¹²² görüldüğü gibi UPR, katlanmamış proteinlerin birikimini azaltmak ve normal ER işleyişini eski haline getirmek için hayatta kalma yanlısı bir süreci başlatır.²³ Bununla birlikte UPR, ER'de aşırı katlanmamış protein birikimini çözemezse, bu üç sinyal yolağından ER şaperonlarının ekspresyonunda artışa neden olarak hücrede inflamasyon ve apoptotik yolları etkinleştirir.²⁵ UPR oluşturmada önemli bir sinyal yolu olan PERK-eIF2 α yolağının CHOP ekspresyonunu arttırması hem in-vitro hem de in-vivo nöronal apoptotik hücre ölümünde önemli bir rol oynamaktadır.²⁶ Ayrıca IRE1 yolağından JNK'nın aktivasyonu ile inflamasyon uyarılmakta ve ATF6 yolağından ise CHOP aracılı apoptozisin uyarıldığı bilinmektedir.²⁷

2.7.1.1. PERK Sinyal Yolağı

GRP78'in PERK'ten ayrılması, kinazın dimerizasyonu ve otofosforilasyon yoluyla aktif PERK meydana gelir. Aktive edildiğinde, PERK ökaryotik translasyon başlatma faktörü olan eIF2 α 'yı fosforile ederek inaktif hale getirir. Fosforilasyon olduktan sonra eIF2 α protein translasyonunun inhibisyonuna yol açar. Protein translasyonunun inhibisyonu, ER'ye gelen yeni oluşan proteinlerin yükünü azaltarak hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur. Aslında PERK knockout fare embriyonik fibroblastları, ER stresini indükleyen ajanlar ile yapılan çalışmalarda, protein translasyonunun bloke edilmediği ve hücre ölümlerinde artışın gözlemlendiği bildirilmiştir.¹²³

Bununla birlikte, bazı mRNA'lar, aktive transkripsiyon faktörünü (ATF4) kodlayan mRNA'ların aktivasyonuna neden olur. ATF4 proteini, UPR'de yer alan birkaç genin promotörlerini düzenleyen bir transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir. ATF4, amino asit metabolizmasında, redoks reaksiyonlarında, stres tepkisinde ve protein salgılanmasında yer alan genleri indükleyerek hücrelerin hayatta kalmasını destekler. Bununla birlikte, ATF4 tarafından indüklenen genlerin tümü antiapoptotik değildir. Şekil 2.6.'da görüldüğü gibi indüksiyonu ATF4'e güçlü bir şekilde bağlı olan CHOP'un apoptotik hücre ölümünü desteklediği iyi bilinmektedir. Sonuç olarak, PERK'in aktivasyonu başlangıçta koruyucudur ve hafif stres sırasında bile hayatta kalmak için çok önemlidir. Bununla birlikte, PERK'in aktivasyonu, hayatta kalma yanlısı sinyalden ölüm yanlısı sinyalemeye geçişin önemli bir unsuru olan CHOP'un indüklenmesine de yol açar.¹²⁴



Şekil 2.6. Endoplazmik retikulum stresi ve UPR yanıtı

2.7.1.2. ATF6 Sinyal Yolağı

ATF6 bazı proteinlere bağlanabilen ER’da sitozolik domainli tip II transmembran proteinidir. GRP78, ER membranından inaktif durumda tuttuğu üç sinyal yolağını stres durumunda aktifleştirmek için ayrılır. GRP78’in serbest bırakılması, ATF6’yı oligomerize etmek yerine golgi aygıtına yer değiştirmesi için serbest bırakır. Golgiye geçen ATF6 burada yerleşik proteazlar (site-1 ve site-2) tarafından bir jukstamembran bölgesinde böler, sonra bu transkripsiyon faktörünü sitozole bırakır. Bazı genlerin translasyonunu düzenlemek, bazı şaperonları aktifleştirmek için hücre çekirdeğine geçişi sağlanır. Çekirdeğe geçen ATF6 daha sonra promotörlerinde bir ER stres yanıt elemanı (ERSE) bulunan genleri indükler. Bu genler GRP78, GRP94, protein disülfid izomeras gibi ER şaperon proteinleri, CHOP ve X-box-binding protein (XBP1) de ATF6 tarafından çekirdekte indüklenir.^{125, 126}

2.7.1.3. IRE1 Sinyal Yolağı

IRE1, GRP78 tarafından aktif hale getirildiğinde ER membranında benzer şekilde oligomerize olur. IRE1, hem serin treonin kinaz hem de bir endoribonükleaz alanı içeren tip I transmembran proteinidir. IRE1 aktif hale geldikten sonra XBP1 mRNA'sından 26 nükleotidlik bir intronu uzaklaştırarak onu transkripsiyon faktörü olan bir proteini üretmek üzere aktif hale getirir. Oluşturulan bu çerçeve kaydırma ekleme varyantı formu (spliced XBP1) sXBP1'dir.¹²⁷ sXBP1 kararlı aktif bir transkripsiyon faktörüdür. sXBP1, ER şaperonları, heat shock protein 40 (HSP40) ailesi ve bunun bir üyesi olan p58IPK da dahil olmak üzere çeşitli hedeflere sahiptir. P58IPK, PERK'i bağlayarak inhibe eder, böylece PERK aracılı translasyonel bloğu durdurulmuş olur. Bu noktada, UPR başarılı olmuşsa, ER normal işleyişine döner ve hücre hayatta kalır; bununla birlikte, stres devam ederse, P58IPK tarafından translasyon bloğunun hafifletilmesi, proapoptotik proteinlerin sentezine izin verebilir. Bunun sonucunda da ATF4'ün ve CHOP'un artışı ile apoptotik süreç başlatılabilir.¹²⁸ IRE1-XBP1 yolağının, ER şaperonlarının ve P58IPK'nin indüklenmesi yoluyla hayatta kalma yanlısı etkilere sahip gibi görünmesine rağmen, apoptotik hücre ölümü ile sonuçlandığı gösterilmiştir.¹²⁹

Ayrıca PERK ve ATF6 aracılı yollar, IRE1'in aktivasyonundan önce stresi çözmeye çalışır. Bir kez etkinleştirildiğinde, IRE1 başlangıçta XBP1'i birleştirerek UPR'ye yardım eder, ancak nihayetinde P58IPK'yi indükleyerek translasyon inhibisyonunu hafifleterek onu sonlandırır. Bu noktada, ya hücre normal işlevine döner ya da stres devam ederse, IRE1, ASK1 ve JNK yolları ile farklı bir yoldan apoptozu indükler.^{130, 131}

2.7.1.4. CHOP Aktivasyonu

Büyümeyi durdurma ve DNA hasarı ile indüklenebilir gen 153 (GADD153) olarak da bilinen CHOP, başlangıçta DNA hasarına tepki olarak tanımlanmıştır. CHOP

indüksiyonu muhtemelen ER stres koşullarına en duyarlı olanıdır. CHOP ekspresyonunda bir artışın apoptozise neden olduğu bilinmektedir. CHOP' un dinlenme durumundaki hücrelerde ekspresyon seviyesi çok düşüktür. Fakat ER strsi durumlarında en yüksek seviyelerde indüklenebilen genler arasında yer almaktadır. ER stres sırasında, UPR'nin üç yolağından da CHOP transkripsiyonu indüklenebilir. Bununla birlikte, CHOP protein ekspresyonunun artışını regüle etmek için UPR'nin PERK–eIF2 α –ATF4 yolağı esastır. CHOP, transkripsiyon ve translasyon düzeyinde aktivitesini artıran inflamasyon ve oksidatif stres yolaklarında mevcuttur.¹³²

Bu nedenle, uzun süreli stres sırasında, PERK ve IRE1 yolları CHOP üzerinde birleşebilir ve muhtemelen birbirlerinin etkisini artırabilir. CHOP ile indüklenen apoptoz mekanizmasını inceleyen çalışmalar Bcl-2, ER oksidoredüktin 1 (ERO1 α) ve Tribbles ile ilgili protein 3 (TRB3) dahil olmak üzere çok sayıda hedef gen tanımlanmıştır. CHOP esas olarak gen ekspresyonunu indüklese de Bcl-2, CHOP tarafından baskılanan bir gendir. Bu baskılama sonrası Bax indüklenmekte ve apoptozis süreci başlatılmaktadır.¹³³

2.7.2. Nöronal Apoptozis

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, önemli bir doku homeostasisi olan ve normal organ involüsyonu, immün yanıt ve embriyogenez dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde ortak olan fizyolojik hücre ölümünün oldukça organize ve düzenlenmiş bir şeklidir. Apoptozis, nekrotik hücre ölümlerinden farklı olarak morfolojik nükleer değişikliklerle karakterize edilebilir. Apoptoz, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, zar kabarması ve makrofajlar tarafından hızla fago-sitoza uğrayan apoptotik cisimlerin oluşumu ile aktif, yüksek düzeyde düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir. Nekroz tipik olarak, erken evrelerde hücre içi organellerin kromatin kümelenmesi, şişmesi ve sonraki evrelerde hücre organellerinin ve zarlarının parçalanması ile karakterize edilen fizyolojik olmayan, düzenlenmemiş hücre ölümünün

patolojik bir şeklidir. Özellikle, nekroz sırasında, dış hücresel membran bozulur ve hücre içi bileşenler, hücreler arası boşluğa salınır, bu da bir inflamatuvar yanıtla sonuçlanır. Ayrıca kaspaz kaskadları aktive edilmez ve apoptozun morfolojik özellikleri yoktur. Merkezi sinir sisteminde nöronal apoptozis, nörogenezin ayrılmaz bir parçası olan fizyolojik bir süreçtir ve anormal apoptozis, nörodejenerasyonun patogenezinde rol oynar. Apoptotik kontrolün kaybının hastalık patogenezinin temelini oluşturabileceğinin kabul edilmesi, apoptoz düzenlemesi veya indüksiyon alanlarında çok fazla araştırmayı teşvik etmiştir. Hücresel apoptoz, ekstrinsik ve intrinsik sinyaller tarafından tetiklenen kompleks bir süreçtir. Ekstrinsik yol, ligandların bağlanması üzerine bir ölüm reseptörünün aktivasyonunu, proteinlerin karışması ve bir dizi protein-protein etkileşimleri yoluyla sinyalleşmesini içerir. İntrinsik yol mitokondriyi ve proapoptotik faktörlerin sitozole salınmasını ve ardından kaspazlarının aktivasyonunu içeren kompleks bir süreçtir.¹³⁴

Düşük seviyelerde ROS hücre sinyalleşmesine katılırken, yüksek ROS konsantrasyonları proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın oksidasyonu nedeniyle zararlıdır. Aynı zamanda kalıcı ROS üretimi, hücresel antioksidan savunma sistemlerini tehlikeye atarak oksidatif stres ve apoptoz ile sonuçlanır. ROS, mitokondriyal ve ölüm reseptörü yolları aracılığıyla apoptosisi başlatabilir. ROS mitokondriyal proapoptotik proteinlerin yeniden salınımını ve Cas-3'ün aktivasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Hücresel redoks durumunun, nöronal hücre apoptozisine aracılık etmede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.¹³⁵ ROS sinyalinin sitokin kaynaklı apoptoza aracılık ettiği de bilinmektedir. TNF, makrofajlar tarafından üretilen proinflamatuvar bir sitokindir, apoptozda ve nörodejeneratif bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde en çok çalışılan sitokindir. TNF'in reseptörüne bağlanması, ROS'un aracılık ettiği bildirilen NF-KB ve JNK sinyalleşme yollarını aktive eder. Bu sinyal

yolları daha sonra alt birimlerdeki proteinleri ve molekülleri aktifleştirerek kaspaz üyelerini harekete geçirmektedir. Hem oksidatif strese hemde inflamasyonda bu durum geri dönülmez apoptozis sürecinin başlatılmasına neden olacaktır.¹³⁶

Bcl-2 protein ailesinin üyeleri (Bcl-2, Bax, Bak), apoptotik hücre ölümünün önemli düzenleyicileridir. Mitokondriyal yolak ile apoptoziste olduğu gibi ER stresi sonucu CHOP tarafından indüklenen apoptoziste Bcl-2 proteini tarafından düzenlenmektedir. ER stresi tarafından indüklenen apoptoziste Bcl-2 proteinlerinin rolleri açık olmasına rağmen, ER stresinin nasıl düzenlediği daha az bilinmektedir. Bax ve Bak proteinleride ER stresi aracılı apoptoziste çok önemlidir. Bu proteinler proapoptotik faktörlerin salınımına neden olmakta ve ayrıca Ca^{2+} homeostasisini düzenlemektedirler.¹³³

ER stresi meydana geldiği zaman sinyal yolları aktifleştikten sonra CHOP indüksiyonu ile beraber ilk olarak Bax ve Bak ER membranında konformasyonel olarak değişikliklere maruz kalmaktadır. Bu değişiklik sonuçta ER'den sitoplazmaya Ca^{2+} akışına yol açmaktadır. Sitozolde kalsiyum artışı ile beraber kalpainler aktive olmakta ve kalpainlerde prokaspaz-12'yi keserek aktive etmektedir. Aktif kaspaz 12 ise prokaspaz 9'u aktifleştirerek böylece kaspaz kaskadları aktive olarak geri dönüşümsüz apoptozis süreci başlamaktadır. İkinci olarak da sitozolde bulunan kalsiyumu mitokondrinin almasıdır. Mitokondriyal membranda depolarizasyon oluşarak sitokrom C salınımına yol açmaktadır. Sitokrom C'de kaspaz 9 aktivasyonu ile kaskadları aktive ederek apoptozisi başlatmaktadır.^{137, 138}

Apoptoziste önemli bir role sahip kaspaz ailesi ER'ye bağlantılı bir sistein proteaz ailesi üyesidirler. Bulundukları hücrelerde inaktif form olarak ve apoptozisin indüklenmesinden sonra aktif forma dönüşerek görev alırlar. Kaspazlar 12, 9, 8, 7, 6 ve 3 şeklide türlerinin işlevleri özellikle apoptoziste ve ER stresi ile ilgili çalışmalarda da

gösterilmiştir. Kaspaz 12 ER stresinde apoptozisin indüklenmesinde anahtar rol oynayan mediatörüdür. Bu kaspazın aktivasyonu ER stres aracılı apoptozisin oluşmasına neden olmaktadır.^{137, 138}

2.8. Melatonin (MEL)

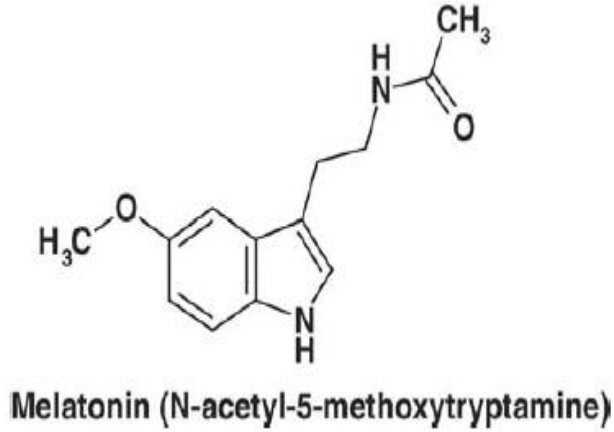
Endokrin sistem, fizyolojik ve davranışsal süreçlerdeki günlük ve mevsimsel ritimleri, biyolojik işlevlerin günün veya yılın belirli bir zamanında gerçekleşmesini sağlayan tüm canlı organizmaların temel bir özelliğidir. Bunun en bariz örneği, birçok hayvanın yalnızca gün ışığı saatlerinde veya karanlık saatlerde aktif olmaları ve günün diğer saatlerinde aktif olmamasıdır. Hibernasyon, kürk rengi değişiklikleri ve göç gibi diğer ritimler de örnek olarak verilebilir. Bu ritmik mekanizmanın çalışma prensibi;

- 1) Çevresel ışık ipuçlarını kaydeden ve ileten fotoreseptörler
- 2) Yaklaşık 24 saatlik ritimler oluşturan ve özellikle aydınlık-karanlık döngüsü tarafından tam olarak 24 saate sürüklenebilen “saatler”
- 3) Bu 24 saatlik döngüden sinyalleri alan ve bunları bir hormonal veya nöro hormonal tepkiye çeviren endokrin ve nöroendokrin efektörlerdir.¹³⁹

Pineal bez, uyku uyanıklık ritimlerini, mevsimsel fonksiyonları kapsayan serotonin türevli MEL hormonunun üretildiği yerdir. Bu bez 3. ventrikülün arka üst bölgesinden gelişir ve pineal sapı ile bu bölgeye bağlı kalmaktadır. Çok küçük yapısı olmasına rağmen oldukça fazla kan alan pineal bezin venöz dolaşımı internal cerebral venler tarafından sağlanır. Pineal bezin hormon salgısı yapan ana hücreleri pinelosit hücreleridir. Bu hücreler çok fazla miktarda sinaptik cisimcik taşımaktadır. Pinelositlerden salgılanan MEL hormonu sistemik kan dolaşımına veya serebrospinal dolaşıma salgılanarak etkisini göstermektedir.¹⁴⁰ MEL, başlangıçta kurbağa ve balık melanositleri üzerinde etkili olan bir cilt aydınlatıcı molekül olarak keşfedilmiştir.⁴⁴ Daha sonra, MEL'in tüm omurgalılarda mevcut olduğu, pineal bez tarafından ritmik olarak

salgılandığı, sirkadiyen ve mevsimsel ritimlerin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir.⁴⁵ MEL'in birçok omurgalı dokusunda sentezlendiği ve bakterilerden, protozoalardan bitkilere, mantarlardan ve omurgasızlara kadar hemen hemen her yerde bulunduğu bilinmektedir.⁴⁶

Pineal bezde MEL sentezi, karanlık bilgisi retinadaki fotoreseptörler tarafından algılanıp retinohipotalamik yolla hipotalamusta bulunan supraşizmatik çekirdeğe iletilir. Burada oluşan impluslar paraventriküler çekirdeğe geçtikten sonra medial ön beyin sapı ile retiküler formasyonda birleşerek omurilikte ki intermediolateral çekirdeğe gelir. Sempatik sistemin etkisi ile süperior servikal gangliyonuna implus geçer. Buradan da son olarak sempatik sinirler ile implus pineal beze bilgi ulaştırır. Sempatik sinirler pinelosit hücrelerinin terminallerinde ritmik olarak değişen ışığa göre norepinefrin salgırlar. Daha sonra norepinefrin beta adrenarjik reseptörleri vasıtasıyla sıklık nükleotid sistemini uyarır. MEL sentezi için gerekli aminositlerden olan triptofan, pineal bez tarafından plazmadan alınır ve pinelositlerde hidroksilllenerek 5-hidroksitriptofanı oluşturur. 5- hidroksitriptofan, 5-hidroksitriptofan dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybederek 5-hidroksitriptamine yani seratonine dönüştürür. Seratonin kan beyin bariyerini geçemediği için N-asetiltransferaz enzimi aracılığıyla N-asetilseratonine dönüştürülür. N-asetilseratonine hidroksiindol-o-metiltransferaz enzimi aracılığı ile N-asetil-5-metoksitriptamine (Şekil 2.7.¹⁴⁰) yani MEL'e dönüştürülür.¹⁴¹ Sempatik sistem aktivasyonu ile artan norepinefrin beta adrenerjik reseptörler aracılığı ile cAMP'yi indükler buda N asetil transferaz enzim aktivitesinde artışa neden olarak seratoninin MEL'e dönüşünü arttırmaktadır. Işık uyarısı oluştuğunda bu ipmluslar ortadan kalktığı için sempatik sistem baskılanmakta ve N asetil transferaz enzimi ile MEL düzeyi hızla azalmaktadır. ¹³⁹⁻¹⁴¹



Şekil 2.7. Melatoninin kimyasal yapısı

MEL fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için hücrelerde bulunan kendilerine özgü MT1 ve MT2 reseptörlerine bağlanmaları gerekmektedir.¹⁴² Hedef hücredeki spesifik reseptörlerine yüksek affinite ile bağlanan MEL, G protein ilişkili reseptörleri ve adenilat siklaz ile hücre içi sinyal yollarını aktive etmektedir. Bu reseptörler hipotalamusun supraşizmatik nükleusunda çok fazla bulunur. Hipokampus, retina ve çeşitli beyin bölgelerinde de bulunmaktadır. Bu reseptörler merkezi sinir sisteminin yanı sıra kan damarları, böbrek, mide ve bağırsak sistemi gibi tüm perifer dokularda bulunmaktadır.^{142, 143} MEL normal konsantrasyonlarda hücredeki reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterebilirken, daha yüksek seviyelerde MEL direk olarak hedefleri üzerinden etki gösterebilir. Hücre içerisinde önemli sinyal yollarından biri olan kalmodulin yolağı, MEL'in direkt hedeflerinden bir tanesidir. Bu şekilde MEL hücre içerisinde çok hızlı bir şekilde çekirdekte transkripsiyonel faktörleri aktifleştirebilmektedir.¹⁴⁴

MEL'in hormonal etkisi, reseptörleri ile etkileşimi sonrası ortaya çıkan etkilerdir. Bu etkiler antioksidatif etki, cAMP/PKA/CREB ve cGMP'de azalma, protein kinaz C (PKC), diaçilgliserol (DAG), inositol 3 fosfat (IP3) aktivitelerinde artma, potasyum ve kalsiyum kanallarının düzenlenmesidir. Bu hedefler genellikle hücre içi MEL sinyal

yolağına bağı hormonal etki şekilleridir.¹⁴⁵ MEL'in diğ etki ise sirkadiyen ritmin düzenlemesidir. İnsanlarda sirkadiyen ritmi düzenleyen en güçlü etkisine sahiptir. Bu etki ise supraşiyazmatik nükleus ve perifer dokulardaki; yağ-kas dokusu, pankreatik beta hücreleri gibi clock genlerle ilişkisidir.¹⁴⁶ MEL'in diğ önemli etki ise mevsimsel ritimleri düzenlemesidir. Gece ve gündüz değışimlerine bağı olarak yaz ve kış aylarında farklı ritimler görülebilmektedir. Mevsimsel senkranizasyon değışimlerinde pituiter pars tubularis üzerindeki etkileri ile mevsimsel etki göstermektedir. MEL bu etki ile enerji metabolizması, üreme, termogenezis, büyüme ve gelişme, immün cevap ve vücut ağırlığı gibi mevsimsel olayları kontrol edebilmektedir.^{145, 146}

Son yıllarda hem hayvanlarda hem de insanlarda yapılan morfolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar, vücudumuzdaki hücre ve dokularda dejeneratif değışikliklerin gelişmesinde oksidatif stresin birincil rol oynadığını göstermiştir. En yüksek derecede oksidatif hasar genellikle beyin, kalp ve iskelet kası gibi organlarda meydana gelmektedir. MEL düşük dozlarda antioksidatif etki gösterirken yüksek dozlarda, doza bağımlı olarak prooksidan etki gösterebilmektedir. MEL serbest radikalleri pirol halkalarından tutarak bunlarla etkileşerek aktivitelerini azaltmaktadır. Ayrıca antioksidanların yapımını indükleyerek etkisini göstermektedir. MEL'in hücrede oluşan tüm serbest radikalleri tutma ve süperoksit süpürücü özelliğı vardır. Böylece antioksidanları kodlayan genlerin ekspresyonunda artış gözlemlenirken serbest radikallerin artmasına neden olan genler ise baskılanmaktadır. MEL gibi metabolitleride oksidatif strese karşı oldukça koruyucu etkilere sahiptir. Aynı zamanda DNA hasarı sonucu gelişen 8-OHdG, MEL tarafından engellenmektedir. Oksidatif hasar sonucu gelişen ve hücrelerde serbest radikaller birikmesi sonucu oluşan lipid peroksidasyonu hücre membranlarında bozulmalara neden olmaktadır. Hasar sonucu hücrelerde sinyal iletimi ve sinyal yollarının aktivasyonları etkilenmekte ve çeşitli metabolik fonksiyonlar

etkisiz hale gelmektedir. MEL bu lipid peroksidasyonunu engelleyerek hücre hasarını en aza indirmektedir. MEL aynı zamanda nitrojenlerin neden olduğu radikalleride etkisiz hale getirerek oluşan nitrik oksidi engellemektedir.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

İnflamasyon doku hasarına karşı immun sistemin birçok sinyal yolağı ile verdiği cevaptır. Yapılan birçok çalışmada MEL inflamatuvar sitokinleri baskıladığı bildirilmiştir. MEL aynı zamanda antiinflamatuvar sitokin ekspresyonunu arttırırken, proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonlarınıda baskılamaktadır. Bu yüzden hücrelerde aşırı inflamasyonun gözükmesi engellenmiş olur ve bunun zararlı etkilerinden hücreyi korur.^{150, 151} MEL ve metabolitleri TNF- α ve IL-1 β , IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinleri doğrudan baskılamaktadır.¹⁵² MEL antinflamatuvar etkilerini NF-kB'nin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek, siklooksijenazı ve NOS gen ekspresyonunu baskılayarak göstermektedir.^{151, 153}

ER, lipid metabolizmasını, kalsiyum depolarını ve proteostazisi kontrol ederek bir dizi hücresel fonksiyona katılan dinamik bir organeldir. Stresli durumlarda, katlanmamış protein miktarı artar ve UPR aktivasyonu ile hücreleri stresten korumaya çalışır ve hücresel homeostasisin yeniden kurulmasına katkıda bulunur. ER stresörleri, duruma bağlı olarak, hücrenin hayatta kalmasını veya ölümünü indükleyen apoptozisi veya otofajiyi modüle edebilir. Oksidatif stres UPR aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır. MEL antioksidan özelliklerinden dolayı, UPR yanıtını da modüle edebilmektedir. Bu şekilde ER stresi üzerinde de koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir. MEL, ER stresi koşullarında artan şaperonların üzerine (GRP78, CHOP vb.) etkisi ile bu sinyal yollarının düzenlenmesi yoluyla apoptozis üzerinede dolaylı olarak etkili olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres, inflamasyon ve ER stresinin bağlantıları sonucu apoptozis mediatörleri üzerine (Bcl-2, Bax ve Cas-3 vb.) MEL güçlü koruyucu etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmanın tüm deneysel uygulamaları ve aşamaları Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Ayrıca lokomotor aktivite ölçümleri Atatürk Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 18.03.2020 tarih ve 36643897-000-E.2000086593 sayılı yazısında belirtilen Etik Kurul Raporunun 41 No'lu kararı ile sözkonusu doktora tez çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Doktora tez çalışması kapsamında ticari olarak alınan kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıkta olup Tablo 3.1'de verilmiştir.

Akrilamid $\geq$ 99% saflıkta Sigma-Aldrich'ten alınarak deneysel çalışmada nörotoksisitenin oluşmasında kullanıldı. MEL $\geq$ 99% saflıkta Alfa Aesar'den alınarak oluşan toksisiteye karşı koruyucu madde olarak verildi. Fosfat buffer (Sigma) pH 7.4 seviyelerinde standart bir şekilde doku homojenizasyonunda dokuların sulandırılmasında tampon olarak kullanıldı. Sevofluran (Sevorane %100 sıvı, Abbvie Laboratories, İstanbul, Türkiye) ise deneysel çalışmanın sonunda ratların beyin dokularının alınması için anestezi edilmesinde yararlanıldı. Ethanol, DEPC Treated Water, Isoamyl Alcohol, Trizol ve Kloroform Real Time PCR analizlerinde kullanıldı. Ayrıca biyokimyasal analizler için alınan kitler ise; tüm ELİSA kitleri SunRed Biyoteknoloji rat uyumlu olarak alındı. PCR analizleri için ise Applied ve Qiagen kitleri alınarak çalışıldı. Kullanılan antibody'ler Abcam'den alınarak incelemeler yapıldı.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözücüler

Kimyasalın Adı	Menşei	Kimyasalın Adı	Menşei
Akrilamid	Sigma	DEPC Treated Water	İnvitrogen
Melatonin	Alfa Aesar	Isoamyl Alcohol	Merck
Fosfat buffer	Sigma	Trizol	Omegabiotek
Ethanol	ISOLAB	Kloroform	Merck

3.2. Deney Hayvanları ve Gruplarının Oluşturulması

Deney hayvanları Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Ratlar, çalışma zamanına kadar yaklaşık olarak 25°C'lik oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü ayarlanabilen ve havalandırması mevcut bir ortamda muhafaza edilerek ad-libitum olarak beslendi. Kısacası tüm hayvanlar standart bakım ve besleme şartlarında kafeslerde tutuldu. Her bir grupta 10 erkek rat kullanıldı ve 5 deney grubu oluşturuldu. Toplamda 220-250 g ağırlığında 12 haftalık yetişkin Sprague Dawley cinsi 50 adet erkek rat kullanıldı. Deneysel gruplara, ACR (50 mg/kg^{75, 158, 159}, intraperitoneal (i.p.), 14 gün) ve MEL'in iki farklı dozu (10 ve 20 mg/kg, i.p, 14 gün)^{160, 161} uygulandı. Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu;

Tablo 3.2. Deney grupları ve gruplardaki hayvan sayıları

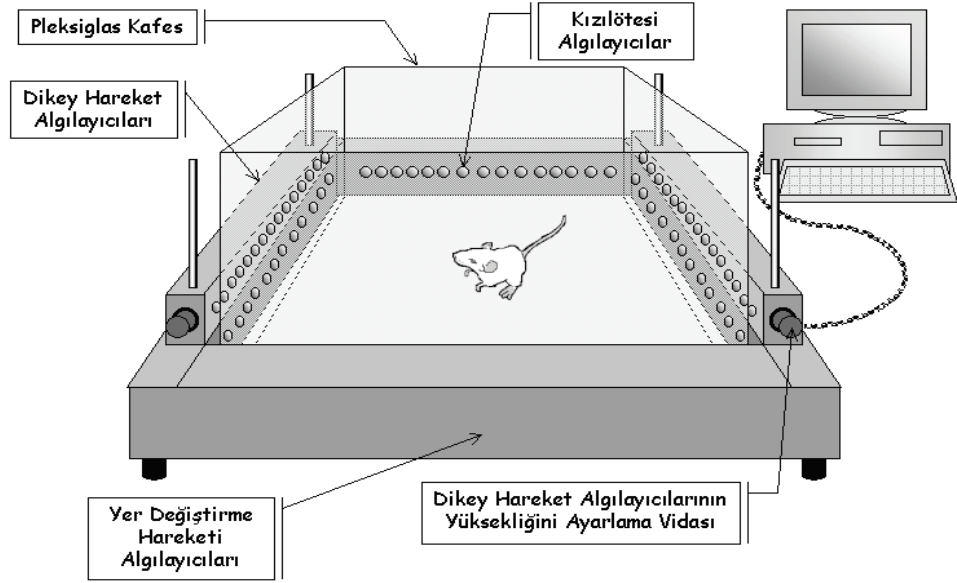
Grup Sayısı	Grup İsimleri	Hayvan Sayıları
Grup 1	Kontrol	10
Grup 2	ACR50	10
Grup 3	MEL10 + ACR	10
Grup 4	MEL20 + ACR	10
Grup 5	MEL20	10

3.3. Deney Gruplarında ACR ve MEL Uygulaması

Grup 1'e 14 gün boyunca i.p. 1 ml salin ve Grup 2'ye 14 gün boyunca ACR (50 mg/kg, i.p.) uygulanadı. Grup 3 ve 4'e 14 gün boyunca sırasıyla 10 ve 20 mg/kg dozunda i.p. MEL uygulandı ve her MEL uygulamasından 1 saat sonra ACR (50 mg/kg, i.p.) enjekte edildi. Grup 5'e ise 14 gün boyunca 20 mg/kg dozunda i.p. MEL uygulaması yapıldı. Deneysel uygulamalar sonunda ratların canlı ağırlık tartımları yapıldı ve tüm ratlar hafif sevofluran anestezisi (Sevorane %100 sıvı, Abbvie Laboratories, İstanbul, Türkiye) altında dekapite edildikten sonra beyin dokuları alındı. Beyin dokularının tartımından sonra her bir gruptan 5 ratın beyni histopatolojik, immunhistokimyasal ve immunfloresan incelemeler için serum fizyolojik ile yıkamayı takiben hemen formaldehit içine alındı. Diğer 5 adet ratın beyin dokuları ise serum fizyolojik ile yıkamayı takiben -20°C'de biyokimyasal ve moleküler analizler yapılana dek muhafaza edildi.

3.4. Lokomotor Aktivite Testi

Ratlar, ACR ve MEL'in son enjeksiyonları yapıldıktan sonra 24 saat boyunca ortama alışmaları için LMA testi yapılacak laboratuvarında bekletildiler. LMA, kenarları üzerinde kızılötesi (IR) ışık kaynağı ve alıcıları içeren bir kafes sistemidir. Deney hayvanlarına LMA testi ölçümü için 42x42x42 cm³ pleksiglas kafesler kullanıldı. Şekil 3.1'de¹⁶² de görüldüğü gibi saydam kafesler IR ışığı geçiren ve kafesin etrafında kızıl ötesi alıcılarından oluşan, bilgisayara bağlı veri kayıt sistemine dayanan bir mekanizmaya sahiptir. Her bir rat kafese yerleştirildiğinde karşılıklı olarak yerleştirilmiş IR sensörleri rat hareket ettiğinde ışık iletiminin kesilmesi sonucu alıcılar bilgisayara bağlı kaydedici tarafından kaydedilir. Bu sistem sayesinde ratların ambulator, horizontal ve vertikal hareketleri kaydedilir. Horizontal hareket, ratın olduğu yerde yaptığı harekettir. Vertikal hareket ise dikilme hareketidir. Ambulator hareket ise ratın dikilme yapmadan kafes içinde yaptığı her türlü gezinme, yer değiştirme hareketidir.^{88, 162}



Şekil 3.1. Lokomotor aktivite ölçüm cihazı

Vertikal ve horizontal hareketler ratların stereotipik hareketleri ve agresivitesi gibi davranışsal hareketleri hakkında önemli sonuçlar verir. Yapılan bu çalışmada stereotipik, ambulator, horizontal, vertikal ve distance aktiviteleri ölçüldü. Ratların enjeksiyonları bitikten sonra her rat kafesin ortasına yerleştirildi ve 10 dk süre ile tüm parametrelerin kayıtları alındı. Kayıt alınırken test süresi boyunca sessizlik sağlandı. Her bir rat ölçümünden sonra kafeslerde diğer ratların bıraktıkları kokuları engellemek için % 30'luk etanol ile temizlendi. Bu şekilde çalışmada ratların LMA aktivitelerinde artma veya azalmalar tespit edildi.^{88, 162}

3.5. Biyokimyasal Analizler

-20°C' de muhafaza edilen beyin dokularından analiz gününde 100 mg kadar örnek alınarak kapaklı tüplere alındı ve Fosfat tampon (PBS) ile 1/20 oranında sulandırılarak Magna Lyser (Roche) homojenizatör ile 90 saniye 6000 devirde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi tamamlandıktan sonra homojenatlar 10000 rmp'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatantlar ependorf tüplerine alındı ve biyokimyasal analizlerde kullanıldı.

Beyin dokusu süpernatantlarında oksidatif stres belirteçlerinden MDA, SOD, GPx, GSH ve KAT parametreleri, inflamasyon belirteçlerinden TNF- α , IL-6, IL-1beta ve nNOS parametreleri ve beyin sinirsel aktivitelerinde birçok önemli fonsiyonlara sahip olan AChE ve MAO parametreleri spesifik çift antikor sandviç rat uyumlu ticari ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kitleri (Sunred Biological Technology, Shanghai, China) ile üretici firmanın protokolüne göre analiz edildi. Pleytlerin okumaları BioTek ELISA reader'da EPOCH II programında 450nm'de yapıldı. Sonuçlar değerlendirilerek gruplar arasında farklar tespit edildi. Yapılan ELISA çalışmasının protokolü;

- Çalışmaya başlamadan önce ELISA kitleri +2/8°C sıcaklıktan 30 dk boyunca oda ısısında bekletildi. Sonra standartlar hazırlandı.
- Standartların hazırlanması: Standartlar beş ayrı ependorf tüpte yapıldı.
Standart 5: 120 µl orjinal standart + 120 µl standart diluent
Standart 4: 120 µl standart 5'ten alınır + 120 µl standart diluent
Standart 3: 120 µl standart 4'ten alınır + 120 µl standart diluent
Standart 2: 120 µl standart 3'ten alınır + 120 µl standart diluent
Standart 1: 120 µl standart 2'den alınır + 120 µl standart diluent eklenerek spesifik monoklonal antibadi ile kaplı pleyt kuyucuklarına standartlar 50 µl sırasıyla eklendi.
- Pleytteki bir test kuyucuk blank olarak seçildi. Blank kuyucuğuna örnek, HRP ve her parametrenin antikorı (IL-6 antikorı vb.) eklenmez sadece kromojen A-B ve stop solüsyonu eklenir.
- Kitte bulunan Streptavidin-HRP, 50 µl pleytte tüm test kuyucuklarına eklendi. Standartlar zaten biotin içerdiğinden dolayı HRP standart kuyucuklarına eklenmez.
- Tüm test kuyucuklarına örnekler 40 µl ve biotin antibody 10 µl eklendikten sonra

seal membran ile playt kapatılarak 37 °C’de 60 dk inkübe edildi.

- 30x konsantre olan yıkama solüsyonu 30 kat sulandırılarak hazırlandı.
- Bir saat sonunda membran yavaşça kaldırıldı ve playt ters çevrilerek döküldü üzerine yıkama solüsyonu tüm kuyucuklara eklendi.
- Mikroplate washer ile yıkama yapıldıktan sonra kromojen A ve B sırasıyla tüm test kuyucuklarına 50 µl eklendi ve 37 C’de 10 dk karanlıkta inkübe edildi.
- Süre sonunda tüm test kuyucuklarına stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
- Pleyt BioTek ELISA okuyucu cihazında EPOCH II programında 450nm dalga boyunda okuması yapıldı.
- Elde edilen sonuçların standart eğri doğrusal regresyon denkleminde hesaplandı ve her örneğin konsantrasyonları hesaplanarak gruplar arasında değerlendirmeler yapıldı.

3.6. Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi (Real Time PCR)

PCR yöntemi DNA zincirinin belirli bir bölgesini veya tamamını çoğaltmak için kullanılan bir yöntemdir. PCR çoğaltma yönteminde primer adı verilen spesifik ekzon bölgelerinden seçilen oligonükleotitler kullanılır. Bu primerler DNA üzerinde bulunan hedeflerine bağlanarak çoğalırlar. PCR yönteminde her bir döngüde 2ⁿ katı kadar DNA kopyası elde edilir. Bu şekilde kısa bir sürede milyonlarca spesifik DNA bölgesi ekspresyonu elde edilir. RNA molekülünün PCR’da çoğaltılabilmesi için reverse transkriptaz enzimi tarafından koplamente DNA (cDNA) elde edilmesi gerekir. Daha sonra bu cDNA normal PCR yöntemi ile çoğaltma işlemi yapılır. Yapılan bu çalışmada belirlenen gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerinin miktarının ölçümü için önce total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve son olarak PCR yöntemi ile çoğaltma işlemi yapıldı.

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Belirlediğimiz dozlarda ACR ve MEL uygulmasının ardından alınan beyin dokularında ER stres parametreleri olan *GRP78*, *ATF4*, *ATF6*, *sXBP-1* ve *CHOP* ayrıca apoptozis belirteçlerinden *Bax*, *Bcl-2* ve *Cas-3* genlerinin ve housekeeping gen olarak *GAPDH* mRNA ekspersyon seviyeleri Real time PCR yöntemi ile belirlenerek gruplar arasında değerlendirme yapıldı. Belirlenen genlerin seviyelerini ölçmek için önce total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA'lar Omega RNA-Solv Reagent (BIO-TEK, LOT: R6830118886-33, USA) kiti kullanılarak üretici firmanın prosedürüne göre yapıldı.

- Ratlardan alınan beyin dokularından küçük kesitler alınarak ependorf tüplerine konuldu.
- Üzerine 1 ml trizol eklendi ve 5 dk beklendi. Magna lyser homojenizatör cihazı ile 6000 devirde 90 saniye kadar parçalandı.
- Tüm tüpler temiz ependorflara aktararak 15000 rpm'de 15 dk ve +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı alındı.
- Alınan süpernatant üzerine 500 µl izomil alkol eklenerek 10 sn vortekslendi ve 10 dk oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı.
- Daha sonra 12000 devirde 10 dk +4°C'de santrifüj yapıldı.
- Bu şekilde tüm RNA'lar tüpün dip kısımlarına çökmüş oldu. Süpernatant kısımları atıldı.
- % 70'lik etanol hazırlandı ve dipte çökmüş olan RNA üzerine 1 ml eklenerek hafif vortekslendi.
- 7500 devirde 10 dk +4°C'de santrifüj yaptıktan sonra üzerindeki sıvı kısım döküldü ve önceden ayarlanmış olan +37°C'lik etüvde kurumaya bırakıldı.
- Sonra üzerine 100 µl DEPC Treated Water ekleyerek pipetleme yapıldıktan sonra elde edilen RNA'nın saflığı ve miktarı spektrometrede 260-280 nm absobans

ölçümleri belirlendi. Yaklaşık olarak elde edilen RNA konsatrasyonları 2 ng/μL olarak ölçüldü.

3.6.2. cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA'dan cDNA elde etmek için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanıldı. Tek zincirli RNA'dan cDNA elde edebilmek için Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak toplam 20 μl'lik bir reaksiyon hazırlandı. cDNA sentezi için her bir örnek hazırlanmasında revers transkriptaz enzimi, dNTP ve Template RNA reaksiyon karışımı Tablo 3.3'te belirtildiği gibi oluşturuldu.

Tablo 3.3. cDNA reaksiyon hazırlanışı

Reaksiyon	Hacim (μl)
10X RT Buffer	2.0
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8
10X RT Random Primers	2.0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0
Nuclease-free H ₂ O	4.2
Template RNA	10

Daha sonra cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyonlar PCR da Tablo 3.4'te belirlenen süre ve sıcaklıklara göre yapıldı. Elde edilen cDNA konsantrasyonları ölçülerek Real Time PCR ile rölatif kantitasyon analizleri yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3.4. cDNA reaksiyonu için PCR süre ve basamakları

Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.6.3. SYBR Green Master Mix Reaksiyon Hazırlama

İlgili genlerin mRNA tanskript seviyelerinin Real Time PCR ile ölçülebilmesi için gerekli primerler <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> ilgili linkindeki Primer Dizayn programı ile Tablo 3.5'te belirtildiği gibi tasarlandı.

Tablo 3.5. Primer sekansları

GEN	Sekans (5' 3')	Baz Uzunluğu	Katalog No
GRP78	F: CGCCTGACCCCTGAAGAAAT R: TGGCTTTCCAGCCATTCGAT	230	S63521.1
ATF4	F: TATCTGGAGGTGGCCAAGCA R: CTCCAACATCCAATCTGTCC	147	NM_024403.2
ATF6	F: TCCTCATGGACCAGGTGAAGAC R: AGTCCAACCTCCTCAGGAACG	305	XM_017598829.1
sXBP1	F: GCTGCGGAGGAACTGAAAAA R: CACGTAGTCTGAGTGCTGCG	299	NM_001004210.2
CHOP	F: TGTTGAAGATGAGCGGGTGG R: CCGGTTTCTGCTTTCAGGTG	117	NM_001109986.1
Bax	F: ACACCTGAGCTGACCTTGA R: AGTTCATCGCCAATTCGCCT	115	NM_016993.1
Bcl-2	F: CTGGTGGACAACATCGCTCT R: GCATGCTGGGGCCATATAGT	115	NM_016993.1
Cas3	F: GGAGCTTGGAACGCGAAGAA R: ACACAAGCCCATTTCAGGGT	169	NM_012922.2
GAPDH	F: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA R: GATGGTGATGGGTTTCCCGT	248	NM_017008.4

Syber green master mix, cDNA, primerler ve nükleer free water -20°C'den alınıp oda sıcaklığında çözündürüldü. Sonra master mix reaksiyonları hazırlamak için Syber Green 2X Rox Dye Master Mix (Qiagen) protokolüne göre her bir reaksiyon için 10 µl SYBR green master mix, 1.5 µl forward ve reserve primerler, RNase free water 5 µl ve cDNA ise 2 µl eklenerek SYBR green master mix hazırlandı. Total karışım hacmi 20 µl olarak hazırlandı. Tüm bu aşamalar soğuk blok üzerinde yapıldı. Hazırladıktan sonra Real Time PCR cihazında; 95°C'de 15 dk (1 cycle), sırasıyla 94°C'de 15 sn, 60°C'de 20 sn, 72°C'de 20 sn (40 cycle) ve en son olarak ta +4 °C'de +∞ şeklinde ayarlanarak ekspresyon seviyeleri belirlendi. Elde edilen Ct/Cq değerleri 2 üzeri eksi delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metoduna uygun olarak hesaplanarak ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri hesaplandı.¹⁶³

3.7. Histopatolojik İncelemeler

Değerlendirme sonunda ratlardan alınan beyin doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildi. Rutin doku takip işlemleri sonucu parafin bloklara gömüldü. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik incelemeler için hazırlanan preparatlar hematoksilin-eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu altında incelendi (Olympus BX 51, Japonya). Kesitler histopatolojik özelliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

3.8. İmmunohistokimyasal İncelemeler

İmmunperoksidaz inceleme amacıyla adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan tüm kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, deparafinize ve dehidre edildi. Daha sonra distile suda 5 dk yıkandı. Fosfat buffer solüsyonu (PBS, pH 7.2) ile 5dk yıkayıp, % 3'lük H₂O₂' de 10 dk tutularak, endojen peroksidaz inaktive edildi. Dokular PBS de 5-10 dk yıkandıktan sonra, nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için tüm primer ve sekonder antikorlarla uyumlu olan Protein blok ile 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda doku kesitleri üzerinde kalan blok solüsyonunun fazlası döküldükten sonra yıkanma yapılmadan primer antikor (8-OHdG, Kat No: sc-66036, Sulandırma Oranı; 1/100 US) damlatıldı ve 37°C' de 1 saat bekletildi. Kesitler PBS ile 2 kez 5'er dk yıkayıp, biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10-30 dk. inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz da 10-30 dk. bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere 3-3' Diaminobenzidine (DAB) kromojen, damlatılarak kromojeni almasına göre 5-10 dk. bekletildi. Kesitler zemin boyanması için Mayer's hematoksilende 1-2 dk. tutulduktan sonra musluk suyunda yıkandı. Daha sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek lamelle kapatıldı ve ışık mikroskobu (OLYMPUS BX51 Japonya) ile inceleme yapıldı. Kesitler immunpozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

3.9. İmmunfloresans İncelemeler

Polilizinli lamalar üzerine 5 µm kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemlerinin ardından sonra PBS ile yıkama uygulandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla %3 lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dk. süreyle bekletildi. Kesitler çekirdekteki antijen maskelenmesini önlemek amacıyla antijen retrieval (sitrat buffer, ph 6) solüsyonu içerisinde, 5'er dk. süreyle 4 kez mikrodalga fırında ısıya maruz bırakıldıktan sonra mikrodalga fırınından çıkarıldı ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Solüsyondan çıkarmadan dışarıda soğuduktan sonra süre sonunda PBS ile yıkandı. Protein blok damlatıldı. Daha sonra dokuların üzerine primer antikor (GFAP, Kat No: sc-33673 Dilüent Oran: 1/200) damlatılarak antikor prospektüsünde tavsiye edilen süre kadar nemlendirilmiş kabin içerisinde inkübe edildi ve sonrasında PBS ile yıkandı. İmmunfloresans sekonder antikor (FITC Cat No: ab6717 Dilüent Oranı: 1/1000) preparatların üzerine damlatıldı ve karanlık ortamda 45 dk. bekletildi. Daha sonra DNA işaretliyi DAPI (Kat No: D 1306, Sulandırma Oranı:1/200 UK) damlatıldı ve karanlık ortamda 5 dk bekletildikten sonra PBS ile yıkandı. Ardından 9 kısım distile su ve 1 kısım oranında gliserol karışımı dokular üzerine damlatılarak, lamel ile kapatılıp floresans ataçmanlı mikroskopta incelendi (Zeiss AXIO). Kesitler immunpozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

3.10. İstatiksel Analiz

Bu araştırma sonunda elde edilen kantitatif değerler GraphPad Prism 8.0.1 istatistik veri programında ikiden fazla bağımsız grupların istatistiksel analizinde kullanılan one-way ANOVA sonrası Tukey testi uygulanarak değerlendirildi. Alfa değeri $P<0.05$ ise anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ve Beyin Ağırlıkları Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri

ACR ile indüklenen nörotoksisite modelinde MEL'in olası protektif etkilerini araştırdığımız bu çalışmada, gruplar arasında vücut ve beyin ağırlıkları değerlendirildi. Deneme öncesi gruplar arasındaki ratların ağırlıklarında herhangi bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Deneysel çalışma sonunda, ACR ve MEL10+ACR gruplarındaki ratların ortalama canlı ağırlıklarının diğer gruplara göre önemli düzeyde azaldığı görüldü ($p<0.05$). MEL20 +ACR ve MEL 20 gruplarında ratların ortalama canlı ağırlıklarının kontrole göre farklılık arz etmediği saptandı ($p>0.05$). Ratların ortalama beyin ağırlıklarının deney grupları arasında farklılık göstermediği tespit edildi ($p>0.05$). Tablo 4.1'de gruplar arasında ratların vücut ve beyin ağırlıkları standart sapmaları ile birlikte gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Deneysel gruplarda ratların vücut ve beyin ağırlıkları (n=10)

Parametreler	Kontrol	ACR	MEL10+ACR	MEL20+ACR	MEL20
Başlangıç					
Vücut Ağırlığı (g)	214,25±12,08 ^a	216,03±9,93 ^a	215,25±9,60 ^a	216,02±9,53 ^a	214,50±11,19 ^a
Son Vücut Ağırlığı (g)	255,12±9,40 ^a	192,75±14,33 ^b	195,37±14,91 ^b	240,12±11,65 ^a	254,25±10,05 ^a
Beyin Ağırlığı (g)	1,8295±0,024 ^a	1,8067±0,050 ^a	1,8055±0,048 ^a	1,802±0,042 ^a	1,8331±0,052 ^a

Aynı satırdaki gruplar arasında farklı harflerle ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak farklılıklar bulunmaktadır. (^{a-b}: $p<0.05$; n=10)

4.2. Lokomotor Aktivite Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri

Deneysel çalışmalarda gözlemlenen stresin, beyin işlevi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olmakta ve hem kısa hem de uzun vadeli davranış değişikliklerine yol açmaktadır. ACR'nin neden olduğu nörotoksisitede ratların hareket ve davranışlarında önemli değişimler gözlemlendi. Lokomotor aktivite testi sonuçları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Test için stereotipik, ambulatory, distance, horizontal ve vertikal hareketler değerlendirmeye alındı. Yapılan bu çalışmada ACR toksisitesinde oluşan lokomotor aktivite bozuklukları bu hareket tiplerinde kontrole gre azalmalar meydana geldi.

Deney grupları arasında yapılan karşılaştırmalar kontrol grubuna gre yapılp değerlendirildi. Deneysel sre boyunca ACR ve MEL uygulamalarının sonucunda şekil 4.1. A'da gsterildiği gibi stereotipik hareketlerde Kontrol grubuna gre kıyaslandığında, ACR ($p<0.0001$) ve MEL10+ACR ($p<0.01$) gruplarında önemli derecede azaldığı ve bu azalma istatistiksel bağlamda anlamlı bulundu. Fakat kontrol grubuna gre kıyaslandığında MEL20+ACR ve MEL20 grupları arasında stereotipik hareketlerde istatistiksel olarak anlamlı dzeyde farkın olmadığı tespit edildi ($p>0.05$, $n=10$). MEL20+ACR ve MEL20 grupları, ACR toksisite grubu ile kıyaslandığında stereotipik hareketlerde grlen artışın istatistiksel olarak önemli dzeyde olduğu belirlendi ($p<0.0001$). MEL10+ACR ve MEL20+ACR grupları karşılaştırıldığında dşk doz MEL uygulamasının stereotipik hareketlerde artışa neden olduğu fakat yksek doz MEL uygulamasının daha çok etkili ve istatistiksel bağlamda anlamlı olduğu grld ($p<0.01$). MEL20 grubu MEL20+ACR ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın oluşmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

Lokomotor aktivite sonuçlarının değerlendirilmesinde Ambulatory hareketler şekil 4.1. B'de gsterildiği gibi; ACR ($p<0.0001$) ve MEL10+ACR ($p<0.001$) gruplarında ambulatory hareketlerde azalmalar olduğu grld. Bu azalmalarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Fakat Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları arasında herhangi bir istatistiksel fark oluşmadığı saptandı ($p>0.05$). ACR grubu; MEL10+ACR ve MEL20+ACR ile kıyaslandığında, 10 mg/kg MEL uygulamasının ambulatory hareketlerde artışa neden olduğu fakat yksek doz MEL uygulamasının daha çok etkili ve istatistiksel bağlamda

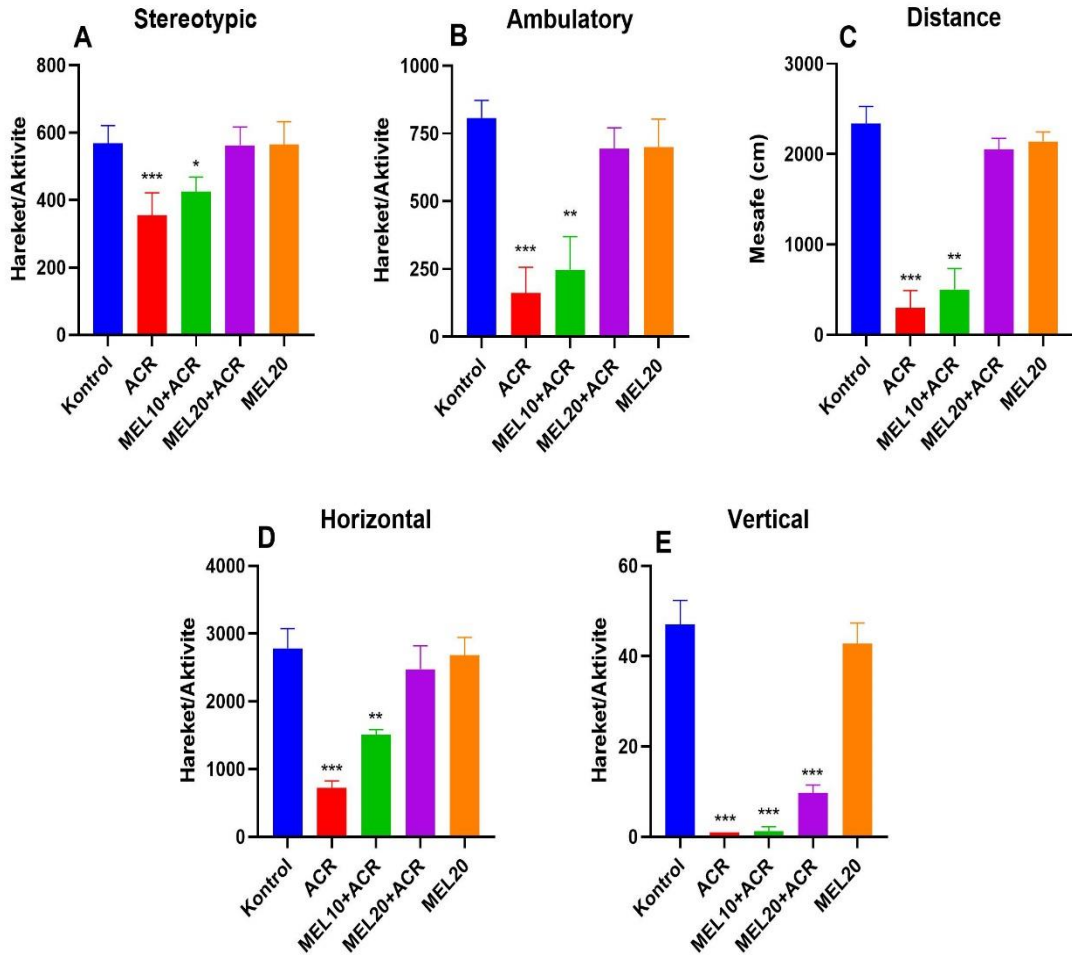
anlamli olduğu görüldü. MEL20+ACR grubu ile ACR grubu arasında $p<0.0001$ düzeyinde farkın olduğu saptandı. Yine ACR grubu ile MEL20 grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu görüldü ($p<0.0001$). MEL20+ACR ile MEL20 grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farkın oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

Şekil 4.1. C’de ratların toplam kat ettiği mesafe (Distance) seviyeleri gruplar arasında değerlendirildi. Ratların toplam kat ettiği mesafenin ACR ($p<0.0001$) ve MEL10+ACR ($p<0.001$) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görüldü. Kontrol grubu ile MEL20 grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark oluşmadığı belirlendi ($p>0.05$). ACR grubu ile MEL10+ACR ve MEL20+ACR grupları kıyaslandığında 10 mg/kg MEL uygulamasının toplam mesafelerinde artışa neden olduğu fakat yüksek doz MEL uygulamasının daha çok etkili ve istatistiksel bağlamda anlamlı olduğu görüldü. MEL20+ACR grubu ile ACR grubu arasında $p<0.0001$ düzeyinde farkın olduğu saptandı. Yine ACR grubu ile MEL20 grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu görüldü ($p<0.0001$). MEL20+ACR ile MEL20 grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farkın oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

Şekil 4.1. D’de Horizontal hareket seviyeleri gruplar arasında değerlendirildi. ACR ($p<0.0001$) ve MEL10+ACR ($p<0.001$) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görüldü. Kontrol grubu ile MEL20 grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark oluşmadığı belirlendi ($p>0.05$). ACR grubu ile MEL10+ACR ve MEL20+ACR grupları kıyaslandığında horizontal hareketlerin MEL10+ACR düşük doz grubunda bir artışa neden olduğu fakat yüksek doz MEL uygulamasının daha çok etkili ve istatistiksel bağlamda anlamlı olduğu görüldü. MEL20+ACR grubu ile ACR grubu arasında $p<0.0001$ düzeyinde farkın olduğu saptandı. Yine ACR grubu ile MEL20 grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu görüldü ($p<0.0001$). MEL20+ACR ile

MEL20 grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farkın oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

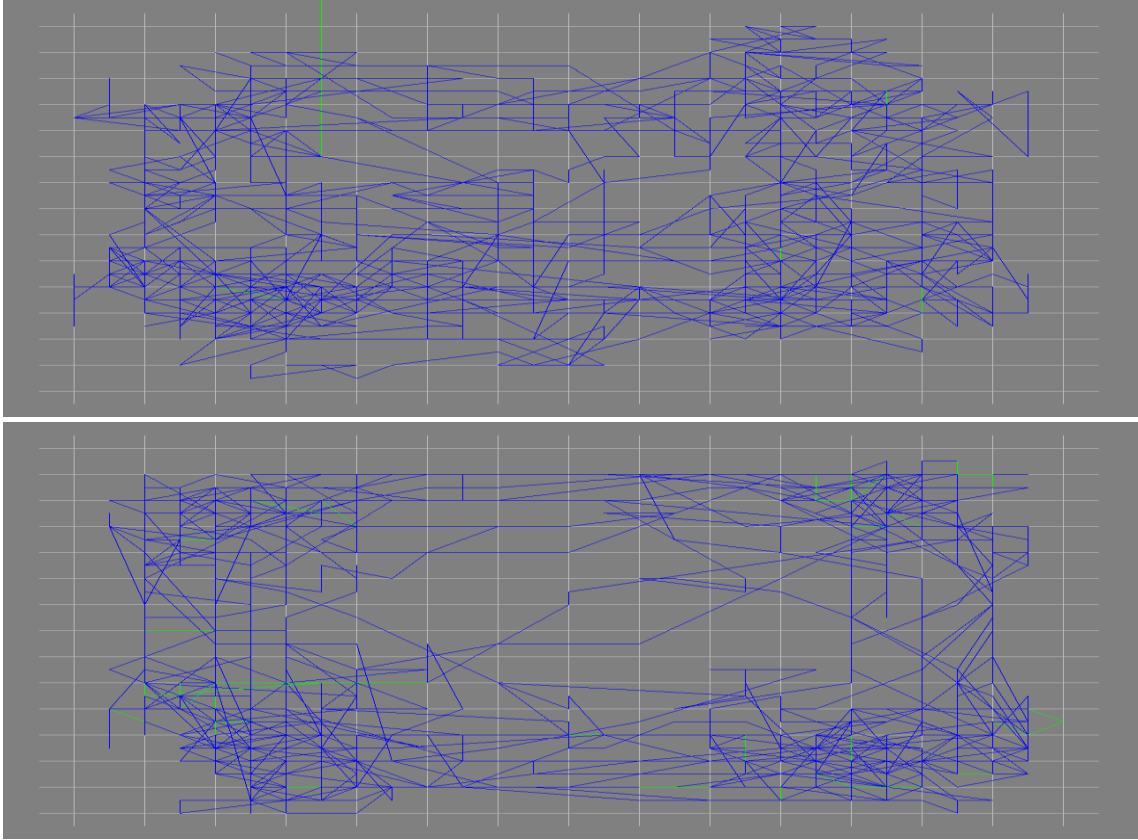
Şekil 4.1. E’de görüldüğü gibi Vertikal hareketlerde ACR, MEL10+ACR ve MEL20+ACR grupları Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede azalmalar görülmüştür ($p<0.0001$). Vertikal hareketlerde ACR ile MEL10+ACR arasında istatistiksel olarak farkın oluşmadığı ($p>0.05$), ACR ile MEL20+ACR grubu arasında $p<0.01$ düzeyinde anlamlı farkın oluştuğu ve ACR ile MEL20 grubu arasında ise $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı farklar oluştuğu gözlemlendi. Fakat Kontrol ile MEL20 grubu arasında istatistiksel fark olmadığı belirlendi ($p>0.05$).



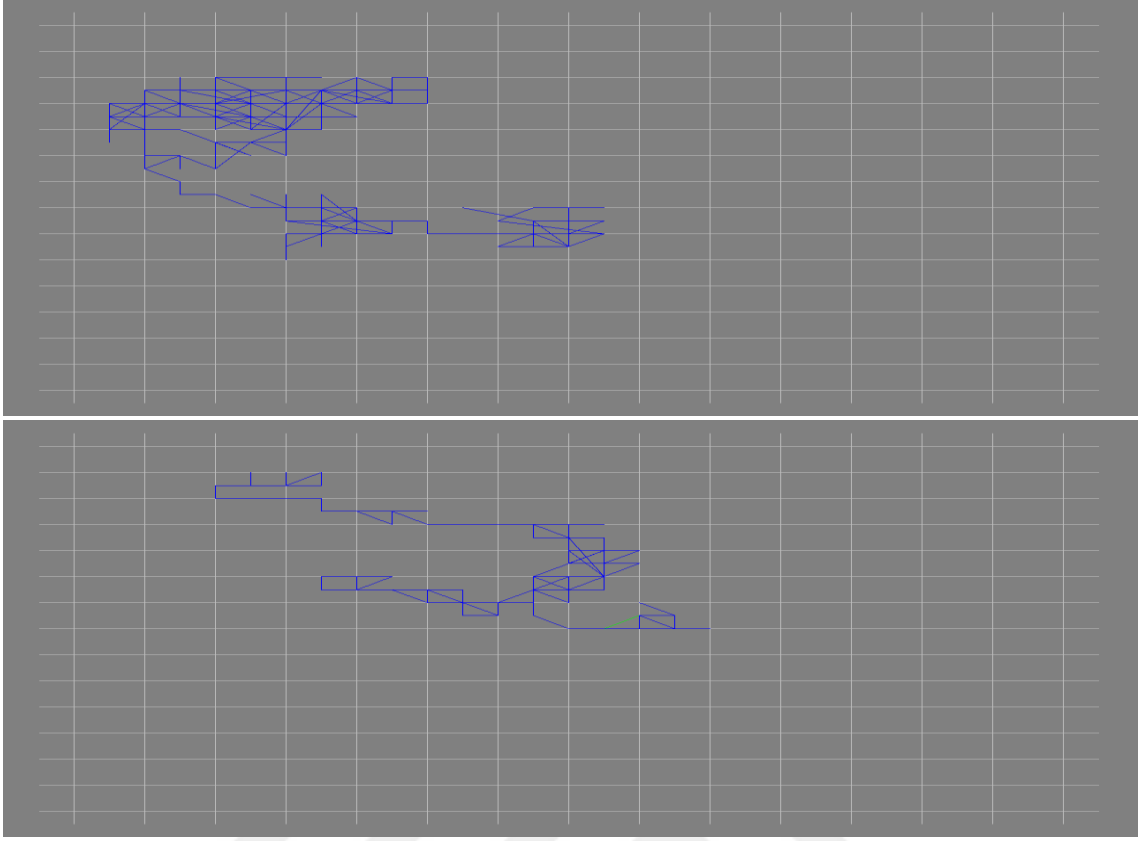
(***: $p<0.0001$, **: $p<0.001$, *: $p<0.01$, $n=10$)

Şekil 4.1. ACR ile indüklenen nörotoksisitede lokomotor aktivite parametreleri üzerine MEL’in etkileri

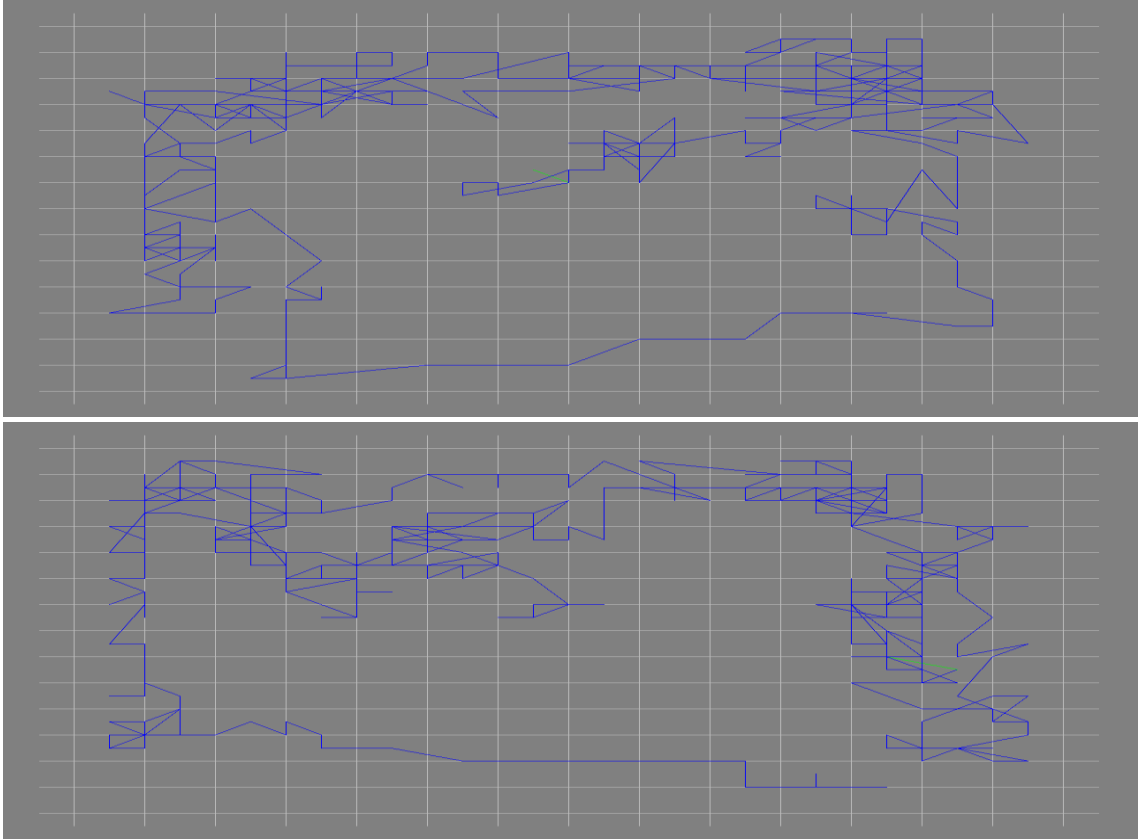
Yapılan bu çalışmada lokomotor aktivite testi uygulanan Kontrol grubu ratlarının kafesin ortalarına ve kenarlarına defalarca gittiği ve dikilme hareketi yaptığı Şekil 4.2.'de görülmektedir. ACR toksisite grubu ratlarının Kontrol grubuna göre neredeyse hiç hareket etmediği, ortalara ve köşelere hiç gitmediği ve dikilme hareketi yapmadığı Şekil 4.3.'te görülmektedir. Uygulanan MEL dozlarından düşük doz olan MEL10+ACR grubu ise Kontrol grubu ile kıyaslandığında hareket etmelerinde azalmanın meydana geldiği, ACR grubuna göre artışın olduğu, fakat bu artışın istatistiksel olarak bir fark oluşturmadığı Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4.'te görülmektedir. Yüksek doz olan MEL20+ACR grubu ACR grubundan daha fazla lokomotor aktivite hareketlerinin olduğu, bu değerlerin Kontrol grubu değerlerine yakın sonuçlar verdiği Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.5 de görülmektedir. MEL20 grubu ile Kontrol grubu kıyaslandığında aralarında herhangi bir fark olmadığı Şekil 4.6.'da görülmektedir ($p>0.05$).



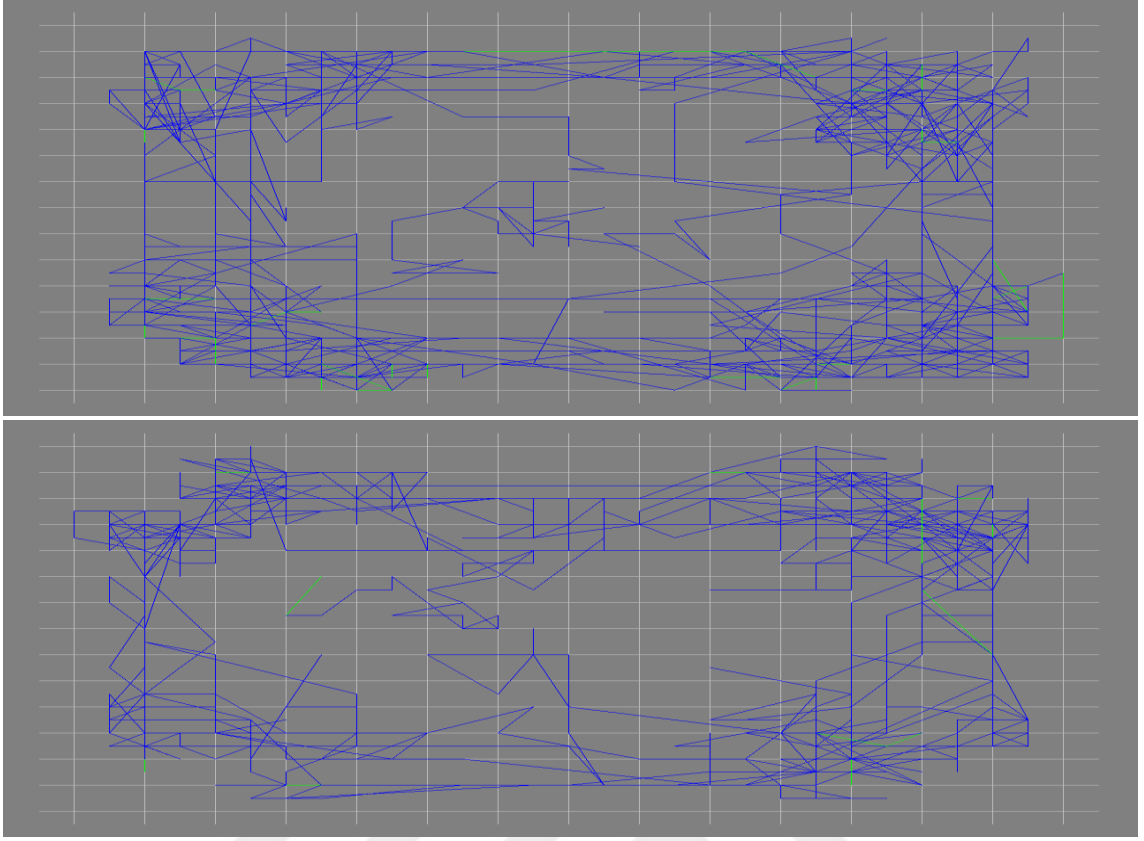
Şekil 4.2. Kontrol grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler



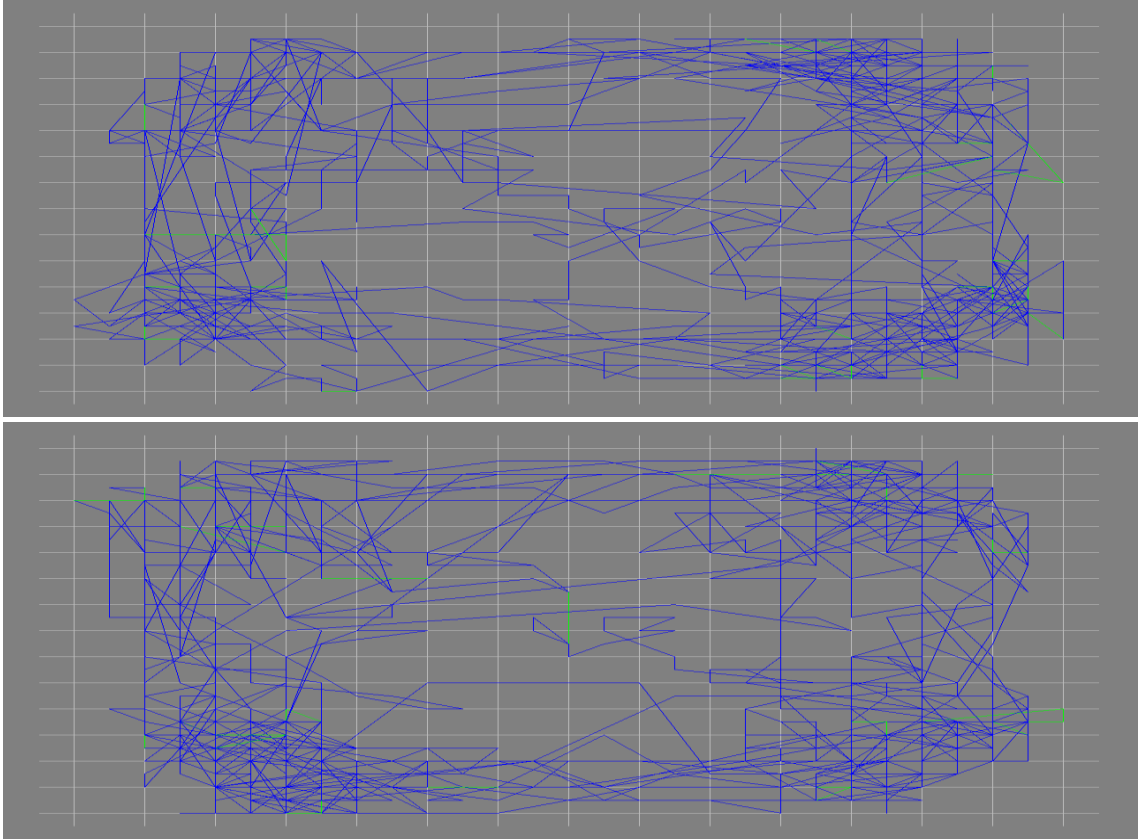
Şekil 4.3. ACR grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler



Şekil 4.4. MEL10+ACR grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler



Şekil 4.5. MEL20+ACR grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler

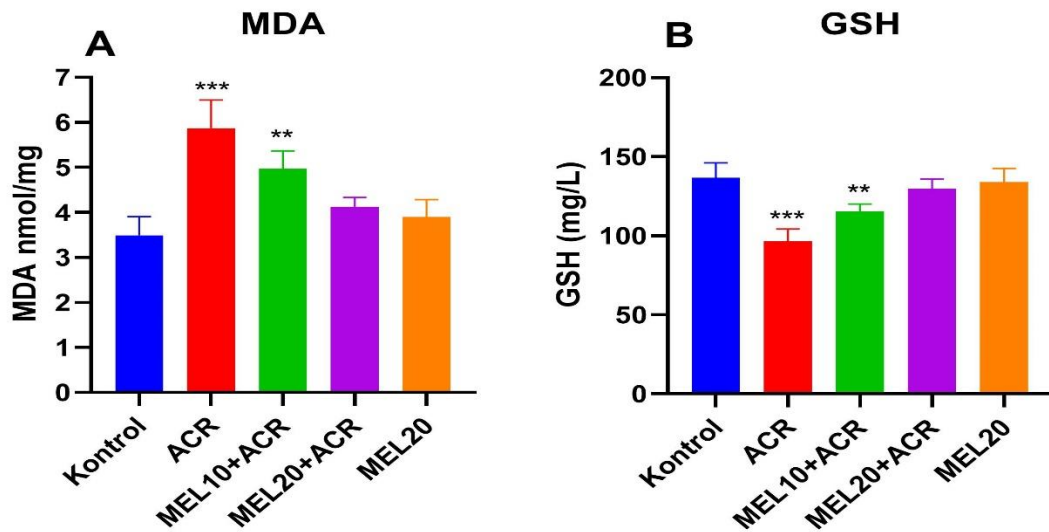


Şekil 4.6. MEL20 grubundan rastgele seçilen iki ratın yaptığı hareketler

4.3. MDA ve GSH Seviyeleri ile SOD, GPx ve KAT Aktiviteleri Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri

Şekil 4.7 A'da görüldüğü gibi beyin dokusu MDA seviyesi ACR grubunda; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 gruplarına göre anlamlı düzeyde arttı ($p<0.0001$). MEL10+ACR grubunda MDA seviyesinin, ACR'ye göre azaldığı fakat bu azalmanın MEL20+ACR grubu kadar etkili olmadığı tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise MEL10+ACR grubunda MDA seviyesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). MDA seviyesinin, MEL20+ACR ve MEL20 gruplarında Kontrole göre farklılık arz etmediği tespit edildi ($p>0.05$).

GSH'nın beyin dokusundaki düzeyleri incelendiğinde, GSH seviyesinin ACR grubunda Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi (Şekil 4.7. B, $p<0.0001$). MEL10+ACR grubunda GSH seviyesinin, ACR'ye göre arttığı fakat bu artışın MEL20+ACR grubu kadar etkili olmadığı tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları kıyaslandığında ise istatistiksel olarak fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).



(***: $p<0.0001$, **: $p<0.001$, $n=10$)

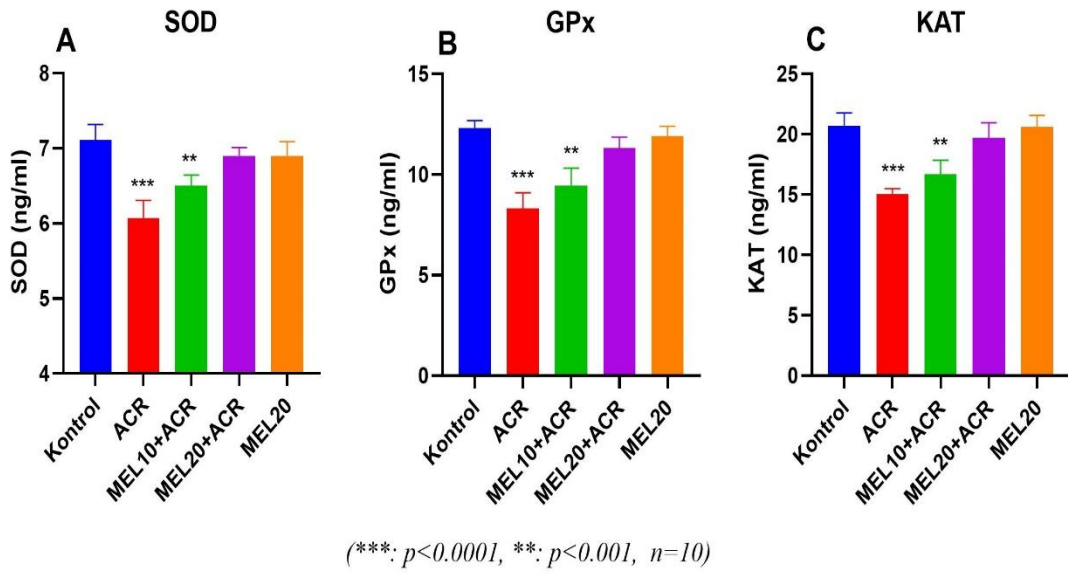
Şekil 4.7. Deney gruplarında beyin MDA ve GSH seviyeleri

Önemli enzimatik antioksidanlardan biri olan ve süperoksid radikallerinin etkisini azaltarak dokuları ve hücreleri hasardan korumayı sağlayan SOD, antioksidan savunma sisteminin etkinliği hakkında önemli fikirler vermektedir. SOD aktivitesi Şekil 4.8. A’da da görüldüğü gibi ACR toksisite grubunda; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 gruplarına göre anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0.0001$). SOD aktivitesi, MEL10+ACR grubunda, ACR grubuna göre arttığı fakat bu artmanın MEL20+ACR grubu kadar etkili olmadığı tespit edildi ($p<0.0001$). MEL10+ACR grubunun istatistiksel olarak $p<0.001$ düzeyinde bir fark ile Kontrol grubundan düşük olduğu tespit edildi. MEL20+ACR ve MEL20 gruplarındaki SOD seviyeleri, ACR grubuna göre anlamlı bir şekilde yükseldiği görüldü ($p<0.05$). Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları kıyaslandığında ise kontrole göre farklılık arz etmediği tespit edildi ($p>0.05$).

Beyin dokusunda oksidatif stres parametrelerinden biri olan GPx, oksidoredüktaz enzim ailesinin bir üyesidir. Şekil 4.8. B’de incelediğimiz GPx enzim aktivitesi, ACR grubunun değerleri, Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 gruplarının değerlerine göre anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0.0001$). MEL10+ACR grubundan elde edilen veriler, ACR grubundan elde edilen verilere göre arttığı fakat bu artışın MEL20+ACR grubu kadar etkili olmadığı tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise istatistiksel olarak fark olduğu tespit edildi ($p<0.001$). MEL20+ACR ve MEL20 grupları, ACR grubuna göre GPx seviyelerinde anlamlı bir şekilde artma olduğu görüldü ($p<0.05$). Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları kıyaslandığında ise kontrole göre farklılık arz etmediği tespit edildi ($p>0.05$).

Hidrojen peroksitin yıkımlanmasından sorumlu olan KAT aktivitesindeki değişiklikler Şekil 4.8. C’de gösterilmiştir. Deney grupları arasında yapılan karşılaştırmalar Kontrol grubuna göre yapıp değerlendirilmiştir. KAT aktivitesinde ACR toksisite grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 gruplarına göre anlamlı düzeyde

azaldığı gözlemlendi ($p<0.0001$). KAT aktivitesi; MEL10+ACR grubunda, ACR grubuna göre arttığı fakat bu artmanın MEL20+ACR grubu kadar etkili olmadığı tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise MEL10+ACR grubunda KAT seviyesinin önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.001$). MEL20+ACR ve MEL20 gruplarında, ACR grubuna göre KAT seviyelerinde anlamlı bir şekilde artma olduğu görüldü ($p<0.05$). Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları kıyaslandığında ise Kontrole göre farklılık arz etmediği tespit edildi ($p>0.05$).



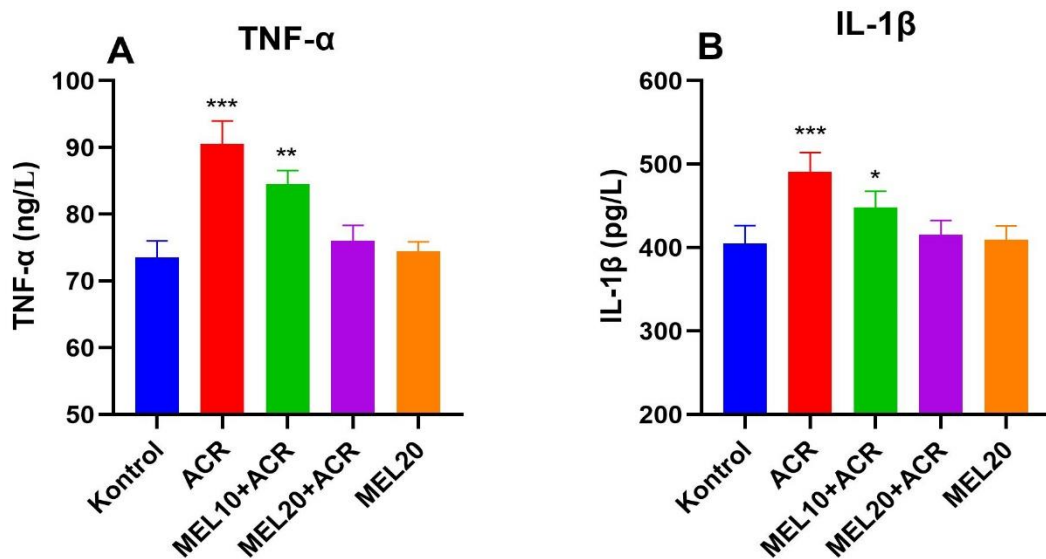
Şekil 4.8. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında SOD, GPx ve KAT aktiviteleri

4.4. TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve nNOS Seviyeleri Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkisi

Yapılan bu çalışmada ACR ve MEL uygulanan gruplar arasında inflamasyon belirteçlerinin seviyeleri değerlendirildi. Doğal bağışıklık sisteminde önemli bir indikatör olan TNF- α seviyelerinde artışın bazı sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayarak apoptozisi indükleyebilmektedir. Bu değerlendirme sonucunda Şekil 4.9. A'da da görüldüğü gibi TNF- α düzeyi incelendiğinde ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve

MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde arttığı saptandı ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise MEL10+ACR grubunda TNF- α seviyesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun TNF- α düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).

Şekil 4.9. B’de görüldüğü gibi IL-1 β düzeyi incelendiğinde ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). MEL10+ACR grubunda IL-1 β seviyesinin, ACR’ye göre azaldığı fakat bu azalmanın MEL20+ACR grubu kadar etkili olmadığı tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında, MEL10+ACR grubunun istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). MEL20+ACR ve MEL20 gruplarında, ACR grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmanın olduğu görüldü ($p<0.05$). IL-1 β seviyesinin, MEL20+ACR ve MEL20 gruplarında kontrole göre farklılık arz etmediği tespit edildi ($p>0.05$).

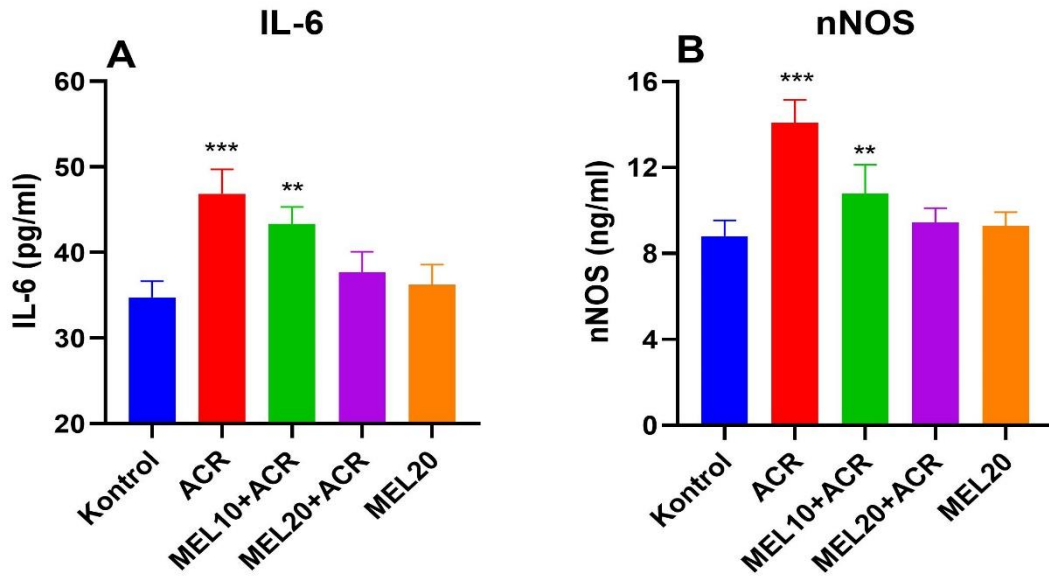


(***: $p<0.0001$, **: $p<0.001$, *: $p<0.01$, $n=10$)

Şekil 4.9. Deney gruplarında beyin TNF- α ve IL-1 β düzeyleri

Şekil 4.10. A’da görüldüğü gibi IL-6 düzeyi incelendiğinde ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise MEL10+ACR grubunda IL-6 seviyesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun IL-6 düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).

Şekil 4.10. B’de gösterildiği gibi beyin dokusunda nNOS düzeyi incelendiğinde ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise MEL10+ACR grubunda nNOS düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun nNOS düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).



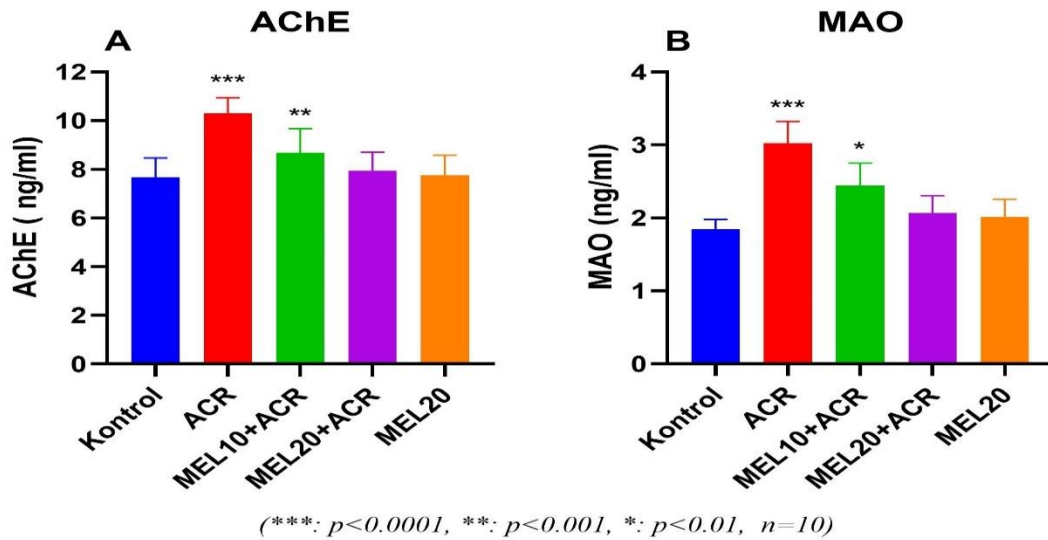
(***: $p<0.0001$, **: $p<0.001$, $n=10$)

Şekil 4.10. Deney gruplarında beyin IL-6 ve nNOS düzeyleri

4.5. ACR ve MEL Uygulamalarının AChE ve MAO Seviyelerine Etkileri

Şekil 4.11. A’da gösterildiği gibi beyin dokusu sinirsel aktivitelerinde görevli olan AChE enzim düzeyi incelendiğinde ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir artışın olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise, MEL10+ACR grubunda AChE düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun AChE aktivitesini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).

MAO enzim düzeyleri incelendiğinde ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi (Şekil 4.11.B, $p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise, MEL10+ACR grubunda MAO düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.01$). Kontrol grubu, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun MAO aktivitesini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).

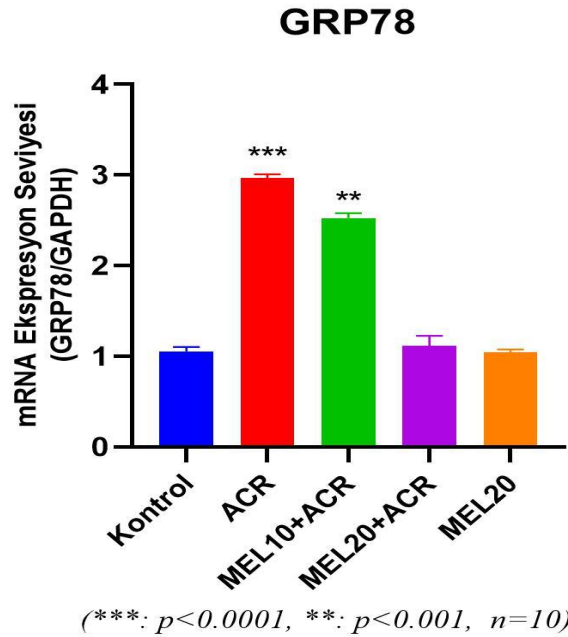


Şekil 4.11. Deney gruplarında beyin AChE ve MAO enzim aktivite düzeyleri

4.6. GRP78, ATF4, ATF6, sXBP1 ve CHOP Gen Ekspresyon Seviyeleri

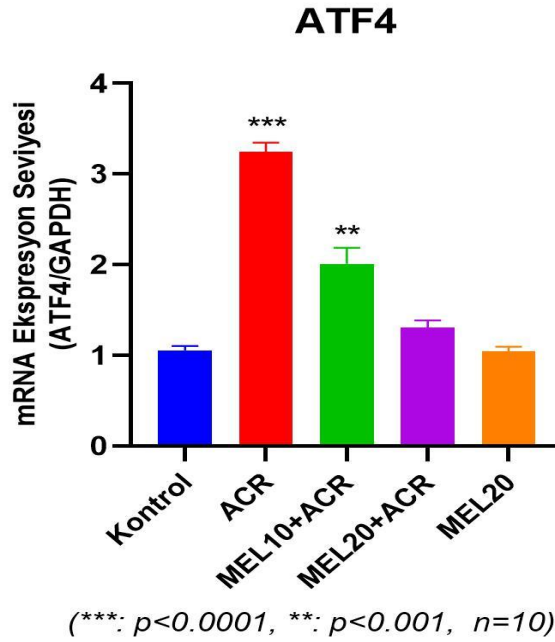
Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri

Protein sentezlenmesi, katlanması, paketlenmesi ve işlenmesi gibi görevleri yerine getiren ER’da stres sonucu bazı ER şaperonlarının ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelmektedir. Yapılan bu çalışmada ACR ve MEL uygulamaları sonucu GRP78 seviyeleri gruplar arasında değerlendirildi. Şekil 4.12’te de görüldüğü gibi GRP78 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise, MEL10+ACR grubunda GRP78 gen ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun GRP78 düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.12. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında GRP78 gen ekspresyon düzeyleri

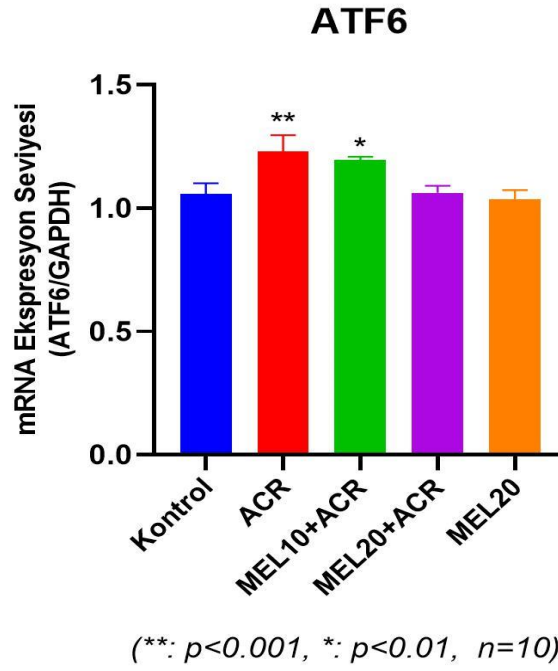
Şekil 4.13’da da görüldüğü gibi ATF4 gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde gruplar arasında ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise, MEL10+ACR grubunda ATF4 gen ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). MEL20+ACR ve MEL20 gruplarında, ACR grubuna göre ATF4 seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun ATF4 düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.13. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında ATF4 gen ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.14’de gösterildiği gibi ATF6 gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında

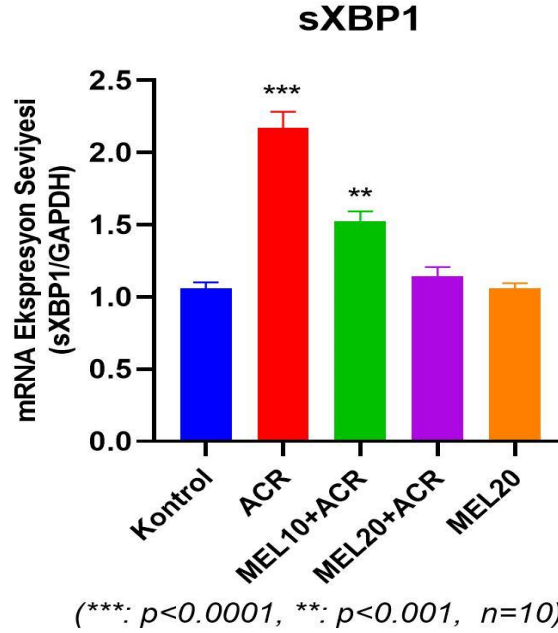
ise, MEL10+ACR grubunda ATF6 gen ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.01$). Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun ATF6 düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.14. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında ATF6 gen ekspresyon düzeyleri

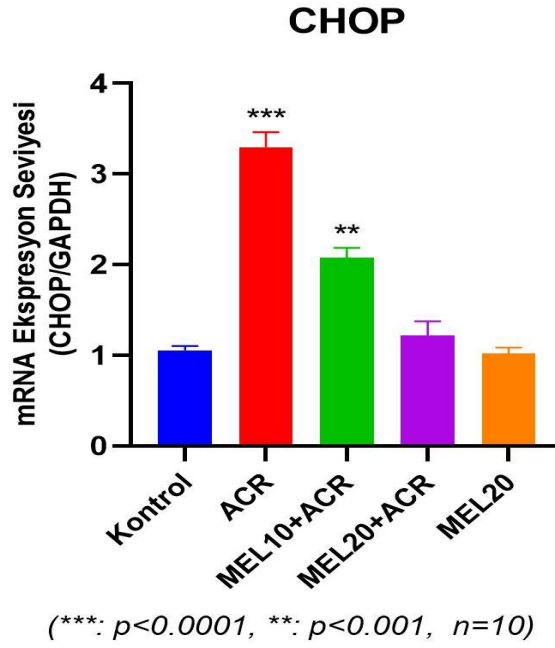
CHOP ekspresyonunu indükleyebilen şaperonlardan birisi olan sXBP1 aktivitesindeki değişiklikler Şekil 4.15’de gösterilmiştir. Deney grupları arasında yapılan karşılaştırmalar kontrol grubuna göre yapıp değerlendirilmiştir. sXBP1 gen ekspresyon düzeyleri ACR toksisite grubu ile kıyaslandığında; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 gruplarına göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($p<0.0001$). MEL10+ACR grubunda, ACR grubuna göre azaldığı fakat bu azalmanın MEL20+ACR grubu kadar etkili olamadığı tespit edildi ($p<0.001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise, MEL10+ACR grubunda sXBP1 gen ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20

grupları kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun sXBP1 düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.15. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında sXBP1 gen ekspresyon düzeyleri

ER’da oluşan stres sonucu hücrelerin hayati faaliyetlerinin sonlandırılması CHOP ekspresyonunun artması ile mümkün olmaktadır. CHOP şaperonu Bax/Bcl-2 oranlarında değişikliğe yol açarak apoptozisi indüklediği bilinmektedir. Şekil 4.16’de gösterildiği gibi CHOP gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde gruplar arasında ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise, MEL10+ACR grubunda CHOP gen ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun CHOP düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.16. Deney gruplarındaki ratların beyin dokularında CHOP gen ekspresyon düzeyleri

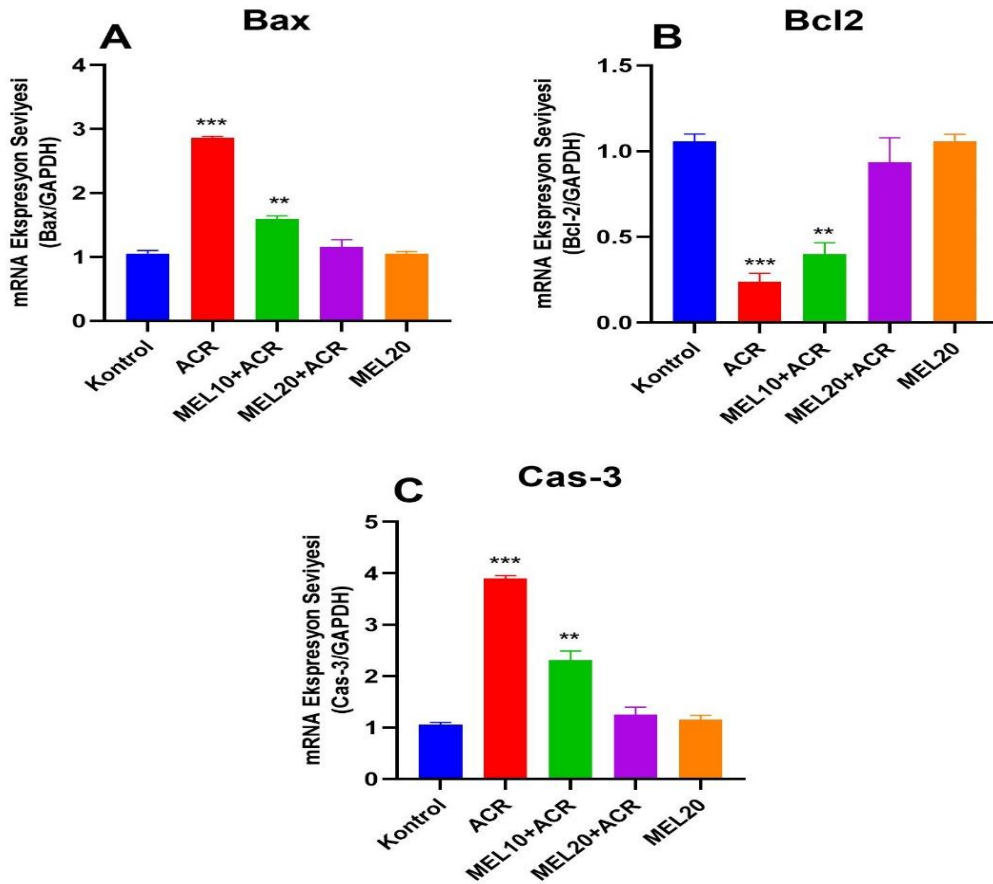
4.7. Bax, Bcl-2 ve Cas-3 Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine ACR ve MEL Uygulamalarının Etkileri

Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozisin önemli parametrelerinden biri olan Bax gen ekspresyon düzeyi gruplar arasında incelendiğinde; Şekil 4.17. A’da gösterildiği gibi ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi ($p < 0.0001$). Kontrol ile MEL10+ACR kıyaslandığında ise, MEL10+ACR grubunda Bax gen ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.001$). Kontrol grubu ile MEL20+ACR ve MEL20 grupları kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p > 0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun Bax düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p < 0.05$).

Bcl-2 düzeyi gruplar arasında incelendiğinde; Şekil 4.17. B’de görüldüğü gibi ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir azalmanın olduğu tespit edildi ($p < 0.0001$). Kontrol grubu ile MEL10+ACR

grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak fark olduğu belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu; MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun Bcl-2 düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede arttırdığı tespit edildi ($p<0.05$).

Cas-3 gen ekspresyon düzeyi gruplar arasında incelendiğinde; Şekil 4.17. C’de gösterildiği gibi ACR grubu; Kontrol, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışın olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). MEL10+ACR grubunda Cas-3 düzeyinin Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, MEL20+ACR ve MEL20 grupları ile kıyaslandığında aralarında fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve 20 mg/kg MEL dozunun Cas-3 düzeyini ACR grubuna göre önemli derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).



(***: $p<0.0001$, **: $p<0.001$, $n=10$)

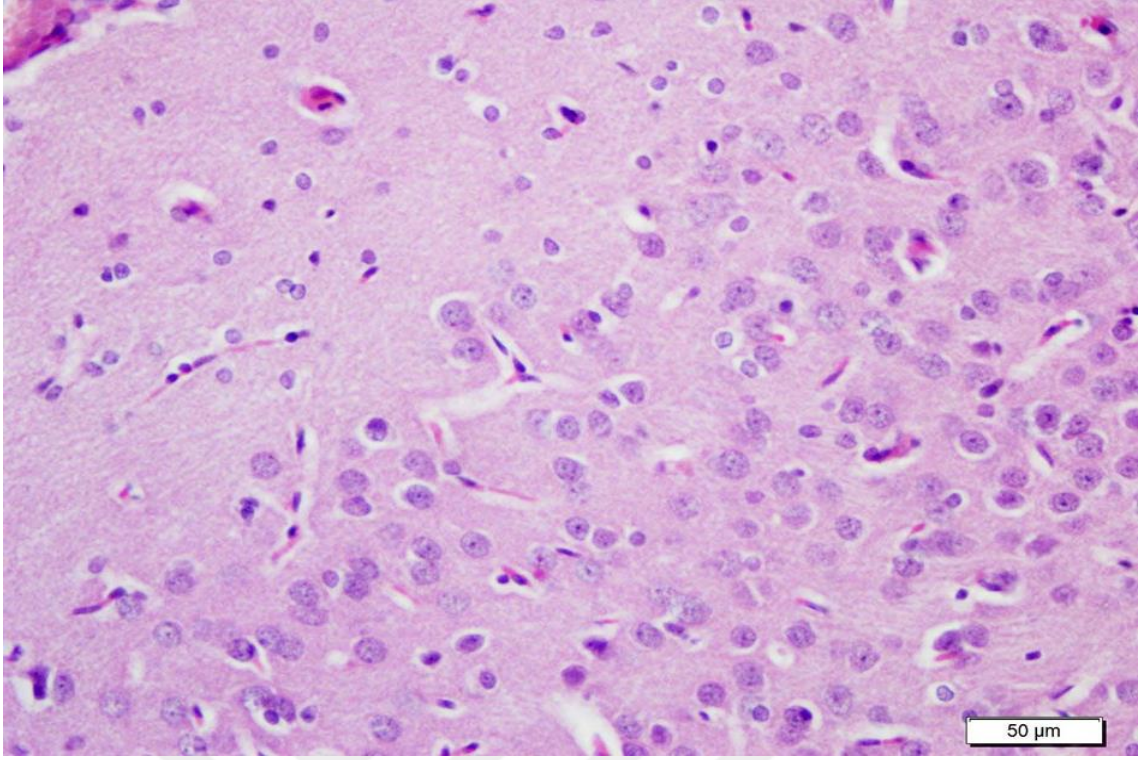
Şekil 4.17. Deney gruplarında beyin Bax, Bcl2 ve Cas-3 düzeyleri

4.8. Beyin Dokusu Histopatolojisi Üzerine ACR ve MEL Uygulamasının

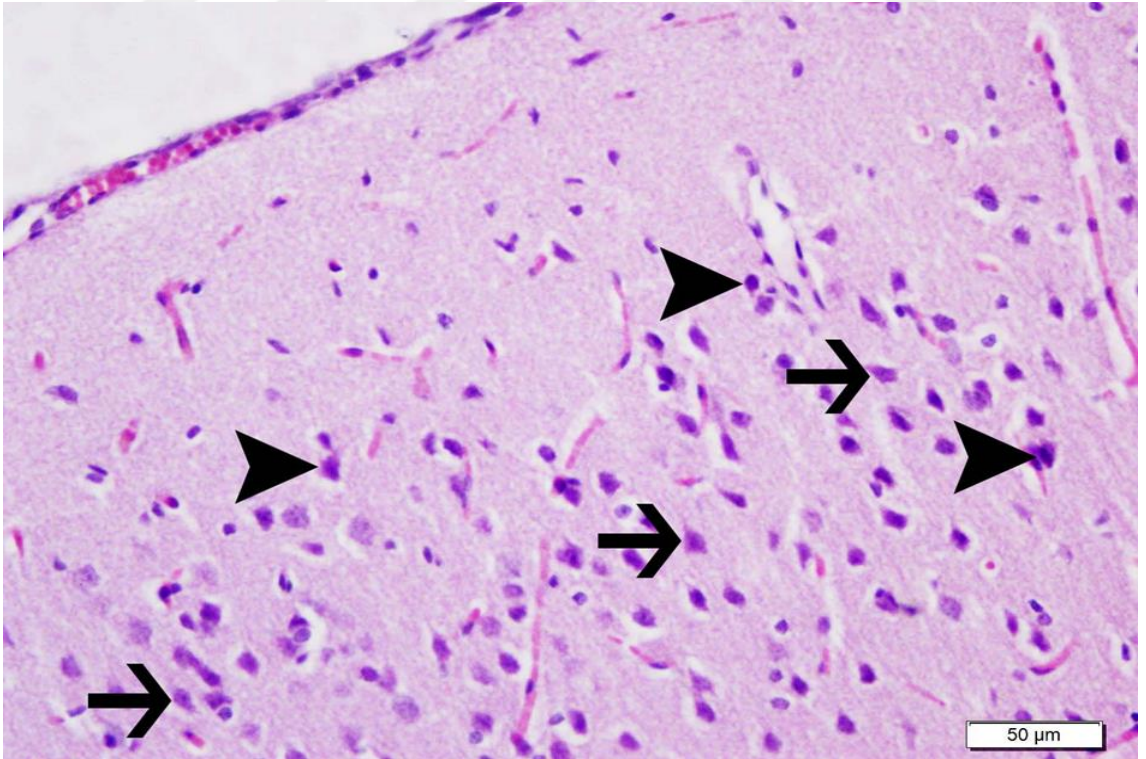
Etkileri

Deneyisel çalışma sonunda ratlardan elde edilen beyin dokularından alınan kesitlere H&E boyaması yapıldı ve gruplar arasında değerlendirmeler yapılarak aşağıda özetlendi.

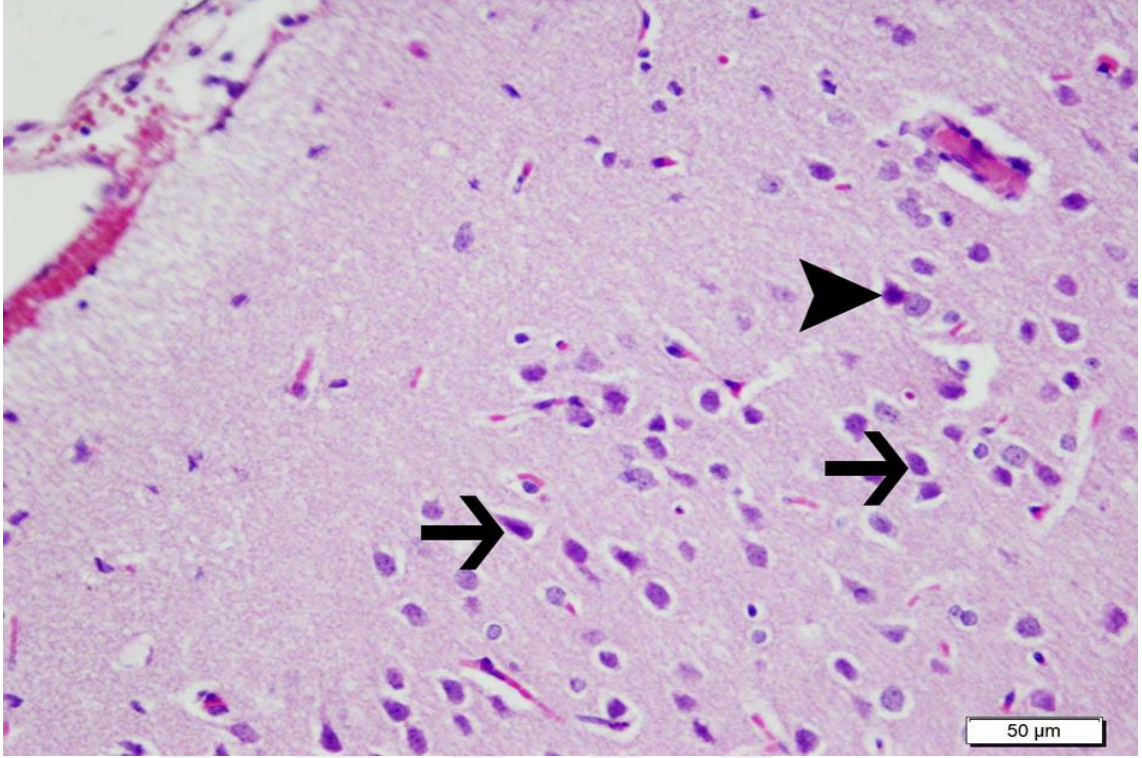
- Kontrol grup: Beyin dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, beyin dokularının normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18).
- ACR grup: Beyin dokularının histopatolojik olarak incelenmesinde, nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon ve nekroz, meningeal ve paransimal damarlarda şiddetli düzeyde hiperemi belirlendi (Şekil 4.19). Kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.05$).
- MEL10+ACR grup: Dokuların histopatolojik incelenmesinde, nöronlarda orta düzeyde dejenerasyon, hafif düzeyde nekroz ve şiddetli düzeyde hiperemi gözlemlendi (Şekil 4.20).
- MEL20+ACR grup: Beyin dokularının histopatolojik olarak değerlendirilmesinde, nöronlarda hafif düzeyde dejenerasyon ve damarlarda hiperemi belirlendi (Şekil 4.21). ACR grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.05$).
- MEL20 grup: Beyin dokularının histopatolojik olarak incelenmesinde, meninkslerin ve paransim dokunun normal histolojik görünümde olduğu belirlendi (Şekil 4.22). Histopatolojik bulgular Tablo 4.2.'de özetlendi.



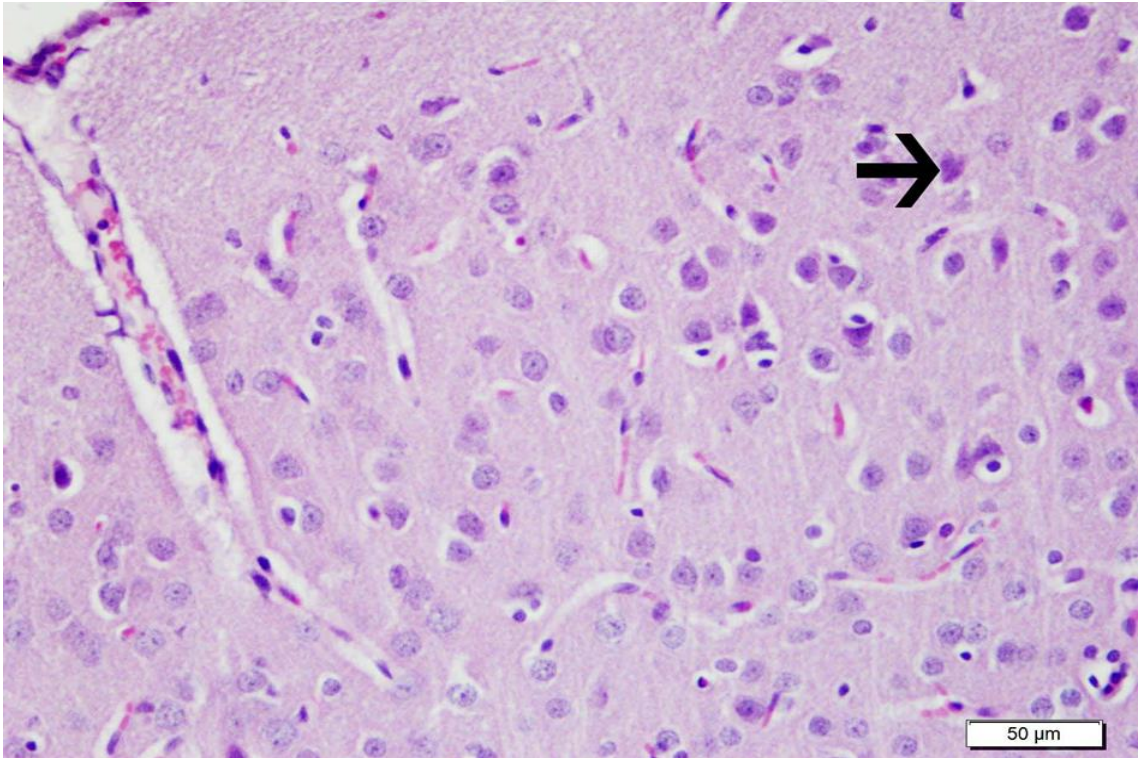
Şekil 4.18. Kontrol grup, beyin dokusu, normal histolojik görünüm, H&E, Bar: 50µm



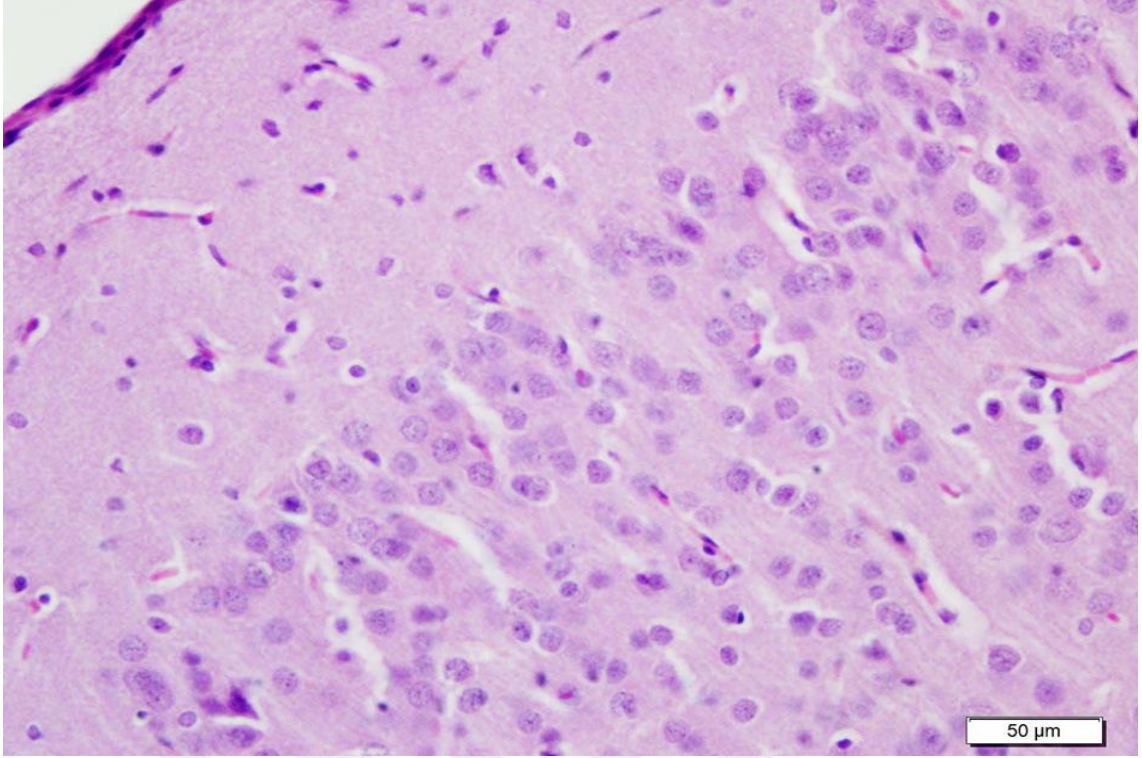
Şekil 4.19. ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon (oklar) ve nekroz (ok başları), H&E, Bar: 50µm



Şekil 4.20. MEL10+ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda orta düzeyde dejenerasyon (oklar), hafif düzeyde nekroz (okbaşı), H&E, Bar: 50µm



Şekil 4.21. MEL20+ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda hafif düzeyde dejenerasyon, H&E, Bar: 50µm



Şekil 4.22. MEL20 grup, beyin dokusu, normal histolojik görünüm, H&E, Bar: 50µm

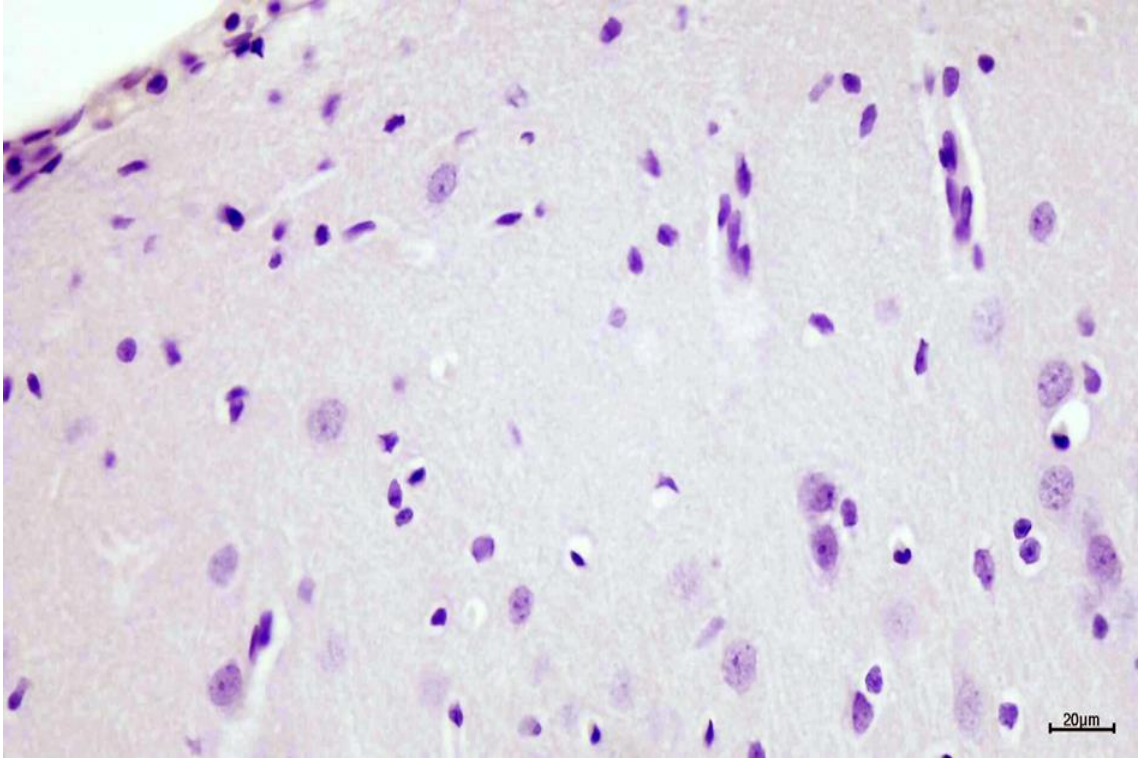
4.9. Beyin Dokusu 8-OHdG Ekspresyonu Üzerine ACR ve MEL Uygulamasının Etkileri

Deneysel çalışmalar sonunda ratlardan elde edilen beyin dokularından alınan kesitler 8-OHdG ekspresyonunun tayini için immunohistokimyasal boyaması ile gruplar arasında değerlendirmeler yapılarak bulgular aşağıdaki özetlenmiştir.

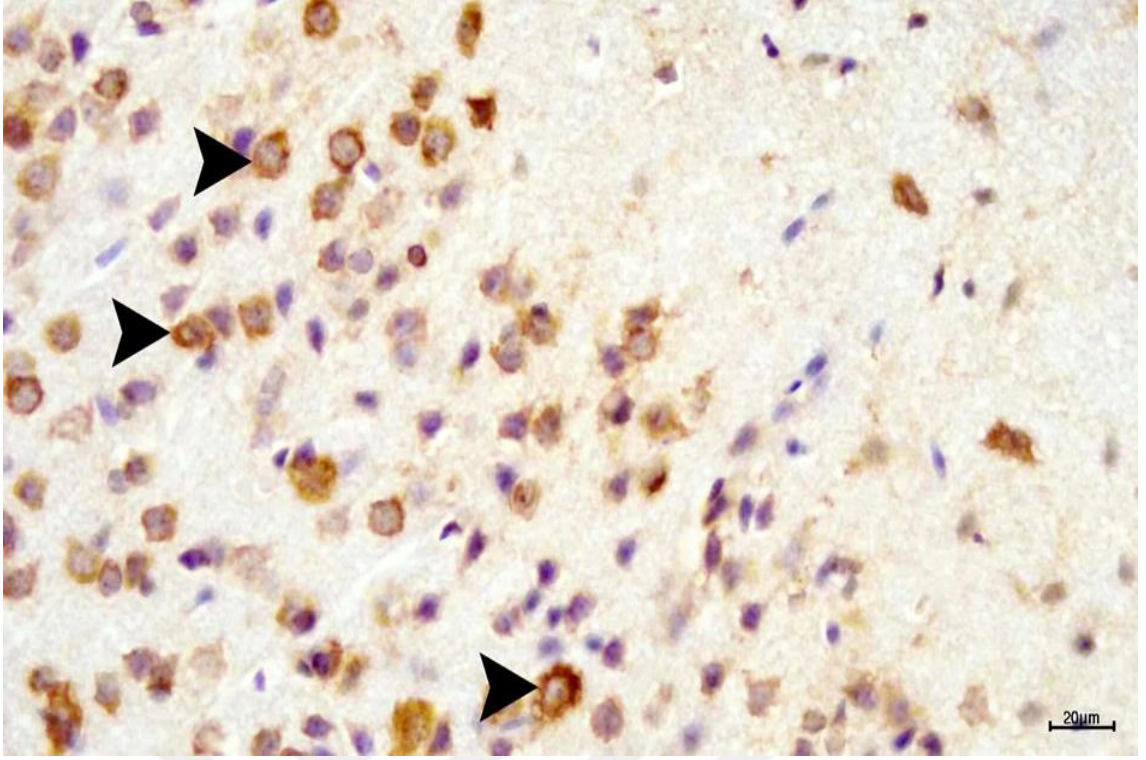
- Kontrol grup: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, 8-OHdG ekspresyonu negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.23).
- ACR grup: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, nöronlarda şiddetli düzeyde sitoplazmik 8-OHdG ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.24). Kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.05$).
- MEL10+ACR grup: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde, nöronlarda orta düzeyde 8-OHdG ekspresyonu tespit edildi

(Şekil 4.25).

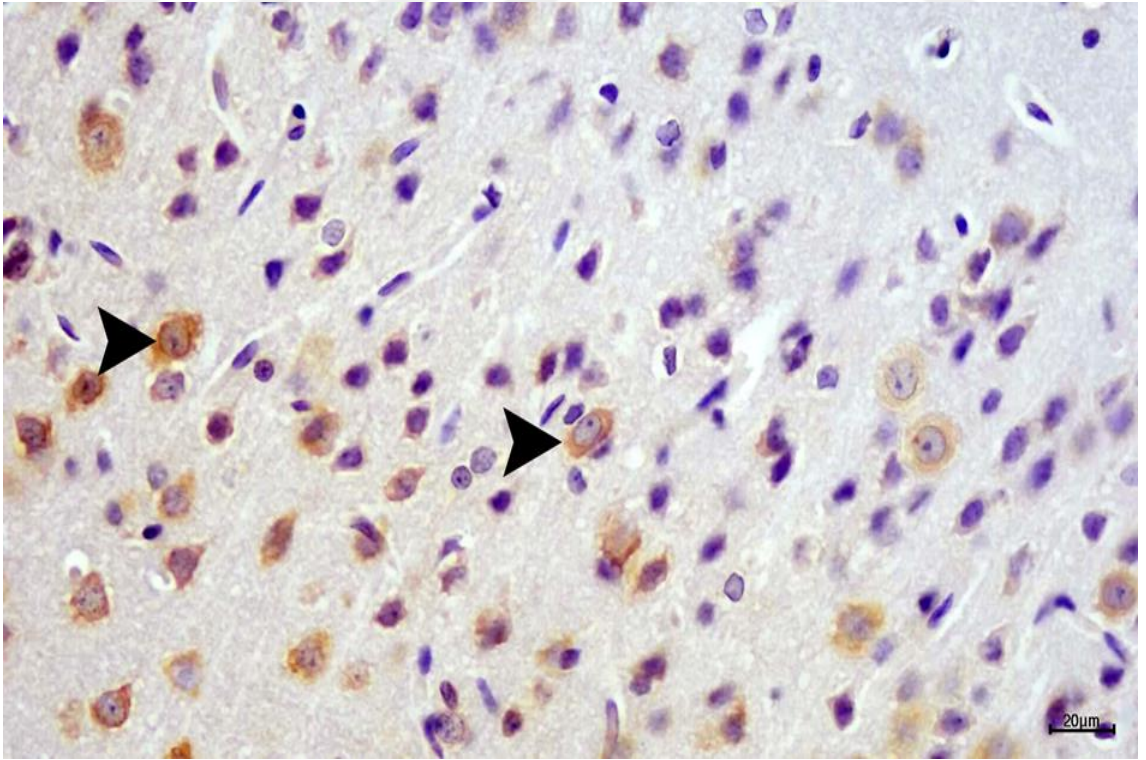
- MEL20+ACR grup: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, nöronlarda hafif düzeyde sitoplazmik 8-OHdG ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.26). ACR grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.05$).
- MEL20 grup: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, negatif 8-OHdG ekspresyonu olarak değerlendirildi (Şekil 4.27). İmmunohistokimyasal bulgular Tablo 4.2.'de özetlendi.



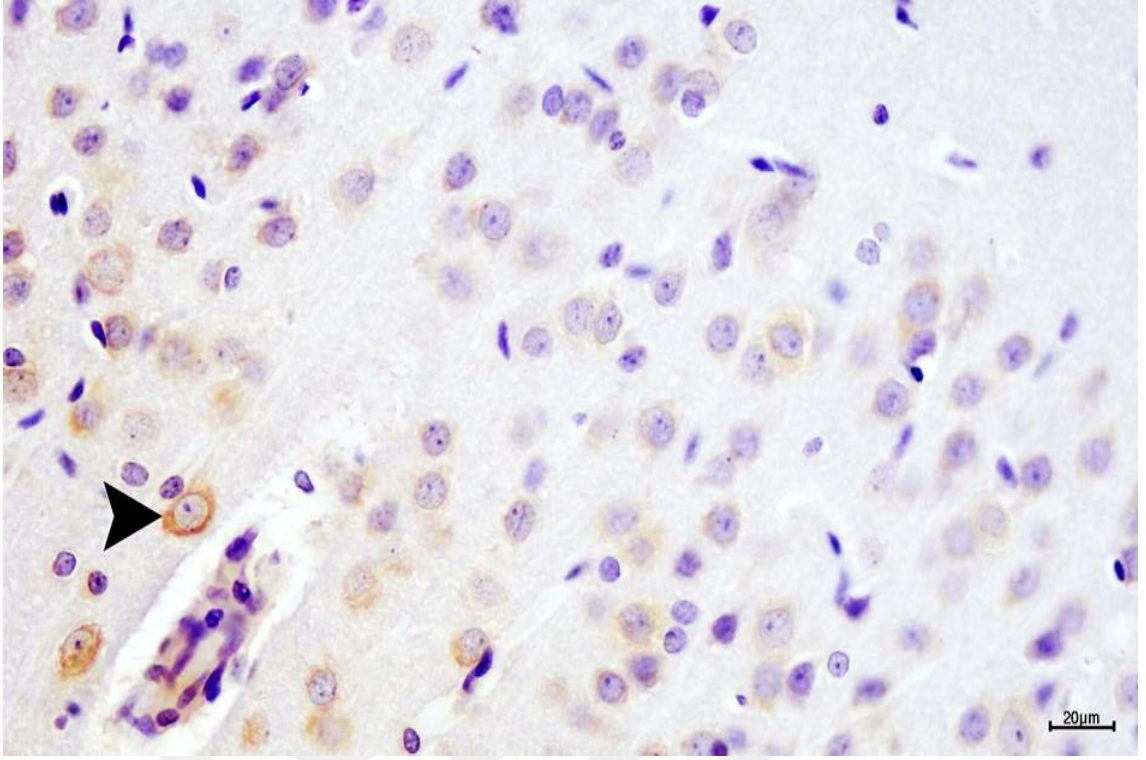
Şekil 4.23. Kontrol grup, beyin dokusu, negatif 8-OHdG ekspresyonu, IHC-P, Bar: 20µm



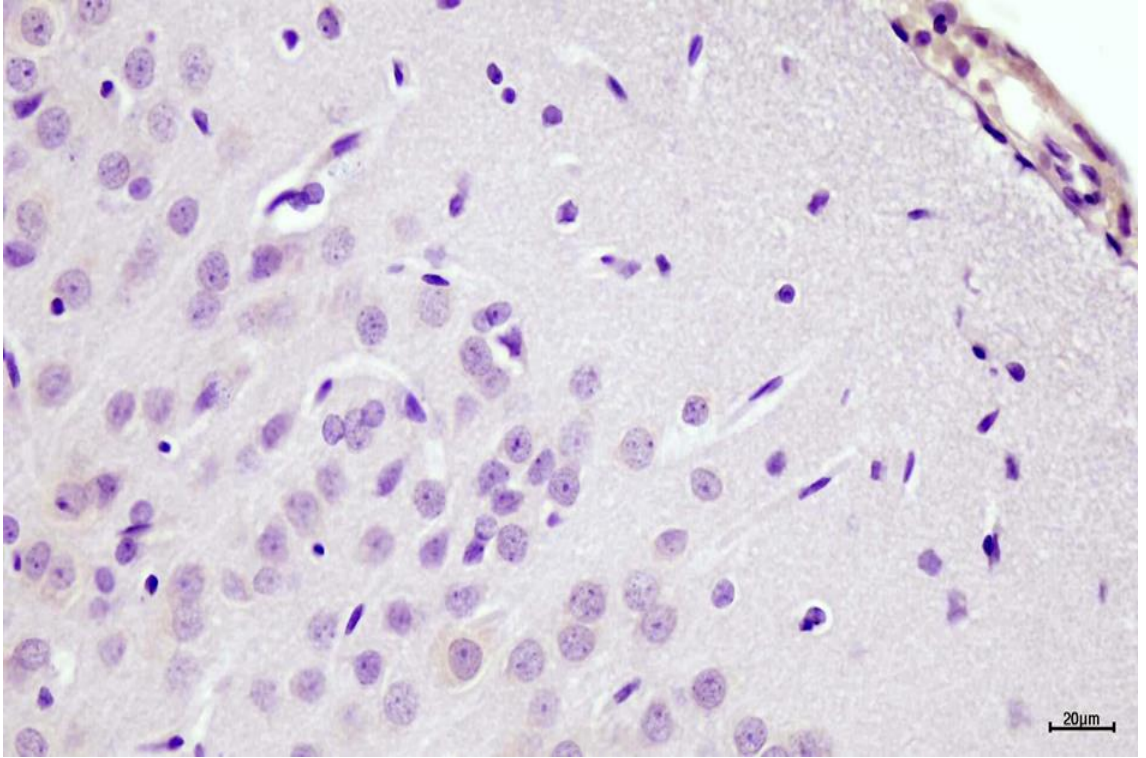
Şekil 4.24. ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda şiddetli düzeyde 8-OHdG ekspresyonu (okbaşları), IHC-P, Bar: 20µm



Şekil 4.25. MEL10+ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda orta düzeyde 8-OHdG ekspresyonu (okbaşları), H&E, Bar: 20µm



Şekil 4.26. MEL20+ACR grup, beyin dokusu, nöronlarda hafif düzeyde sitoplazmik 8-OHdG ekspresyonu, H&E, Bar: 20µm

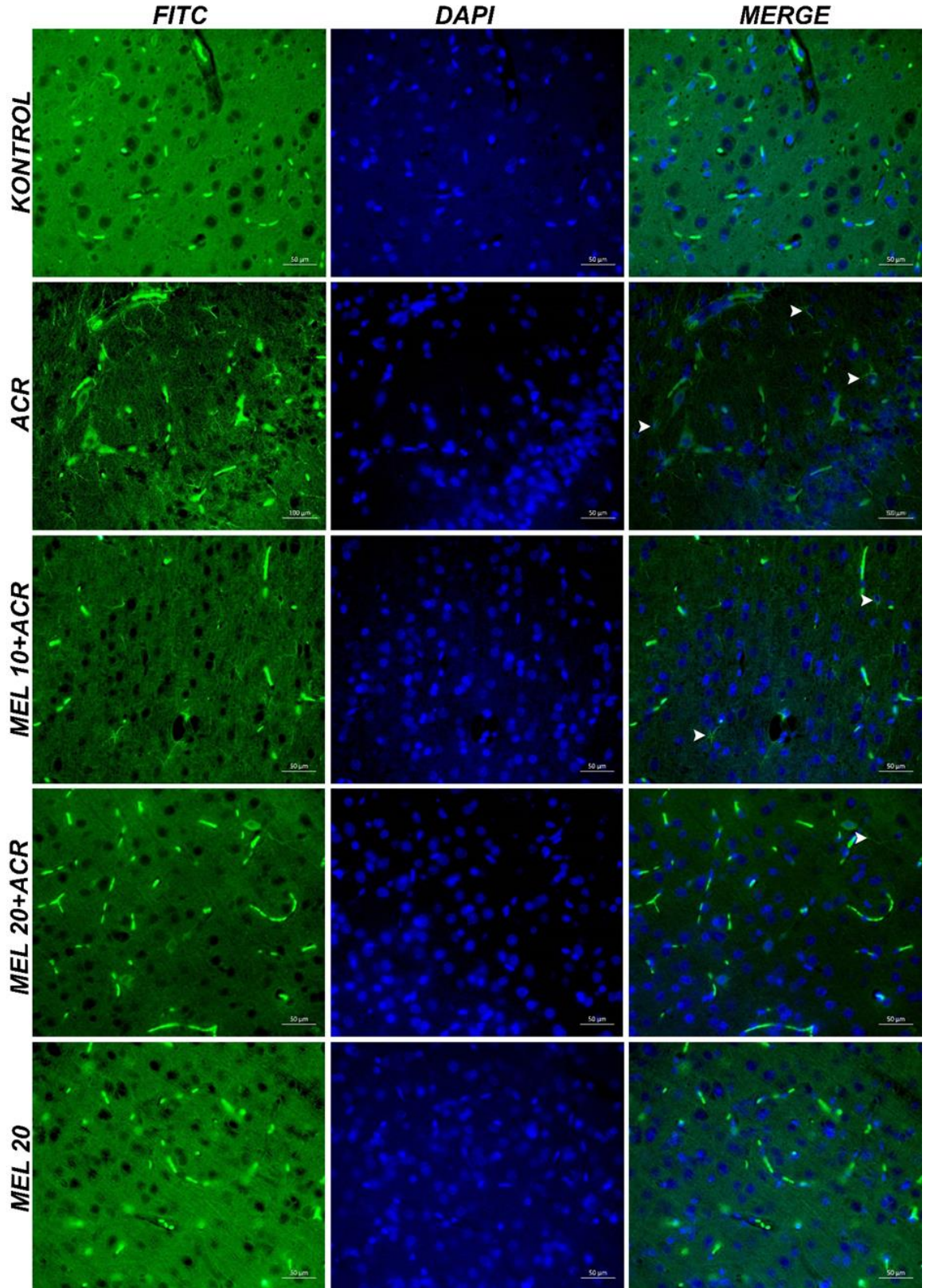


Şekil 4.27. MEL20 grup, beyin dokusu, normal histolojik görünüm, H&E, Bar: 50µm

4.10. Beyin Dokusu GFAP Ekspresyonu Üzerine ACR ve MEL Uygulamasının Etkileri

Deneysel çalışmalar sonunda ratlardan elde edilen beyin dokularından alınan kesitler GFAP ekspresyonunun tayini için immünofloresan boyaması ile gruplar arasında değerlendirmeler yapılarak bulgular aşağıdaki özetlenmiştir.

- Kontrol grup: Beyin dokuları immunfloresans yöntemiyle incelendiğinde, GFAP ekspresyonu negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.28).
- ACR grup: Beyin dokuları immunfloresans yöntemiyle incelendiğinde, astrositlerde şiddetli düzeyde GFAP ekspresyonu görüldü (Şekil 4.28). Kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0.05$).
- MEL10+ACR grup: Beyin dokuları immunfloresans yöntemiyle değerlendirildiğinde, astrositlerde orta düzeyde GFAP ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.28).
- MEL20+ACR grup: Beyin dokuları immunfloresans yöntemiyle incelendiğinde, astrositlerde GFAP ekspresyonu hafif düzeyde tespit edildi (Şekil 4.28). ACR grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.05$).
- MEL20 grup: Beyin dokuları immunfloresans yöntemiyle incelendiğinde, GFAP ekspresyonu negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.28). İmmünofloresan sonuçlar Tablo 4.2.'de özetlendi.



Şekil 4.28. Beyin dokusu, astrositlerde GFAP ekspresyonu (okbaşları), IF, Bar: 50µm

Tablo 4.2. Deneysel grupların beyin dokularında gözlenen histopatolojik, immunhistokimyasal ve immunfloresan bulguların skorlanması

Bulgular	Kontrol	ACR	MEL10+ACR	MEL20+ACR	MEL20
Nöronlarda dejenerasyon	-	+++	++	+	-
Nöronlarda nekroz	-	+++	+	-	-
Damarlarda hiperemi	-	+++	+++	++	-
8-OHdG ekspresyonu	-	+++	++	+	-
GFAP ekspresyonu	-	+++	++	+	-

Beyin dokuları immun pozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

5. TARTIŞMA

ACR birçok endüstriyel alanda kullanılan suda çözünür vinil bir monomerdur. ACR özellikle atık suların saflaştırılmasında, bazı inşaat malzemelerinin üretiminde, jel kromatografisi için moleküler laboratuvarlarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılmasından dolayı özellikle inşaat sektöründe ve diğer sektörlerde çalışan işçilerde de ACR'ye maruziyet görülmektedir. Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmalarda ACR'nin sadece dış faktörlere bağlı olarak değil aynı zamanda gıdasal ürünler ile de organizmaya alınabildiği rapor edilmiştir.^{164, 165} Yapılan çalışmada besinlerin yüksek sıcaklıklara maruz kalması sonucu ACR'nin oluştuğu gözlemlenmiştir. Genel olarak 120 °C ve üzerinde yüksek ısıya maruz kalan ekmek, kızartma, patates cipsi, kavrulmuş kahve, bisküvi, kraker ve ızgara gibi besinlerde ACR açığa çıkmaktadır. Bu oluşum hızı ve miktarı çeşitli faktörlere bağlı olmakla birlikte ısı miktarına göre sıcaklık arttıkça logaritmik olarak artmaktadır. Özellikle karbonhidrat bakımından zengin besinler ile asparajın aminoasitlerince zengin besinlerde daha fazla miktarda ACR bileşiği oluştuğu bilinmektedir. Maillard esmerleşme reaksiyonu sonucunda asparajın amino asitinin şekerler, özellikle glikoz ve fruktoz ile reaksiyona girmesiyle ACR bileşiği meydana gelmektedir.^{166, 167}

Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı, ACR'yi insanlar için muhtemelen kanserojen olarak sınıflandırmıştır. 2001 yılında, Toksisite, Ekotoksisite ve Çevre Bilimsel Komitesi, ACR'nin nörotoksisite, genotoksisite, kanserojen ve üreme toksisitesi gibi doğal toksik özelliklerini ortaya çıkarmıştır.¹⁶⁷ ACR, hem insanlarda hem de laboratuvar hayvanlarında iyi belgelenmiş bir nörotoksik maddedir. İnsanların ACR'ye subkronik, düşük seviyeli mesleki maruziyeti, ataksi, iskelet kası zayıflığı, el ve ayaklarda uyuşma ile karakterize nörotoksisiteye neden olmaktadır. Laboratuvar hayvanlarında deneysel olarak oluşturulan ACR toksisitesi modellerinde sonucunda görülen klinik

bulgular birçok açıdan insanlarda meydana gelen toksisitede görülen bulgularla benzerlik göstermektedir.¹⁶⁸

ACR sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) tarafından metabolize edilmektedir. ACR metabolize olduktan sonra glisidamid metabolitine parçalanarak DNA ve proteinlerde hasar oluşturmaktadır.¹⁶⁹ ACR ve glisidamid metaboliti GSH ile konjuge edilerek uzaklaştırılır ve daha sonra idrarla atılır. Bu yüzden ACR toksisitesinde GSH düzeylerinin azaldığı görülmektedir.^{170, 171} Hem ACR hem de glycidamid, sülfhidril ve amino grupları gibi nükleofilik bölgelere karşı reaktiftirler. Bu bileşiklerin özellikle ACR'nin farklı organlarda mikronükleusları indükleyerek kanserojen etki yaptığı, plasental bariyeri geçerek anomalilere neden olduğu, yüksek dozlarda genetik mutasyonlara ve özellikle sinirsel nöropatlilere sebep olduğu bilinmektedir.⁷⁹ Ayrıca yapılan çalışmalarda ACR'nin nörotoksosite¹⁷², reproduktif tosisitesi¹⁷³, nefrotoksosite¹⁷⁴, hepatotoksosite¹⁷⁵ ve kardiyotoksositeye¹⁷⁶ neden olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, ratlarda çoklu organ toksisitesine neden olan ACR bileşiği ile indüklenen nörotoksosite modeli üzerine güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkili MEL'in etkileri araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda ACR nörotoksitesinde MEL olası etkileri lokomotor aktivite, oksidatif stres, nöroinflamasyon, ER stresi ve nöronal apoptozis ile immünohistokimyasal ve immünofloresan bulgular değerlendirildi.

ACR, düşük düzeydeki mesleki maruziyetleri insanlarda ve deney hayvanlarında benzer karakteristik özellikler gösteren iskelet kas kaybı, ataksi ve el-ayaklarda uyuşma ile karakterize nörotoksik belirtiler göstermektedir. ACR toksisitesinin ilk belirtileri hind limb paralizis olarak adlandırılan arka bacak felci şeklinde tanımlanmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda ACR toksisitesinde verilen doz ve güne bağlı olarak vücut ağırlığında azalma ve hind limb paralizisin olduğu görülmüştür.^{174, 177, 178} Yapılan bu çalışmada ise i.p. olarak 14 gün boyunca 50 mg/kg ACR uygulamasının sonucunda gelişen

nörotoksisite ile ratlarda Kontrol grubu ile kıyaslandığında ACR, MEL10+ACR ve MEL20+ACR gruplarında iskelet kası zayıflığı, vücut ağırlığında azalma ve hind limb paralizis oluşmuştur. Tablo 4.1.'de de görüldüğü gibi düşük doz MEL uygulamasının vücut ağırlığı üzerine çok az olumlu bir etkisi görüldü. Fakat yüksek doz MEL (20 mg/kg) uygulanan ratlarda ACR grubu ile kıyaslandığında vücut ağırlığının arttığı görülmüştür.

ACR, hem insanlarda hem de deney hayvanlarında nöronal hasar, ataksi, iskelet kas kaybı, hind limb paraliz, nöronal apoptozis, mitokondriyal disfonksiyon, mikrogliyalarda hasara sebep olmaktadır.^{168, 179} ACR nörotoksisitesin oluşum mekanizmaları hala araştırılmakta olan bir konudur. Sinir sisteminde gelişen hasar sonucu dejenerasyon, programlı hücre ölümleri ve hücrel mekanizmalarda anormallikler meydana gelmektedir. Bu toksik nöropatinin önemli özelliği uzun miyelinli sinir liflerinin distal aksonlarında hasarlar oluşturmalarıdır.^{21, 166} Merkezi sinir sisteminde gelişen hasarlar sonucunda çeşitli nörolojik kusurlar görülmektedir. Bu nörolojik kusurlar sonucunda hareket etme kabiliyetlerinde önemli düzeyde değişiklikler meydana gelmektedir. Hareketlerdeki değişiklikler nörolojik değişikliklerin göstergesi olabilir ve anormal beyin fonksiyonlarını yansıtabilmektedir. Anormal beyin fonksiyonları ise davranış ve hareket etme kabiliyetlerinde anormallikler meydana getirmektedir. LMA testi deneğin genel sağlık durumunu, stres düzeyini, anksiyete benzeri davranışları ve spontan hareketlerdeki değişiklikleri belirlemede kullanılan yöntemlerden biridir. Sağlıklı olmayan hayvanlar daha az hareket etme eğilimindedirler.^{88, 92} Deneysel çalışmalarda gözlemlenen stresin, beyin işlevi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu ve hem kısa hem de uzun vadeli davranış değişikliklerine yol açabildiği bilinmektedir.⁸⁹ Bu şekilde gelişen streslere hücrel ve davranışsal yanıt her zaman içeriğe bağlıdır ve çeşitli çevresel faktörler bireyin strese tepkisini şekillendirebilir.⁹⁰ Açık alan testlerinde en yaygın olarak kullanılan hareket tipleri stereotipik, ambulutuvar, horizontal ve vertikal hareketlerdir. Bu

hareketler ayrı ayrı değerlendirileceği gibi toplam LMA olarak da değerlendirilebilmektedir. Kaşınma, tırmalama ve kazma aktiviteleri gibi tek bir ışık demetini kesen aktiviteler stereotipik aktivite sayısı olarak kaydedilmektedir. Hayvanların aktivite kafesini terk etme çabaları ise ambulatuvar hareket sayısı olarak kaydedilmektedir. Horizontal harekette ise deneğin dikilme ve yer değiştirme hareketi yapmadan oldukları yerde yaptıkları hareketlerdir. Vertikal hareket ise arka ayakları üzerinde yaptıkları dikilme hareketi olarak değerlendirilmektedir.^{92, 162, 180}

ACR, perifer sinir sisteminin dejenerasyonu ve bazı beyin bölgelerinde hafıza merkezi dejenerasyonu nedeni ile öğrenme kaybı, uyuşukluk, serebellar ataksi, duyuşsal ve motor perifer polinöropatidir.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ ACR maruziyeti sonucunda motor alanlarda gelişen hasarmeydana gelmekte ve buna bağlı olarak lokomotor aktivitede değişimler görülmektedir. Bowyer ve ark.¹⁸⁵ ratlarda ACR ile indükledikleri nörotoksisite modelinde lokomotor aktivitede azalma, koordinasyon bozukluğu (uyuşuma ve hind limb paralizis) ve kilo alımının baskılandığını tespit etmişlerdir. Crofton ve ark.¹⁸⁶ doza bağımlı ACR maruziyeti ile oluşturdukları nörotoksisitede genel motor aktiviyi incelemişlerdir. Bu inceleme sonucunda ACR maruziyetinin hem merkezi hemde perifer sinirlerde hasara neden olarak, horizontal ve vertikal aktivitelerde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Zhang ve ark.¹⁸⁷ ACR bileşiği ile oluşturdukları nörotoksisitede hindlimb paralizise bağlı postür anomaliliği, ataksi, lokomotor aktivitede azalma, iskelet kas zayıflığı ve arka uzuv sürüklenmesi şeklinde genel davranış değişikliklerinin oluştuğunu bildirmişlerdir. Shukla ve ark.¹⁸⁸ ACR'nin lokomotor aktivite üzerinde yaptıkları çalışmada stereotipik aktivitede, kontrol grubu ile kıyaslandığında ACR grubunda önemli derecede azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada ambulatuvar aktivite ve distance/toplam mesafede de ACR grubunda önemli derecede azalma olduğu görülmüş ve protektif amaçlı *Acorus calamus* uygulamasının bu parametreler üzerinde terapötik

etkilerine işaret etmişlerdir. Benzer çalışmalarda da antioksidan ve antiinflamatuvar etkili bileşiklerin lokomotor aktivite üzerine koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir.^{181, 189} Yapılan bu çalışmada ise deney gruplarındaki ratların lokomotor aktivitesini değerlendirmek amacıyla stereotipik, ambulatuvar, distance, horizontal ve vertikal hareketler incelenmiştir. ACR enjeksiyonundan sonra yapılan açık alan testi uygulaması ile elde edilen LMA sonuçlarına göre ACR toksisite grubu LMA değerleri Kontrol grubu LMA değerlerine göre önemli derece azaldı. Şekil 4.1’de de görüldüğü gibi koruyucu amaçla kullanılan güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkili MEL bileşiğinin özellikle yüksek dozunun (20 mg/kg), ACR nörotoksitesine karşı koruyucu etki sağladığı ve buna bağlı olarak LMA düzeylerinin ACR toksisite grubundan yüksek olduğu ve kontrol ile farklılık oluşmadığı belirlendi. Fakat MEL yüksek dozunun vertikal aktivite üzerine etkisinin olmadığı görüldü. Bunun nedeni ise ACR’nin hind limb paralizi oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. MEL’in yüksek dozunun tek başına uygulamasının ise LMA üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı görüldü. Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6’da görüldüğü gibi Kontrol grubundaki ratlar açık alanda defalarca gezinirken ACR grubunda hareket çok azaldı. MEL20+ACR grubunda ise hareketlerde artışın olduğu görüldü. Tek doz MEL grubunda ise Kontrol ile paralel hareketler tespit edildi.

ACR ve benzeri bileşiklerin toksik etkilerinden dolayı insanlarda ve hayvanlarda birçok nörodejeneratif hastalığa neden olduğu bilinmektedir. Bu toksik bileşikler Parkinson, Alzheimer ve Huntington hastalığı gibi çeşitli beyin hasarlarına neden olabilirler. Bu bileşiklerin nöron hücrelerinde azalma, motor ve bilişsel fonksiyonlarda hasar, hücrel enerji azlığı ve anormal protein agregasyonu yoluyla bu tip hasarlara neden olabilmektedirler.^{166, 190} Hücrel enerji; genellikle enerji metabolizması, kalsiyum homeostasisi, lipid biyosentezi ve apoptozis gibi birçok hücrel işleyiş için önemli bir

organel olan mitokondri içerisinde oksidatif fosforilasyon yoluyla üretilir. Hücrel enerji için gerekli olan ATP'nin üretimi ve oksidasyonunda, serbest radikaller, ROS, reaktif nitrojen türleri ve karbon-sülfür türleri meydana gelmektedir.^{101, 191} Yapılan çalışmalarda ROS artışı tüm hücrel biyomakromolekülerin; lipid, karbonhidratlar, proteinler ve polinükleotitlerin hasarına neden olduğu bilinmektedir. Artan ROS miktarı oksidan ve antioksidan dengesini bozduğu ve hücrel işleyişi engellediği bilinmektedir.^{191, 192} ACR bileşiği özellikle sinir sisteminde oksidan ve antioksidan mekanizmaları etkilemekte ve bu mekanizmaları bozarak hücrel hasara neden olmaktadır.⁷⁵ Sinir sisteminde hücrel olayların gelişebilmesi için prooksidan-antioksidan homeostasisinin sağlanması gerekmektedir. Sinir iletiminin oluşumu, nörotransmitter üretimi ve çeşitli hücrel reseptörlerin ekspresyon seviyelerinin değişimi, apoptozisin gelişimi gibi çeşitli hücrel fonksiyonların ROS tarafından etkilendiği bilinmektedir.¹⁹³ ACR ve bazı benzeri bileşikler bu antioksidan homeostasisini bozarak, ROS üretiminin artışına neden olmaktadır. Enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemi normal şartlarda üretilen ROS'u temizleyerek oksidan-antioksidan dengesini korumaktadır. Artan ROS miktarı ise sinir hücrelerinin normal fonksiyonlarını engellemektedir.^{194, 195} ACR dâhil çeşitli kimyasal ajanlar ROS miktarını arttırdığından bu denge bozulmakta ve oksidatif stres gelişmektedir.¹⁹⁶ Beyin dokusundaki yüksek metabolik hız düşük hücrel yenilenme kapasitesi ve yüksek düzeyde çoklu doymamış yağ asitleri bu dokunun ROS'a diğer dokulardan çok daha duyarlı olmasına neden olmaktadır.¹⁹⁷ Hücrelerin membran yapısında bulunan ve hücrel hasarda peroksidasyona uğrayıp hücrel hasarın ilk belirteci lipidlerdir. Özellikle membran fosfolipitleri gibi çoklu doymamış yağ asilerinin lipid peroksidasyonu, ROS aracılı oksidatif bozulma sonucunda oluşmaktadır. Hücrel reaksiyonlar sonucu lipid radikalleri ile moleküler oksijenin birleşmesi sonucunda lipid peroksit radikalleri oluşmaktadır. Bu radikaller hidrojen atomlarını alarak lipid

hidroperoksitleri oluşturmaktadır ve bu şekilde bu reaksiyon kendi kendini katalizlemektedir.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Oluşan oksidatif stres lipid peroksidasyonunu arttırarak MDA düzeyinde artışa neden olmaktadır. ACR ile indüklenen nörotoksisite modellerinde oksidatif stres sonucu gelişen MDA miktarının arttığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.^{103, 201, 202} Yapılan bazı çalışmalarda hem in vivo hem de in vitro deneyler ACR'nin nörositlerde oksidatif stresi indüklediği bildirilmiştir.^{203, 204} Mehri ve ark.¹⁰³ yaptıkları bir çalışmada 50 mg/kg dozunda ACR uygulamasının beyin dokusunda lipid peroksidasyonunu uyarması sonucunda MDA düzeyinin arttığını ve GSH miktarında ise önemli derecede azalmanın olduğunu rapor etmişlerdir. Acaroz ve ark.²⁰¹ yaptıkları çalışmada ACR ile oluşturulan multi-organ toksisitesinde MDA düzeyinin arttığı ve antioksidan ve antiinflamatuvar etkili boron bileşiğinin MDA düzeyinde azalmaya neden olduğunu göstermişleridir. Bazı araştırmacılar²⁰⁵⁻²⁰⁷, benzer şekilde güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar bir bileşik olan MEL'nin oksidatif stres sonucu oluşan artmış MDA düzeyini azaltarak beyin dokusunu hasara karşı koruduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, Şekil 4.7.A'da da görüldüğü gibi 50 mg/kg ACR ile oluşturulan nörotoksisitede, ACR'nin nöronal lipid peroksidasyonunu indükleyerek MDA seviyesinde artışa sebep olduğu ve MEL'in özellikle 20 mg/kg dozunun MDA düzeylerindeki ACR kaynaklı artışı önemli düzeyde önlediği belirlendi.

Hücrel olaylarda önemli bir non-enzimatik antioksidan olan GSH, kimyasal olarak sistein, glutamik asit ve glisin amino asitlerinden oluşan tripeptittir. Ayrıca GPx için önemli bir substrattır. Bu nedenle hem GSH hem de GPx lipid peroksidasyonunu inhibe edebilirler. Yapılan çalışmalarda ACR'nin absorpsiyonundan sonra metabolizması için özellikle iki yol olduğu gösterilmiştir. Birincisi glutatyon-S-transferaz enziminin aktivitesi ile GSH birleşerek veya ikinci yol olarak, CYP2E1'in oksidasyonu ile Glisidamid bileşiğine dönüştüğü gözlemlenmiştir. Daha sonra glisidamid yine transferaz

enziminin aktivitesi ile GSH birleşerek veya epoksi hidrolaz enzimleri ile N-asetil-S sistein konjuge türevine dönüştürülerek vücut dışına atıldığı gösterilmiştir.⁷⁵⁻⁷⁸ ACR kaynaklı oksidatif strese genellikle GSH depoları tükenir. Bunun nedeni ise ACR'nin toksik olmayan formuna dönüşümü sırasında GSH kullanarak miktarının azaltılmasıdır.¹⁹⁷ ACR'nin beyin dokusunda GSH düzeyini azalttığı bu nedenle nörotoksisiteye neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^{104, 105, 205} Bu çalışmada ise belirtilen literatürlere paralel olarak ACR toksisitesi sonucu beyin dokusunda gelişen oksidatif strese bağlı olarak GSH düzeyinin azaldığı belirlendi. Bazı araştırmalarda ise MEL'nin antioksidan etkiliği ile oksidatif stresi önlediği ve GSH miktarını yükselttiği bildirilmiştir.^{206, 207} Sunulan bu çalışmada, Şekil 4.7.B'de de görüldüğü gibi ACR grubunda GSH miktarı azalırken; MEL'in yüksek dozunun antioksidan etki sağladığı ve ACR'nin sebep olduğu GSH düzeyindeki azalmayı önlediği belirlendi.

SOD, süperoksit radikallerine karşı ana savunma sistemini oluşturur. Ayrıca oksidatif strese karşı ilk savunma hattıdır. SOD, süperoksit anyonunun (O_2^-) dismutasyonunu sağlar ve H_2O_2 formatını katalize eden bir enzim grubunu temsil eder. Oluşan hidrojen peroksit ise GPx ve KAT enzimlerinin reaksiyonları ile su ve moleküler oksijene indirgenir.²⁰⁸ Hücre sitozolünde ve mitokondride bulunan GPx, H_2O_2 'yi suya dönüştürme yeteneğine sahiptir. Bu reaksiyonu yapabilmesi için GSH'a ihtiyacı vardır. GSH ile hidrojen peroksiti parçaladıktan sonra GSH oksitlenmiş glutatyonla dönüşmektedir.²⁰⁹ GPx ve KAT, H_2O_2 üzerinde aynı etkiye sahiptir, ancak GPx, yüksek ROS konsantrasyonunda daha verimlidir ve KAT daha düşük H_2O_2 konsantrasyonunda da önemli bir etkiye sahiptir. Toksik maddeleri detoksifiye edebilen KAT peroksizomlarda bulunan enzimatik antioksidanlardan biridir.²¹⁰ ROS artışı ile oksidan ve antioksidan dengenin bozulması hücre içi bu enzimatik antioksidanların işlevlerinin azalmasına neden olmaktadır. Goudarzi ve ark.¹⁸⁹ yaptığı bir çalışmada ACR uygulaması

sonucu ratlarda gelişen nörotoksisitede ellagic asitin koryucu etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları inceleme sonucunda ACR kaynaklı oksidatif stresin geliştiği ve SOD, GPx ve KAT enzimlerinin aktivitelerinin ACR grubunda önemli miktarda azaldığı ve koruyucu amaçlı uyguladıkları ellagic asitin bu enzimlerin aktivitelerini artırarak nörotoksisiteye karşı koruma sağladığını göstermişlerdir. Motallebzadeh ve ark.²¹¹ ratlarda radyasyon ile indükledikleri oksidatif stres ve apoptozis üzerine güçlü antioksidan özelliği olan MEL bileşiğinin nöroprotektif koruyuculuğu değerlendirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada radyasyon ışımasının ROS artışına neden olduğu ve beyin hücrelerinde gelişen hasar sonucu oksidatif enzimlerin inaktivasyonuna sebep olarak SOD, GPx ve KAT aktivitelerinin azaldığını belirlemişlerdir. MEL uygulamasının ise oluşan oksidatif stresi azalttığını ve nöroprotektif etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise 50 mg/kg ACR uygulaması sonucunda ratlarda gelişen nörotoksisitede SOD, GPx ve KAT aktivitelerinin azaldığı belirlendi. MEL'nin yüksek dozunun oksidatif hasarı engelleyerek bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmayı önlediği tespit edildi (Şekil 4.8)

İnflamasyon, vücudu korumayı ve savunmayı amaçlayan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir tepkisidir. İnflamatuar yanıt, hem lokal hem de sistemik bir yanıt üreten, çeşitli hücre tiplerinin ve sinyal moleküllerinin mobilizasyonu ve etkileşimi ile düzenlenir.¹¹² Nöroinflamasyon; nöronlar, makroglia ve mikroglialar dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi içinde bulunan tüm hücreleri içeren bir yanıttır. İnflamasyon oluşumu sırasında çeşitli sinyal yolları aktif hale getirilerek bazı sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanmasını sağlamaktadır. Organizmada yabancı bir made bulunduğu zaman mikroglialar PI3K/AKT, MAPK ve mTOR sinyal yollarının aktivasyonu ile NF-κB'nin aktivasyonunu sağlamaktadır.²¹² NF-κB'nin aktivasyonu daha sonra proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve indüklenebilir enzimlerin, yani iNOS ve COX-2'nin üretimine aracılık eder ve bunların hepsi birlikte nöroinflamasyona neden

olur.^{111, 212}

İnflamasyon ile aktive olan mikrogliya, dendritik ve T lenfositleri gibi bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan primer proinflamatuvar sitokin olan TNF- α nöroinflamasyona aracılık eden sitokinlerin dizisini başlatır. TNF- α hem inflamasyon hemde apoptozis düzenlenmesi ile ilişkisi bulunmaktadır.²¹³ TNF- α hücre reseptörüne bağlandığı zaman hücrenin hayatta kalması için proinflamatuvar genlerin ekspresyonunun artmasını veya hücrede apoptozis ile ilgili genlerin ekspresyonunu arttırarak faaliyetlerinin durdurulmasını sağlamaktadır. TNF- α ayrıca hastalıkların patogenezinde de rol oynamaktadır.²¹⁴ Edres ve ark.²¹⁵ ACR ile indükledikleri nörotoksistide allicin ve MEL uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. MEL uygulamasının ACR kaynaklı ROS üretimini, inflamasyonu ve mitokondriyal hasarı azalttığını ve antioksidanların düzeyini arttırdığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, ACR uygulamasının ise TNF- α ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığını belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise Mehri ve ark.²¹⁶ PC12 hücrelerinde ACR ile indükledikleri sitotoksistide inflamasyonun oluştuğu ve TNF- α ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada elde edilen verilerin literatürle uyumlu olduğu, ACR uygulaması sonucu beyin dokusunda TNF- α ekspresyonunda önemli düzeyde artış olduğu ve MEL'nin özellikle yüksek dozunun antiinflamatuvar etki göstererek TNF- α düzeylerini azalttığı belirlendi.

Monositler tarafından indüklenen IL-1 β inflamatuvar ve immün yanıtın başlamasında en temel etkidir. Esas olarak kan monositleri ve doku makrofajları tarafından üretilen IL-1 β , hem akut hem de kronik inflamasyona aracılık etmede rol oynamaktadır. Endotel hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri, nöronlar, Schwann hücreleri, astrositler ve mikrogliyalardan salgılanabilir. Proinflamatuvar sitokin olan IL-1 β çeşitli hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde önemli bir mediatör ve apoptozis aracılı hücre sağkalımını düzenlemektedir. Hücrelerin poliferasyonunu ve anjiyogenez

üzerine de etkilidir.^{217, 218} Elhelaly ve ark.²¹⁹ ACR ile indükledikleri karaciğer, böbrek ve beyin hasarı üzerine hesperidin ve diosminin koruyucu etkilerini araştırmışlardır. ACR toksisite grubunda IL-1 β düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Tyagi ve ark.²²⁰ yaptıkları nörotoksisite modeli ile ratlarda oksidatif stres ve nöroinflamasyonu Lipopolisakkarit ile indüklemişler, tedavi amacıyla verdikleri MEL uygulamasının ise IL-1 β düzeyindeki artışı önlediğini rapor etmişlerdir. Sunulan bu çalışmada ise bulguların literatür ile uyumlu olduğu, ACR grubundaki ratların IL-1 β seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli derecede yükseldiği MEL'nin (MEL20+ACR) özellikle yüksek dozunun IL-1 β ekspresyonunu baskıladığı, düşük doz MEL'nin (MEL10+ACR) ise daha az etkili olduğu belirlendi (Şekil 4.9 B).

İnflamasyonda ve yaralanma sırasında, mikroorganizmaların bileşenleri ve hücre metabolitleri, IL-6 ve ilgili sitokinlerin üretimini uyarmaktadır. Bu maddeler, hızlı ve etkili bağışıklık aktivasyonu, mikroorganizmaların ortadan kaldırılması ve doku onarımı için gerekli olan bir proinflamatuvar sinyali oluşturur.²²¹ Pleiotropik sitokin IL-6, hepatik akut faz reaksiyonunu, hematopoezi, antikör sekresyonunu ve T hücrelerini yönettiği için bu süreçlerde kritik bir rol oynar. Bu tip sinyaller ile aktivasyon, metabolik ve endokrin reaksiyonların patojenik mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasını, yara iyileşmesini, enfeksiyon hastalıkları ve travmadan kurtulmayı destekler.²²² Ayrıca IL-6 ve reseptörleri, vücut sıcaklığının ve gıda alımının düzenlenmesine katılan yapılar olan medial preoptik çekirdek ve medial hipotalamus dâhil olmak üzere sıçan beyninde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, IL-6 reseptörü (IL-6R) mRNA'sı bu bölgelerle sınırlı değildir ve hipokampus ve korteks serebrinin farklı loblarında da bulunmuştur. IL-6 ve IL-6 reseptör sinyal iletim mekanizmasının bağışıklık düzenlemesi, hematopoez, iltihaplanma ve onkogeneze üzerine de etkileri vardır.^{223, 224} Abou zaid ve ark.²²⁵ tarafından yapılan bir çalışmada ACR ile indükledikleri nörotoksistide inflamasyonun şekillendiği ve buna

bağlı olarak IL-6 düzeylerinde bir artışın olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer çalışmalarda da çeşitli toksisite modellerinde IL-6 düzeylerinin inflamasyona bağlı olarak arttığı ve çeşitli terapötik ve antioksidan etkili bileşiklerin preinflamatuvar sitokinlerin düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir.^{174, 226, 227} Yapılan bu çalışmada ise, Şekil 4.10.A'da görüldüğü gibi ACR'nin beyin dokusunda IL-6 düzeylerinde artışa neden olduğu ve MEL'in yüksek dozunun IL-6 düzeyindeki artışı önemli düzeyde önlediği belirlendi.

NO vücutta birçok önemli fizyolojik işlevi olan ve sinir sisteminde hücreler arası bir sinyal molekülüdür. NO, NOS tarafından L-arginin ve moleküler oksijenden enzimatik olarak üretilir ve nNOS, iNOS ve eNOS formları ile düzenlenir. Nöronal izoformu, kalsiyum/kalmodulin tarafından aktive edilen nNOS enzimi tarafından üretilir. NOS memeli beyninden izole edilmiş ve nöronlardaki lokalizasyonu nedeniyle nNOS olarak adlandırılmıştır. NO bir nöromodülatör olarak işlev gördüğünde, uyku, iştah, vücut ısısı, sinir salgısını, sinaptik plastisiteyi, nörogelişimi ve gen ekspresyonunu dahil birçok işlevi bulunmaktadır. Ayrıca NO'nun kas kontraktilesini ve yerel kan akışını kontrol ettiği de bilinmektedir. nNOS aktivitesi öncelikle kalmodulin bağlanması yoluyla nNOS'u aktive eden hücre içi Ca^{2+} daki artışlarla düzenlenir. nNOS aktivitesi sonucunda NO sentezinde artış görülmektedir. NO, normal homeostatik sınırlar içinde belirtilen fizyolojik fonksiyonları yerine getirirken; nNOS'un indüklenmesi sonucu NO miktarında aşırı artış görülmesi yüksek reaktif türlerinin oluşumu, peroksinitrit türlerinin artışı, reaktif nitrojen türlerinin oluşumu ve kararlı nitrozotiyollerin oluşumuna sebep teşkil etmektedir. Bu zararlı reaktiflerin artışı dönüşümsüz hücre hasarı, nöronal hücre ölümleri, ekzotoksisite, iskemi, parkinson ve depresyon gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır.²²⁸⁻²³⁰ Yapılan çalışmalarda nNOS'un artışına bağlı olarak oluşan NO; nöroinflamasyona neden olduğu ve sonuç olarak nöronlarda hasar oluştuğu bildirilmiştir.^{231, 232} Yapılan farklı çalışmalarda ACR bileşiğinin toksik etkisi ile nNOS

seviyelerindeki artış sonucu özellikle beyin ve çeşitli dokularda hasar meydana geldiği belirlenmiştir.²³³⁻²³⁵ Ayrıca farklı bileşiklerle oluşturulan nörotoksisite sonucunda da nNOS seviyelerinde artışın gözlemlendiği ve protektif amaçlı kullanılan bileşiklerin bu artışı inhibe ettiği bildirilmiştir.^{195, 236-238} Bu çalışmada ise 50 mg/kg ACR uygulaması sonucunda oluşan nörotoksisitede nNOS seviyelerinde artışın olduğu (Şekil 4.10 B) ve protektif amaçlı uygulanan MEL bileşiğinin yüksek dozunun (MEL20+ACR) nNOS seviyesindeki artışı önemli düzeyde önlediği, fakat düşük doz MEL uygulamasının ise yüksek doz kadar etkili olmadığı belirlendi.

AChE, esas olarak nöromüsküler kavşaklarda ve kolinerjik beyin sinapslarında bulunan bir serin hidrolazdır. Asetilkolin nörotransmitterini, asetat ve koline hızlı hidrolizi ile kolinerjik sinapslarda sinyal iletiminin sonlandırılmasını sağlamaktadır.²³⁹ Ayrıca yapılan çalışmalarda AChE enziminin, sinir sistemi boyunca morfometrik süreçler, hücre farklılaşması ve sinaptogenez gibi kolinerjik olmayan fonksiyonlarda da rol oynadığını öne sürülmüştür. AChE enzimi her türlü iletken doku, sinir ve kas, merkezi ve perifer dokular, motor ve duyuşal lifler, kolinerjik ve kolinerjik olmayan olarak adlandırılan sempatik ve parasempatik lifler ile hücre gövdelerinin ve bağlantılarının bulunduğu tüm bölgelerde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır.²⁴⁰ Kolinerjik nöronlar cerebral kortekste hafıza fonksiyonu ve öğrenme olaylarında çok önemlidir ve AChE enzimi bu olaylarda önemli rol oynamaktadır. Kolinerjik nöronlar öğrenme ve hafıza, omurilik sıvısının oluşumu, pH seviyeleri, iyonik bileşiklerin düzenlenmesi, hücresel reaksiyonlar, nörogenesis ve bikarbonat üretimi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir.¹⁹⁵ AChE enzim aktivitelerindeki artışın kolinerjik nöronların hasarına neden olduğu bilinmektedir. Oluşan hasar nedeni ile asetilkolin seviyelerinde de azalmalar görülmektedir. Bu yüzden AChE enzimi nörotoksisite çalışmalarında önemli bir biyomarkır olarak kabul edilmektedir.²⁴¹ AChE'nin aşırı aktivasyonu, daha hızlı asetilkolin degradasyonuna ve

sonuç olarak, çeşitli kolinerjik ve kolinerjik olmayan fonksiyonların azalmasına neden olan asetilkolin reseptörlerinin stimülasyonunun azalmasına yol açar.^{242, 243} Sinaptik yarıktaki asetilkolin seviyelerinde bir azalma, ilerleyici bilişsel bozulmaya ve muhtemelen diyabetik nöropati veya diğer nörodejeneratif bozukluklarda görüldüğü gibi nörolojik işlev bozukluklarına da sebep olur.²⁴²⁻²⁴⁴ AChE aktivitesindeki artışın hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve oksidatif hasara neden olarak apoptozisi teşvik ettiği bildirilmiştir.²⁴⁵ Yapılan farklı çalışmalarda da görüldüğü gibi ACR'nin AChE enzim aktivitesinde artışa sebep olduğu, bu yüzden kolinerjik nörotransmisyonunda azalmamının gözlemlendiği ve dokularda hasar meydana geldiği rapor edilmiştir.^{215, 225, 246, 247} Farklı toksik ajanlarla yapılan çalışmalarda AChE enzim aktivitelerindeki artışın gözlemlendiği ve protektif amaçlı kullanılan bileşiklerin bu artışı inhibe ettiği de bildirilmiştir.^{215, 236, 246-248} Sunulan bu çalışmada ise ACR grubundaki ratların AChE enzim aktivite seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli derecede yükseldiği MEL'nin (MEL20+ACR) özellikle yüksek dozunun AChE enzim seviyesindeki artışı önlediği, düşük doz MEL'nin (MEL10+ACR) ise bu artışı önlediği fakat yüksek doz MEL kadar etkili olmadığı ve elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğu belirlendi (Şekil 4.11 A).

Epinefrin, norepinefrin, serotonin ve dopamin en önemli monoamin nörotransmitterleridir. Monoamin nörotransmitterlerinin katabolizmasında görevli enzimlerden biri MAO enzimidir. Beyinde MAO enzimi ile çeşitli amin nörotransmitterlerinin oksidatif deaminasyonunu katalize eder ve bu işlem sonucunda yan ürün olarak H_2O_2 açığa çıkar.²⁴⁹ Açığa çıkan bu yan ürün ise oksidatif stresin ve indüklenen lipid peroksidasyonunun önemli kaynaklarından biridir.²⁵⁰ Toksikite durumlarında MAO enzim aktivitesi artar ve monoamin nörotransmitterlerinin katalizi sonucunda açığa çıkan H_2O_2 , mitokondriyal oksidatif mekanizmaları aktif hale getirmektedir. Bu şekilde ROS'un oluşumuna neden olarak mitokondriyal elektron

taşıma zincirinde hasara neden olarak aşırı kalsiyum birikmesi görülmektedir. Bu olaylar zinciri ise apoptozise sebep olan hücresel kaskadları aktif hale getirir.²⁵¹ Monoaminlerin aşırı parçalanması ile bu bileşiklerin birikimine neden olmakta ve buda hücresel savunma mekanizmalarında hasar oluşturmaktadır.²⁵² Monoamin nörotransmitterleri, korteks serebri, bazal ganglionlar, limbik alanlar ve omurilikte yaygın olarak yer almaktadır. Hafıza, ruh hali, hareket, davranış, kan basıncının düzenlenmesi gibi otonomik fonksiyonlar ile beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Bu merkezlerde gelişen hasar nedeniyle nöronların fonksiyonlarını yerine getirememesi sonucu alzheimer ve parkinson hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklar görülebilmektedir.²⁵³ Yapılan çalışmalarda farklı toksik ajanlarla oluşturulan nörotoksisite modellerinde MAO enzim aktivitesinde bir artışın olduğunu göstermiş ve çeşitli flavonoid bileşiklerle bu artışın inhibe olduğu rapor edilmiştir.^{250, 254, 255} Sunulan bu çalışmada ise Şekil 4.11 B’de görüldüğü gibi ACR grubunda MAO miktarı artarken MEL20+ACR grubunda ise düştüğü ve Kontrol ve MEL20 gruplarına yakın bir değerde olduğu belirlendi. MEL10+ACR grubunda da MAO enzim düzeylerinde düşüşün olduğu fakat yüksek doz MEL kadar etkili olmadığı belirlendi.

Vezikül, tübül ve sisternalardan oluşan membrana bağlı bir organel olan ER; fizyolojik olarak protein sentezi, proteinlerin katlanması, üç boyutlu yapı kazanmalarını sağlama, taşınması, lipid biyosentezi ve kalsiyum homeostasisinin korunmasını sağlayan önemli bir organeldir. Aynı zamanda proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonu (N-bağlı glikosilasyon) sağlar ve bir sinyal organeli olarak kabul edilir. Çeşitli patolojik koşullar altında bu fonksiyonlarını yerine getiremezse ER stresi oluşmakta ve aşırı protein üretimi ve yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonuna neden olmaktadır. Oksidatif stres, inflamasyon, toksisite durumları ve proteinlerin yanlış katlanması gibi çeşitli etkenler ER stresinin oluşumuna sebep olmaktadır.²⁵⁶ Katlanmamış, yanlış katlanmış, mutasyona

uğramış proteinlerin birikmesi,²⁵⁷ hücrel redoks durumundaki bozukluklar ve ROS artışı,²⁵⁸ hipoksi,²⁵⁹ kalsiyum düzenlenmesindeki sapmalar,²⁶⁰ viral enfeksiyonlar,²⁶¹ ER stresine neden oldukları, ER homeostasisini bozdukları ve işlevini baskıladıkları yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir. ER stresi sonucunda Alzheimer, Parkinson hastalığı, amiotrofik lateral skleroz (ALS), poli glutamin hastalıkları, iskemi, ateroskleroz, bipolar bozukluk, prion hastalıkları, kanser, diyabet, oto immün hastalıkları ve kardiyovasküler bozukluklar meydana gelmektedir.²⁵⁶ Ayrıca ER stres inhibisyonunun nöronal hasara,²⁶² iskekiye²⁶³ ve kardiyovasküler hastalıklara²⁶⁴ karşı koruma sağlayabileceğini gösteren çeşitli çalışmalarda mevcuttur. ER stresi sonucu hücrel cevaplar, katlanmamış protein yanıtı olarak adlandırılan UPR sinyallerinin aktif hale gelmesine, protein sentezinin azalmasına ve ER’de protein katlama kapasitesinin artmasına sebep olur. Yanlış katlanmış protein tepkisi olarak da bilinen ER ile ilişkili bozunma (ERAD) olarak adlandırılan sinyal yolu, yanlış katlanmış proteinleri spesifik olarak tanıır ve onları ER zarından sitozole doğru hareket ettirerek sitoplazmada onları yok eder.^{37, 265} UPR sinyal yolları indüklenirse, ERAD kapasitesinin arttığı, ERAD’ın kaybı UPR’yi indüklediği ve bu iki sinyal yolağının birlikte inhibisyonu ise hücrelerin, nöronların canlılığını büyük oranda azalttığı ve apoptozise neden olduğu bilinmektedir.²⁶⁵ Bu çalışmada üzerinde durulan ER stresini oluşumu sırasında aktive olan UPR sinyal yolları; PERK, ATF6 ve IRE1 dir. Bu üç sinyal transmembran protein reseptörleri ER homeostasisinde önemli rol oynamaktadır. ER stresinin olmadığı veya bazal koşullarda olduğu durumlarda, ER şaperonu olan immünoglobulin ağır zincir bağlayıcı protein (BIP)/GRP78; UPR’nin üç sinyal yolağı olan PERK, ATF6 ve IRE1 reseptörlerine bağlanarak onları inhibe etmektedir. ER stresi durumunda ise GRP78, üç UPR reseptöründen ayrılır ve katlanmamış/yanlış katlanmış proteinlere bağlanır. Böylece ER stresinin oluşan stresin ortadan kaldırılması için uyarlanabilir sinyal olaylarını başlatılmaktadır.^{266, 267} Bu ve

ark.²⁶⁸ HepG2 hücre hattında ACR ile indükledikleri ER stresi sonucu GRP78 gen ekspresyon seviyelerinin arttığını bildirmişleridir. Hong ve ark.²⁶⁹ ACR ile indükledikleri ER stresinde GRP78 ekspresyonunun doza bağımlı olarak arttığını ve rosmarinik asit uygulamasının GRP78 ekspresyonundaki artışı önleyerek ER stresinin azalttığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada elde edilen bulguların literatürle uyumlu olduğu, ACR uygulamasının beyin dokusunda ER stresini indüklediği ve buna bağlı olarak GRP78 gen ekspresyon seviyelerinin arttığı belirlendi. MEL'in her iki dozunun GRP78 gen ekspresyon düzeylerindeki artışı inhibe ettiği, MEL10+ACR grubunda GRP78 gen ekspresyon düzeyinin kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ve MEL20+ACR grubunda ise kontrolden farklı olmadığı belirlendi (Şekil 4.12).

GRP78'in neden olduğu inhibisyonun ortadan kalkması PERK'in dimerizasyonu, otofosforilasyonu ve aktivasyonuna neden olur. Aktif PERK, eIF2 α 'nın fosforilenmesini sağlayarak genel protein translasyonunu inhibe eder.¹³³ eIF2 α , ER'de biriken katlanmamış proteinlerin miktarını azaltmak için genel protein translasyonunu inhibe ederek hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Ayrıca eIF2 α fosforilasyonu ile ribozomda bazı spesifik genleri etkileyebilmektedir.²⁷⁰ Hücrenin hayatta kalmasına yönelik ve UPR için merkezi olan birkaç genin ekspresyonunu indükleyen ATF4'ün, translasyonu eIF2 α 'nın fosforillenmesi ile translasyonu şekillenmektedir.²⁷¹ ATF4'ün upregülasyonu amino asit metabolizmasında, redoks reaksiyonlarında, stres tepkisinde ve protein salgılanmasında yer alan genleri indükleyerek hücrenin hayatta kalmasını destekler. ATF4 tarafından indüklenen genlerin tümü anti-apoptotik değildir. İndüksiyonu güçlü bir şekilde ATF4'e bağlı olan CHOP'un, apoptozisi indüklediği bilinmektedir.^{126, 271} PERK aktivasyonu hücrenin hayatta kalması için koruyucudur fakat stresin devam etmesi ve artması sonucu ölüm kaskadlarının aktivasyonuna yol açan sinyaller üretmektedir. Ayrıca PERK aktivasyonu NF-kB aktivasyonuna neden

olmaktadır. Yapılan çalışmalarda NF- κ B'nin aktive olması NO üretimine, proinflatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) üretimine, ROS ve eksitotoksinlerin miktarının artması ile hücre ölümlerinin şekillenmesine sebep olmaktadır.²⁷² Ayrıca PERK'in substratlarından biri olan Keap1 fosforile olur ve Nrf2'yi inhibisyonundan kurtararak antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu düzenler.^{24, 272} Tüm bu sinyal yollarının aktivasyonun amacı hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktır. ER'de stresin devam etmesi sonucu aktive olan PERK- eIF2 α -ATF4 sinyalleri sonucu çekirdekte CHOP ekspresyonu artar ve buna bağlı olarak hücre apoptozise gider. Yapılan literatür çalışmalarında; Komoike ve ark.³⁸ ACR'nin doza bağlı uygulaması ile oluşan ER stresi sonucu PERK aktivasyonunun ve ATF4 ekspresyon miktarının arttığını bildirmişlerdir. Yuan ve ark.²⁷³ yaptıkları bir çalışmada kadmiyum bileşiğinin doza bağlı uygulamasının rat kortikal nöronlarında ER stresini indüklediğini ve ER stresi sonucu GRP78 gen ekspresyonunda artışın olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca PERK/eIF2 α fosforilenmesi sonucu ATF4 seviyelerinin arttığını ve bunun sonucu olarak CHOP ekspresyonunun arttığını, protektif amaçlı uyguladıkları alfa lipoik asidin bu parametrelerdeki artışı önlediğini tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada 50 mg/kg ACR ile indüklenen nöronal ER stresinde GRP78'in artması sonucu, PERK/eIF2 α aktivasyonu ile ATF4 gen ekspresyonunun arttığı belirlendi. ATF4 gen ekspresyon seviyelerindeki artışı MEL'in doza bağımlı olarak önlediği ve özellikle yüksek dozunun artan ATF4 ekspresyon düzeyini baskılayarak apoptozisin şekillenmesini önlediği tespit edildi (Şekil 4.13).

GRP78, ER membranında ATF6 sinyal yolağına bağlı haldedir ve bu sinyal yolağının inaktif durumda olmasını sağlar. Ancak ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin açığa çıkması durumunda ATF6 sinyal yolağından ayrılarak bu proteinlere tutunur. GRP78 ATF6'dan ayrıldıktan sonra, ATF6'nın golgiye translokasyonunu sağlayarak golgide site-1 ve site-2 protezlar tarafından aktif formuna

dönüşümü sağlar.¹²⁶ Aktive ATF6, hücrenin çekirdeğine geçerek UPR’de yer alan proteinlerin gen ekspresyonlarını düzenlemek için ER stres yanıt elemanı (ERSE) genlerinin ve diğer transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indükler. Bu genler kısaca ER şaperonları olarak adlandırılmaktadır.²⁵⁶ Bunlar arasında protein disülfid izomeras, GRP78, GRP94, CHOP ve XBP1 yer almaktadır. XBP1, IRE1 sinyalleşmesinde ana mediatör olarak aktif rol oynamaktadır.¹³³ ATF6, IRE1 sinyal yolağı aracılığı ile de hücrelerin hayatta kalabilmesi yönünde sinyaller üretmektedir.²⁴ Hücrede belli düzeye kadar ATF6 ekspresyonu hücrenin hayatta kalması yönünde sinyaller oluşmasına sebep olurken, ATF6’nın aşırı ekspresyonu ER şaperonu olan CHOP mRNA ekspresyonunu indükler ve buna bağlı olarak hücre apoptozise gider.^{274, 275} ATF6 hücrenin hayatta kalması yönünde sinyaller üreterek UPR ve ERAD genlerini indükler, şaperonların artışına, aminoasit metabolizmasına, lipid biyosentezine ve oksidatif strese karşı tepki oluşturarak ER stresini baskılar.²⁷⁶ Xia ve ark.³⁶ yaptıkları çalışmada rat kortikal nöronlarda gadolinyum uygulaması ile ER stresini indüklemişler ve toksisite grubunda ATF6 ekspresyonunun arttığı rapor etmişlerdir. Shati²⁷⁷ yaptığı çalışmada kadmiyum klorid uygulaması sonucu hipokampal ER stresini oluşturmuş ve ATF6 ekspresyon seviyesinin toksisite grubunda arttığını belirtmiştir. Yine bu çalışmada protektif olarak uyguladığı resveratrol bileşiğinin, oluşan ER stresini inhibe ettiği, ATF6 ekspresyonundaki artışı önlediğini tespit etmiştir. Yapılan bu çalışmada ise ACR uygulaması sonucu gelişen nöronal ER stresine bağlı olarak ATF6 mRNA gen ekspresyon seviyesinin ACR grubunda diğer gruplara göre önemli düzeyde arttığı belirlendi. ACR kaynaklı ATF6 gen ekspresyon düzeylerindeki artışı MEL’in doza bağımlı olarak önlediği tespit edildi (Şekil 4.14).

IRE1, GRP78 tarafından aktif hale getirildiğinde benzer şekilde oligomerize olmaktadır. IRE1, bir serin-treonin kinaz alanına ve bir endoribonükleaz alanına sahip

olan çift aktiviteli bir enzimdir.¹²⁷ IRE1 aktivasyonu ile endoribonükleazın işlevi ATF6 tarafından indüklenen XBP1 mRNA'sından 26 nükleotidlik bir intronunu uzaklaştırmaktadır. Bu şekilde oluşturulan yeni varyant sXBP1 kararlı aktif bir transkripsiyon faktörüdür. Genellikle hücre çekirdeğine transloke olduğunda ER şaperonlarını, HSP40 ailesi üyelerini, ERSE, ERAD ve UPR ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini düzenleyebilmektedir. Bu düzenlemeler sayesinde ER'de gelişen stresin ortadan kaldırılmasını ve hücrenin hayatta kalması yönünde sinyallerin meydana gelmesini sağlamaktadır.²⁷⁸ ER stresi ile alakalı yapılan bazı çalışmalarda GRP78 inhibisyonunun ortadan kalkması sonucu aktive olan reseptör proteinlerinin, ER lümeninde şekillenen düzenleyici faktörler ile stresin ortadan kaldırıldığı ve ER stresinin baskılandığı gösterilmiştir. Bu yollar arasında IRE1'in aktive olması sonucunda XBP1 mRNA'sının sXBP1 formuna dönüştüğü ve toksisite gruplarında sXBP1 gen ekspresyon düzeyinin arttığı ve protektif etkili bileşiklerin bu artışı inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^{36, 279-281} Yapılan bu çalışmada ise ACR uygulaması ile gelişen nöronal ER stresi sonucu sXBP1 mRNA gen ekspresyonunun ACR toksisite grubunda arttığı belirlendi. Wongprayoon ve ark.²⁸² yaptıkları bir çalışmada methamphetamine ile indükledikleri ER stresi sonucu sXBP1 ekspresyonunun arttığı ve MEL uygulamasının bu artışı inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Çalışmamızda ACR ile indüklenen nörotoksistide sXBP1 gen ekspresyon düzeyindeki artışı MEL'in doza bağımlı olarak önlediği ve bulgularımızın literatür ile uyumlu olduğu belirlendi.

Proteinlerin hücresel işlevlerini yerine getirebilmeleri için ER'da spesifik konformasyonel katlanmalara ihtiyaç vardır. Hücrelerde katlanmamış protein miktarı veya yanlış katlanmış proteinlerin artması durumunda ER stresi oluşmaktadır. ER stresi durumunda, çeşitli sinyal molekülleri aktive olarak ER stresini ortadan kaldırmaya çalışır. Bu sinyal moleküllerinin birincisi olan translasyonel blok, yeni protein sentezinin

baskılanmasını veya yanlış katlanmış proteinlerin miktarının azaltılmasını sağlar. İkinci sinyal molekülü GRP78 gibi ER şaperonlarının ekspresyonunu artıran moleküller, üçüncü olarak PERK-eIF2 α 'nın aktivasyonu sonucunda NF- κ B'nin indüklenmesi ile immun ve antiapoptotik sinyallerin oluşumunu sağlayan sinyal molekülleri ve son olarak hücrel olayların devamı için hasarlı hücreleri ortadan kaldıran apoptozis sinyalleridir.²⁸³ Birinci yol ile CHOP gen ekspresyonu indüklenir, ikinci yolun aktivasyonu ile IRE1-TNF reseptörü ile ilişkili TRAF2 apoptozis düzenleyici kinaz-1 (ASK1)-JNK sinyal yolağının aktivasyonu gerçekleşir ve üçüncü yol aracılığıyla ise ER ile ilişkili kaspaz-12 aktive hale gelir.^{283, 284} Bu üç yolun aktivasyonu sonucunda apoptozis indüklenmektedir. Hücrelerde oluşan stresin ortadan kaldırılamaması ve yanlış katlanmış proteinlerin aşırı birikmesi sonucu PERK-ATF6-IRE1 sinyal yollarının aktivasyonuna bağlı olarak hücre çekirdeğinde CHOP gen ekspresyonunun artması ile apoptozis uyarılmaktadır. Büyümeyi durdurma ve DNA hasarı ile indüklenebilir gen 153 (GADD153) olarak da bilinen CHOP, başlangıçta DNA hasarına yanıt olarak tanımlanmıştır. CHOP'un aşırı ekspresyonu apoptotik sinyallerini oluşturur ve bu etkisini Bcl-2 gen ekspresyonunu baskılayarak gerçekleştirir.²⁸⁵ Mitokondriyal apoptozis mekanizmaları oluşumu sırasında Bcl-2 gen ekspresyon miktarının azalması Bax gen ekspresyon miktarının artışına neden olur. CHOP'un aşırı ekspresyonu, Bax proteininin sitozolden mitokondriye translokasyonuna neden olur ve mitokondride sitokrom c'nin salınımına neden olarak apoptotik olayları başlatır.²⁴ Böylece ER stresi oluşumu ve CHOP aracılı ölüm sinyali iletimi ile mitokondriyal sinyal kaskadları aktive edilmiş olur. ER stresi-CHOP regülasyonları sonucu Bax aktivasyonu ile apoptozisin son basamağı olan kaspaz kaskadları aktive olur. Apoptozisin son basamağı olarak kabul edilen Cas-3 aktivasyonu ile geri dönüşümsüz bir sürece girilir ve hücre apoptozis ile ortadan kaldırılır.^{24, 133, 283}

Bo ve ark.²⁶⁸ ACR ile indüklenen ER stresinde CHOP gen ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Wang ve ark.²⁸⁶ yaptıkları çalışmada, ACR maruziyeti sonrası rat cerebellumunda ER stresinin geliştiğini ve buna bağlı olarak CHOP düzeyinin arttığını rapor etmişlerdir. Deneysel olarak oluşturulan organ toksisitesi modellerinde ER stresinin olduğu ve CHOP aracılı apoptozisin meydana geldiği belirlenmiştir.^{287, 288} Yapılan bu çalışmada ise ACR ile indüklenen nöronal ER stresinde, PERK-ATF6-IRE1 aktivasyonu sonucunda CHOP aracılı apoptozis geliştiği belirlendi. Apoptozis belirteçlerinden olan CHOP gen ekspresyonunun ACR grubunda diğer gruplara göre anlamlı düzeyde artış olduğu ve MEL2in doza bağımlı olarak bu artışı baskıladığı tespit edildi (Şekil 4.16).

Apoptozis sinyal moleküllerinin aktivasyonu, hücrelerde antiapoptotik gen ailesinin üyesi olan Bcl-2 ekspresyonunun baskılanmasına, proapoptotik gen ailesinin üyesi olan Bax ekspresyonunun ise artmasına sebep olur. Apoptozis sinyal moleküllerinin aktivasyonu sonucunda, Cas-3 gen ekspresyon düzeyinin arttığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir.²⁸⁹⁻²⁹¹ Hong ve ark.²⁶⁹ ACR ile indükledikleri ER stresinde, Bcl-2 seviyelerinin baskılandığını, Bax ve Cas-3 gen ekspresyon düzeylerinin ise arttığını belirlemişlerdir. Wang ve ark.²⁹² ACR ile indükledikleri nörotoksistide nöronal apoptozisin geliştiğini, Bcl-2 ekspresyonunun azaldığını, Bax ve Cas-3 ekspresyonunun arttığını rapor etmişlerdir. Fan ve ark.¹⁵⁷ ise mitokondriyal oksidatif hasar sırasında ER stresi ile bağımlı apoptozis üzerine MEL etkilerini araştırdıkları çalışmada, protektif amaçlı MEL uygulamasının Bcl-2 ekspresyon seviyesini arttırdığı, Bax ve Cas-3 seviyelerini ise düşürdüğünü belirlemişlerdir. Tüm bu literatür bilgileri doğrultusunda yapılan bu çalışmada ratlarda ACR ile indüklenen beyin hasarı sonrasında ER stresine-CHOP aracılı apoptozisin geliştiği saptandı. Apoptotik belirteçlerden olan Bcl-2 gen ekspresyonunun ACR grubunda baskılandığı, Bax ve Cas-3 gen ekspresyonlarının ise arttığı ve buna bağlı olarak nöronal apoptozisin indüklendiği belirlendi. MEL'in doza

bağımlı olarak noroprotektif etki göstererek Bcl-2 seviyesindeki azalmayı, Bax ve Cas-3 seviyelerindeki artışı önlediği tespit edildi.

ACR ile indüklenen nörotoksisite modellerinde, beyin dokusunun histolojik yapısında bazı patolojiler meydana gelmektedir. Çok yaygın kullanıma sahip olan ACR ile deneysel olarak indüklenen nörotoksisite modellerinde cortex cerebride yapısal değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. Dasari ve ark.²⁹³ ACR uygulamasının ratların beyin dokusunda piramidal ve glial hücrelerin dejenerasyonuna, piramidal hücrelerin hafif vakuolasyonuna, glia hücrelerde sponjioz ve spongios gibi histopatolojik değişikliklere sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca nekroz ve piknozun yanı sıra nöron ve nörofaji nekrozu, fokal gliosis ve sinir liflerinin demiyelizasyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir. Jangir ve ark.¹⁶ ise ACR'nin rat beyinde nöronal dejenerasyon, ödem ve tıkanıklık gibi histopatolojik bozukluklar meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Edres ve ark.²¹⁵ ACR uygulaması yapılan ratlarda meninkslerde hafif inflamatuvar, hücre infiltrasyonu, sub-meningeal kan damarlarında tıkanıklık, meninkslerde kanama, nöropil sponjioz ve dejenere olmuş nöronofajinin geliştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca antioksidan ve antiinflamatuvar etkili allisin ve MEL uygulamasının ise protektif etki sağlayarak beyinde gelişen patolojiyi önlediğini tespit etmişlerdir.²¹⁸ Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların literatürle uyumlu olduğu ve ACR grubundaki ratların beyin kesitlerinde, nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon ve nekroz, meningeal ve paraneşimal damarlarda şiddetli düzeyde hiperemi belirlendi. MEL'in düşük dozunun ACR kaynaklı patolojileri orta düzeyde, yüksek dozunun ise önemli düzeyde dejenerasyonu önlediği ve hipereminin hafif düzeyde kaldığı tespit edildi (Tablo 4.2).

Oksidatif stresin artışına bağlı olarak artan ROS ve oksijensiz radikaller önemli fizyolojik fonksiyonlara sahipken, bununla beraber reaktif yapıları nedeniyle hücrel membranların lipidlerinde, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasara da neden

olabilmektedirler. Hasar görmüş DNA'lar enzimatik olarak onarılır ve fonksiyonlarını yerine getirirler. Fakat yanlış onarılan veya onarılamayan DNA'lar mutasyonlara ve çeşitli hücresel hasarlara neden olabilirler. Hidroksil radikali ROS oluşumu ile hidrojen peroksitten açığa çıkmaktadır ve proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilmektedir. Oluşan bu zararlı bileşik DNA bazlarına hasar vererek oksidatif DNA hasarı oluşturmaktadır. Hidroksil radikali DNA'da guanin bazı etkileşimi ile 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşumuna neden olmaktadır. Bu şekilde hasarlı DNA replikasyonları sırasında mutasyonlar gelişebilmektedir. He ve ark.²⁹⁴ ACR ile oluşturdukları nörotoksisitede serabral kortekste immünohistokimyasal olarak inceledikleri 8-OHdG ekspresyonlarının arttığını tespit etmişlerdir. ACR grubunda 8-OHdG ekspresyonunun arttığı ve protektif etkili epigallocatechin-3-gallate bileşiğinin bu artışı inhibe ederek oksidatif DNA hasarını önlediğini rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada elde edilen immünohistokimyasal bulguların literatürle uyumlu olduğu, ACR grubundaki ratların beyin dokularında 8-OHdG ekspresyonlarının arttığı tespit edildi. ACR ile indüklenen nörotoksisitede beyin dokularında artan 8-OHdG ekspresyon düzeyi üzerine MEL'in doza bağımlı uygulamasının 8-OHdG ekspresyon seviyelerindeki artışı önemli derecede önlediği Tablo 4.2'de belirtildiği gibi tespit edildi.

Beyinde astrositlerde bulunan ara filamentler hücre iskeletini, hücre esnekliğini ve bütünlüğünü sağlayan çok önemli yapılardır. Hücrenin yapısal özelliklerindeki önemli rolünün yanı sıra biyomekanik ve moleküler sinyallerin iletimi ile ilgili yeni işlevleri ortaya çıkmıştır. Astrositlerdeki ana ara filament gliyal fibriller asidik protein olarak adlandırılan GFAP'tır.²⁹⁵ GFAP ekspresyonunun, genel olarak beyin hasarı ve merkezi sinir sisteminin dejenerasyonu ile arttığı bilinmektedir. Beyinde oluşan hasar, travma, nörodejeneratif hastalıklar, genetik bozukluklar ve çeşitli kimyasal bileşiklerin etkileri ile astrositler reaktif hale gelirler.²⁹⁶ Mikroglialar ve astrositlerde hasar veya yaralanmaya

genellikle reaktif gliosis veya basitçe gliosis denir. Gliosis oluşması durumunda hücre çekirdeğinden GFAP gen ekspresyonunun artışı ve hasar sonucu ölüm kaskadlarının aktif hale gelmesi ile yıkım gerçekleşmekte ve oluşan nöronal hasar sonucunda ise GFAP regülasyonu da bozulmaktadır.²⁹⁷ Chen ve ark.²⁹⁸ ACR uyguladıkları ratların beyin dokularının immünofloresan incelemesinde GFAP ekspresyon seviyelerinin ACR grubunda arttığını belirlemişlerdir. Farag ve ark.²⁹⁹ ise ratlarda ACR ile indüklediği nörotoksisitede protektif amaçlı semizotu tohum ekstraktının etkilerini incelemişlerdir. ACR toksisitesi ile gliosisin geliştiğini, GFAP ekspresyon seviyelerinin arttığını ve bu ekstraktın GFAP seviyesindeki artışı önlediğini rapor etmişlerdir. Farouk ve ark.³⁰⁰ ACR ile indükledikleri nörotoksisitede likopen bileşiğinin nöroprotektif ve antioksidan etkilerini araştırdıkları çalışmada, ACR grubunda GFAP ekspresyon seviyelerinin arttığını ve likopenin bu artışı inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada deney gruplarındaki ratların beyin dokularının immünofloresan bulgularının literatürle uyumlu olduğu ve ACR gruplarındaki beyin kesitlerinde yapılan inceleme sonucu GFAP ekspresyon seviyelerinin arttığı tespit edildi. Antioksidan, antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkili MEL'in doza bağımlı uygulamasının artan GFAP ekspresyon düzeylerini önlemede etkili olduğu Şekil 4.28 ve Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi belirlendi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan bu çalışmada, ratlarda ACR ile indüklenen nörotoksisitede antioksidan ve antiinflamatuvar bir bileşik olan MEL'in protektif etkileri araştırıldı. Çalışmada elde edilen sonuçlar ve veriler kısaca aşağıda belirtilmiştir.

1. Çalışma sonucunda, ACR'nin 50 mg/kg'lık dozu sinir sisteminde hasara ve nöropatiye neden olarak, özellikle motor sinirleri etkileyerek lokomotor aktivitede değişikliklere neden olmakta ve MEL'in 20 mg/kg'lık yüksek dozu oluşan bu hasarı önlemede etkili olduğu ve lokomotor aktivitedeki hareket ve davranışları düzelttiği saptandı.
2. ACR beyin dokusunda oksidatif stresi indüklediği ve MEL'nin doza bağımlı uygulamasının oluşan oksidatif stres üzerine antioksidan etkili olduğu ve oluşan oksidatif stresi önlediği saptandı.
3. Toksik etkili bileşikler, enerji yetersizliği, kalsiyum dengesinin bozulması ve oksidatif stres gibi etkenler ER stresine neden olmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda, ACR ile indüklenen nörotoksisitede oksidatif stresin artışı, sinir sistemin de düzenleyici görevleri olan AChE ve MAO enzim miktarının artışı ve motor fonksiyonlarda hasarın gelişmesi ile ER stresinin geliştiği ve nöronlarda hayatta kalmak için inflamasyonun indüklendiği görüldü. Antioksidan ve antiinflamatuvar etkili MEL'in doza bağımlı uygulaması AChE, MAO, ER stres parametreleri ve nöroinflamasyon üzerine protektif etkili olduğu tespit edildi.
4. Bu çalışmanın sonucunda, ACR'in ile indüklenen ER stres sonucu beyin dokusunda CHOP gen ekspersyonunun artışının apoptozisi indüklendiği ve bu şekilde hücrelerin ölümüne neden olduğu, MEL'in doza bağımlı uygulamasının antiapoptotik etki göstererek hücrelerin hayatta kalmasına ve ER stresini inhibisyonuna neden olduğu saptandı.

5. Beyin dokusunda hasara neden olan ACR bileşiminin, 8-OHdG'yi indüklediği ve bunun sonucunda DNA hasarının geliştiği, MEL'in doza bağımlı uygulamasının DNA hasarı üzerine protektif etki gösterdiği saptandı.
6. ACR bileşimi, beyin dokusunda yerleşik hücreler olarak adlandırılan Astrosit hücrelerini etkileyerek GFAP ekspresyonunu arttırmaktadır. Nöronal hasarın belirteçlerinden olan GFAP artışı üzerine, MEL'in doza bağımlı uygulamasında 20 mg/kg'lık dozunun nöroprotektif etki gösterdiği tespit edildi.
7. Kısaca yukarıda belirtilen oksidatif protein katlanması, oksidatif stresin tetiklenmesi ve ROS'un artışı, ER stresini indüklediği, ER stresi inflamasyona ve apoptoze neden olduğu, nöronal hücre ölümünün bu yollar üzerinden gerçekleştiği detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda oksidatif stresin geliştiği, nöroinflamasyonun şekillendiği, ER stresinin indüklendiği ve sonuç olarak bir apoptozis indükleyicisi olan CHOP ekspresyonunun arttığı ve nöronal hücrelerin ACR gruplarında apoptozis ile ortadan kaldırıldığı bunun sonucu olarak motor alanlarda hasarın gelişmesi ile beraber genel lokomotor aktivite düzeylerinin değiştiği gözlemlendi. Tüm bu yollar üzerine MEL'in doza bağımlı olarak koruyucu etkili olduğu saptandı.
8. Elde edilen bulgular ışığında MEL'in, ratlarda ACR ile indüklenen nörotoksisitede antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerinden dolayı protektif etkili olduğu kanısına varıldı. Elde edilen bulguların literatürdeki eksiği gidereceği ve gelecekte yapılacak daha ileri düzeydeki çalışmalara katkı sağlayacağı ve yön vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. LoPachin RM. The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 2004, 25: 617-630.
2. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002, 50: 4998-5006.
3. Keramat J, LeBail A, Prost C, Jafari M. Acrylamide in baking products: a review article. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4: 530-543.
4. Reynolds T. Acrylamide and cancer: tunnel leak in Sweden prompted studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 2002, 94: 876-878.
5. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chemical research in toxicology*, 2000, 13: 517-522.
6. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, 51: 4504-4526.
7. Schettgen T, Kütting B, Hornig M, Beckmann M, Weiss T, Drexler H, Angerer J. Trans-placental exposure of neonates to acrylamide—a pilot study. *International archives of occupational and environmental health*, 2004, 77: 213-216.
8. Dybing E, Farmer P, Andersen M, Fennell T, Lalljie S, Müller D, Olin S, Petersen B, Schlatter J, Scholz G. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43: 365-410.
9. Lyn-Cook Jr LE, Tareke E, Word B, Starlard-Davenport A, Lyn-Cook BD, Hammons GJ. Food contaminant acrylamide increases expression of Cox-2 and nitric oxide synthase in breast epithelial cells. *Toxicology and industrial health*, 2011, 27: 11-18.
10. Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. *The American journal of clinical nutrition*, 2008, 87: 1428-1438.
11. Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Sega GA, Brusick DJ. Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1995, 330: 71-99.
12. LoPachin RM, Balaban C, Ross J. Acrylamide axonopathy revisited. *Toxicology and applied pharmacology*, 2003, 188: 135-153.
13. Gökmen V. Acrylamide formation in foods: role of composition and processing. *İçinde: Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, Springer, 2016: 67-80.
14. Lakshmi D, Gopinath K, Jayanthi G, Anjum S, Prakash D, Sudhandiran G. Ameliorating effect of fish oil on acrylamide induced oxidative stress and neuronal apoptosis in cerebral cortex. *Neurochemical research*, 2012, 37: 1859-1867.
15. Zhang P, Pan H, Wang J, Liu X, Hu X. Telomerase activity-independent function of telomerase reverse transcriptase is involved in acrylamide-induced neuron damage. *Biotechnic & Histochemistry*, 2014, 89: 327-335.
16. Jangir BL, Mahaprabhu R, Rahangdale S, Bhandarkar AG, Kurkure NV. Neurobehavioral alterations and histopathological changes in brain and spinal cord of rats intoxicated with acrylamide. *Toxicology and industrial health*, 2016, 32: 526-540.
17. Prasad SN. Neuroprotective efficacy of eugenol and isoeugenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: behavioral and biochemical evidence. *Neurochemical research*, 2013, 38: 330-345.

18. Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 2000, 32: 1-14.
19. Thameem Dheen S, Kaur C, Ling E-A. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Current medicinal chemistry*, 2007, 14: 1189-1197.
20. Sloan SA, Barres BA. Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Current opinion in neurobiology*, 2014, 27: 75-81.
21. LoPachin RM, Gavin T. Molecular mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry. *Environmental health perspectives*, 2012, 120: 1650-1657.
22. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007, 8: 519-529.
23. Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2005, 569: 29-63.
24. Gorman AM, Healy SJ, Jäger R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacology & therapeutics*, 2012, 134: 306-316.
25. Malhotra JD, Kaufman RJ In *The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response*, Seminars in cell & developmental biology, (editör).^(editörler). Elsevier: 2007; 716-731.
26. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS journal*, 2016, 283: 2640-2652.
27. Kaneto H, Matsuoka T-a, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *Journal of molecular medicine*, 2005, 83: 429-439.
28. Viana RJ, Nunes AF, Rodrigues CM. Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, 2012, 46: 522-534.
29. Cali T, Ottolini D, Brini M. Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Biofactors*, 2011, 37: 228-240.
30. Tadic V, Prell T, Lautenschlaeger J, Grosskreutz J. The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2014, 8: 147.
31. Vidal R, Caballero B, Couve A, Hetz C. Converging pathways in the occurrence of endoplasmic reticulum (ER) stress in Huntington's disease. *Current molecular medicine*, 2011, 11: 1-12.
32. Doroudgar S, Thuerauf DJ, Marcinko MC, Belmont PJ, Glembotski CC. Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284: 29735-29745.
33. Zhou L, Yang D, Wu DF, Guo ZM, Okoro E, Yang H. Inhibition of endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis by 2-aminopurine in apolipoprotein e-deficient mice. *ISRN pharmacology*, 2013, 2013.
34. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circulation research*, 2010, 107: 1071-1082.
35. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T, Samini F. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 87: 223-229.
36. Xia Q, Feng X, Huang H, Du L, Yang X, Wang K. Gadolinium-induced oxidative stress triggers endoplasmic reticulum stress in rat cortical neurons. *Journal of neurochemistry*, 2011, 117: 38-47.

37. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature cell biology*, 2011, 13: 184-190.
38. Komoike Y, Matsuoka M. Endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis by acrylamide exposure. *Toxicology and applied pharmacology*, 2016, 310: 68-77.
39. Zargar S, Siddiqi NJ, Ansar S, Alsulaimani MS, El Ansary AK. Therapeutic role of quercetin on oxidative damage induced by acrylamide in rat brain. *Pharmaceutical biology*, 2016, 54: 1763-1767.
40. Motamedshariaty VS, Farzad SA, Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Effects of rutin on acrylamide-induced neurotoxicity. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 22: 27.
41. Tamarkin L, Westrom W, Hamill A, Goldman B. Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology*, 1976, 99: 1534-1541.
42. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life sciences*, 1994, 56: 83-89.
43. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabó C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *Journal of pineal research*, 1997, 23: 106-116.
44. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80: 2587-2587.
45. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 1993, 49: 654-664.
46. Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *Journal of pineal research*, 2003, 34: 233-241.
47. Mayo JC, Sainz RM, Tan D-X, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *Journal of neuroimmunology*, 2005, 165: 139-149.
48. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Current topics in medicinal chemistry*, 2002, 2: 113-132.
49. Yang Z, Bao Y, Chen W, He Y. Melatonin exerts neuroprotective effects by attenuating astro-and microgliosis and suppressing inflammatory response following spinal cord injury. *Neuropeptides*, 2020, 79: 102002.
50. Skaper S, Floreani M, Ceccon M, Facci L, Giusti P. Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999, 890: 107-118.
51. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 2002, 296: 1991-1995.
52. Noyan A. *Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji*. 14. Baskı. Meteksan, 2004.
53. Yıldırım M AM, Agar E, Peker GO, Yılmaz O, Demiralp T, Arslan A, Yıldırım A. Sinir Sistemi. İçinde: *Tıbbi Fizyoloji*, Yeğen BÇ, Alican İ, Solakoğlu Z, (Çeviri editörleri). *Textbook of Medical Physiology*, Guyton AC, Hall JE. 13. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2017.
54. Erzurumlu R, Şengül G, Ulupınar E. *Nöroanatomi*. 1. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2019.

55. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Ganong's Review of Medical Physiology. Çeviri: Gökbel H, Okudan N, Gergerlioğlu HS, Belviranlı M. *Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi*. İçinde: 24. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2015.
56. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. Vander's Human Physiology The Mechanisms of Body Function. Çeviri: Özgünen T, Solakoğlu Z. *Vander İnsan Fizyolojisi*. İçinde: 14. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2018.
57. Preston RR, Wilson TE. Lippincott's Illustrated Reviews: Physiology. Çeviri: Alkaç Üİ, Ermutlu MN, Yılmaz B. *Fizyoloji*. İçinde: 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2016.
58. Segura-Aguilar J, Kostrzewa RM. Neurotoxins and neurotoxicity mechanisms. An overview. *Neurotoxicity research*, 2006, 10: 263-285.
59. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal cell death. *Physiological reviews*, 2018, 98: 813-880.
60. Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86: 5178-5182.
61. Apte M, Haber P, Applegate T, Norton I, McCaughan G, Korsten M, Pirola R, Wilson J. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 1998, 43: 128-133.
62. Goss JR, Finch CE, Morgan DG. Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain. *Neurobiology of aging*, 1991, 12: 165-170.
63. Weinstein DE, Shelanski ML, Liem R. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *The Journal of cell biology*, 1991, 112: 1205-1213.
64. O'Callaghan JP, Sriram K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert opinion on drug safety*, 2005, 4: 433-442.
65. Whittaker VP. The contribution of drugs and toxins to understanding of cholinergic function. *Trends in pharmacological sciences*, 1990, 11: 8-13.
66. Tipton KF, Boyce S, O'Sullivan J, Davey GP, Healy J. Monoamine oxidases: certainties and uncertainties. *Current medicinal chemistry*, 2004, 11: 1965-1982.
67. Edmondson D, Mattevi A, Binda C, Li M, Hubalek F. Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Current medicinal chemistry*, 2004, 11: 1983-1993.
68. Vianello R, Repič M, Mavri J. How are biogenic amines metabolized by monoamine oxidases? *European Journal of Organic Chemistry*, 2012, 2012: 7057-7065.
69. Raffan S, Halford NG. Acrylamide in food: Progress in and prospects for genetic and agronomic solutions. *Annals of Applied Biology*, 2019, 175: 259-281.
70. Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutation research/reviews in genetic toxicology*, 1988, 195: 45-77.
71. Friedman M, Mottram D. *Chemistry and safety of acrylamide in food*. Baskı. Springer Science & Business Media, 2006.
72. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert M-C, Riediker S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 2002, 419: 449-450.
73. Yaylayan VA, Stadler RH. Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. *Journal of AOAC International*, 2005, 88: 262-267.
74. Midland A In *Overview of acrylamide toxicity and metabolism*, JIFSAN/NCFST Workshop on Acrylamide in Food Toxicology and Metabolic Consequences Working Group, (editör).^(editörler). 2002; 1-35.

75. LoPachin RM. Acrylamide neurotoxicity: neurological, morphological and molecular endpoints in animal models. *Chemistry and safety of acrylamide in food*, 2005: 21-37.
76. Calleman CJ, Bergmark E, Stern LG, Costa LG. A nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by the neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide. *Environmental health perspectives*, 1993, 99: 221-223.
77. Das M, Mukhtar H, Seth PK. Effect of acrylamide on brain and hepatic mixed-function oxidases and glutathione-S-transferase in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 1982, 66: 420-426.
78. Dixit R, Husain R, Mukhtar H, Seth P. Acrylamide induced inhibition of hepatic glutathione-S-transferase activity in rats. *Toxicology letters*, 1981, 7: 207-210.
79. Rice JM. The carcinogenicity of acrylamide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2005, 580: 3-20.
80. Suzuki K, Pfaff LD. Acrylamide neuropathy in rats. *Acta neuropathologica*, 1973, 24: 197-213.
81. Humans IWGoTEoCRt. Acrylamide. İçinde: *Some Industrial Chemicals*, International Agency for Research on Cancer, 1994.
82. Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2007, 16: 2304-2313.
83. Hinson JA, Roberts DW. Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1992, 32: 471-510.
84. Abelli L, Ferri G-L, Astolfi M, Conte B, Geppetti P, Parlani M, Dahl D, Polak J, Maggi C. Acrylamide-induced visceral neuropathy: evidence for the involvement of capsaicin-sensitive nerves of the rat urinary bladder. *Neuroscience*, 1991, 41: 311-321.
85. De Rojas TC, Goldstein BD. Primary afferent terminal function following acrylamide: alterations in the dorsal root potential and reflex. *Toxicology and applied pharmacology*, 1987, 88: 175-182.
86. Seale SM, Feng Q, Agarwal AK, El-Alfy AT. Neurobehavioral and transcriptional effects of acrylamide in juvenile rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2012, 101: 77-84.
87. Rafales L, Bornschein R, Caruso V. Behavioral and pharmacological responses following acrylamide exposure in rats. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 1982, 4: 355-364.
88. Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. İçinde: *Pre-Clinical Models*, Springer, 2019: 99-103.
89. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature reviews neuroscience*, 2009, 10: 434-445.
90. Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nature reviews neuroscience*, 2009, 10: 459-466.
91. Sturman O, Germain P-L, Bohacek J. Exploratory rearing: a context-and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, 2018, 21: 443-452.
92. Kelley AE. Locomotor activity and exploration. İçinde: *Techniques in the behavioral and neural sciences*, Elsevier, 1993: 499-518.
93. LoPachin R, Ross J, Reid ML, Das S, Mansukhani S, Lehning E. Neurological evaluation of toxic axonopathies in rats: acrylamide and 2, 5-hexanedione. *Neurotoxicology*, 2002, 23: 95-110.

94. Garey J, Ferguson SA, Paule MG. Developmental and behavioral effects of acrylamide in Fischer 344 rats. *Neurotoxicology and teratology*, 2005, 27: 553-563.
95. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. Baskl. Oxford University Press, USA, 2015.
96. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 2002.
97. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology and medicine*, 2000, 29: 222-230.
98. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes mechanisms and consequences. *Journal of Cell Biology*, 2004, 164: 341-346.
99. Rajmakers M, Burton G, Jauniaux E, Seed P, Peters W, Steegers E, Poston L. Placental NAD (P) H oxidase mediated superoxide generation in early pregnancy. *Placenta*, 2006, 27: 158-163.
100. Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Medicine*, 1996, 21: 213-238.
101. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress. *Sports Medicine*, 2006, 36: 327-358.
102. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 2017, 482: 419-425.
103. Mehri S, Abnous K, Khooei A, Mousavi SH, Shariaty VM, Hosseinzadeh H. Crocin reduced acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rat through inhibition of oxidative stress. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2015, 18: 902.
104. Pan X, Zhu L, Lu H, Wang D, Lu Q, Yan H. Melatonin attenuates oxidative damage induced by acrylamide in vitro and in vivo. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2015.
105. Ahmed HH, Elmegeed GA, El-Sayed E-SM, Abd-Elhalim MM, Shousha WG, Shafic RW. Potent neuroprotective role of novel melatonin derivatives for management of central neuropathy induced by acrylamide in rats. *European journal of medicinal chemistry*, 2010, 45: 5452-5459.
106. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C*, 2009, 27: 120-139.
107. Hayashi M. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology*, 2009, 29: 1-8.
108. Barbosa ML, de Meneses A-APM, de Aguiar RPS, e Sousa JMdc, Cavalcante AAdCM, Maluf SW. Oxidative stress, antioxidant defense and depressive disorders: a systematic review of biochemical and molecular markers. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*, 2020, 36: 65-72.
109. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2021, 17: 22.
110. Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free radical biology and medicine*, 2002, 33: 450-456.
111. Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, 2017, 127: 624-633.
112. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: the role and consequences. *Neuroscience research*, 2014, 79: 1-12.
113. Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2003, 358: 1669-1677.

114. Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, Zipp F. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *The Lancet*, 2000, 356: 827-828.
115. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal of Experimental Medicine*, 2011, 208: 417-420.
116. Akbar M, Essa MM, Daradkeh G, Abdelmegeed MA, Choi Y, Mahmood L, Song B-J. Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. *Brain research*, 2016, 1637: 34-55.
117. Peng Y-L, Liu Y-N, Liu L, Wang X, Jiang C-L, Wang Y-X. Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. *Journal of neuroinflammation*, 2012, 9: 1-12.
118. Terazawa R, Akimoto N, Kato T, Itoh T, Fujita Y, Hamada N, Deguchi T, Iinuma M, Noda M, Nozawa Y. A kavalactone derivative inhibits lipopolysaccharide-stimulated iNOS induction and NO production through activation of Nrf2 signaling in BV2 microglial cells. *Pharmacological research*, 2013, 71: 34-43.
119. Porter KR, Claude A, Fullam EF. A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. *The Journal of experimental medicine*, 1945, 81: 233.
120. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 2011, 475: 324-332.
121. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 2002, 110: 1389-1398.
122. Seydel G, Aksoy K. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 21: 221-235.
123. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular cell*, 2000, 5: 897-904.
124. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell*, 2003, 11: 619-633.
125. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular cell*, 2000, 6: 1355-1364.
126. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.*, 2005, 74: 739-789.
127. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 2001, 107: 881-891.
128. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, 2003, 23: 7448.
129. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *The EMBO journal*, 1998, 17: 5708-5717.
130. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Molecular cell*, 1998, 2: 389-395.
131. Hatai T, Matsuzawa A, Inoshita S, Mochida Y, Kuroda T, Sakamaki K, Kuida K, Yonehara S, Ichijo H, Takeda K. Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1

- (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 26576-26581.
132. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development*, 1998, 12: 982-995.
 133. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*, 2006, 7: 880-885.
 134. Okouchi M, Ekshyyan O, Maracine M, Aw TY. Neuronal apoptosis in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*, 2007, 9: 1059-1096.
 135. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 1997, 82: 291-295.
 136. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 1997, 61: 375-380.
 137. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*, 2009, 14: 996-1007.
 138. Zong W-X, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu Q-C, Yuan J, Thompson CB. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of cell biology*, 2003, 162: 59-69.
 139. Pévet P. Melatonin. *Dialogues in clinical neuroscience*, 2002, 4: 57.
 140. Hardeland R, Pandi-Perumal S, Cardinali DP. Melatonin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006, 38: 313-316.
 141. Atasoy ÖB, Erbaş O. Melatonin hormonunun fizyolojik etkileri. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi*, 2017, 3: 52-62.
 142. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Molecular and cellular endocrinology*, 2012, 351: 152-166.
 143. Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochemical pharmacology*, 2010, 80: 1844-1852.
 144. Benitez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, 1993, 49: 635-641.
 145. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology*, 2014.
 146. Arendt J. Aaron Lerner, who discovered melatonin. *Journal of pineal research*, 2007, 43: 106-107.
 147. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of pineal research*, 2016, 61: 253-278.
 148. Sánchez A, Calpena AC, Clares B. Evaluating the oxidative stress in inflammation: role of melatonin. *International journal of molecular sciences*, 2015, 16: 16981-17004.
 149. Tan D-X, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules*, 2015, 20: 18886-18906.
 150. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 2005, 27: 189-200.
 151. Hardeland R. Melatonin and inflammation—Story of a double-edged blade. *Journal of pineal research*, 2018, 65: e12525.
 152. Naseem M, Parvez S. Role of melatonin in traumatic brain injury and spinal cord injury. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014.

153. Deng W-G, Tang S-T, Tseng H-P, Wu KK. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood*, 2006, 108: 518-524.
154. Fernández A, Ordóñez R, Reiter RJ, González-Gallego J, Mauriz JL. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. *Journal of pineal research*, 2015, 59: 292-307.
155. Zha L, Fan L, Sun G, Wang H, Ma T, Zhong F, Wei W. Melatonin sensitizes human hepatoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Journal of pineal research*, 2012, 52: 322-331.
156. Chen Y, Zhang J, Zhao Q, Chen Q, Sun Y, Jin Y, Wu J. Melatonin induces anti-inflammatory effects to play a protective role via endoplasmic reticulum stress in acute pancreatitis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, 40: 1094-1104.
157. Fan C, Feng J, Tang C, Zhang Z, Feng Y, Duan W, Zhai M, Yan Z, Zhu L, Feng L. Melatonin suppresses ER stress-dependent proapoptotic effects via AMPK in bone mesenchymal stem cells during mitochondrial oxidative damage. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020, 11: 1-22.
158. Motamedshariaty VS, Farzad SA, Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Effects of rutin on acrylamide-induced neurotoxicity. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 22: 1-9.
159. Esmaeelpanah E, Razavi BM, Vahdati Hasani F, Hosseinzadeh H. Evaluation of epigallocatechin gallate and epicatechin gallate effects on acrylamide-induced neurotoxicity in rats and cytotoxicity in PC 12 cells. *Drug and chemical toxicology*, 2018, 41: 441-448.
160. Tapias V, Cannon JR, Greenamyre JT. Melatonin treatment potentiates neurodegeneration in a rat rotenone Parkinson's disease model. *Journal of neuroscience research*, 2010, 88: 420-427.
161. Paul R, Phukan BC, Thenmozhi AJ, Manivasagam T, Bhattacharya P, Borah A. Melatonin protects against behavioral deficits, dopamine loss and oxidative stress in homocysteine model of Parkinson's disease. *Life sciences*, 2018, 192: 238-245.
162. Uzbay İT. Madde bağımlılığı çalışmalarında kullanılan deneysel hayvan modelleri. *Meslek içi sürekli eğitim dergisi*.
163. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 2001, 25: 402-408.
164. Lineback DR, Coughlin JR, Stadler RH. Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. *Annual review of food science and technology*, 2012, 3: 15-35.
165. Chain EPoCitF. Scientific opinion on acrylamide in food. *Efsa Journal*, 2015, 13: 4104.
166. Erkekoglu P, Baydar T. Acrylamide neurotoxicity. *Nutritional neuroscience*, 2014, 17: 49-57.
167. Zamani E, Shokrzadeh M, Fallah M, Shaki F. A review of acrylamide toxicity and its mechanism. *Pharmaceutical and biomedical research*, 2017, 3: 1-7.
168. Exon J. A review of the toxicology of acrylamide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2006, 9: 397-412.
169. Sumner SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chemical research in toxicology*, 1999, 12: 1110-1116.
170. Riboldi BP, Vinhas ÁM, Moreira JD. Risks of dietary acrylamide exposure: A systematic review. *Food chemistry*, 2014, 157: 310-322.

171. Hashimoto K, Sakamoto J, Tanii H. Neurotoxicity of acrylamide and related compounds and their effects on male gonads in mice. *Archives of Toxicology*, 1981, 47: 179-189.
172. Ghasemzadeh Rahbardar M, Hemadeh B, Razavi BM, Eisvand F, Hosseinzadeh H. Effect of carnosic acid on acrylamide induced neurotoxicity: in vivo and in vitro experiments. *Drug and chemical toxicology*, 2020: 1-8.
173. Abd Al Haleem EN, Hasan WYS, Arafa HMM. Therapeutic effects of thymoquinone or capsaicin on acrylamide-induced reproductive toxicity in rats mediated by their effect on oxidative stress, inflammation, and tight junction integrity. *Drug and chemical toxicology*, 2021: 1-13.
174. Sengul E, Gelen V, Yildirim S, Tekin S, Dag Y. The effects of selenium in acrylamide-induced nephrotoxicity in rats: roles of oxidative stress, inflammation, apoptosis, and DNA damage. *Biological trace element research*, 2021, 199.
175. Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S, Caglayan C, Darendelioğlu E, Dortbudak MB. Protective effects of morin against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity: A multi-biomarker approach. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 138: 111190.
176. Kushwah AS, Kalia TS. Quercetin attenuates oxidative stress, inflammation and cardiac dysfunction in acrylamide-induced cardiotoxicity. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 2020, 77: 343-352.
177. Ko M-H, Chen W-P, Lin-Shiau S-Y, Hsieh S-T. Age-dependent acrylamide neurotoxicity in mice: morphology, physiology, and function. *Experimental neurology*, 1999, 158: 37-46.
178. Elblehi SS, El Euony OI, El-Sayed YS. Apoptosis and astrogliosis perturbations and expression of regulatory inflammatory factors and neurotransmitters in acrylamide-induced neurotoxicity under ω 3 fatty acids protection in rats. *Neurotoxicology*, 2020, 76: 44-57.
179. Liu Z, Song G, Zou C, Liu G, Wu W, Yuan T, Liu X. Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells. *Free radical biology and medicine*, 2015, 84: 42-53.
180. Uzbay IT, Erden BF, Tapanyigit EE, Kayaalp SO. Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats. *Life sciences*, 1997, 61: 2197-2209.
181. Wei X, Yan F, Meng E, Zhang C, Li G, Yang X, Zhang F, Wang S, Yu S. Neuroprotective effect of calpeptin on acrylamide-induced neuropathy in rats. *Neurochemical research*, 2015, 40: 2325-2332.
182. Lehning E, Balaban C, Ross J, LoPachin RM. Acrylamide neuropathy: II. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in brainstem and spinal cord. *Neurotoxicology*, 2002, 23: 415-429.
183. Spencer PS, Schaumburg HH. A review of acrylamide neurotoxicity Part II. Experimental animal neurotoxicity and pathologic mechanisms. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 1974, 1: 152-169.
184. Edwards P, Parker V. A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 1977, 40: 589-591.
185. Bowyer JF, Latendresse JR, Delongchamp RR, Warbritton AR, Thomas M, Divine B, Doerge DR. The mRNA expression and histological integrity in rat forebrain motor and sensory regions are minimally affected by acrylamide exposure through drinking water. *Toxicology and applied pharmacology*, 2009, 240: 401-411.
186. Crofton K, Padilla S, Tilson H, Anthony D, Raymer J, MacPhail R. The impact of dose rate on the neurotoxicity of acrylamide: the interaction of administered dose, target

tissue concentrations, tissue damage, and functional effects. *Toxicology and applied pharmacology*, 1996, 139: 163-176.

187. Zhang B, Hua S, Wang XH, Xiao C, Li ZS, Peng C, Dan Z, Yang YG, Xiao JW, Bin L. Acrylamide-induced subacute neurotoxic effects on the cerebral cortex and cerebellum at the synapse level in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2017, 30: 432-443.

188. Shukla PK, Khanna VK, Ali M, Maurya R, Handa S, Srimal R. Protective effect of *Acorus calamus* against acrylamide induced neurotoxicity. *Phytotherapy research*, 2002, 16: 256-260.

189. Goudarzi M, Mombeini MA, Fatemi I, Aminzadeh A, Kalantari H, Nesari A, Najafzadehvarzi H, Mehrzadi S. Neuroprotective effects of Ellagic acid against acrylamide-induced neurotoxicity in rats. *Neurological research*, 2019, 41: 419-428.

190. LoPachin RM, Gavin T. Acrylamide-induced nerve terminal damage: relevance to neurotoxic and neurodegenerative mechanisms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, 56: 5994-6003.

191. Cenini G, Lloret A, Cascella R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from a mitochondrial point of view. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019.

192. Salim S. Oxidative stress and the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2017, 360: 201-205.

193. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical research in toxicology*, 2008, 21: 172-188.

194. Al Olayan EM, Aloufi AS, AlAmri OD, Ola H, Moneim AEA. Protocatechuic acid mitigates cadmium-induced neurotoxicity in rats: Role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Science of the total environment*, 2020, 723: 137969.

195. Çelik H, Kucukler S, Çomaklı S, Özdemir S, Caglayan C, Yardım A, Kandemir FM. Morin attenuates ifosfamide-induced neurotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, neuroinflammation and neuronal apoptosis. *Neurotoxicology*, 2020, 76: 126-137.

196. Abdel-Daim MM, Abd Eldaim MA, Hassan AG. *Trigonella foenum-graecum* ameliorates acrylamide-induced toxicity in rats: Roles of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and DNA damage. *Biochemistry and Cell Biology*, 2015, 93: 192-198.

197. Gur C, Kandemir FM, Darendelioglu E, Caglayan C, Kucukler S, Kandemir O, Ileriturk M. Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: an investigation into different signal pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021: 1-12.

198. Getzoff ED, Tainer JA, Weiner PK, Kollman PA, Richardson JS, Richardson DC. Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, 1983, 306: 287-290.

199. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 1993, 57: 715S-725S.

200. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors*, 2008, 34: 171-180.

201. Acaroz U, Ince S, Arslan-Acaroz D, Gurler Z, Kucukkurt I, Demirel HH, Arslan HO, Varol N, Zhu K. The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 118: 745-752.

202. Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Şehirli AÖ, Demiralp E, Şener G, Omurtag GZ. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Molecular biology reports*, 2012, 39: 4589-4596.
203. Pan X, Yan D, Wang D, Wu X, Zhao W, Lu Q, Yan H. Mitochondrion-mediated apoptosis induced by acrylamide is regulated by a balance between Nrf2 antioxidant and MAPK signaling pathways in PC12 cells. *Molecular neurobiology*, 2017, 54: 4781-4794.
204. Yousef M, El-Demerdash F. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*, 2006, 219: 133-141.
205. Tabeshpour J, Mehri S, Abnous K, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effects of thymoquinone in acrylamide-induced peripheral nervous system toxicity through MAPK kinase and apoptosis pathways in rat. *Neurochemical research*, 2019, 44: 1101-1112.
206. Sokolovic D, Djindjic B, Nikolic J, Bjelakovic G, Pavlovic D, Kocic G, Krstic D, Cvetkovic T, Pavlovic V. Melatonin reduces oxidative stress induced by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain. *Journal of radiation research*, 2008, 49: 579-586.
207. Soliman G. Protective effect of Solanum nigrum, vitamin C or melatonin on the toxic effect of acrylamide on rats. *J Pharm Biol Sci*, 2013, 5: 47-54.
208. McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2005, 59: 139-142.
209. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer research*, 2004, 64: 2350-2356.
210. Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovì B, Rossi CA, Toninello A. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 24407-24415.
211. Motallebzadeh E, Tameh AA, Zavareh SAT, Farhood B, Aliasgharzadeh A, Mohseni M. Neuroprotective effect of melatonin on radiation-induced oxidative stress and apoptosis in the brainstem of rats. *Journal of cellular physiology*, 2020, 235: 8791-8798.
212. Streit WJ, Mrazek RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *Journal of neuroinflammation*, 2004, 1: 1-4.
213. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*, 2016, 139: 136-153.
214. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 2013, 62: 641-651.
215. Edres HA, Taha NM, Lebda MA, Elfeky MS. The potential neuroprotective effect of allicin and melatonin in acrylamide-induced brain damage in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021: 1-13.
216. Mehri S, Abnous K, Mousavi SH, Shariaty VM, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Cellular and molecular neurobiology*, 2012, 32: 227-235.
217. Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators of inflammation*, 2013, 2013.
218. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*, 2010, 140: 871-882.
219. Elhelaly AE, AlBasher G, Alfarraj S, Almeer R, Bahbah EI, Fouda MM, Bungău SG, Aleya L, Abdel-Daim MM. Protective effects of hesperidin and diosmin against

- acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative damage in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26: 35151-35162.
220. Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R. Effect of melatonin on neuroinflammation and acetylcholinesterase activity induced by LPS in rat brain. *European journal of pharmacology*, 2010, 640: 206-210.
 221. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annual review of immunology*, 1990, 8: 253-278.
 222. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*, 1989, 74: 1-10.
 223. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*, 2012, 8: 1237.
 224. Schöbitz B, Pezeshki G, Pohl T, Hemmann U, Heinrich PC, Holsboer F, Reul JM. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *The FASEB Journal*, 1995, 9: 659-664.
 225. Abou Zaid OA, El-Sonbaty SM, Barakat WE. Brain derived neurotrophic factor, β amyloid, interleukin-6 and neurotransmitters in amelioration of acrylamide neurotoxicity: Role of ferulic acid. *Med J*, 2017, 33: 199-207.
 226. Chtourou Y, Aouey B, Aroui S, Kebieche M, Fetoui H. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. *Chemico-biological interactions*, 2016, 243: 1-9.
 227. Demirci K, Nazıroğlu M, Övey İS, Balaban H. Selenium attenuates apoptosis, inflammation and oxidative stress in the blood and brain of aged rats with scopolamine-induced dementia. *Metabolic brain disease*, 2017, 32: 321-329.
 228. Arami KM, Jameie B, Moosavi SA. Neuronal nitric oxide synthase. *Nitric oxide synthase: simple enzyme-complex roles*, 2017, 1.
 229. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal*, 2001, 357: 593-615.
 230. Mungrue IN, Bredt DS. nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *Journal of Cell Science*, 2004, 117: 2627-2629.
 231. Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2015, 9: 322.
 232. Džoljić E, Grabatinić I, Kostić V. Why is nitric oxide important for our brain? *Functional neurology*, 2015, 30: 159.
 233. Palus K, Makowska K, Całka J. Alterations in galanin-like immunoreactivity in the enteric nervous system of the porcine stomach following acrylamide supplementation. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20: 3345.
 234. Palus K, Całka J. Influence of acrylamide administration on the neurochemical characteristics of enteric nervous system (ENS) neurons in the porcine duodenum. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21: 15.
 235. Krishnan M, Kang SC. Vitexin inhibits acrylamide-induced neuroinflammation and improves behavioral changes in zebrafish larvae. *Neurotoxicology and teratology*, 2019, 74: 106811.
 236. Çelik H, Kandemir FM, Caglayan C, Özdemir S, Çomaklı S, Kucukler S, Yardım A. Neuroprotective effect of rutin against colistin-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat brain associated with the CREB/BDNF expressions. *Molecular biology reports*, 2020, 47: 2023-2034.
 237. Wu D, Liu H, Liu Y, Wei W, Sun Q, Wen D, Jia L. Protective effect of alpha-lipoic acid on bisphenol A-induced learning and memory impairment in developing mice: nNOS and keap1/Nrf2 pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 2021: 112307.

238. Jiang J, Duan Z, Nie X, Xi H, Li A, Guo A, Wu Q, Jiang S, Zhao J, Chen G. Activation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) signaling pathway in 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced neurotoxicity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2014, 38: 119-130.
239. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical journal*, 1989, 260: 625-634.
240. Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 264: 672-686.
241. Yuan L, Li J, Zha J, Wang Z. Targeting neurotrophic factors and their receptors, but not cholinesterase or neurotransmitter, in the neurotoxicity of TDCPP in Chinese rare minnow adults (*Gobiocypris rarus*). *Environmental Pollution*, 2016, 208: 670-677.
242. Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Corrêa M, da Rosa MM, Rubin MA, Schetinger MRC, Morsch VM. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 2009, 610: 42-48.
243. Chacón MA, Reyes AE, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 2003, 87: 195-204.
244. Bernhardt R, Alarcón R, Mezzano D, Fuentes P, Inestrosa NC. Blood cells cholinesterase activity in early stage Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 2005, 19: 204-212.
245. Jin QH, He HY, Shi YF, Lu H, Zhang XJ. Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2004, 25: 1013-1021.
246. Zhao M, Deng L, Lu X, Fan L, Zhu Y, Zhao L. The Involvement of Oxidative Stress, Neuronal Lesions, Neurotransmission Impairment, and Neuroinflammation in Acrylamide-Induced Neurotoxicity. 2021.
247. Abou Z, Omayma AR, Sonbaty S, Mohammed EA, Wael E, Barakat M. Effect of Acrylamide on neurotransmitters and acetyl-cholinestrerase activity in the brain of rats: Therapeutic effect of ferulic acid and selenium nanoparticles. *Ann Brit Med Sci*, 2017, 3: 18-25.
248. Auti ST, Kulkarni YA. Neuroprotective effect of cardamom oil against aluminum induced neurotoxicity in rats. *Frontiers in neurology*, 2019, 10: 399.
249. Fišar Z. Cannabinoids and monoamine neurotransmission with focus on monoamine oxidase. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2012, 38: 68-77.
250. Ghareeb DA, Khalil AA, Elbassoumy AM, Hussien HM, Abo-Sraiaa MM. Ameliorated effects of garlic (*Allium sativum*) on biomarkers of subchronic acrylamide hepatotoxicity and brain toxicity in rats. *Toxicological & environmental chemistry*, 2010, 92: 1357-1372.
251. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of neurochemistry*, 1992, 59: 1609-1623.
252. Ben-Shachar D, Zuk R, Glinka Y. Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *Journal of neurochemistry*, 1995, 64: 718-723.
253. Burke WJ, Li SW, Chung HD, Ruggiero DA, Kristal BS, Johnson EM, Lampe P, Kumar VB, Franko M, Williams EA. Neurotoxicity of MAO metabolites of catecholamine neurotransmitters: role in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology*, 2004, 25: 101-115.

254. Abdel-Wahab WM, Moussa FI. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug design, development and therapy*, 2019, 13: 1155.
255. Hussien HM, Abd-Elmegied A, Ghareeb DA, Hafez HS, Ahmed HE, Abd El-moneam N. Neuroprotective effect of berberine against environmental heavy metals-induced neurotoxicity and Alzheimer's-like disease in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 111: 432-444.
256. Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Helencourt C, Ravanani P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2014, 8: 213.
257. Hetz CA, Soto C. Stressing out the ER: a role of the unfolded protein response in prion-related disorders. *Current molecular medicine*, 2006, 6: 37-43.
258. Fedoroff N. Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses. *Annals of Botany*, 2006, 98: 289-300.
259. Feldman DE, Chauhan V, Koong AC. The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Molecular Cancer Research*, 2005, 3: 597-605.
260. Görlach A, Klappa P, Kietzmann DT. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxidants & redox signaling*, 2006, 8: 1391-1418.
261. He B. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death & Differentiation*, 2006, 13: 393-403.
262. Sokka A-L, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, Belluardo N, Lindholm D, Korhonen L. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *Journal of Neuroscience*, 2007, 27: 901-908.
263. Nakka VP, Gusain A, Raghubir R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotoxicity research*, 2010, 17: 189-202.
264. Teng X, Song J, Zhang G, Cai Y, Yuan F, Du J, Tang C, Qi Y. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by intermedin 1-53 protects against myocardial injury through a PI3 kinase-Akt signaling pathway. *Journal of molecular medicine*, 2011, 89: 1195-1205.
265. Römisch K. Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005, 21: 435-456.
266. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2000, 2: 326-332.
267. Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Current opinion in cell biology*, 2011, 23: 150-156.
268. Bo N, Yilin H, Chaoyue Y, Lu L, Yuan Y. Acrylamide induces NLRP3 inflammasome activation via oxidative stress-and endoplasmic reticulum stress-mediated MAPK pathway in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 145: 111679.
269. Hong Z, Minghua W, Bo N, Chaoyue Y, Haiyang Y, Haiqing Y, Chunyu X, Yan Z, Yuan Y. Rosmarinic acid attenuates acrylamide induced apoptosis of BRL-3A cells by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 151: 112156.
270. Brewer JW, Diehl JA. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97: 12625-12630.

271. Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101: 11269-11274.
272. Jiang H-Y, Wek SA, McGrath BC, Scheuner D, Kaufman RJ, Cavener DR, Wek RC. Phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF- κ B in response to diverse cellular stresses. *Molecular and cellular biology*, 2003, 23: 5651-5663.
273. Yuan Y, Yang J, Chen J, Zhao S, Wang T, Zou H, Wang Y, Gu J, Liu X, Bian J. Alpha-lipoic acid protects against cadmium-induced neuronal injury by inhibiting the endoplasmic reticulum stress eIF2 α -ATF4 pathway in rat cortical neurons in vitro and in vivo. *Toxicology*, 2019, 414: 1-13.
274. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, 2000, 20: 6755-6767.
275. Morishima N, Nakanishi K, Nakano A. Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286: 35227-35235.
276. Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 27013-27020.
277. Shati AA. Resveratrol protects against cadmium chloride-induced hippocampal neurotoxicity by inhibiting ER stress and GAAD 153 and activating sirtuin 1/AMPK/Akt. *Environmental toxicology*, 2019, 34: 1340-1353.
278. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, 2003, 23: 7448-7459.
279. Oishi N, Duscha S, Boukari H, Meyer M, Xie J, Wei G, Schrepfer T, Roschitzki B, Böttger EC, Schacht J. XBP1 mitigates aminoglycoside-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell death. *Cell death & disease*, 2015, 6: e1763-e1763.
280. Tungsum W, Jumnonprakhon P, Tocharus C, Govitrapong P, Tocharus J. Melatonin suppresses methamphetamine-triggered endoplasmic reticulum stress in C6 cells glioma cell lines. *The Journal of toxicological sciences*, 2017, 42: 63-71.
281. Alshammari GM, Al-Qahtani WH, AlFaris NA, Albekairi NA, Alqahtani S, Eid R, Yagoub AEA, Al-Harbi LN, Yahya MA. Quercetin alleviates cadmium chloride-induced renal damage in rats by suppressing endoplasmic reticulum stress through SIRT1-dependent deacetylation of Xbp-1s and eIF2 α . *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 141: 111862.
282. Wongprayoon P, Govitrapong P. Melatonin protects SH-SY5Y neuronal cells against methamphetamine-induced endoplasmic reticulum stress and apoptotic cell death. *Neurotoxicity research*, 2017, 31: 1-10.
283. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death & Differentiation*, 2004, 11: 381-389.
284. Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *The Journal of Biochemistry*, 2012, 151: 217-219.
285. Li Y, Guo Y, Tang J, Jiang J, Chen Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2014, 46: 629-640.

286. Wang Y, Duan L, Zhang X, Jiao Y, Liu Y, Dai L, Yan H. Effect of long-term exposure to acrylamide on endoplasmic reticulum stress and autophagy in rat cerebellum. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 224: 112691.
287. Qaisiya M, Brischetto C, Jašprová J, Vitek L, Tiribelli C, Bellarosa C. Bilirubin-induced ER stress contributes to the inflammatory response and apoptosis in neuronal cells. *Archives of Toxicology*, 2017, 91: 1847-1858.
288. Yin L, Dai Y, Cui Z, Jiang X, Liu W, Han F, Lin A, Cao J, Liu J. The regulation of cellular apoptosis by the ROS-triggered PERK/EIF2 α /chop pathway plays a vital role in bisphenol A-induced male reproductive toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 2017, 314: 98-108.
289. Erfan OS, Sonpol HM, Abd El-kader M. Protective effect of rapamycin against acrylamide-induced hepatotoxicity: The associations between autophagy, apoptosis, and necroptosis. *The Anatomical Record*, 2021.
290. Liu Y, Zhao H, Yin K, Guo M, Wang Y, Wang D, Zong H, Xing M. The protective effect of Zn²⁺ on As³⁺ toxicity in common carp: Resistance to oxidative stress, inhibition of endoplasmic reticulum stress, apoptosis and autophagy. *Aquaculture*, 2022, 546: 737375.
291. Han Q, Liu H, Zhang R, Yang X, Bao J, Xing H. Selenomethionine protects against ammonia-induced apoptosis through inhibition of endoplasmic reticulum stress in pig kidneys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 223: 112596.
292. Wang W, Huang L, Hu Y, Thomas E, Li X. Neuroprotective effects of notoginsenoside R1 by upregulating Trx-1 on acrylamide-induced neurotoxicity in PC12. *Human & experimental toxicology*, 2020, 39: 797-807.
293. Dasari S, Ganjayi MS, Gonuguntla S, Ramineedu K, Konda PY, Meriga B. Assessment of biomarkers in acrylamide-induced neurotoxicity and brain histopathology in rat. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 1970, 6: 79-86.
294. He Y, Tan D, Bai B, Wu Z, Ji S. Epigallocatechin-3-gallate attenuates acrylamide-induced apoptosis and astrogliosis in rat cerebral cortex. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2017, 27: 298-306.
295. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochemical research*, 2000, 25: 1439-1451.
296. Middeldorp J, Hol E. GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*, 2011, 93: 421-443.
297. Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 1985, 8: 203-214.
298. Chen J-H, Wu K-Y, Chiu M, Tsou T-C, Chou C-C. Acrylamide-induced astrogliotic and apoptotic responses in human astrocytoma cells. *Toxicology in Vitro*, 2009, 23: 855-861.
299. Farag OM, Abd-Elsalam RM, Ogaly HA, Ali SE, El Badawy SA, Alsherbiny MA, Li CG, Ahmed KA. Metabolomic profiling and neuroprotective effects of purslane seeds extract against acrylamide toxicity in rat's brain. *Neurochemical research*, 2021, 46: 819-842.
300. Farouk SM, Gad FA, Almeer R, Abdel-Daim MM, Emam MA. Exploring the possible neuroprotective and antioxidant potency of lycopene against acrylamide-induced neurotoxicity in rats' brain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 138: 111458.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Doğum tarihi: Doğum Yeri: Medeni Hali: Uyruğu: Adres: Tel: Faks: E-mail:
Eğitim
Lise: Lisans: Yüksek lisans: Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
-
İlgi Alanları ve Hobiler
-

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Yusuf DAĞ
Öğrencinin Numarası	Öğrenci numarasını yazmak için tıklayınız
Ana Bilim Dalı	Veterinerlik Fizyolojisi
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 0	% 15
II. Genel Bilgiler	%8	% 35
III. Materyal ve Metod	%21	% 35
IV. Bulgular	%14	% 15
V. Tartışma	%1	% 20

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Yusuf DAĞ	Prof. Dr. Dursunali ÇINAR
27.1.2022	27.1.2022
İmza:	İmza:

¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla ÜBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük

Sayı : 75296309-050.01.04-E.2000098913

31.03.2020

Konu : HADYEK Kararı.

VETERİNER FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 18.03.2020 tarihli ve 36643897-000-E.2000086593 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazımız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 30.03.2020 tarih ve 2 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 41 no'lu kararı ile sözkonusu doktora tez çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ad: <http://www.atauni.edu.tr/birim=veteriner-fakultesi>

Kep Adresi: atauni@hr01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



TOPLANTI TARİHİ : 30.03.2020

TOPLANTI SAYISI : 2

KARAR N0 41: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Veteriner Hekimliği Temel Bilimleri Bölümü, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Dursunali ÇINAR'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Ratlarda Akrilamid İle İndüklenen Endoplazmik Retikulum Stresi, Nöroinflamasyon ve Nöronal Apoptozis Üzerine Melatoninin Etkileri" isimli Doktora tez çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Dekanlığının 18.03.2020 tarihli ve 36643897-000-E.2000086593 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen Doktora tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

