

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SPİNAL KORD HASARI OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
ETANOLÜN FERROPTOSİS İLİŞKİLİ NRF2/GPX4
YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Sercan EROL

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2025

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SPİNAL KORD HASARI OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
ETANOLÜN FERROPTOSİS İLİŞKİLİ NRF2/GPX4
YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Sercan EROL

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Güngör KANBAK

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 3170 nolu proje kapsamında
desteklenmiştir

ESKİŞEHİR
2025

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Spinal Kord Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Etanolün Ferroptosis İlişkili NRF2/GPx4 Yolağı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 21.02.2024 tarihinde, 991 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sercan EROL

Tarih: 14.03.2025

İmza:

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Sercan EROL'a ait “Spinal Kord Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Etanolün Ferroptosis İlişkili NRF2/GPx4 Yolağı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması” adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 14.03.2025

Jüri Başkanı Prof. Dr. Güngör KANBAK
Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

Üye Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ
Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

Üye Prof. Dr. Hüseyin KAYADİBİ
Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun/...../.....
Tarih ve/.... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atilla Özcan ÖZDEMİR
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında almış olduğum uzmanlık eğitimi sürecinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren hocalarımdan, tez çalışmam boyunca bana farklı bakış açıları kazandıran, tezimde yapmak istediklerimi gerçekleştirmeme destek olan ve bu zorlu süreci keyifli hale getiren tez danışmanım Prof. Dr. Güngör KANBAK'a, nitelikli bir tıbbi biyokimya uzmanı olmamız için verdiği desteği ilk günümden itibaren hissettiğim, bana kazandırdığı bakış açılarının meslek hayatımda önemli izleri olacağına inandığım Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ'a, Prof. Dr. Sema USLU'ya, Prof. Dr. Hüseyin KAYADİBİ'ne, Doç. Dr. Fahrettin AKYÜZ'e, uzmanlık eğitimim boyunca üzerimdeki emeği burada anlatılamayacak kadar fazla olan Doç. Dr. Evin KOCATÜRK'e, Dr. Öğr. Üyesi Özben Özden IŞIKLAR'a, Dr. Öğr. Üyesi Zeynep KÜSKÜ KİRAZ'a, tez sürecinde tecrübelerinden faydalandığım ve kendisinden çok şey öğrendiğim Arş. Gör. Dr. Betül CAN'a, tez çalışmam boyunca bir çok aşamadaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Dr. Zeynep BAŞOĞLU'na, tez çalışmamdaki deney modelini oluşturmamıza yardımcı olan ESOGÜ Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Ana Bilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Turan KANDEMİR'e, histolojik incelemelerimizi gerçekleştiren ESOGÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ'e ve geçirimli elektron mikroskobu incelemelerimizi gerçekleştiren ESOGÜ ARUM koordinatörü Prof. Dr. İlknur DAĞ'a, istatistiksel analizlerimizi gerçekleştiren ESOGÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ertuğrul ÇOLAK'a, ESOGÜ TICAM ekibine, tez çalışmamdaki destekleri için ESOGÜ BAP koordinasyon birimine, uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarım ile tüm biyokimya ailesine ve son olarak her zaman yanımda olan aileme sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Erol S. Spinal kord hasarı oluşturulan sıçanlarda etanolün ferroptosis ilişkili NRF2/GPx4 yolağı üzerindeki etkisinin araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir 2025. Etanol kullanımı spinal kord hasarı vakalarının yaklaşık üçte birinde bulunmaktadır. Buna karşın etanolün spinal kord hasarındaki fizyopatolojik süreçlere etkisi iyi anlaşılamamıştır. Spinal kord hasarı sonrası travma bölgesinde gerçekleşen kanama ile demir yükünün artması ve spinal dokunun lipid içeriğinden zengin olması, ferroptosis için uygun zemin hazırlamaktadır. Etanolün spinal kord hasarındaki ferroptosis mekanizmalarına etkisini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda sıçanlara etanol uygulanmasının ardından spinal kord hasarı modeli oluşturuldu ve 1 saat sonra ferroptosis NRF2/GPx4 yolağı ile ilişkili biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular incelendiğinde, NRF2 gen ekspresyonlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim izlenmedi. Ferroptosisin ana düzenleyicisi olan SLC7A11/GPx4/GSH yolağı değerlendirildiğinde, sadece etanol uygulanan veya spinal kord hasarı oluşturulan gruplarda yolağın baskılanmasının yanı sıra, etanol uygulanmasının ardından spinal kord hasarı gerçekleştirilen grupta yolağın daha fazla baskılandığı görüldü. Lipid peroksidasyon ürünleri değerlendirildiğinde, SLC7A11/GPx4/GSH yolağındaki baskılanma ile uyumlu olarak, sıçanlara etanol uygulanmasının ardından gerçekleşen spinal kord hasarında 4-HNE ve MDA düzeyleri belirgin olarak daha yüksekti. Hematoksilen-Eozin, Nissl boyama ve TEM analizleri, biyokimyasal bulgular ile uyumlu olarak nöron hasarının ve karakteristik ferroptosis bulgularının etanol uygulanması sonrası gerçekleştirilen spinal kord hasarında daha belirgin olduğunu gösterdi. Sonuç olarak çalışmamız, yüksek kan alkol konsantrasyonlarında gerçekleşen spinal kord hasarında, ferroptotik hasarın daha şiddetli ve 1 saat gibi erken bir dönemde gerçekleştiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Alkol, SLC7A11, Geçirimli elektron mikroskopi, Nissl cisimciği

Destekleyen Kurumlar: ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, Proje No:

ABSTRACT

Erol S. The investigation of the effect of ethanol on ferroptosis-associated NRF2/GPx4 pathway in rats with spinal cord injury. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry Thesis in Medical Specialization, Eskişehir 2025. Ethanol use is found in approximately one-third of spinal cord injury cases. However, the effect of ethanol on the physiopathological processes in spinal cord injury is not well understood. After spinal cord injury, the increase in iron load with bleeding at the trauma site and the rich lipid content of the spinal tissue provide a favorable environment for ferroptosis. There is no study in the literature demonstrating the effect of ethanol on ferroptosis mechanisms in spinal cord injury. Therefore, in our study, a spinal cord injury model was created in rats after ethanol administration and biochemical and histopathological examinations related to ferroptosis NRF2/GPx4 pathway were performed 1 hour later. When the findings were analyzed, no statistically significant change was observed in NRF2 gene expression between the groups. When evaluating the main regulatory SLC7A11/GPx4/GSH pathway of ferroptosis, it was observed that in addition to the pathway being suppressed in the groups where ethanol was administered or spinal cord injury was performed, the pathway was more significantly suppressed in the group where spinal cord injury was performed after ethanol administration. When evaluating lipid peroxidation products, consistent with the suppression of the SLC7A11/GPx4/GSH pathway, the levels of 4-HNE and MDA were significantly higher in the spinal cord injury following ethanol administration in rats. Hematoxylin-Eosin, Nissl staining and TEM analyses showed that neuronal damage and characteristic signs of ferroptosis were more pronounced in spinal cord injury after ethanol administration, consistent with biochemical findings. In conclusion, our study shows that ferroptotic damage is more severe and occurs as early as 1 hour in spinal cord injury at high blood alcohol concentrations.

Key Words: Alcohol, SLC7A11, Transmission electron microscopy, Nissl bodies

Supporting Institution: ESOGU Commission of Scientific Research Projects, Project

No: 3170

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Spinal Kord Hasarı	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Fiziopatoloji	3
2.1.3. Spinal Kord Hasarı Yönetimi ve Tedavi Yaklaşımları	4
2.2. Reaktif Oksijen Türleri	5
2.3. Fenton Reaksiyonu	7
2.4. Lipid Peroksidasyonu	7
2.5. Ferroptosis	15
2.5.1. Tanımı ve Tarihi	15
2.5.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları ve Ferroptosis	15
2.5.3. Ferroptosis Mekanizması ve Regülasyonu	17
2.5.4. NRF2'nin Ferroptosisteki Rolü	27
2.5.5. Mitokondri ve Ferroptosis	28
2.6. Etanol	30
2.6.1. Genel Bilgiler	30
2.6.2. Etanolün Terapotik Kullanımı	31
2.6.3. Absorbsiyon ve Dağılım	31
2.6.4. Metabolizma	32
2.6.5. Eliminasyon	38
2.6.6. Etanol, Reaktif Oksijen Türleri ve Ferroptosis	40

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Etik Kurul İzni	42
3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı	42
3.3. Çalışma Planı	42
3.4. Deney Grupları	43
3.5. Etanol Hazırlanması ve Uygulanması	44
3.6. Spinal Kord Hasar Modeli	44
3.7. Biyokimyasal Analizler	46
3.7.1. Serum Örneklerinde Yapılan Analizler	46
3.7.2. Spinal Kord Doku Örneklerinde Yapılan Analizler	46
3.8. Histolojik Analizler	57
3.8.1. Hematoksilen-Eozin ve Nissl Boyama	57
3.8.2. Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM)	58
3.9. İstatistiksel Analiz	59
4. BULGULAR	60
4.1. Biyokimyasal Bulgular	60
4.1.1. Etanol Düzeyleri	60
4.1.2. Total Demir Düzeyleri	61
4.1.3. GSH Düzeyleri	62
4.1.4. MDA Düzeyleri	63
4.1.5. Western Blot Analiz Sonuçları	64
4.1.6. Kantitatif Real Time PCR Analiz Sonuçları	66
4.2. Histolojik Bulgular	69
4.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama	69
4.2.2. Nissl Boyama	71
4.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskopi	74
5. TARTIŞMA	
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	
KAYNAKLAR	

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-HHE	4-hidroksi-2E-heksenal
4-HNE	4-hidroksinonenal
13-HpODE	13-hidroperoksiyoktadekadienoik asit
15-HpETE	15-hidroperoksiikosatetraenoik asit
AA	Araşidonik asit
AdA	Adrenik asit
AANS	Amerikan Nörolojik Cerrahlar Birliği
ACSL4	Açıl-koenzim A sentetaz uzun zincir aile üyesi 4
ADH	Alkol dehidrojenaz
AIFM2	Apoptozu indükleyen faktör mitokondri ile ilişkili 2
ALDH	Aldehit dehidrogenaz
ALOX	Araşidonat lipoksijenaz
AMPK	AMP bağımlı protein kinaz
BH ₄	Tetrahidrobiyopterin
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CAT	Katalaz
CHMP5	Yüklü multivesiküler cisim proteini 5
CHMP6	Yüklü multivesiküler cisim proteini 6
CNS	Nörolojik Cerrahlar Kongresi
CoQ10	Koenzim Q
COX	Siklooksijenaz
CYB5R1	Sitokrom b5 redüktaz 1
CYP2E1	Sitokrom P450 2E1
DHODH	Dihidroorotat dehidrogenaz

DMT-1	İki değerklikli metal demir taşıyıcı-1
DTNB	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit
ESCRT-III	Taşıma için gerekli endozomal ayırma kompleksi
EtG	Etil glukuronid
EtS	Etil sülfat
FAEE	Yağ asidi etil esterleri
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu
FSP1	Ferroptosis baskılayıcı protein 1
GCH1	GTP siklohidrolaz-1
GCL	γ -Glu-Cys ligaz
GSH	Redükte glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
GPx4	Glutatyon peroksidaz 4
H	Hidrojen
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H&E	Hematoksilen-Eozin
OH [•]	Hidroksil radikali
KEAP1	Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1
LO [•]	Alkoksil radikali
L'OO [•]	Hidroperoksil radikali
LOOH	Hidroperoksit
LOX	Lipoksijenaz
LPCAT3	Lizofosfatidilkolin açiltransferaz 3
MDA	Malondialdehit
MEOS	Mikrozomal etanol oksidasyon sistemi
MUFA	Tekli doymamış yağ asitleri

NAD	Nikotinamid-adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat
NIAAA	Amerikan Alkolizm ve Madde Bağımlılığı Enstitüsü
NOX	NADPH oksidaz
NRF2/NFE2L2	Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2
O ₂ ^{•-}	Süperoksit anyon radikali
PCD	Programlı hücre ölümü
PE	Fosfatidiletanolamin
PEth	Fosfatidiletanol
POR	Sitokrom P450 oksidoredüktaz
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
ROO [•]	Peroksil radikali
ROOH	Organik hidroperoksit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SKH	Spinal kord hasarı
SLC7A11	Solüt taşıyıcı aile 7 üye 11
SLC3A2	Solüt taşıyıcı aile 3 üye 2
STEAP3	Prostat 3'ün altı-transmembran epitelyal antijeni
TfR1	Transferrin reseptörü 1
TEM	Geçirimli elektron mikroskopi
TNB	5'-thio-2-nitrobenzoik asit
VDAC	Voltaja bağlı anyon kanalı

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Farklı hücre içi yapılarda reaktif oksijen türlerinin üretimi	6
2.2. Lipid peroksidasyonu genel mekanizması	8
2.3. Lipid peroksitlerin GPx4 ile indirgenmesi	9
2.4. Non-enzimatik lipid peroksidasyonu basamakları	9
2.5. İlk lipid peroksit oluşumu ve ferroptosis bağlantısı	10
2.6. n-3 ve n-6 PUFA'ların non-enzimatik ve enzimatik peroksidasyonu	12
2.7. 4-HNE'nin protein aminoasit rezidüleri ile oluşturduğu bağlanmalar ve analiz yöntemleri	13
2.8. Ferroptosis aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları	17
2.9. Demirin intestinal absorpsiyonu	18
2.10. Demirin ferroptosisteki rolü ve SLC7A11/GPx4 yolağı	19
2.11. Lipid peroksidasyonu ve ferroptosis	21
2.12 NRF2/SLC7A11/GPx4 yolağı ve regülatör yolaklar	23
2.13. Etanol metabolizması	32
2.14. Etanolün alkol dehidrojenaz ile oksidasyonu	33
2.15. Etanolün MEOS ile oksidasyonu	34
2.16. Etanolün katalaz ile oksidasyonu	35
2.17. Asetaldehitin oksidasyonu	36
2.18. Asetatın asetil-KoA sentetaz ile aktivasyonu	36
2.19. Karaciğerdeki etanol metabolizması	38
2.20. Etanol metabolizması ve eliminasyonu	39
3.1. Çalışma planı özeti	42
3.2. Spinal kord hasar modeli	45
3.3. Western Blot analizi çalışma gruplarının oluşturulması	49

	Sayfa
3.4. Western blot analizi yürütme işlemi	51
3.5. Western blot analizi membrana transfer işlemi	51
3.6. Primer ve sekonder antikorların uygulanması	52
3.7. RNA izolasyonu sırasında fazların oluşumu	54
3.8. cDNA sentezi protokolünün uygulanması	55
4.1. Serum etanol düzeyleri	60
4.2. Spinal kord doku demir düzeyleri	61
4.3. Spinal kord doku GSH düzeyleri	62
4.4. Spinal kord doku MDA düzeyleri	63
4.5. Western blot analizi	64
4.6. GPx4, SLC7A11 ve 4-HNE rölatif protein ekspresyon düzeyleri	65
4.7. Spinal kord doku GPx4 gen ekspresyon düzeyleri	66
4.8. Spinal kord doku SLC7A11/xCT gen ekspresyon düzeyleri	67
4.9. Spinal kord doku NRF2 gen ekspresyon düzeyleri	68
4.10. Grupları temsil eden sıçanların medulla spinalislerinin ışık mikroskopik görüntüleri.	69
4.11. Grupları temsil eden sıçanların medulla spinalislerinin nissl boyama görüntüsü	71
4.12. K, E, S ve SE gruplarını temsil eden TEM kesitleri	74

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Hücre ölüm mekanizmalarının biyokimyasal ve morfolojik özellikleri	16
2.2. Ferroptosis uyarıcıları	26
2.3. Ferroptosis inhibitörleri	27
2.4. Etanol ilişkili ROT üretimi	40
3.1. Spinal kord doku GSH analiz prosedürü	48
3.2. Antikorlar ve işaretleyiciler	52
3.3. qRT-PCR analizi için kullanılan forward ve reverse primerler	56
4.1. Serum etanol düzeyleri	60
4.2. Spinal kord doku demir düzeyleri	61
4.3. Spinal kord doku GSH düzeyleri	62
4.4. Spinal kord doku MDA düzeyleri	63
4.5. GPx4, SLC7A11 ve 4-HNE rölatif protein ekspresyon düzeyleri	64
4.6. Spinal kord doku GPx4 gen ekspresyon düzeyleri	66
4.7. Spinal kord doku SLC7A11/xCT gen ekspresyon düzeyleri	67
4.8. Spinal kord doku NRF2 gen ekspresyon düzeyleri	68
4.9. Histolojik değerlendirmeler ve skorlamalar	73

1. GİRİŞ

Spinal kord hasarı (SKH), motor, duyuşal ve otonomik işlevlerde hasara yol açan, aynı zamanda hastanın psikolojik durumunu da olumsuz yönde etkileyen, yaşam boyu yüksek sağlık bakım maliyetleri ile ilişkili bir patolojidir. Akut spinal kord hasarının primer ve sekonder olmak üzere 2 fazı vardır. Primer hasar küt travmanın bir sonucudur. Sekonder hasar ise ilk travmaya verilen fizyolojik yanıttır (1). Bir çok çalışma SKH sonrası kan-spinal kord bariyerinin bozulmasının spinal kord ödemi, kanama, oksidatif stres ve aşırı inflamatuvar cevap gibi sekonder hasarlara neden olabileceğini göstermiştir (2). Spinal kord hasarında primer hasarın geri dönüşümsüz olmasından dolayı, sekonder hasar kaskadı üzerinden nöronal dejenerasyonun önlenmesine ve aksonal rejenerasyonun stimülasyonuna odaklanılması önerilmektedir (3). Dekametazon ve metilprednizolon gibi glukokortikoidler SKH tedavisinde kullanılmaktadır. Spinal kord hasarı ile ilgili çalışmalarda elde edilen bulgulara göre steroidlerin tedavideki faydası tartışmalıdır (1, 4). Rehabilitasyon terapisi ise kısıtlı ve küratif olarak memnun edici değildir (3). Bu nedenle SKH fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve nöron sağ kalımı ile rejenerasyonuna yönelik yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Ferroptosis, 2012 yılında Stockwell ve Dixon tarafından tanımlanan non-apoptotik regüle hücre ölüm formudur. Genetik, biyokimyasal ve morfolojik olarak diğer programlı hücre ölüm formlarından farklıdır. Ferroptosisi oluşturan mekanizmalar demir fazlalığı ve lipid peroksidasyonu iken, glutatyon peroksidaz 4 (GPx4) ferroptosisin ana düzenleyicisidir. SKH sonrası, spinal kord bol miktarda kanar, eritrositler birikir, hemoliz oluşur ve ortamda demir birikimi gerçekleşir. Travma sonrası oluşan stres, reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumunu ve glutamat eksitotoksitesitesini artırır. Bütün bu faktörler ferroptosisi indükler. Son yıllardaki çalışmalarda elde edilen bulgular ferroptosisin SKH sonrası gelişen sekonder hasarda kritik rol oynadığını gösterir niteliktedir ancak bu konuda kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (3, 5). Ferroptosis inhibisyonu ile spinal kord hasarında iyileşmenin sağlandığı çalışmalar literatürde yerini almıştır (6–9). Ancak, literatürde yapılan SKH ve ferroptosis ilişkili araştırmalar, ağırlıklı olarak SKH'den günler ya da haftalar sonrasındaki biyokimyasal ve histolojik değişiklikler hakkında bilgi vermektedir. Bu

nedenle SKH sonrası ferroptotik süreçler ile ilgili erken dönemdeki biyokimyasal ve histolojik bulguların araştırılması, nöron kaybını en aza indirmek ve nöron rejenerasyonuna yönelik yeni tedavi stratejileri geliştirmek için faydalı olabilir.

Spinal kord hasarlı bireylerin %20-47'sinin hasar anında yüksek kan alkol düzeyine sahip olduğu raporlanmıştır. Akut etanol intoksikasyonu SKH vakalarının yaklaşık üçte birinde bulunmasına karşın etanolün SKH'ye bağlı patofizyolojik süreçler üzerindeki etkileri iyi anlaşılamamıştır. Yüksek kan alkol düzeylerinin spinal kord hasarı üzerindeki etkisini araştırarak klinik çalışmalar, sensorimotor iyileşme, morbidite ve mortalite ile ilgili farklı sonuçlara sahiptir (10). Etanolün ferroptosisi indüklediği ve hepatik hücre ölümüne katkı sağladığı yakın zamandaki çalışmalarda gösterilmiştir (11). Spinal kord hasarında etanolün ferroptosis mekanizmaları üzerindeki etkilerini gösteren bir çalışma ise literatürde bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, deneysel spinal kord hasarı sıçan modeli oluşturularak, travma öncesi tüketilen etanolün, medulla spinalis hasarında oluşan ferroptosis üzerindeki akut etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla spinal kord örneklerinde ferroptosis NRF2/GPx4 yolağı ilişkili biyobelirteçlerin analizleri ve histopatolojik incelemeler yapıldı. Spinal kord hasarlı bireylerin yaklaşık üçte birinde etanol tespit edildiği ve ferroptosisin sekonder hasarda önemli bir rol aldığı göz önünde bulundurulduğunda, etanolün spinal kord hasarı ve ferroptosis üzerindeki akut etkilerinin araştırılması, SKH fizyopatolojisinin anlaşılmasına ve nöron sağkalımı ile nöron rejenerasyonuna yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Kord Hasarı

2.1.1. Epidemiyoloji

Spinal kord hasarının Dünya çapında görülme sıklığı yılda bir milyon kişi başına 10,4 ile 83 vaka arasında değişmektedir. Vakaların %78'i erkek bireylerde görülmektedir. Yaralanma anında hastaların ortalama yaşı yaklaşık 43'tür, ancak adolesan/genç yetişkinlerde bir pik ve 65 yaş üstü ikinci bir pik ile bimodal dağılım gösterir. Motorlu taşıt kazaları spinal kord yaralanmalarının %38,6'sını oluştururken, düşmeler vakaların %32,2'sini, şiddet eylemleri %14'ünü, sporla ilgili etkinlikler %7,8'ini, cerrahi %4,2'sini ve diğer tüm nedenler %3,2'sini oluşturmaktadır (4).

2.1.2. Fiziopatoloji

Normal spinal kord fizyolojisi astrositler, nöronlar, mikroglia ve oligodendrositler gibi birçok hücre tipi arasındaki etkileşimi içerir. Spinal kord hasarından sonra, bu etkileşimler kesintiye uğrar ve disorganize olur, bu da iyileşmenin bozulmasına yol açar (1). Akut spinal kord hasarının primer ve sekonder olmak üzere iki fazı vardır. Primer faz, künt travmanın bir sonucudur. Burst kırığı, faset dislokasyonu ve fleksiyon-distaksiyon gibi yaralanmalar, vertebral kolon, intervertebral disk, ligamanlar ve spinal kortta hasarla sonuçlanabilir (4). Primer yaralanma, spinal dokularda daha fazla biyokimyasal ve mekanik hasar oluşturan sekonder yaralanmayı tetikler. Sekonder faz, ilk travmaya verilen fizyolojik yanıttır ve akut, subakut ve kronik olmak üzere üç faza ayrılır. Primer yaralanma fazını takiben akut sekonder faz; vasküler hasar, iyon dengesizliği, eksitotoksisite, serbest radikal üretimi, kalsiyum artışı, lipid peroksidasyonu, inflamasyon, ödem ve nekroz ile kendini gösterir. Akut sekonder faz devam ederse, subakut sekonder faz başlar ve nöronal apoptoz, aksonal demiyelinizasyon, wallerian dejenerasyonu, aksonal remodelling ve glial skar oluşumu görülür. Subakut sekonder yaralanma, kistik kavite oluşumu ve glial skarın olgunlaşması ile karakterize edilen kronik sekonder yaralanma fazına yol açar (1, 4).

Spinal kord hasarı oluştuktan sonra, hemoraji nedeniyle eritrositler birikir, hemoliz oluşur ve demir birikimi gerçekleşir. SKH sonrası ortaya çıkan stres, ROT oluşumunu aktive eder ve ferroptosisi uyarır. Son yıllarda elde edilen bulgular ile ferroptosisin SKH'yi takiben gelişen sekonder hasarda kritik rol oynadığı anlaşılmıştır (3, 5). SKH'nin patofizyolojik sürecinde, nöronlar, mikrogliya, astrositler ve endotelyal hücreler dahil olmak üzere birçok hücre ferroptosisine uğrar (12). Diğer yandan nekroz, otofaji, apoptosis ve piroptosisin de SKH sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir (13).

2.1.3. Spinal Kord Hasarı Yönetimi ve Tedavi Yaklaşımları

Spinal kord hasarında hasta yönetimi yaralanma yerinde başlatılır. SKH'nın yaklaşık %25'i beyin, göğüs/karın veya büyük ekstremiteler yaralanması ile birlikte görülür. Tüm tıbbi acil durumlarda olduğu gibi, ilk değerlendirme hava yolu, solunum ve dolaşım'a odaklanır ve kılavuzlara göre kapsamlı acil yönetimi yapılır. Görüntüleme, SKH'de tanı ve yönetim rehberliğinde temel bir rol oynar. Spinal kordtaki yapısal yaralanma gösterilir ve tedavinin cerrahi olup olmayacağı belirlenir. Birçok çalışma erken dekompresif cerrahinin fayda sağladığını göstermektedir (4).

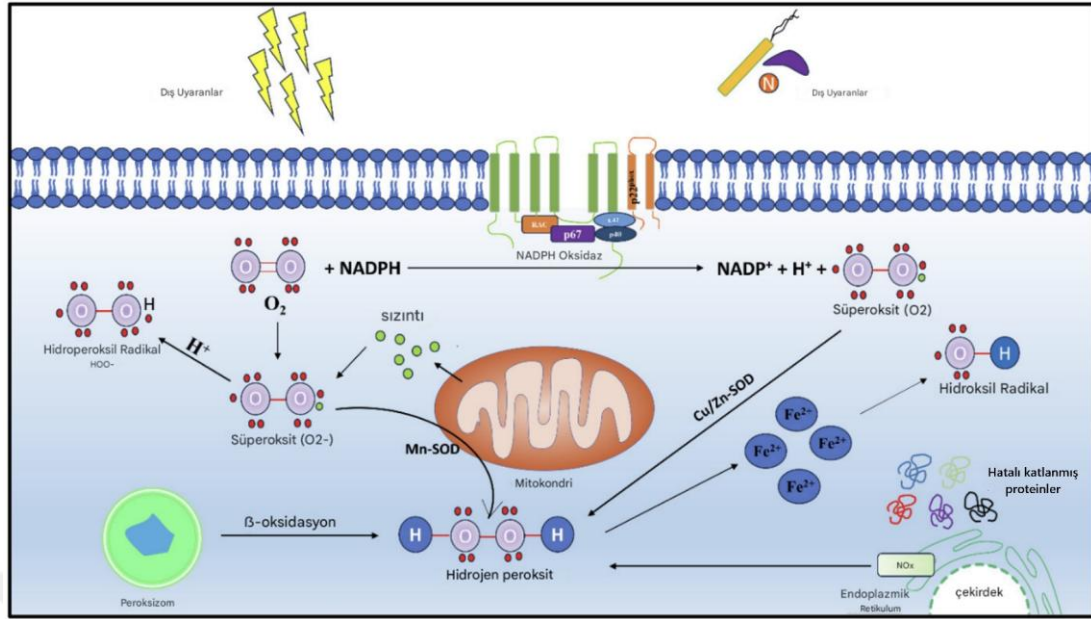
Spinal kord hasarında primer hasarın irreversible olmasından dolayı, sekonder hasar kaskadı üzerinden nöronal dejenerasyonun önlenmesine ve aksonal rejenerasyonun stimülasyonuna odaklanılması önerilmektedir (3). Spinal kord hasarındaki sekonder hasarın kompleks fizyopatolojisinden dolayı birden çok mekanizmayı etkileyen tedavi kombinasyonlarının başarılı olabileceği düşünülmektedir. Metilprednizolon SKH'nin medikal tedavisinde FDA-onaylı tek ilaçtır (14). Deksametazon ve metilprednizolon gibi glukokortikoidler SKH'nin medikal tedavisinde yıllardır kullanılmaktadır. Glukokortikoidler nöron uyarılabilirliği üzerinde etkili olur, reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyonu oluşumunu inhibe eder (1). İlk veriler steroid uygulamasının faydalı olduğunu düşündürse de, steroidlerin rolünü araştıran çok sayıda çalışma, kullanımlarının fayda sağlamadığını göstermiştir. 2013 yılında Amerikan Nörolojik Cerrahlar Birliği (AANS) ve Nörolojik Cerrahlar Kongresi (CNS) kılavuzları, spinal kord hasarı tedavisi için metilprednizolon kullanımını kanıt eksikliği ve olası ciddi

komplikasyonlara yol açması nedeniyle önermemesine karşın, 2017 tarihli AO Spine kılavuzları, tıbbi kontrendikasyonu olmayan hastalarda spinal kord hasarından sonraki ilk 8 saat içinde 24 saat boyunca intravenöz yüksek doz metilprednizolon verilmesini önermiştir. Steroidlerin akut spinal kord hasarı tedavisindeki rolü tartışmalı olmaya devam etmektedir (4). Ferroptosis inhibisyonu ile spinal kord hasarında iyileşmenin sağlandığı çalışmalar ise literatürde yerini almıştır (6–9).

2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen memeli yaşamı için vazgeçilmezdir. Dört elektron transferi ile oksijen suya indirgenir ve açığa çıkan enerji kimyasal enerji olarak depolanır. Ancak her zaman oksijenin indirgenmesi tamamlanamayabilir ve ROT oluşur (15). Reaktif oksijen türleri, moleküler oksijenden türetilen oksidanlar için kullanılan genel bir terimdir. ROT, reaktif nitrojen, sülfür, karbon, selenyum, elektrofil ve halojeni de içeren reaktif türlerinin bir parçasıdır. ROT, hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$), peroksil radikali ($\text{ROO}^\bullet$), süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) gibi radikal olan ve hidrojen peroksit (H_2O_2), organik hidroperoksitler (ROOH) gibi radikal olmayan türler olarak ikiye ayrılır (16).

Reaktif oksijen türleri, indirgeyici olan bileşiklerden moleküler oksijene elektron transferi nedeniyle oluşur. Genel olarak, mitokondriler ROT üretiminin başlıca yerleri olarak kabul edilir, ancak patojenler, nanopartiküller, radyasyon veya fotoaktivasyon gibi farklı uyarıcılar tarafından tetiklendiğinde sitoplazma, hücre zarı, peroksizomlar ve endoplazmik retikulum gibi farklı hücresel bölümlerde önemli miktarda ROT üretilebilir (17) (Şekil 2.1). Sitoplazmik ROT büyük ölçüde NADPH oksidaz (NOX) ailesine ait enzimler tarafından üretilir. Bu enzimler elektronları NADPH'den moleküler oksijene aktararak süperoksit ve ardından diğer reaktif oksijen moleküllerini üretirler. Endoplazmik retikulumda oksidatif protein katlanması ve katlanmış proteinlerde disülfid bağı oluşumunun bir yan ürünü olarak H_2O_2 üretilir. Mitokondriyal ROT esas olarak oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünü olarak oluşurken, peroksizomlarda elektron transferi adenosin trifosfat (ATP) üretmez ancak çeşitli oksidazlar H_2O_2 üretir (17). Ayrıca eritrositler, mitokondri olmamasına rağmen, heme bağlı demir (Fe^{2+}) aracılığıyla ROT üretebilir (18).



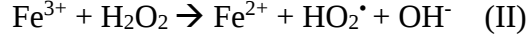
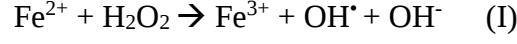
Şekil 2.1. Farklı hücre içi yapılarda reaktif oksijen türlerinin üretimi-Mukherjee ve ark. (17)'dan alınmıştır.

Hidrojen peroksit, Fe^{2+} ile reaksiyona girdiğinde, Fenton reaksiyonuna uğrar ve hidroksil radikalleri üretirken, süperoksitin protonlarla etkileşimi hidroperoksil radikalleri verir (17). H_2O_2 , iki elektronlu bir oksidandır ancak reaktivitesi zayıftır. $\text{OH}^\bullet$, spesifik olmayan bir şekilde reaksiyona giren en reaktif biyolojik oksidandır. $\text{O}_2^\bullet$, Fe-S kümeleri ile reaksiyona girerek demir salımına neden olur ve bazı geçiş metal iyonları ile reaksiyona girer. Organik hidroperoksitler ise spesifik çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) lipoksigenazlar ve siklooksigenazlar tarafından enzimatik olarak oluşturulur ve hücre sinyalizasyonunda önemlidirler. Organik hidroperoksitler Nükleer faktör eritroid 2- Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 (NRF2-KEAP1) yoluyla sinyalizasyonunda doğrudan fonksiyon görebilirler (16).

2.3. Fenton Reaksiyonu

1890'larda Henry John Horstman Fenton, Fe^{2+} ve hidrojen peroksit arasında, Fenton reaksiyonu olarak adlandırılan hidroksil radikali üreten redoks reaksiyonunu bulmuştur (19). Reaksiyon karmaşık zincir reaksiyonları içerir. Fe^{2+} ve H_2O_2 arasında

hidroksil radikalleri üretilir (Reaksiyon I). Ardından, üretilen Fe^{3+} , H_2O_2 tarafından indirgenerek Fe^{2+} (Reaksiyon II) yeniden üretilir ve bir döngü başlatılır (20).



Demirin farklı değerlikleri arasındaki redoks döngüsü, verimli Fenton reaksiyonları için en kritik bileşendir. Heterojen Fenton reaksiyonu sırasında Fe, demir hidroksit çökmesi olmaksızın $\text{OH}^\bullet$ üretir. Yüksek miktarda H_2O_2 gerekliliği, reaksiyon için optimum pH aralığının dar olması ve ferrik hidroksitlerin oluşumu gibi durumlar reaksiyon verimliliğini etkileyebilir. pH 3'ün üzerinde olduğunda Fe^{2+} $\text{Fe}(\text{OH})_2$ oluşturur ve bu pH 4 te maksimumdur. Bu noktada $\text{Fe}(\text{OH})_2$ 'nin reaktivitesi Fe^{2+} 'den çok daha yüksek olmasına rağmen, Fe^{3+} pH 3'ün üzerinde inaktif hidroz oksihidroksitler üretir ve bu ileri reaksiyonları büyük ölçüde engeller (20).

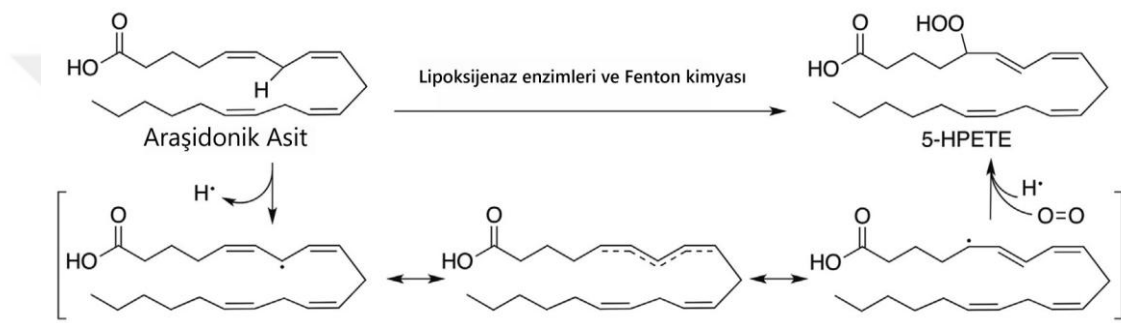
2.4. Lipid Peroksidasyonu

Tüm biyolojik sistemlerde, oksidatif ve indirgeyici reaksiyonlar redoks dengesinde bulunur. Redoks dengesindeki bozulmalar sonucu biriken oksidan maddeler DNA, lipid ve proteinleri oksitleyerek yapılarını, fiziksel özelliklerini ve aktivitelerini değiştirebilir. Lipidler hücre membran bütünlüğünden sorumludurlar ve lipidlerin peroksidasyonu lipid-lipid etkileşimlerini, iyon gradyanlarını, membran akışkanlığını ve membran geçirgenliğini değiştirir. Giderek artan sayıda çalışma, lipid peroksitlerin inflamasyon, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, oküler ve böbrek dejenerasyonu gibi birçok patolojik duruma aracılık ettiğini göstermektedir. Ayrıca, lipid peroksidasyonu regüle non-apoptotik hücre ölüm formu olan ferroptosiste rol oynamaktadır (21).

Lipid peroksitler, lipid endoperoksitler ve lipid hidroperoksitler olarak iki sınıfa ayrılabilir. Lipid peroksitlerin biyosentezi enzimatik veya non-enzimatik olarak gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte her iki durumda da lipid peroksidasyonunun mekanizması hemen hemen aynıdır (21).

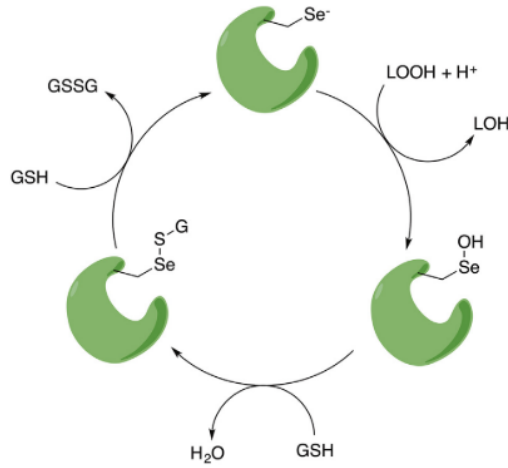
Bu süreçteki basamaklar;

- i) Oksijen metabolizmasından serbest radikallerin oluşumu ($\text{OH}^\bullet$; $\text{HO}_2^\bullet$), çoklu doymamış bir lipitten bir hidrojen (H) çıkarımı;
- ii) Lipidin karbon merkezli radikaline O_2 eklenmesi;
- iii) Lipid hidroperoksil radikaline H eklenmesi ve lipid hidroperoksit (LOOH) oluşumu şeklindedir (21) (Şekil 2.2) .



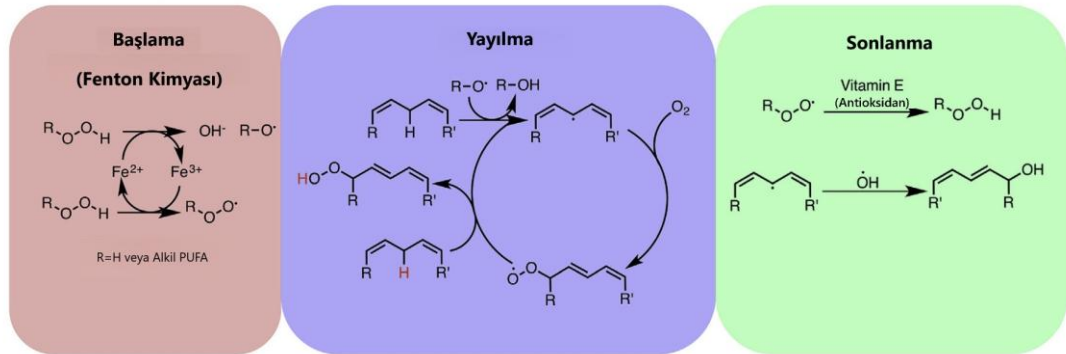
Şekil 2.2. Lipid peroksidasyonu genel mekanizması-Gaschler ve ark. (21)'dan alınmıştır.

Okside lipidler, siklooksijenazlar (COX'lar), sitokrom p450'ler (CYP'ler) ve lipoksijenazlar (LOX'lar) tarafından enzimatik olarak sentezlenebilir. Lipid hidroperoksitlerin sentezine en büyük katkıyı LOX enzimleri sağlar (22). Araşidonat lipoksijenaz (ALOX), öncü hidroperoksit (LOOH) ve ardından malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi reaktif aldehytler gibi çeşitli hidroperoksi PUFA türevlerini üreten hem olmayan demir içeren bir enzim sınıfıdır (23). Aerobik metabolizma sırasında membranlarda sürekli olarak LOOH üretilir. Muhtemelen LOX'lar tarafından çoğaltılan membranlardaki LOOH , GPx4 tarafından sürekli olarak hidroksi türevlerine (LOH) indirgenir (22) (Şekil 2.3). Sitokrom P450 oksidoredüktaz (POR), ferroptosis sırasında PUFA peroksidasyonunu arttırmada ALOX'tan bağımsız bir rol oynar (23).



Şekil 2.3. Lipid peroksitlerin GPx4 ile indirgenmesi- Ursini ve ark. (22)'dan alınmıştır.

Lipidlerin enzimatik olmayan peroksidasyonu, karbon ve oksijen merkezli radikallerin aracılık ettiği bir süreçtir. Bu süreç başlama, yayılma ve sonlanma olarak üç aşamaya ayrılır (21) (Şekil 2.4).

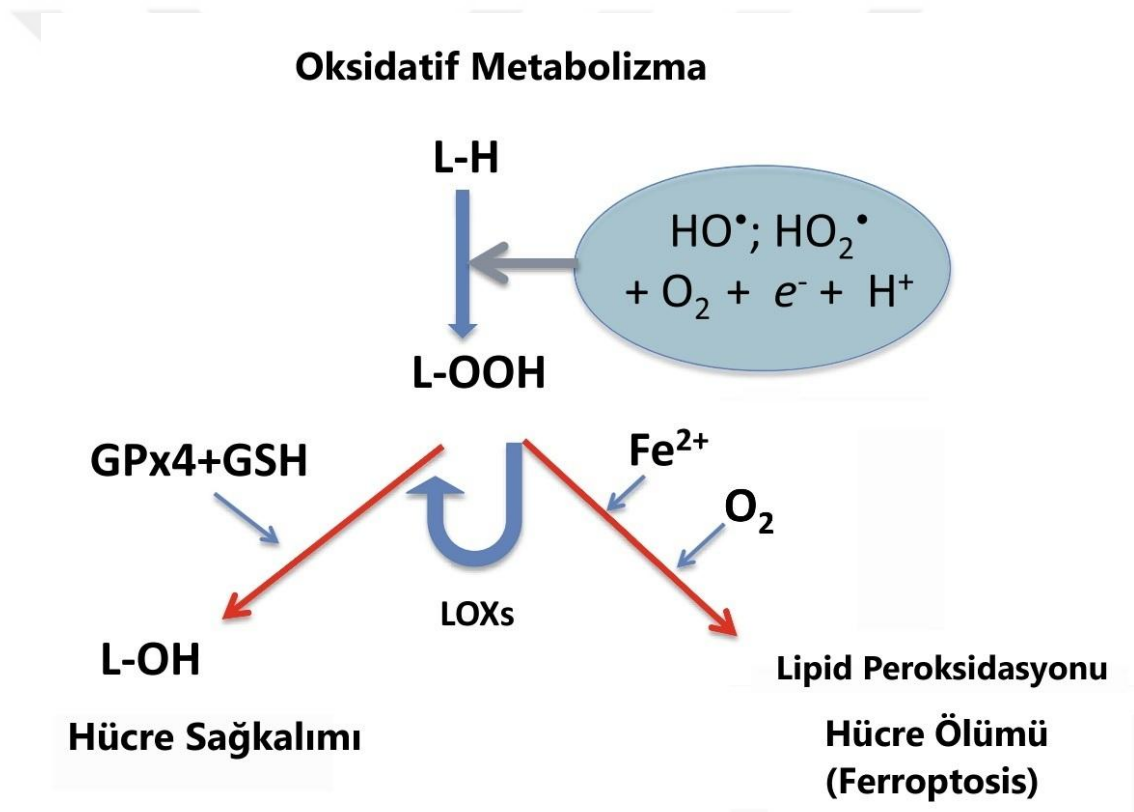


Şekil 2.4. Non-enzimatik lipid peroksidasyonu basamakları- Gaschler ve ark. (21)'dan alınmıştır.

Başlama adımı, radikal olmayan moleküllerden radikal bileşikler üreten herhangi bir süreçtir. Başlatma adımı tamamlandıktan sonra lipid peroksidasyonu yayılma aşamasına geçer. Radikal bileşiklerin yeni radikallere yol açması, yayılma

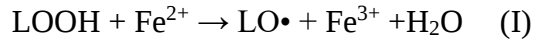
aşamasının ayırt edici özelliğidir. Bu nedenle enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu zincirleme bir reaksiyon olarak düşünülebilir. Bu zincir reaksiyon iki radikalın birbiri ile reaksiyona girmesiyle veya antioksidanlar tarafından sonlandırılabilir (21).

LOOH, peroksidatif zincir reaksiyonunun başlatılması için öncüdür (Şekil 2.5). Hücre membranında öncü LOOH oluşumunda, mevcut verilere göre ilk kritik olayın $O_2^{\cdot -}$ üretimi olduğu varsayılmaktadır. Süperoksit anyonu iyi bir oksidan değildir. $O_2^{\cdot -}$, kendiliğinden veya enzimatik olarak hidrojen peroksit ve ardından Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikale indirgenir (22) (Bkz. Şekil 2.1)



Şekil 2.5. İlk lipid peroksit oluşumu ve ferroptosis bağlantısı- Ursini ve ark. (22)'dan alınmıştır.

Membranlarda başlatma aşaması, bir geçiş metalinden bir LOOH'a elektron transferi ile gerçekleştirilir. Önce alkoksil radikali (LO•) üretilir (I) ve ardından diğer basamaklar reaksiyon II, III, IV, V ve VI'da belirtildiği gibi gerçekleşir (22).



LO•, komşu bir lipitten (L'H) bir H çıkararak karbon merkezli bir radikal (L'•) oluşturur (II) veya daha büyük olasılıkla, aynı yağ asidi zincirinde bir epoksi grubu ve yeni bir karbon merkezli radikal oluşturarak yeniden düzenlenir (Epoksi-L•).



Karbon merkezli radikallere (L'• veya Epoksi-L•) geri dönüşebilir olarak oksijen eklenerek bir lipid hidroperoksil radikali (L'OO•) oluşur (III).



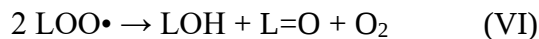
LOO•, doymamış bir yağ asidinden bir H alarak LOOH'ya dönüşür ve yeni bir L'• oluşur, lipid peroksidasyonu yayılır (radikallerin sayısı artmaz) (IV).



Antioksidanlar (Aox-OH), H donörü olarak bu reaksiyonları stabilize edebilir. Oluşan antioksidan radikali (Aox-O•), peroksidatif zincir reaksiyonunun yayılması için etkin olmadığından yayılmayı önleyen bu reaksiyon “zincir kırma” olarak tanımlanır (V). Zincir kırma reaksiyonunun, yayılmayı sınırlamasına rağmen, Fe²⁺ varlığında peroksidasyonu başlatan LOOH oluşumunu desteklediğini belirtmek gerekir.

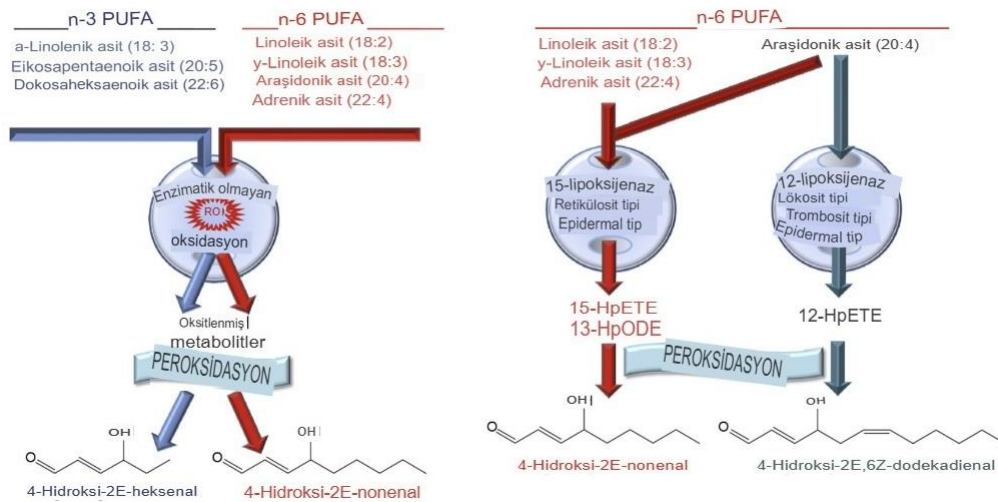


Serbest radikallerin sayısının azalmasıyla sonuçlanan tipik bir durdurma reaksiyonu ise, Russell mekanizması aracılığıyla gerçekleşir (VI). Yağ asidi zincirinin bir hidroksil ve bir keto türevi (LOH ve L=O) üretilirken, moleküler oksijen bir foton yayarak serbest bırakılır.



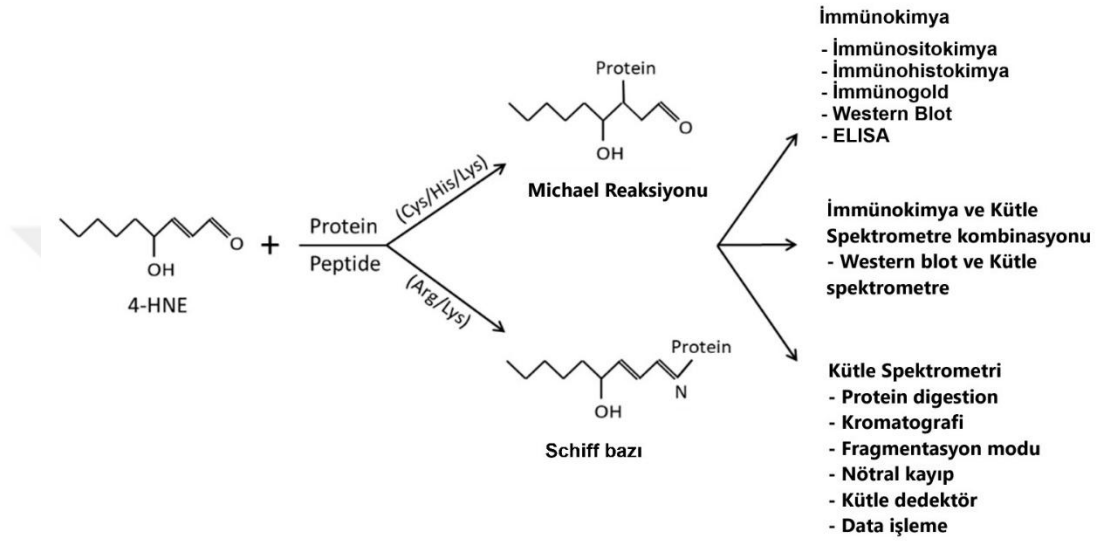
Peroksidatif zincir reaksiyonunun uzunluğu membran yapısı ve bileşimine bağlıdır. Genel olarak çok kısa olduğu kabul edilir, yayılma radikal-radikal etkileşimi ile sonlandırılır (22).

Lipid hidroperoksitlerin ileri oksidasyonu reaktif aldehitler gibi son ürünlerin oluşumuna yol açar (24). 4-HNE ve MDA, aldehitler sınıfının en iyi tanımlanmış ve kapsamlı olarak araştırılmış üyeleridir. Hem 4-HNE hem de MDA oldukça reaktif moleküllerdir (21). 4-HNE, araşidonik ve linoleik asitler ve bunların 15-lipoksijenaz metabolitleri, yani 15-hidroperoksiikosatetraenoik asit (15-HpETE) ve 13-hidroperoksioktadekadienoik asit (13-HpODE) gibi n-6 PUFA'ların peroksidasyon ürünüdür. 4-hidroksi-2E-heksenal (4-HHE) molekülü linolenik asit, eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asit gibi n-3 PUFA'ların peroksidasyonu ile oluşur (25) (Şekil 2.6). 4-HNE oluşumu için öne sürülen bir diğer yol, başlıca mitokondride bulunan linoleik asit bakımından zengin bir fosfolipid olan kardiyolipinin oksidasyonudur (24).



Şekil 2.6. n-3 ve n-6 PUFA'ların non-enzimatik ve enzimatik peroksidasyonu- Riahi ve ark. (25)'dan alınmıştır.

4-HNE'nin yaklaşık %2-8'inin proteinlerle reaksiyona girerek 4-HNE-protein bağlanmaları oluşturduğu tahmin edilmektedir. Başlıca sistein (Cys), histidin (His), lizin (Lys) ve bir miktar da proteinlerin arginin (Arg) kalıntıları ile reaksiyona girerek Michael reaksiyonu veya Schiff bazları oluşturur (24) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. 4-HNE'nin protein aminoasit rezidüleri ile oluşturduğu bağlanmalar ve analiz yöntemleri- Milkovic ve ark. (24)'dan alınmıştır.

Mitokondri tarafından aşırı ROT üretimi, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna ve ardından büyük miktarda 4-HNE üretimine neden olabilir. Çeşitli çalışmalar mitokondriyal solunum zincirindeki önemli proteinlerin (adenin nükleotid translokator ve sitokrom c oksidaz) ve krebs döngüsündeki enzimlerin (α -ketoglutarat dehidrojenaz ve izositrat dehidrojenaz) 4-HNE kaynaklı inaktivasyona duyarlı olduğunu göstermiştir (25).

Oksidatif strese yanıt olarak hücreler koruyucu mekanizmaları harekete geçirir. Bunlardan bir tanesi NRF2 sinyal yolağıdır. NRF2 transkripsiyon faktörünün düzenlenmesi karmaşık olsa da, aktivitesinin ana düzenleyicisi, 4-HNE gibi elektrofille duyarlı, sisteinler bakımından zengin olan KEAP1'dir. 4-HNE muhtemelen KEAP-1 NRF2 bağlanmasını bozarak NRF2 aktivasyonunu

artırmaktadır. Ayrıca 4-HNE'nin hücrelerde ferroptosis'e karşı hassasiyet oluşturduğunu veya direnç geliştirdiğini gösteren farklı bulgular literatürde yer almaktadır (24). 4-HNE'nin detoksifikasyonu ise, glutatyon S-transferaz tarafından glutatyon ile konjugasyon ve aldehit dehidrojenaz veya alkol dehidrojenaz tarafından oksidasyonu veya indirgenmesi şeklinde gerçekleşebilir (26).

MDA, ω -3 ve ω -6 yağ asitlerinin peroksidasyonunun bir biyobelirtecidir (27). Tromboksan A₂ (TXA₂) ve 12-l-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienoik asit (HHT) biyosentezi sırasında enzimatik olarak araşidonik asitten veya lipid peroksidasyonu sırasında üretilen bisiklik endoperoksitlerden non-enzimatik olarak oluşabilir. MDA oluşuktan sonra enzimatik olarak metabolize edilebilir veya hücrel ve dokusal proteinler veya DNA ile reaksiyona girerek biyomoleküler hasarlara yol açabilir. (28).

2.5. Ferroptosis

2.5.1. Tanımı ve Tarihi

Ferroptosis, lipid peroksidasyonu ve bunu izleyen membran hasarının neden olduğu, demir bağımlı yeni bir programlı hücre ölüm biçimi olarak tanımlanır (23). Ferroptosis kavramı, 2003 yılında Dolma ve arkadaşları tarafından kanserde rol oynayan mutasyona uğramış RAS'ı hedef alan yeni terapötik ilaçların araştırılması sırasında ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalarda, erastin ve RSL3'ün, onkogenik RAS'ı eksprese eden kanser hücrelerine selektif olarak toksik iken doğal hücrelere toksik olmadığı görüldü (29). Erastin veya RSL3 tarafından indüklenen hücre ölümünün geleneksel apoptoz, nekroz ve otofajiden farklı olduğu ortaya çıkarıldı. RAS'a bağlı bu hücre ölümünün demir şelatörü deferoksamin tarafından engellenebildiği Yang ve Yagoda tarafından gösterildi (30, 31).

Ferroptosis terimi apoptotik olmayan hücre ölümünün demire bağlı bir formunu tanımlamak için 2012 yılında Scott J Dixon ve Brent Stockwell tarafından ortaya atılmış olsa da, 1950'lerde Harry Eagle tarafından yapılan önceki çalışmalarda besin maddelerinin (özellikle sistein) tükenmesinin hücre ölümüne neden olduğu bulunmuştu. 2001 yılında Pamela Maher, sistem Xc- inhibisyonunun (özellikle glutamat kullanarak) nöron ölümüne neden olduğunu bildirmiş ve bu ferroptosis örneğini 'oksitoz' olarak tanımlamıştı (23, 32). O zamandan beri birçok araştırmacı farklı hücre tiplerinde ve hastalık modellerinde ferroptosis üzerinde çalışmıştır (33).

2.5.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları ve Ferroptosis

Hücre ölüm mekanizmaları sinyal bağımlılıklarına göre programlı hücre ölümü (PCD)/Regüle ve PCD olmayan hücre ölümü/Unregüle (UHÖ) olarak iki şekilde sınıflandırılır. PCD olmayan hücre ölüm biçimi, fiziksel, biyolojik veya kimyasal faktörler ile geri dönüşümsüz hasara neden olur. PCD, hücre sinyalleri ve gen regülasyonları ile kontrol edilir. Apoptosise ek olarak nekroptosis, otofaji bağımlı hücre ölümü, piroptosis, entosis, netosis, parthanatos, lizozom bağımlı hücre ölümü, alkaliptosis, okseiptosis ve ferroptosis apoptotik olmayan programlı hücre ölüm

formlarıdır (3, 34). Ferroptosis, mitokondrinin büzüşmesi, mitokondri membran yoğunluğunun artması, mitokondriyal kristallerin azalması, hücre zarının intakt kalması, nükleusun normal boyutta olması, sistein-glutatyon-GPx4 antioksidan yolağının baskılanması gibi özellikleri ile diğer hücre ölümü biçimlerinden farklı bir süreçtir (35, 36) (Tablo 2.1).

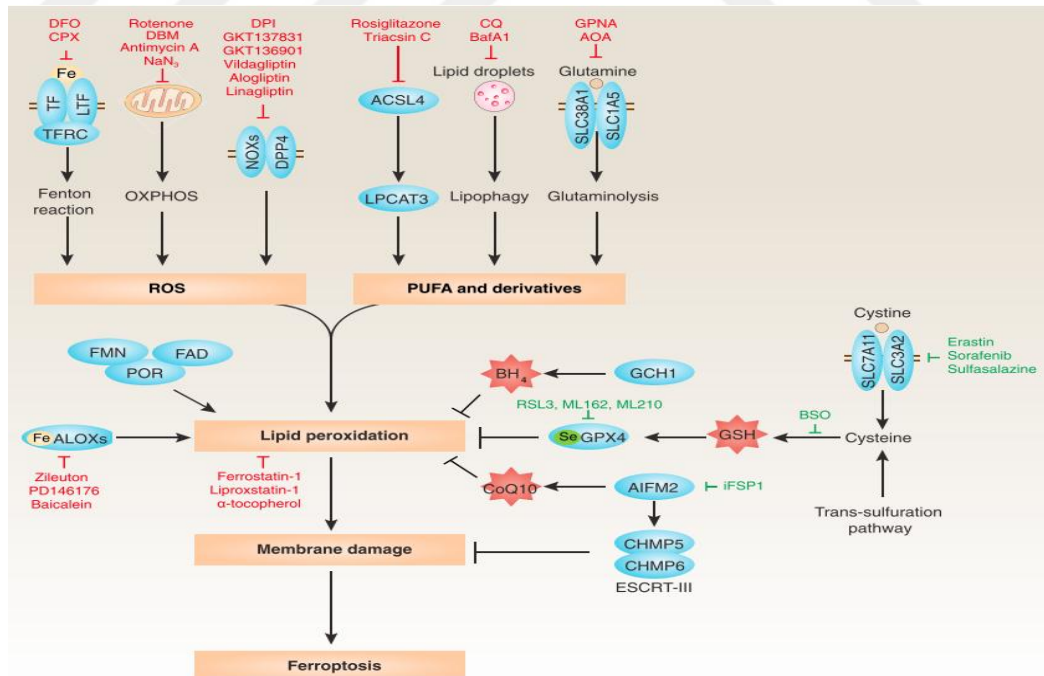
Tablo 2.1. Hücre ölüm mekanizmalarının biyokimyasal ve morfolojik özellikleri

Ferroptosis	Demir ve ROT birikimi, sistem Xc- inhibisyonu, redükte glutatyonun (GSH) tükenmesi, glutatyon peroksidaz inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu. Mitokondrilerde kristallerin azalması, artmış mitokondriyal membran yoğunluğu ve rüptürü, küçük mitokondri, nükleusun normal olması ve kromatin kondenzasyonu olmaması.
Apoptosis	Pro-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri, kaspaz aktivasyonu. Nükleer fragmentasyon, plazma membranında tomurcuklanma, piknosis, apoptotik cisimciklerin oluşumu, kromatin aglütinasyonu, mitokondride önemli bir değişiklik olmaması.
Nekroptosis	RIPK1, RIPK3, MLKL, RIPK1'in fosforilasyonu ve ubiquitinasyonu, sitozolde nekrozom kompleksinin oluşumu, ATP seviyelerinde düşme, hasar ilişkili molekül paternlerinin (DAMPs) salınımı. Sitoplazmik şişme (onkosis), plazma membran bütünlüğünün kaybı, sitoplazmik organellerin şişmesi.
Otofaji	LC3-I'den LC3-II'ye dönüşüm ve p62'nin bölünmesi, atg gen ailesi tarafından kodlanan proteinler. Otofajik vakuollerin birikimi, sitoplazmanın vakuolizasyonu, kromatin kondenzasyonunun olmaması.
Piroptosis	İnflamatuvar kaspazlar (initiator kaspaz 1 ve 11, efektör kaspaz 1 ve 3), biyo-aktif IL-1 β ve IL-18 salınımı ve Gasdermin D'nin proteolitik aktivasyonu Hücre membranının rüptüre olması ve hücre şişmesinin olmaması.

2.5.3. Ferroptosis Mekanizması ve Regülasyonu

Ferroptosisin uyarılması üç karakteristik özellik gerektirir (37): Labil demir havuzu şeklinde redoks aktif demir ile lipoksijenazlar ve sitokrom P450'ler gibi demire bağımlı peroksidasyon enzimlerinin varlığı; Peroksidasyona uğramaya eğilimli bis-alklik karbonlara sahip çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) varlığı; Lipid peroksidasyonu onarım mekanizmalarının bozukluğu.

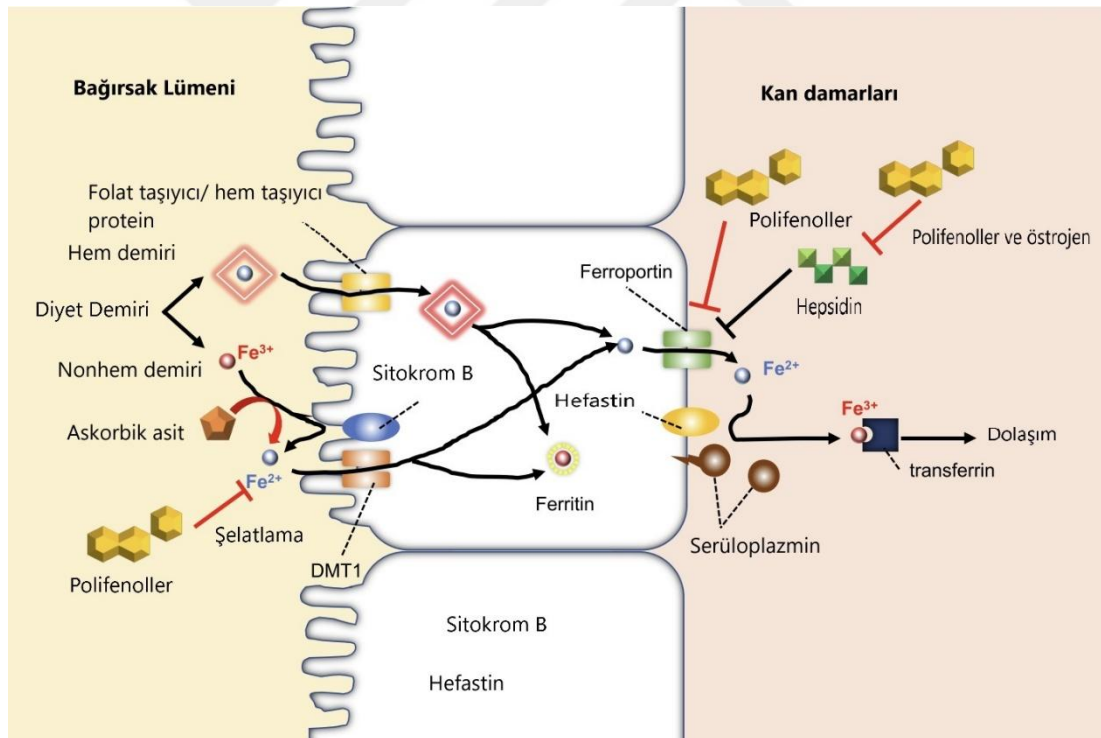
Lipid peroksidasyonu ferroptosisi tetikleyen ana biyokimyasal olaydır (23, 37). Ferroptosis indüksiyonu fazla demir yükünden veya GPx4'ün inaktivasyonundan kaynaklanır (38). ROT üretimi (NOX enzimleri, Fenton reaksiyonu, oksidatif fosforilasyon), PUFA türevlerinin sağlanması (ACSL4-LPCAT3, lipofaji, glutaminoliz) ve lipid peroksidasyonu ilişkili enzim aktivitelerinin artışı (ALOX, POR) bu süreci desteklerken, sistem Xc- (SLC7A11 ve SLC3A2)-GSH-GPx4, GCH1-BH4, AIFM2-CoQ10 ve ESCRT-III kompleksi (CHMP5 ve CHMP6) lipid peroksidasyonunu sınırlar (23) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Ferroptosis aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları. Ferroptoz indükleyicileri ve inhibitörleri sırasıyla yeşil ve kırmızı ile gösterilmiştir- Tang ve Kroemer (23)'den alınmıştır.

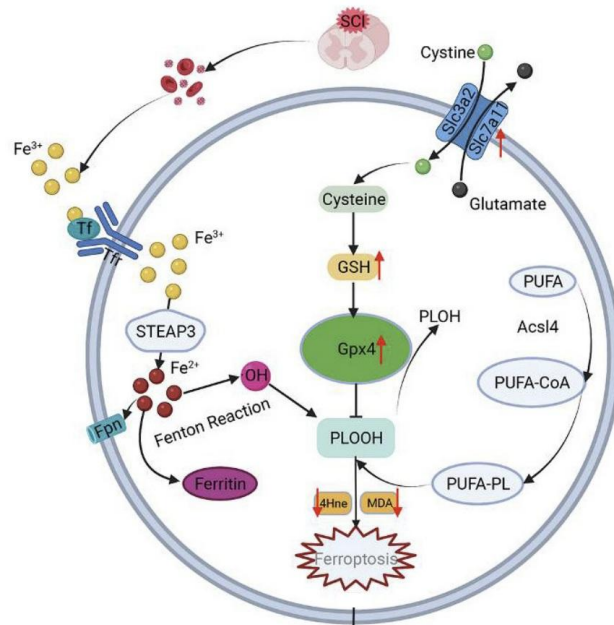
Demir Metabolizması ve Ferroptosisteki Rolü

Demir, insan bağırsak mukozası yoluyla hem ve hem olmayan formlarda emilirken, hem demirinin folat taşıyıcısı ile daha kolay emildiği bildirilmiştir. Hem olmayan demir, Fe^{2+} ve Fe^{3+} , Fe^{2+} halinde iki değerlikli metal demir taşıyıcı-1 (DMT-1) aracılığıyla duodenal sitoplazmaya taşınırken, Fe^{3+} önce sitokrom b redüktaz ve/veya diğer redüktanlar tarafından Fe^{2+} 'ye indirgenir. Hücrelere taşındıktan sonra demir ya depolanmak üzere ferritine bağlanır ya da Fe^{2+} olarak ferroportin aracılığıyla kan dolaşımına verilir. Demir daha sonra membrana bağlı ferroksidaz hefastin ve serüloplazmin tarafından oksitlenerek transferrin- Fe^{3+} kompleksini oluşturmak üzere transferrine bağlanır. Hepsidin, karaciğerden salgılanan bir peptit hormondur ve ferroportine bağlanarak internalizasyonunu ve yıkımını artırıp demir homeostazını düzenler (39) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Demirin intestinal absorpsiyonu- Abe ve ark. (39)'dan alınmıştır.

Yaşamdaki temel rolüne rağmen, fazla demir, reaktif oksijen türleri üretme ve hücre ölümünü tetikleme yeteneği nedeniyle toksiktir (40). Bu nedenle, labil demirin uygun düzeyde tutulması hücre canlılığı için kritik öneme sahiptir. Demirin hücre içine alımı, transferrin-Fe (III) kompleksinin transferrin reseptörü 1 (TfR1)'e tutunması ve klattrin aracılı endositozu ile gerçekleşir. Hücre içindeki Fe (III) daha sonra asidik endozomlara alınır ve burada Fe (III), STEAP3 (the six-transmembrane epithelial antigen of prostate family member 3) tarafından Fe (II)'ye indirgenir. Daha sonra Fe (II), DMT1 ile endozomdan sitozole salınır. Demir depolanması temel olarak, hücreleri reaktif oksijen türlerine karşı koruyan ağır ve hafif zincirden oluşan ferritin tarafından gerçekleştirilir. Omurgalı türlerde bilinen tek demir eksporteri olan ferroportin (Fpn), demir homeostazını korumak için plazma membranı boyunca demir atılımını sağlar. Bu süreçte demir geçici olarak sitozolde toplanır ve kararsız demir havuzu oluşturur (Şekil 2.10). Hücrelerdeki serbest demir seviyesi, demirin emilimini, depolanmasını, kullanımını ve etkinliğini etkileyen entegre bir sistem tarafından kontrol edilir (38). Ferroptosis sürecinde, bu demir düzenleyici yol, hücresel labil demiri artırmak için birden fazla mekanizma aracılığıyla ele geçirilir (37).



Şekil 2.10. Demirin ferroptosisteki rolü ve SLC7A11/GPx4 yolağı- Kang ve ark. (41)'dan alınmıştır.

Ferroptosiste demirle ilgili mekanizmalar belirsizliğini korusa da, demir metabolizmasının ferroptosis sürecindeki kilit rolü hakkında literatürde bir çok yayın bulunmaktadır: Demir şelatörleri in vitro ve in vivo ferroptotik hücre ölümünü engeller (32); Ferroptosis indüksiyonu sırasında hücrel labil demir artışı gözlenir (42); Eksojen demir verilmesi, hücrelerin ferroptosis indükleyicilerine (örn. erastin) duyarlılığını artırır (32); Fazla hem ve hem olmayan demir doğrudan ferroptosisi indükleyebilir (43); ALOX'lar, NOX'lar ve CYP gibi çeşitli hem ve hem olmayan demir içeren enzimler lipid peroksidasyonundan sorumludur (32, 44–47); Fenton reaksiyonu ile demir aracılı ROT üretimi, ferroptosiste lipid peroksidasyonunu artırır (32).

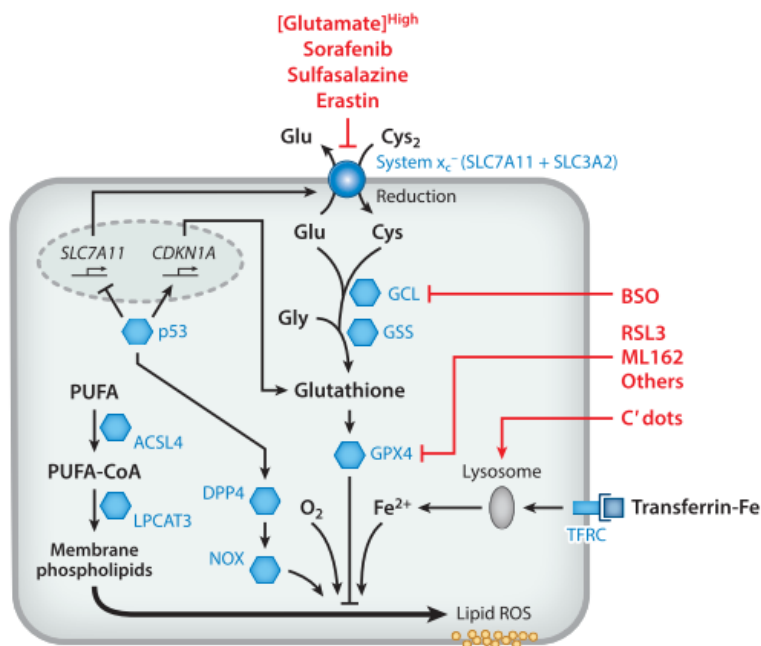
Ayrıca, ROT ile indüklenen otofaji ferritin degradasyonu (ferritinofaji) ile serbest demir düzeylerini artırır ve TfR1 ekspresyonunun uyarılması ile demire bağlı ferroptosise yol açar (37, 38). Bu nedenle, demir alımı, depolanması, kullanımı ve atılımı ile ilgili demir metabolizmasının çok sayıda düzenleyicisi ferroptosis hassasiyetini etkileyebilir (40). Yüksek seviyelerde hücre dışı demire maruz kalmak bazı hücrelerde ferroptosisi indüklemek için tek başına yeterli olabilir (48). Kontüzyondan sonra, subdural kanama spinal kordun hasarlı bölgesinde eritrosit ve hemoglobin birikimine yol açarak anormal demir birikimine neden olur (41).

Yağ Asitlerinin Ferroptosisteki Rolü

Doymuş yağ asitleri, tekli doymamış yağ asitleri (MUFA'lar) ve PUFA'lar, hücre zarında yapı taşı, enerji kaynağı ve sinyal molekülü olma gibi birçok işleve sahiptir (23). Ferroptosiste PUFA içeren fosfolipidlerin peroksidasyonu ve lipid hidroperoksitlerin oluşumu gerçekleşir (49). Doymuş yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asitlerinin aksine, PUFA'larda bulunan bis-allilik hidrojen atomları serbest radikal veya enzim aracılı oksidasyona karşı oldukça hassastır (21). Bu nedenle PUFA'lar (özellikle araşidonik asit ve adrenik asit) ferroptosisi artırırken, MUFA'lar (özellikle oleik asit ve palmitoleik asit) ferroptosisi sınırlar (23, 44). PUFA içeren fosfolipitlerin ferroptosisteki önemi, aktive PUFA'ların membran fosfolipitlerine dahil edilmesi veya aktivasyonu için gerekli genlerin (örneğin ACSL4, LPCAT3) delesyonunun

ferroptosisi önlediği gözleminde gelmektedir (48, 50). Araşidonik asit (AA) ve adrenik asit (AdA), açıl-koenzim A sentetaz uzun zincir aile üyesi 4 (ACSL4)'ün tercih edilen substratları olduğundan, olasılıkla bu spesifik PUFA türleri, ferroptosisin başlatılması için peroksidasyona uğrayan fosfolipidler üzerindeki ana açıl zincirleridir (37). Araşidonik asit ve adrenik asit, ACSL4 ve lizofosfatidilkolin açıltransferaz 3 (LPCAT3) ile fosfatidiletanolamin (PE)-AA'lar ve PE-AdA'lara esterleştirilir. Lipoksigenaz, PE-AA'ları ve PE-AdA'ları PE-AA-O-OH ve PE-AdA-O-OH'a oksitleyebilir (51).

Serbest PUFA'ların ferroptosisi artırma olasılığı düşüktür ve bu süreçte katılmaları için aktive edilmeleri ve membran fosfolipitlerine dahil edilmeleri gerekir (48). Hücreler ferroptosisi indükleyen koşullara maruz kaldığında, lipid peroksitler başlangıçta endoplazmik retikulum ve diğer organellerde ve daha sonra membran rüptüründen önce plazma membranında birikiyor gibi görünmektedir (49). Lipid hidroperoksitler bir kez oluştuğundan sonra demir ile reaksiyona girerek yüksek oranda reaktif lipid radikalleri oluşturabilir (48, 49) (Şekil 2.11 ve Bkz. Şekil 2.5). Ferroptosis için gerekli PUFA türevleri iki önemli PUFA biyosentez enzimi ACSL4 ve LPCAT3'ün yanı sıra, glutaminoliz ve stres koşullarında lipid damlacıklarından serbestleşen yağ asitleri ile meydana gelebilir (23) (Bkz. Şekil 2.8).



Şekil 2.11. Lipid peroksidasyonu ve ferroptosis-Dixon ve ark. (48)'dan alınmıştır.

SLC7A11/GPx4/GSH Yolağı

Enzimatik ve non-enzimatik antioksidanları içeren entegre antioksidan sistem, serbest radikalleri hücrenel bileşenlere saldırmadan önce stabilize edebilir veya etkisiz hale getirebilir (23). Birçok oksidatif ve antioksidan yolak ferroptotik reaksiyonu etkiler (40). GSH, genellikle vücudun ana antioksidanı olarak anılmaktadır. GSH, toksik fosfolipid hidroperoksitleri toksik olmayan fosfolipid alkollere indirgeyerek merkezi bir ferroptosis baskılayıcı olarak fonksiyon gören selenoenzim GPx4'ün aktivitesi için gereklidir (23). GSH (gama-L-glutamil-L-sisteinil-glisin) glutamik asit, sistein ve glisinden sentezlenir (51). GSH biyosentezi için sistem Xc- aracılı sistin alımı ve ardından sistein üretimi gereklidir (40). Alternatif bir sistein kaynağı ise, sülfür içeren amino asitlerin metabolizması için ana yol olan trans-sülfürasyon yoludur (23).

Sistem Xc-, hafif zincir, solüt taşıyıcı aile 7 üye 11 (SLC7A11/xCT) ve ağır zincir, solüt taşıyıcı aile 3 üye 2'den (SLC3A2) oluşan heterodimerik bir transmembran kompleksidir (40). SLC7A11 hücre içi glutamati hücre dışı alana taşıırken, hücre dışı sistini sitozole taşır (Şekil 2.12 ve Bkz. Şekil 2.10). Sistin, GSH biyosentezi için NADPH tüketen bir indirgenme reaksiyonu ile sistine dönüştürülür (38). GSH, glutamat sistein ligaz ve GSH sentetaz tarafından iki aşamalı bir reaksiyonda sentezlenir. Hücre içine alınan sistin veya diğer kaynaklardan elde edilen sistein, GSH sentezi için hız kısıtlayıcıdır (49). SLC7A11'in transkripsiyonu çeşitli stres koşullarında ATF4 veya NRF2 aracılığıyla kısmen artırılırken, P53 ve ATF3 tarafından inhibe edilir (Şekil 2.11 ve Şekil 2.12). SLC7A11 ekspresyonunun inhibisyonu sonucunda, hücrenel sistein ve GSH sentezi doğrudan engellenir. Azalan GSH seviyeleri GPx4 inaktivasyonuna yol açar ve ferroptosisi uyarır (52).

Çeşitli ferroptosis düzenleyici moleküller arasında GPx4, ferroptosisin temel düzenleyicisi olarak kabul edilir (53). GPx4, hidroperoksitlerin (L-OOH) karşılık gelen alkol formlarına (L-OH) indirgenmesinde ve böylece lipid peroksidasyon zincirinin kırılmasında önemli bir rol oynar. Normal koşullar altında GPx4, L-OOH üretimi ve indirgenmesi arasında bir denge sağlar. GPx4 olmadığında veya inaktive edildiğinde, L-OOH hücrelerde birikir ve bu da membranda yapısal hasara yol açabilir (9). Sitozolik, mitokondriyal ve nükleer GPx4 izoformları mevcuttur. Mitokondriyal

FSP1-CoQ10 Yolağı ve ESCRT Sistemi

Koenzim Q (CoQ10, ubikinon olarak da adlandırılır) bir koenzim ailesini temsil eder. Mitokondriyal CoQ10 apoptozu inhibe ederken, mitokondriyal olmayan CoQ10 ferroptosisi önler (23). Ferroptosis baskılayıcı protein 1 (FSP1), hücre membranında bulunan nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat (NADP) bağımlı bir koenzim Q (CoQ) oksidoredüktazdır. FSP1, NADPH kullanarak CoQ10'un rejenerasyonunu katalize eder (38) (Bkz. Şekil 2.12). Apoptozu indükleyen faktör mitokondri ile ilişkili 2 (AIFM2/FSP1), CoQ10'un apoptosis ve ferroptosteki konuma bağlı rolünü belirleyebilir. AIFM2 mitokondriden plazma membranına transloke olduktan sonra, NADPH kullanarak mitokondriyal olmayan CoQ10'u enzimatik olarak indirgeme kabiliyeti nedeniyle pro-apoptotik aktivitesini anti-ferroptotik bir aktiviteye dönüştürür (23). FSP1-CoQ10 yolu, fosfolipid peroksidasyonunu ve ferroptosisi baskılamak için GPx4 ve glutatyon ile işbirliği yapar. FSP1 bir ferroptosis supresörü olarak doğrulanmıştır (38).

Ayrıca AIFM2, CoQ10 gerektirmeyen aktif bir membran onarım yolu ile de ilgilidir (23). FSP1 özellikle plazma membranına ve lipid damlacıklarına lokalize olur. Lipid peroksidasyonu hücre içi Ca^{2+} seviyelerinde bir artışı tetikleyebilir. Artan hücre içi Ca^{2+} , taşıma için gerekli endozomal ayırma komplekslerinin (ESCRT)-III bileşenleri olan yüklü multivesiküler cisim proteini 5 (CHMP5) ve CHMP6'yı lokal membran onarımına katıldıkları plazma membranına almak için bir sinyal görevi görür (49). ESCRT, membran tomurcuklanmasında ve onarımında rol oynar. Özellikle, ESCRT'nin beş alt kompleksinden biri olan ESCRT-III, nekroptoz, piroptoz ve ferroptozdan kaçınmak için membran onarımını başlatır. ESCRT-III mekanizmasının temel bileşenleri olan yüklü multivesiküler cisim proteini 5 (CHMP5) veya CHMP6'nın genetik inhibisyonu, ferroptosis'e karşı hücre hassasiyetini artırır (23).

GCH1-BH₄ Yolağı

GTP siklohidrolaz-1-tetrahidrobiopterin (GCH1-BH₄) yolu, sistem Xc-GSH-GPx4 ekseninden ve NADPH-FSP1-CoQ10 yolundan bağımsız bir antioksidan yoludur. GCH1, BH₄'ün sentezinde hız sınırlayıcı bir enzimdir. GCH1'in fazla

ekspresyonu, güçlü bir antioksidan olan BH₄'ün üretimini artırır (54). GCH1'in ekspresyonundaki artış lipid peroksidasyonunu ortadan kaldırır ve RSL3 veya GPx4'ün inhibisyonu ile indüklenen ferroptosis'e karşı koruma sağlar. BH₄ takviyesinin hücreleri ferroptosis'ten koruduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, GCH1-BH₄ yolu, GPx4/GSH sisteminden bağımsız bir mekanizma yoluyla ferroptosis'i inhibe etmek için endojen bir antioksidan yol olarak hizmet eder (38) (Bkz. Şekil 2.12).

The DHODH-CoQH₂ Yolağı

Dihidroorotat dehidrogenaz (DHODH), de novo pirimidin sentez yolundaki dördüncü basamağı katalize eden flavin bağımlı bir mitokondriyal enzimdir. DHODH mitokondrinin iç membranında bulunur, dihidroorotatin (DHO) orotata (OA) CoQ aracılı oksidasyonunu katalize eder. DHODH, CoQ'yu CoQH₂'ye indirger ve CoQH₂'nin CoQ'ya rejenerasyonu sırasında lipid radikallerini ortadan kaldırıp ferroptosis'i inhibe eder (38, 55) (Bkz. Şekil 2.12).

Diğer Regülatörler ve Aktivatör/İnhibitör Bileşikler

NADPH, NADP'nin indirgenmiş formudur ve tüm organizmalarda temel bir elektron donörüdür. NADPH üretimi esas olarak glikolize paralel bir metabolik yol olan pentoz fosfat yoluna bağlıdır. GPx4, AIFM2, NOX ve POR gibi birçok ferroptosis modülatörü, elektron transferini düzenlemek için NADP/NADPH sistemini kullanır. Mevcut kanıtlar, daha yüksek NADPH seviyelerinin veya daha düşük NADP/NADPH oranının ferroptosis'e karşı direnci artırdığını göstermektedir (23). NADPH, glutatyon-disülfid redüktaz (GSR) tarafından okside glutatyondan (GSSG) GSH, FSP1 tarafından okside CoQ'dan indirgenmiş CoQ (CoQH₂) ve okside K vitamininden indirgenmiş K vitamini ve dihidrofolat redüktaz (DHFR) tarafından BH₂'den indirgenmiş tetrahidrobiyopterin (BH₄) gibi endojen antioksidan metabolitleri sentezlemek veya yenilemek için kullanıldığı için bu akla yatkındır (Bkz. Şekil 2.12). Bununla birlikte, NADPH aynı zamanda plazma membranındaki NOX enzimleri ve endoplazmik retikulum membranındaki sitokrom P450 oksidoredüktaz (POR) ve sitokrom b5

redüktaz 1 (CYB5R1) oksidoredüktazları tarafından ROT sentezi için bir elektron donörüdür. Dolayısıyla, NADPH muhtemelen hem pro-ferroptotik hem de anti-ferroptotik işlevlere sahiptir ve bunların göreceli önemi hücreler arasında değişecektir (49).

Ferroptosis uyarımı veya inhibisyonu yapan bazı önemli bileşikler ve hedef mekanizmaları tablo 2.2 ve tablo 2.3'te gösterilmiştir (38).

Tablo 2.2. Ferroptosis uyarıcıları

Hedef Mekanizma	Bileşik
SLC7A11	Erastin, Piperazin, İmidazol, Sulfasalazin, Sorafenib, Glutamat
GPx4	RSL3, FIN56, DP17, ML210/JKE1674, Altretamin, Withaferin A
Demir Yüğü	Hemoglobin, FeCl ₂ , Hemin, (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ , Non-termal Plasma, Salinomycin
Demir Oksidasyonu	FINO ₂
Glutamat Sistein Ligaz	Buthinon sülfoksimin (BSO)
Glutasyon S-Transferaz	Artesunat
Skualen Sentaz	FIN56
HMG KoA Redüktaz	Fluvastatin, Lovastatin, Simvastatin
Diğer	DPI2, Sisteinaz, BAY 87-2243, Lapatinib, Lanperison, CIL41, CIL56, CIL69, CIL70, CIL75, CIL79

Tablo 2.3. Ferroptosis inhibitörleri

Hedef Mekanizma	Bileşik
Antioksidan	Ferrostatin-1, Liproksatin-1, Vitamin E, UAMC-3203, Troloks, XJB-5-131
Demir Şelasyonu	Deferoksamin mesilat, Deferasiroks
LOX inhibisyonu	Zileuton, Baikalein, AA861, PD146176
ACSL4 inhibisyonu	Tioglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon
Diğer	Selenyum, BRD4770

2.5.4. NRF2'nin Ferroptosisteki Rolü

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2), oksidatif/elektrofilik hareketlere yanıt olarak bir dizi sitoprotektif geni uyaran bir transkripsiyon faktörüdür. Fizyolojik koşullar altında NRF2, sitozolde kendi baskılayıcısı olan Kelch benzeri ECH ilişkilendirici protein 1'e (KEAP1) bağlıdır. Oksidatif/elektrofilik uyarılara yanıt olarak NRF2, KEAP1'den salınır, nükleusa transloke olur ve hedef genlerinin transkripsiyonunu sağlar (56).

NRF2 antioksidan genlerin transkripsiyonunu artırır, bunların arasında GCL (γ -Glu-Cys Ligase)'nin katalitik ve düzenleyici alt birimleri vardır ve GSH biyosentezi NRF2'nin kontrolü altındadır (Bkz. Şekil 2.12). Bununla birlikte, NRF2 sadece GSH biyosentezini aktive etmekle kalmaz, aynı zamanda GSH-konjugatlarının, GSSG'nin ve GSH'nin kendisinin eksportu ile ilişkili olan çoklu ilaç direnci ilişkili proteinlerin (Mrp/Abcc) ekspresyonlarını da artırır. Bu nedenle, NRF2 aktivasyonu, belirli koşullar altında, hücre içi GSH'yi azaltarak hücreleri ferroptosise karşı hassaslaştırabilir. NRF2 aktivasyonunun koruyucu etkisi büyük ölçüde kabul edilirken, NRF2 aktivasyonu tarafından artırılan GSSG/GSH ekstrüzyonunun ferroptoza duyarlılığı modüle edip edemeyeceği net değildir. Bu nedenle, GPx4'ü bir NRF2 hedefi olarak tanımlayan gözlemlerin, teorik olarak akla yatkın olmasına rağmen, dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini belirtmek yerinde olacaktır. GPx4 promotörleri NRF2 bölgeleri içermemektedir ve bu konuyu ele alan sistematik çalışmalar eksiktir. NRF2'nin

ferroptosis üzerindeki nihai etkisinin tam olarak tanımlanmadığı sonucuna varılabilir (22).

Çeşitli transkripsiyon faktörleri, demir metabolizmasında yer alan genlerin ekspresyonunu kontrol ederek ferroptozu düzenler. Bunlar arasında, nükleer faktör eritroid 2 benzeri 2 (NFE2L2/NRF2), ferroptotik hasara karşı sitoprotektif tepkileri düzenleyen anahtar transkripsiyon faktörüdür. Anti-ferroptotik etkisinin bir mekanizması, FTH1, SLC40A1, HMOX1 ve metallothionein 1G (MT1G) gibi demir metabolizmasında yer alan çeşitli genlerin upregülasyonudur (40). Ayrıca NRF2, SLC7A11/xCT ekspresyonunu destekleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür (57) (Bkz. Şekil 2.12).

2.5.5. Mitokondri ve Ferroptosis

Ferroptosis, azalmış veya kaybolmuş mitokondri kristalları, rüptüre olmuş dış mitokondri membranı ve kondanse mitokondri membranı ile karakterizedir. Mitokondri, endojen ROT üretimi için primer bölgedir. Solunum sürecinde tüketilen oksijenin çoğu suya indirgenir, ancak oksijenin yaklaşık %1-2'si ROT'a dönüşür. Mitokondriyal genlerin mutasyonları ROT'un aşırı üretimine yol açar. Voltaja bağlı anyon kanalı (VDAC) mitokondri dış membranında bulunan bir iyon kanalıdır, mitokondri ve sitoplazma arasındaki moleküler ve iyon değişimini kontrol eder. VDAC'ın ilaçlar veya diğer etkileşimlerle değiştirilen geçirgenliği metabolik bozukluklara neden olur ve ROT üretimini ve ardından oksidatif ölümü artırır (38).

Sistem Xc- inhibitörü erastin uygulanan hücrelerde, mitokondri daha küçüktür ve disorganize kristallar görülmektedir. Bu bulgu ferroptosisin potansiyel bir morfolojik belirtecini temsil eder. Bununla birlikte, mitokondriyal morfolojideki değişikliklerin ferroptosis gerçekleşmesine katkıda bulunup bulunmadığı veya sadece bu sürecin bir göstergesi olup olmadığı açık değildir. Mitokondri, Koenzim Q10 sentezinin yapıldığı yerdir. CoQ, mitokondriyal elektron taşıma sisteminde (ETS) bir elektron taşıyıcısıdır ancak aynı zamanda önemli bir anti-ferroptotik olarak da işlev görür. ETS, kompleks I ve III'te süperoksit gibi reaktif oksijen türleri üretmek için oksijeni kısmen indirgeyebilir. O₂'nin dismutasyonu hidrojen peroksit oluşturur ve

Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olabilir. Mitokondriyal trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, sistin yoksunluğunda ferroptosis duyarlılığını arttırır. Glutaminoliz sırasında glutamin, mitokondri içinde glutamata ve TCA döngüsü ara maddesi α -ketoglutarata dönüştürülür; hem glutamat hem de α -ketoglutarat ferroptosisi artırabilir. TCA döngüsü aktivitesini ferroptosisin indüksiyonu ile ilişkilendiren net efektör mekanizma belirsizliğini korumaktadır, ancak artmış oksidatif stresin de işin içinde olduğu görülmektedir (49).

Mitokondri aynı zamanda demir metabolizması için önemli bir merkezdir. Fe-S kümelerinin mitokondriyal biyosentezinin bozulması da ferroptosis hassasiyetini artırabilir. Sistem Xc- inhibisyonunun neden olduğu sistin yoksunluğunun, sistein türevi sülfür ihtiyacı göz önüne alındığında mitokondriyal Fe-S biyosentezi üzerinde etkileri olması mümkündür (49).

2.6. Etanol

2.6.1. Genel Bilgiler

Etanol, birçok organın morfolojik ve fonksiyonel durumunu doğrudan etkileyen, en yaygın tüketilen stimulanlardan biridir (58). GABA-A reseptörünün alfa-subunitine bağlanıp, allosterik modülasyon ile postsinaptik nöronu inhibe eder ve merkezi inhibisyonundan sorumludur. GABA-A reseptörleri üzerindeki etkilerine ek olarak, N-metil-D-aspartat reseptörlerini, alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit reseptörlerini ve kainat reseptörlerini antagonize eder. Glutamat, uyarıcı bir nörotransmitter olduğundan, bu reseptörlerin bloke edilmesi etanolün merkezi sinir sistemi üzerindeki depresan etkisini artırır. Ayrıca glisin reseptörleri, nöronal nikotinik reseptörler ve serotonin tip 3 reseptörleri ile de etkileşime girdiği gösterilmiştir (59).

Etanol hem hidrofilik hem de hidrofobik özelliklere sahip bir bileşik olarak biyolojik membranlarla etkileşime girer. Ayrıca, proteinlerle doğrudan etkileşime geçerek biyolojik işlevlerini değiştirebilir. Etanolün toksik etkileri, yalnızca vücut bileşenleri üzerindeki doğrudan etkisinden değil, aynı zamanda biyotransformasyonu sırasında oluşan toksik metabolitlerin etkisinden kaynaklanmaktadır. Alkol dehidrojenaz (ADH), mikrozomal etanol oksidasyon sistemi (MEOS) ve karaciğer katalazı (CAT) ile etanolün aerobik metabolizması sırasında oluşan asetaldehit burada özel bir rol oynar. Etanol oksidasyonu ile ortaya çıkan ROT ve etanol metabolizmasının oksidatif olmayan ürünleri de toksik olabilir (58). İlginç bir şekilde, düşük ila orta düzeyde alkol tüketiminin, kardiyovasküler mortalite, tip 2 diyabetes mellitus gelişme riski, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve demansta, otoimmün hastalıklarda ve Meniere hastalığında faydalı etkileri gösterilmiştir. 1894 yılında Fermie etanol hakkındaki bilgileri “Yok ettiği gibi kurtarabilir de (It can save as well as destroy)” şeklinde özetlemiştir. Etanolün zararlı etkilerinin yanında, risk/fayda oranı bazı endikasyonlarda olumlu görünmektedir. Bu da alkolü değerli bir terapötik haline getirmektedir (60).

2.6.2. Etanolün Terapotik Kullanımı

19. yüzyılın sonlarında alkol bilim insanları tarafından tedavi edici bir madde olarak görülüyordu ve antipiretik, sedatif, inhalasyon anesteziği, kardiyak stimülasyon gibi amaçlarla kullanıldı. Günümüzde etanol, kanıta dayalı tıp uygulamalarında halen bir çok endikasyonda kullanılmaktadır. Etanol (izopropanol ve n-propanol ile birlikte) antimikrobiyal dezenfektan ve antiseptik olarak en yaygın kullanılan alkoldür. Alkol, aktivitesini membran ve sitoplazmik proteinleri denatüre ederek gösterir. Esas tıbbi endikasyonları cilt antisepsisi ve yüzey dezenfeksiyonu ile ilgilidir. Metanol veya etilen glikol zehirlenmesi vakalarında etanol, metanol (örn. formaldehit) ve etilen glikolün (örn. glikolik asit ve oksalik asit) toksik metabolitlerinin üretimini önemli ölçüde azaltmak için kompetitif bir ADH substratı olarak kullanılabilir. Fomepizolün kullanımı daha kolay olmasına rağmen, etanol düşük maliyeti, hazır bulunabilirliği ve doktorlar için bilindik olması nedeniyle bazı tıp merkezlerinde hala ilk basamak antidot olarak kullanılmaktadır. Etanol kist skleroterapisi için en yaygın kullanılan bileşik olmaya devam etmektedir. Ana endikasyonları ise hepatik, renal ve tiroid kistleridir. (60).

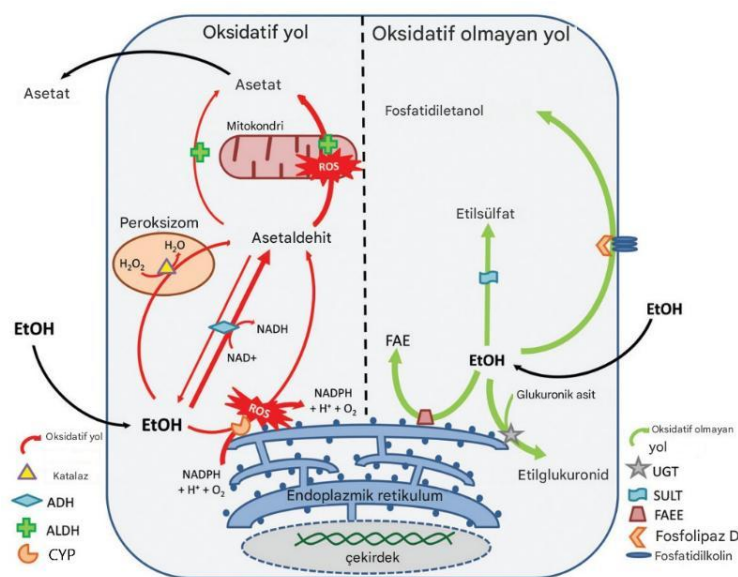
2.6.3. Absorbsiyon ve Dağılım

Etanolün yaklaşık %2'si ağız boşluğundan ve özofagustan, %22'si mideden ve %75'i ince bağırsaktan emilir (58). Etanolün emilim hızı midedeki etanol konsantrasyonu veya miktarı ile orantılıdır. Maksimum kan-alkol konsantrasyonuna genellikle 10 ila 60 dakika arasında ulaşılır (61). Şu ana kadar, kan plazmasında etanol bağlayıcı proteinler tespit edilmemiştir (58). Etanolün dağılım hacmi kişinin yaşına, cinsiyetine ve adipozite derecesine bağlıdır (61). Etanol biyolojik membranlardan kolayca geçer ve vücuda dağılır. Vücutta tüm su içeren boşluklardaki konsantrasyonu kan plazmasındakine yakındır. Bu nedenle, vücuttaki doku ve hücreler etanole neredeyse eşit derecede maruz kalır ve metabolizma hızı lokal enzim içeriği tarafından belirlenir (62).

2.6.4. Metabolizma

Etanolün metabolizması oksidatif veya oksidatif olmayan yollar ile gerçekleşebilir (58, 59) (Şekil 2.13). Oksidatif yol, insan vücudunda etanol biyotransformasyonunun ana yoludur. Tüketilen etanolün çoğu, ADH tarafından katalize edilen bir reaksiyonda toksik asetaldehite ve ardından aldehit dehidrogenaz (ALDH) ile asetata dönüştürülür. Esas olarak kronik etanol tüketiminde özel bir rol oynayan CYP2E1 de dahil olmak üzere mikrozomal CYP'ler tarafından katalize edilen reaksiyon ve H_2O_2 varlığına bağlı olarak peroksizomal katalaz tarafından aracılık edilen yol alternatif oksidatif yollardır. Her iki alternatif biyotransformasyon yolu da insanlarda alkol oksidasyonunun payının küçük bir yüzdesini temsil eder. Oksidatif olmayan yollar, genellikle yüksek alkol tüketiminden sonra veya oksidatif yolların inhibe edilmesinden sonra kullanılır (58).

Etanolün oksidasyonu irreversible ve regüle edilemezdir, reaksiyon hızı lokal konsantrasyona ve enzim aktivitesine bağlıdır (62). Etanolün asetik aside dönüşümü, sitoplazmada (ADH, ALDH), endoplazmik retikulumda (MEOS) ve peroksizomlarda (CAT) gerçekleşir. Dönüşümler sırasında oluşan aldehit ve asetik asit, proteinlerin yapısında bulunan amino asitlerin $-SH$ gruplarıyla etkileşime girerek biyolojik işlevlerini inhibe edebilir. Ayrıca, CYP aracılı yol, hücre hasarını artıran serbest oksijen radikalleri üretir (58).

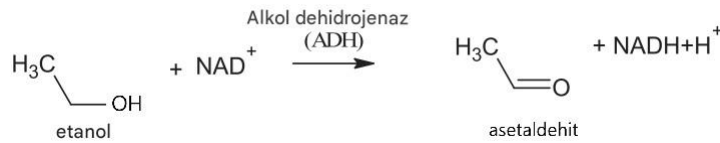


Şekil 2.13. Etanol Metabolizması-Daré ve ark. (59)'dan alınmıştır.

Oksidatif Yolaklar

Etanolün Alkol Dehidrojenaz ile Asetaldehite Oksidasyonu

Sitoplazmik ADH, asetaldehit ve redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) üreten, etanolün faz I oksidatif metabolizmasından sorumlu majör enzimdir (59). Bu sistem etanol havuzunun %85-90'ının asetaldehite oksidasyonunu katalize eder (Şekil 2.14) (58).



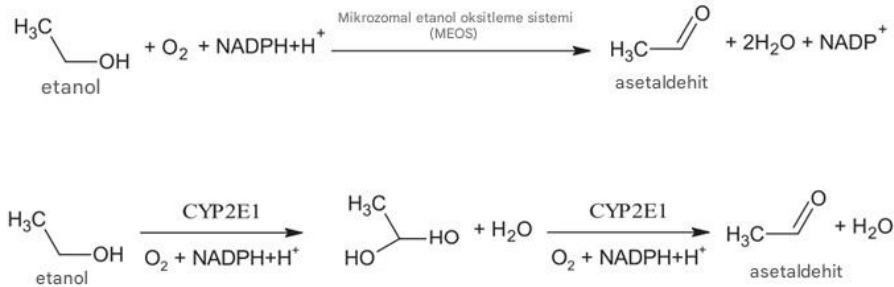
Şekil 2.14. Etanolün alkol dehidrojenaz ile oksidasyonu-Tomaszewska ve ark. (58)'dan alınmıştır.

İnsanda tanımlanan sınıf I, II, III, IV ve V olmak üzere ADH'nin 5 izoenzimi bulunur. Etanol metabolizmasında belirleyici rol oynayan ADH izoenzimi, hepatosit sitoplazmasında bulunan sınıf I ADH'dir. Karaciğer parankimindeki belirli alanlarda sınıf I ADH dağılımında önemli farklılıklar bulunur. Bu enzim sınıfının en yüksek aktivitesi lobüllerin merkezinde gözlemlenirken, en düşük aktivite kenarındaki hepatositlerdedir (58). ADH tarafından etanol oksidasyonu sırasında, koenzim nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), NADH'ye indirgenir ve bu da hepatositlerde NADH/NAD^+ oranını yükseltir. Karaciğerin bu değişmiş redoks durumu, NAD 'ye bağlı diğer metabolik reaksiyonları bozar (61).

Etanolün Mikrozomal Etanol Oksidasyon Sistemi ile Asetaldehite Oksidasyonu

MEOS, sitokrom P450 ailesinin bir monooksijenazı olup, $\text{NADPH} + \text{H}^+$:sitokrom P450 oksidoredüktazı, fosfatidilkolin ve sitokrom P450 2E1 (CYP2E1)'den oluşur (58). Mikrozomal yol vücudun etanol metabolizmasının yaklaşık %10'undan sorumludur. CYP2E1 etanol metabolizmasında ana rolü oynarken CYP1A2 ve CYP3A4'ün katkısı daha düşüktür. Bu oksidatif metabolik yol

hepatositlerin endoplazmik retikulumunda gerçekleşir. CYP2E1, NADPH ve oksijen kullanarak etanolü asetaldehide ve ardından asetaldehiti asetata dönüştürür (58, 59) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Etanolün MEOS ile oksidasyonu-Tomaszewska ve ark. (58)'dan alınmıştır.

Yüksek ve kronik alkol tüketimi durumunda, MEOS'un önemi dinamik olarak artar. Uzun süreli alkol tüketiminin ve yüksek kan etanol seviyelerinin CYP2E1 geninin transkripsiyonunu artırdığı bilinmektedir (58). Ayrıca etanol, CYP2E1'i proteazom kompleksi tarafından ubiquitinasyon ve degradasyondan koruyarak kendi metabolizmasını artırır. Bu mekanizmanın kronik alkol kullanıcılarında görülen etanol toleransında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (59).

Etanolün asetaldehite dönüşümü, alkolün toksisitesine önemli ölçüde katkıda bulunan reaktif oksijen türleri üretir (59). Alkolün toksik etkisi, etanolün kendi değil de, etanol metabolizması sırasında karaciğerde oluşan asetaldehit veya ROS üretimi ve fazla NADH+H⁺ oluşumu ile ilgili görünmektedir (58).

Etanolün Katalaz ile Asetaldehite Oksidasyonu

Etanolün asetaldehite oksidasyonu, peroksizomlarda bulunan hemoprotein grubuna ait bir enzim olan katalaz tarafından gerçekleştirilir ve oksidan olarak hidrojen peroksit kullanır (58) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Etanolün katalaz ile oksidasyonu-Tomaszewska ve ark. (58)'dan alınmıştır.

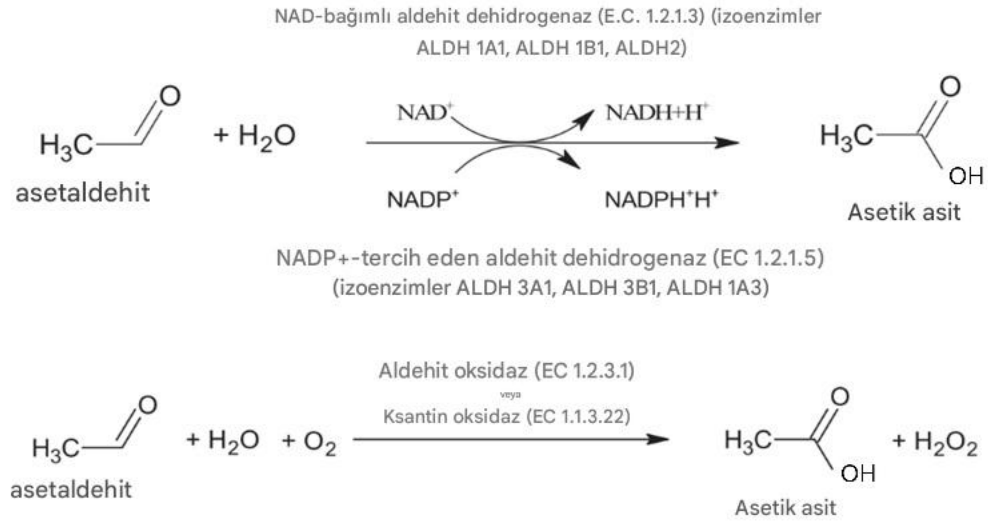
Hepatik katalazın etanol metabolizmasında önemli bir rolü yoktur (59). Beyinde etanol biyotransformasyonunda CAT'ın önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. Zimatkin ve ark. (58), CAT'ın beyinde asetaldehitin yaklaşık %60-70'ini sağlayabileceğini göstermiştir.

Asetaldehitin Asetik Asite Oksidasyonu

Etanol intoleransının etkileri (bulantı, yutma güçlüğü, baş ağrısı ve yüzdeki vazodilatasyon gibi) asetaldehit konsantrasyonuna dayandırılmıştır (59). Asetaldehit kimyasal olarak reaktiftir ve hücresel bileşenlerle non-enzimatik olarak reaksiyona girebilir. Asetaldehit konsantrasyonu, dokularda yaygın olarak bulunan aldehit dehidrojenaz (ALDH) tarafından düşük tutulur (62). Bugüne kadar, altısı asetaldehitin metabolizmasında rol oynayan 10 ALDH izoenzimi tanımlanmıştır (58). Sitozolik ALDH1 ve mitokondriyal ALDH2 izoenzimleri etanol metabolizmasında primer rol oynayan izoenzimlerdir (59). Kafkas nüfusunda, en çok sayısal ve niteliksel öneme sahip olan mitokondriyal izoenzim, NAD^+ bağımlı ALDH2'dir. Asetaldehit için yüksek afinite ve spesifiteye sahiptir. Fizyolojik koşullar altında geri dönüşümsüzdür (62). Kronik etanol alımı koşullarında karaciğerde ALDH2 aktivitesinin azaldığı bulunmuştur (58).

ALDH asetaldehiti asetata oksitleyerek indirgeyici eşdeğerleri NAD^+ 'ya aktarır (Şekil 2.14). Redüksiyon eşdeğerlerinin son alıcısı NADH veya bazen NADPH olabilir (58). Asetat bu yoldaki son metabolit değildir çünkü CO_2 , yağ asitleri, ketonlar, kolesterol veya steroidlere dönüştürülebilir (59). ALDH tarafından katalize edilen reaksiyonun bir ürünü olan asetik asit, karaciğer hücrelerinden peritoneal alana etkili

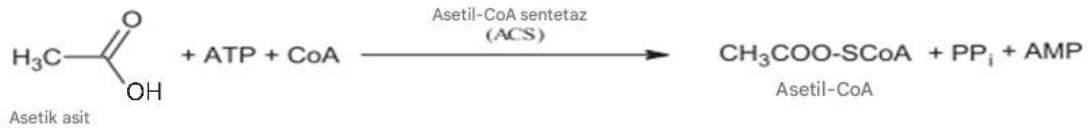
bir şekilde salınır ve buradan kan dolaşımına geçer (58). Asetaldehitin asetik aside oksidasyonu, karaciğerde bulunan aldehit oksidaz ile memeli bezleri, pankreas ve karaciğer hücrelerinde yüksek aktiviteye sahip ksantin oksidaz tarafından da katalize edilebilir (Şekil 2.17) (58).



Şekil 2.17. Asetaldehitin oksidasyonu-Tomaszewska ve ark. (58)'dan alınmıştır.

Asetatın Oksidasyonu

Etanol oksidasyonunun ana ürünü olan asetat, hem enerji metabolizmasında hem de metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynar. Asetat, asetil-KoA sentetaz tarafından asetil-KoA'ya dönüştürülür (58, 62) (Şekil 2.18).



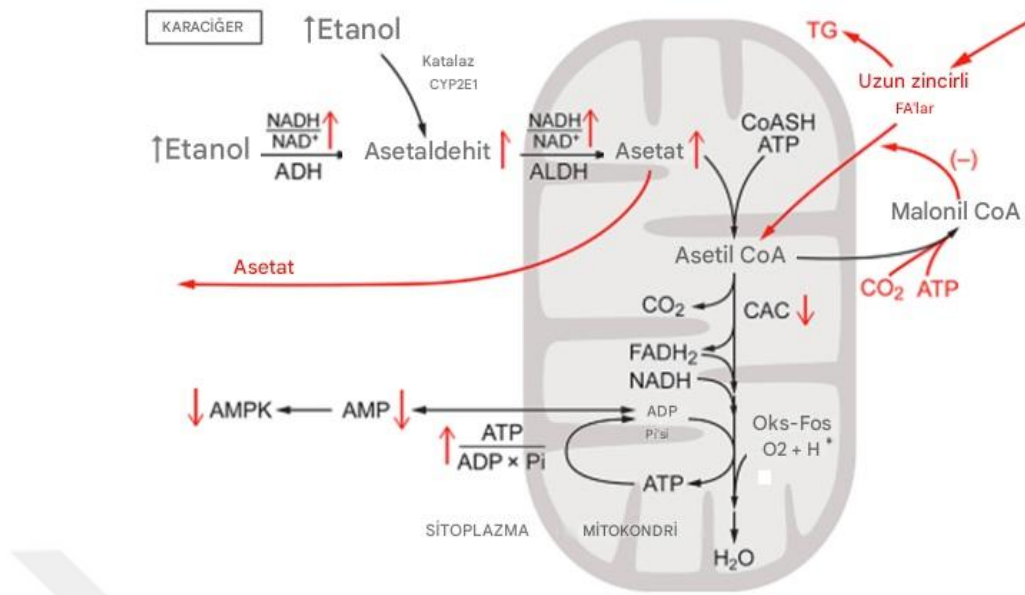
Şekil 2.18. Asetatın asetil-KoA sentetaz ile aktivasyonu- Tomaszewska ve ark. (58)'dan alınmıştır.

Mitokondride, asetil-KoA öncelikle sitrik asit döngüsüne girer ve oksitlenir, ancak hücresel düzeyde proteinleri asetillemek için de kullanılıp, enzimlerin aktivitesini ve histon asetilasyonu yoluyla gen ekspresyonunu değiştirir (62).

Karaciğerde üretilen asetatin bir kısmı sitrik asit döngüsü yoluyla daha fazla oksitlenmiş olsa da, çoğu (>%75) kana salınır, periferik organ ve dokularda CO₂ ve H₂O'ya dönüşür (61, 62) (Şekil 2.19).

Etanolün asetata oksidasyonundan üretilen NADH oranı, sitrik asit döngüsünün azalmasına neden olacak kadar yüksektir. Laktat/piruvat oranının artması sitozolik NAD'nin azaldığını, β-hidroksibutirat/asetoasetat oranının artması intramitokondriyal NAD'nin azaldığını gösterir (62). İndirgeyici ekvalentlerin bu düzensiz girişi hücresel enerji durumunu $\{[ATP]/([ADP][Pi])\}$ artırır. Karaciğerde, enerji durumundaki artış piruvat dehidrojenaz aktivitesini baskılar (artan asetilKoA, $[NADH]/[NAD^+]$ ve $[ATP]/[ADP]$), piruvat karboksilazı aktive eder (yüksek asetilKoA). $[AMP]$ ve AMP bağımlı protein kinaz (AMPK) aktivitesinin azalması ile katabolik metabolizma baskılanır ve anabolik metabolizma artar (Şekil 2.19). Azalan AMPK aktivitesi asetil-KoA karboksilaz aktivitesini ve malonil-KoA konsantrasyonunu artırır. Malonil-KoA, karnitin palmitoil transferaz 1'i inhibe ederek uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri tarafından alınımı ve oksidasyonunu baskılar. Yağ asidi sentezi aktive olur ve fazla yağ asitleri trigliseritlere dönüşür (62).

Laktat/piruvat oranı, büyük ölçüde piruvattaki azalmaya bağlı olarak artar ve bu da piruvat karboksilaz aktivitesini sınırlayarak glukoneogenezi baskılar. Kan glukoz konsantrasyonları ve beyin tarafından glukoz tüketimi azalır. Etanol beyin metabolizmasında glukoz alımının ve metabolizmasının azalması, monokarboksilat alımının ve metabolizmasının artması, dopaminerjik nöral aktivitenin uyarılması, glutamaterjik nöral aktivitenin baskılanması ve glutamat metabolizmasının bozulması gibi önemli metabolik bozukluklara yol açar (62).



Şekil 2.19. Karaciğerdeki etanol metabolizması-Wilson ve ark. (62)'dan alınmıştır.

Non-oksidatif Metabolizma

Etanol metabolizmasının küçük bir kısmı (<%0,2) karaciğerde konjugasyon ile başlıca nonoksidatif metabolitler olan etil glukuronid (EtG) ve etil sülfat (EtS) üretir. Etanolün diğer oksidatif olmayan metabolitleri arasında çeşitli yağ asidi etil esterleri (FAEE) ve fosfatidiletanol (PEth) yer alır (59, 61) (Bkz. Şekil 2.13 ve Şekil 2.20).

EtG vücuttan daha yavaş atılır ve kanda ve idrarda etanolden birkaç saat daha uzun süre tespit edilebilir, bu da EtG analizinin farklı klinik ve adli durumlarda yakın zamanda alkol alımını ortaya çıkarmak için yararlı olabileceği anlamına gelir. Kan, idrar ve saç tellerinde EtG ve EtS analizi için gaz kromatografisi-kütle spektrometresi yöntemleri kullanılmaya başlandıktan sonra, bir çok adli uygulama ortaya çıkmıştır (61).

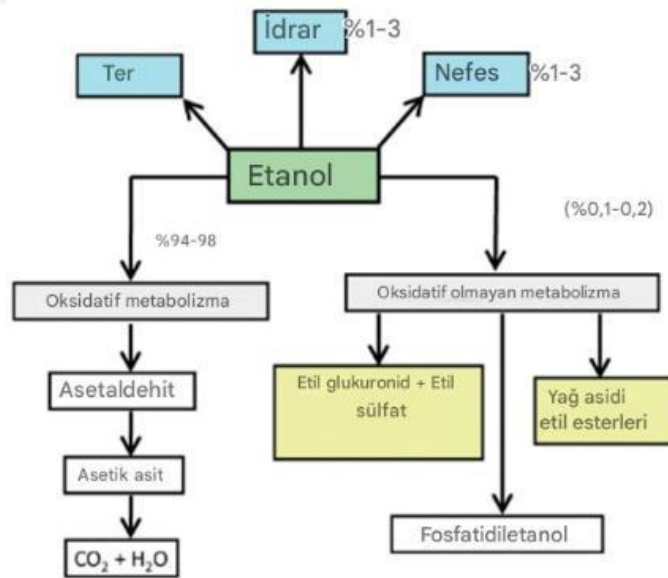
2.6.5. Eliminasyon

Etanol doza bağlı farmakokinetik gösterir, çünkü hepatik ADH enzimi 15-20 mg/dL üzerindeki kan alkol konsantrasyonunda substrat ile doyurulur. Postabsorptif

eliminasyon fazının çoğunda sıfır dereceli kinetik gösterir ve kan alkol konsantrasyonu saatte 10-35 mg/dL arasında değişen sabit bir oranda azalır (61).

Etanolün çoğu (%95-98) oksidatif metabolizma yoluyla vücuttan uzaklaştırılır ve %10'dan azı değişmeden akciğerler, böbrekler ve deri yoluyla atılır (Şekil 2.20). Orta düzeyde bir içkiden sonra, idrar, solunan hava ve ter analizi ile etanol dozunun %2-5'i geri kazanılabilir. Bu vücut sıvıları genellikle adli toksikolojide, kişinin herhangi bir nedenle alkolden uzak durması gereken durumlarda alkol tükettiğinin kanıtı olarak analiz edilir (61).

Kan dolaşımında etanolün biyolojik yarı ömrü ortalama 74 dakikadır ve kadınlarda erkeklere göre daha yüksektir. Etanolün nispeten hızlı biyotransformasyonu ve atılımı, tüketiminden sonra biyolojik materyaldeki konsantrasyonunun nispeten kısa bir süre içinde ölçülmesini gerekli kılar. Pozitif sonuçlar, 4-6 saat içinde nefesle, 10-12 saat içinde kanla ve 18-24 saat içinde idrarla elde edilir (58).



Şekil 2.20. Etanol metabolizması ve eliminasyonu-Jones (61)'dan alınmıştır.

Etanol, Reaktif Oksijen Türleri ve Ferroptosis

Kronik yüksek dozda etanol alımının etkisi ile artan ROT üretim süreçleri Tablo 2.4'te özetlenmiştir (63).

Tablo 2.4. Etanol ilişkili ROT üretimi-Prokopieva ve ark. (63)'dan alınmıştır.

1	Etanol ve asetaldehit metabolizması vücutta ROT üretimi ile sonuçlanır
2	Etanol solunum zincirinde fonksiyonel değişikliklere, ATP üretiminde azalmaya ve ROT artışına neden olan mitokondriyal disfonksiyona neden olur
3	Etanol, ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümünü sağlayarak ROT üretir
4	Etanol, vücuttaki bazı metallerin konsantrasyonunu değiştirebilir ve ROT oluşumuna neden olabilir
5	Etanol, antioksidan seviyelerini azaltabilir
6	Etanol, antioksidan enzimlerin aktivitelerini değiştirir

Etanol, çeşitli biyolojik membranlar (nöronlar, eritrositler, miyelin ve mitokondriyal membranlar, sinaptozomlar) üzerinde membranotropik bir etkiye sahiptir. Suda ve kısmen membranların lipid çift katmanında çözünen etanol molekülü, fosfolipidlerin polar grupları arasındaki yüzey bölgesine sokulur. Bu, doymamış yağ asitlerinin çift bağlarına oksijen erişimini kolaylaştırır, böylece lipid peroksidasyon süreçlerinin aktivasyonunu kolaylaştırır (63).

Mitokondri, birçok hücre tipinde ROT'un ana kaynaklarından biridir. Etanol metabolizması sırasında üretilen NADH, mitokondrinin solunum komplekslerine taşınır. Q döngüsü sırasında, O₂'ye elektron sızıntısının süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit ürettiği gösterilmiştir (15). Mitokondriyal elektron taşıma zincirinde ROT oluşumunun ana bölgeleri kompleks I ve III'tür (sırasıyla NADH dehidrojenaz ve ubikinon sitokrom c redüktaz) (63).

Etanol, GSH seviyelerinin tükenmesine neden olur ve antioksidan aktiviteyi azaltır (15). Mitokondriler GSH sentezleyemezler; mitokondriyal dış membranda lokalize bir taşıyıcı protein kullanarak sitozolden alırlar. Etanolün bu proteinin işlevini bozduğu ve bunun mitokondriyal GSH tükenmesine yol açtığı öne sürülmektedir.

Buna ek olarak, sıçanlara etanol uygulanması sisteinin taurine katabolizma hızında artışa neden olmuştur; bu da glutatyon biyosentezinin azalmasına katkıda bulunabilir (63).

Hipoksi gibi belirli koşullar altında, ksantin dehidrojenaz ROT üreten bir oksidaza dönüşür. Etanol tüketimi de ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümünü artırır. İn vitro deneyler, dehidrojenazın oksidaza dönüşümünün asetaldehit tarafından sağlandığını göstermiştir. Oksidaz formunda, enzimin NAD^+ için afinitesi önemli ölçüde azalırken, oksijen için afinitesi artar; bu da süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumuyla O_2 'nin bir ve iki elektronlu indirgenmesine yol açar (63).

Alkole bağlı oksidatif stres, mitokondrinin yanısıra mikrozomal etanol metabolizmasıyla da bağlantılıdır. Etanol, sitokrom P450 enziminin CYP2E1 formunu indükler. CYP2E1 süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit üretir ve demir varlığında hidroksil radikali gibi güçlü oksidanlar üretir (15). Demir iyonları hidroksil radikallerinin oluşumunda kritik bir rol oynadığından, hücrelerdeki serbest demir seviyesini artıran tüm faktörler ROT oluşumuna ve oksidatif stres gelişimine katkıda bulunur (63). Kronik etanol tüketiminin, labil demir birikimi ve GPx4'ün dolaylı inaktivasyonu (GSH tüketimi) ile karaciğerde ferroptosis'e yol açtığı gösterilmiştir (11). Ayrıca SLC7A11, GPx4 ekspresyonlarını azalttığı, lipid peroksidasyonu ile hepatosit ölümüne neden olduğu ve hasarın ferrostatin-1 ile engellendiği gösterilmiştir (64, 65). Buna ek olarak, asetaldehit, NRF2 ve tiyoredoksinin dahil olduğu antioksidan genlerin ekspresyonunu azaltarak antioksidan sistemin etkinliğini düşürmektedir. Ayrıca alkole bağlı karaciğer hastalıklarının (yağlı karaciğer, steatohepatit, hepatit, siroz, hepatoselüler tümörler vb.) gelişiminde ferroptosisin rol oynadığı ortaya konulmuştur (65).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

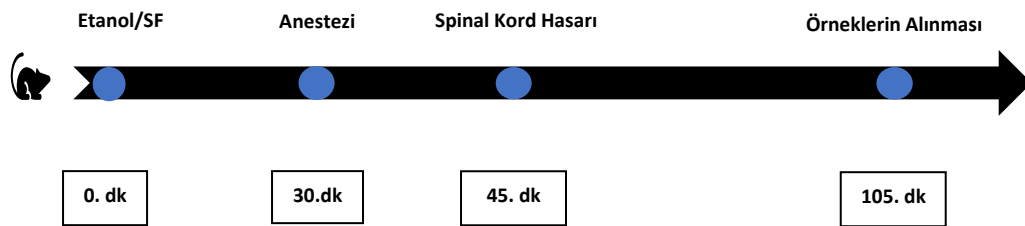
3.1. Etik Kurul İzni

Bu çalışmanın belirtildiği gibi yapılması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 21.02.2024 tarihli 179 sayılı toplantıda, 991 numaralı karar ile uygun bulunmuştur.

3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Deneyde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (TICAM)’nden sağlanan 8 haftalık 200-280 gram Sprague-Dawley cinsi 46 erkek sıçan kullanıldı. SKH’nin erkeklerde daha sık görülmesi nedeniyle çalışmamızda erkek sıçan tercih edildi. Sıçanlar standart hayvan bakım kafeslerinde her kafeste 3-5 sıçan olacak şekilde, 12 saatlik gündüz/gece döngüsünde, sabit nemli (%55±5) ve sabit 22±3⁰C sıcaklıktaki ortamda tutuldu. Sıçanların çalışma boyunca standart sıçan yemi ve çeşme suyuna ulaşımı serbest bırakıldı.

3.3. Çalışma Planı



Şekil 3.1. Çalışma planı özeti

Şekil 3.1’de özetlenen çalışma planına uygun olarak, sıçanlar tartıldıktan sonra 3g/kg etanol 20% (v/v) veya eşit hacimde izotonik serum fizyolojik (SF) intraperitoneal uygulandı. Etanol uygulamasından 30 dakika sonra ksilazin hidroklorid (10mg/kg, Xylazinbio %2, Bioveta A.S., Çekya) ve ketamin hidroklorür (100 mg/kg,

Keta-Kontrol, Doğa İlaç, Türkiye) anestezisi uygulandı. Anestezi derinliği pedal, pupiller refleks ve ağrılı uyaran ile kontrol edildi. Etanol uygulamasından 45 dakika sonra Riylin ve Tator tarafından tanımlanan klip kompresyon modeli uygulandı. Spinal kord hasarı yapılmayan çalışma gruplarındaki sıçanlara modelin içerdiği diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. Spinal kord hasarından 1 saat sonra sıçanlar genel anestezi altında kalpten kan alma yöntemiyle sakrifiye edildi. Kalpten alınan kan örnekleri jel separatörlü pıhtı aktivatörlü tüplere (Referans No: 455071, Vacuette, Greiner Bio-one, Avusturya) aktarıldı. Kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra 3500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi (MSE Mistral 2000, Ürün Kodu: ESCHLE 2, UK) ve elde edilen serum numuneleri analiz edilene kadar -40 °C’de muhafaza edildi. Spinal kord örnekleri lezyon bölgesinden veya spinal kord hasarı oluşturulmayan sıçanlarda aynı medulla spinalis seviyesinden alındı. Dokular biyokimyasal analizler için soğuk salin solüsyonda yıkanıp -80 °C’de, histopatolojik analizler için ise uygun fiksatif içine alınarak karanlık ve serin ortamda muhafaza edildi.

3.4. Deney Grupları

Deney grupları Sham (K), Etanol (E), Spinal Kord Hasarı (S) ve Spinal Kord Hasarı + Etanol (SE) olmak üzere 4 gruptan oluşmaktadır:

Sham Grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlarda spinal kord hasarı oluşturulmadı. Riylin ve Tator’un tanımladığı spinal kord hasarı modelindeki diğer basamaklar diğer gruplar ile aynı şekilde uygulandı. Diğer gruplar ile eş zamanlı olarak (spinal kord hasarından 45 dakika önce) eşit hacimde izotonik salin intraperitoneal olarak uygulandı.

Etanol Grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara spinal kord hasarı oluşturulmadı. Riylin ve Tator’un tanımladığı spinal kord hasarı modelindeki diğer basamaklar diğer gruplar ile aynı şekilde uygulandı. Diğer gruplar ile eş zamanlı olarak 3g/kg etanol 20% (v/v) izotonik salin içinde intraperitoneal olarak uygulandı.

Spinal Kord Hasarı Grubu: (n=15): Bu gruptaki sıçanlara Riylin ve Tator’un tanımladığı spinal kord hasar modeli uygulandı. Diğer gruplar ile eş zamanlı olarak eşit hacimde izotonik salin intraperitoneal olarak uygulandı.

Spinal Kord Hasarı + Etanol Grubu (n=15): Bu gruptaki sıçanlara Riylin ve Tator'un tanımladığı spinal kord hasar modeli uygulandı. Spinal kord hasarından 45 dk önce 3g/kg etanol 20% (v/v) izotonik salin içinde intraperitoneal olarak uygulandı.

Bu çalışmada, K ve E gruplarındaki biyokimyasal ve histolojik analizler için 8'er adet sıçan, S ile SE gruplarında ise biyokimyasal analizler için 8'er adet sıçan ve spinal kord hasarı oluşturulan bölgeden yeterli doku sağlanabilmesi amacıyla histolojik analizler için ayrıca 7'şer adet sıçan olmak üzere, toplam 46 adet sıçan spinal kord dokusu ve 32 kan örneği kullanıldı.

3.5. Etanol Hazırlanması ve Uygulanması

Sıçanlar tartıldıktan sonra absolute etanol (Ürün kodu: 34870, saflık $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ve izotonik salin kullanılarak, 3g/kg etanol 20% (v/v) hazırlandı ve intraperitoneal uygulandı. Etanol uygulanmayan gruplara eş zamanlı ve eşit hacimde izotonik salin intraperitoneal uygulandı. Her sıçana ağırlığına göre uygulanması gereken etanol hacmi aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$V = g / d \times \%$$

V = Uygulanması gereken etanol hacmi, mL

g = Sıçan ağırlığına göre gerekli etanol miktarı, gram

d = Etanol yoğunluğu, g/mL

% = Etanol saflığı, %

3.6. Spinal Kord Hasar Modeli

S ve SE gruplarındaki sıçanlarda spinal kord hasarı oluşturmak için 1978 yılında Rivlin ve Tator tarafından tanımlanan klip kompresyon modeli uygulandı (66). Bu modelin avantajı omuriliğin tamamının travmaya maruz bırakılarak, aynı zamanda iskemiye yol açmasıdır ki bu da insanlarda meydana gelen travma sonrası omurilik yaralanmasına benzer bir model oluşturmaktadır (67, 68).

Özetle, anestezi sonrası sıçanlar prone pozisyonda operasyon masasına yatırılıp dorsal bölge tıraş edilerek polivinil iyot ile antisepsi uygulandı. Cerrahi işlem sırasında antisepsi kurallarına uyularak tüm gruplardaki sıçanlara orta hat insizyonu yapıp, dorsal 8-10 vertebralar arası laminalar açığa çıkarıldıktan sonra tek seviye total laminektomi uygulandı. Spinal kord dikkatli bir şekilde duraya hasar verilmeden ortaya çıkarıldıktan sonra S ve SE çalışma gruplarındaki sıçanlar, anevrizma klipsi (Yaşargil FE 721K, Aesculap/Almanya) ile T9 vertebra seviyesinden kliplendi. Bir dakika sonra klip alındı ve lezyon bölgesinde hasara sekonder hemoraji oluşumu görüldü. Anatomik katmanlar usulüne uygun olarak kapatılarak spinal kord hasar modeli tamamlandı (Şekil 3.2). Prone pozisyonda spinal kord hasar modeli uygulanırken, etanol uygulanan sıçanlarda solunum depresyonu nedeniyle olduğu düşünülen ölümler yaşanması nedeniyle, sıçanlar bir miktar lateralize edilerek model uygulandı.



Şekil 3.2. Spinal Kord Hasar Modeli

3.7. Biyokimyasal Analizler

3.7.1. Serum Örneklerinde Yapılan Analizler

Etanol Düzeylerinin Analizi

Etanol düzeylerinin analizi alkol dehidrojenaz enzimatik yöntemi ile Cobas c702 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) otoanalizöründe Roche Etanol Gen.2 (Katalog No: 05967104) ticari kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar mg/dL olarak elde edildi.

Ölçüm Prensibi: Bu yöntemde etil alkol ve NAD^+ 'nin alkol dehidrojenaz tarafından asetaldehit ve $\text{NADH} + \text{H}^+$ 'ya oksidatif dehidrojenasyonu gerçekleşmektedir. Reaksiyon sırasında oluşan NADH 'ın 340 nm'de spektrofotometrik ölçümünden elde edilen absorbans etanol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.7.2. Spinal Kord Doku Örneklerinde Yapılan Analizler

Doku Homojenatının Hazırlanması

Doku homojenatı elde etmek için lezyon bölgesinden veya aynı seviyedeki hasarsız spinal kord doku örneklerinden ependorflara 40-45 mg alındı. Analizler için yeterli miktarda süpernatant elde edebilmek için üzerine 1:19 oranında fosfat tampon solüsyonu (PBS, P4417-100TAB, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) ilave edildi ve 4°C 'de el tipi homojenizatör (MT-30K, Hangzhou Miu Instruments, Zhejiang, Çin) ile buz üzerinde homojenize edildi. Numuneler 10000g ve 4°C 'de 10 dakika santrifüj edildi (MR22i Jouan, France). Süpernatanttan total protein, total demir, GSH ve MDA analizleri gerçekleştirildi.

Total Protein Düzeylerinin Analizi

Total protein düzeylerinin analizi Cobas c702 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) otoanalizöründe, Roche Total Protein Urine/CSF Gen.3 ticari kiti (Ref No: 05171954) kullanılarak, beyin omurilik sıvısı (BOS) aplikasyonunda türbidimetrik yöntemle gerçekleştirildi. Sonuçlar mg/dL olarak elde edildi.

Ölçüm Prensibi: Bu yöntemde numune, proteini denatüre eden ve magnezyum iyonlarının neden olduğu etkileşimi ortadan kaldıran etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren bir alkali solüsyon içinde inkübe edilir. Daha sonra benzetonyum klorür eklenir ve bulanıklık oluşur. Ölçüm 505 nm dalga boyunda gerçekleştirilir.

Total Demir Düzeylerinin Analizi

Demir düzeylerinin analizi Cobas c702 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) otoanalizöründe Roche Iron Gen.2 ticari kiti (Ref No: 05169291) kullanılarak kolorimetrik yöntemle gerçekleştirildi. Sonuçlar $\mu\text{g/g}$ protein olarak verildi.

Ölçüm Prensibi: Bu ölçüm yönteminde, asidik koşullarda demir, demir bağlayan proteinlerden ayrılır. Lipemik numuneler deterjan tarafından arındırılır. Askorbat, serbest kalan Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirger ve Fe^{2+} ferrozin ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Renk şiddeti fotometrik olarak 570 nm'de ölçülebilir ve total demir konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Redükte Glutasyon Düzeylerinin Analizi

Redükte Glutasyon analizi ticari GSH kiti (Katalog No: E-BC-K030-S, Elabscience, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar mg GSH/g protein olarak hesaplandı.

Ölçüm Prensibi: GSH'nin, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Ellman Reaktifi) ile reaksiyonu sonucunda sarı renkli bir koromofor olan 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ve glutasyon disülfid oluşmaktadır. GSH düzeyleri 420 nm'de optik dansite değerleri ölçülerek hesaplanabilir.

Çalışma Basamakları: Kit içeriğindeki asit reaktifi, fosfat solüsyonu, DTNB solüsyonu, tuz reaktifi, GSH standardı ve GSH standart dilüenti kit prosedürüne uygun olarak hazırlandı. GSH standart stok solüsyonundan, GSH standart dilüenti ile 20 $\mu\text{mol/L}$ standart solüsyonu hazırlandı. Numune miktarının azlığı nedeniyle kit prosedüründe belirtilen hacimler her basamak için orantılı olarak azaltılarak numune hazırlık aşamaları gerçekleştirildi.

Daha önce hazırlanan doku homojenatından 400 µL alınarak üzerine 400 µL asit reaktifi ilave edildi ve 4500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan GSH ölçümü için 500 µL kullanıldı. Numune üzerine 625 µL fosfat solüsyonu, 125 µL DTNB ve 25 µL tuz reaktifi pipetlenerek 15 dakika oda ısısında inkübe edildi (Tablo 3.1). Spektrofotometre distile su ile sıfırlandı ve semi-mikro küvetler (Ref No: BSA002, Biosigma S.p.A., İtalya) kullanılarak numunelerin optik dansiteleri 420 nm'de Shimadzu UV-1601 (Kat No: 206-67001-93, Tokyo, Japonya) UV-Visible spektrofotometre ile ölçüldü. GSH konsantrasyonları, ölçülen optik dansiteler ve aynı numuneden analiz edilen protein konsantrasyonları kullanılarak mg GSH/g prot olarak hesaplandı.

Tablo 3.1. Spinal Kord Doku GSH Analiz Prosedürü

	Kör	Standart	Numune
Süpernatant	-	-	500 µL
Asit Reaktifi	500 µL		
Standart (20µmol/L)		500 µL	
Fosfat Solüsyonu	625 µL	625 µL	625 µL
Tuz Reaktifi	25 µL	25 µL	25 µL
DTNB	125 µL	125 µL	125 µL

Hesaplama : $(OD_{Numune} - OD_{Kör}) / (OD_{Standart} - OD_{Kör}) \times c \times M_A \times 2^* \times f / C_{pr}$

OD: Optik dansite,

c : Standart konsantrasyonu, 20×10^{-3} mmol/L

M_A : Moleküler ağırlık, 307

2^* : Numune ön işlemlerindeki dilüsyon faktörü

f : Test öncesi numune dilüsyonu, 1

C_{pr} : Numunenin protein konsantrasyonu, g protein/L

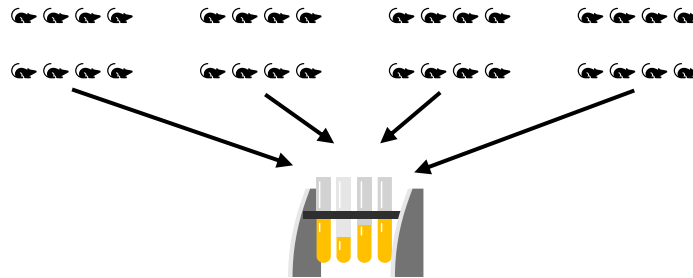
MDA Düzeylerinin Analizi

MDA düzeylerinin analizi, ticari Rat MDA ELISA kiti (Katalog No: E0156Ra, BT Lab, Çin) kullanılarak sandviç ELISA prensibi ile Biotek ELx800 mikropate okuyucu (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ve Biotek ELx50 plate yıkayıcı kullanılarak (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) gerçekleştirildi. Sonuçlar nmol /mg protein olarak verildi.

Ölçüm Prensibi: Kullanılan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kitinde kuyucuklar MDA antikoru ile kaplanmıştır. Numune eklendiğinde, numunedeki MDA kuyucuklardaki antikorlara bağlanır. Daha sonra biotinlenmiş rat MDA antikoru eklenir ve numunedeki MDA'ya bağlanır. Ardından eklenen Streptavidin-HRP ise biyotinlenmiş MDA antikorlarına tutunur. İnkübasyon sonrası yıkama yapılarak bağlı olmayan streptavidin-HRP uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu eklenir ve MDA miktarı ile orantılı olarak renk oluşumu gözlenir. Reaksiyon 10 dakika asidik solüsyonun eklenmesiyle sonlandırılır ve 450 nm'de absorbans ölçümü yapılır.

Western Blot Analizleri

Spinal kord hasarı oluşturulan sıçanların lezyon bölgesinden ve hasar oluşturulmayan sıçanların aynı seviyedeki spinal kord dokusundan alınan örnekler farklı ependorflara konularak 4 çalışma grubu için 4 doku havuzu oluşturuldu (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Western Blot analizi çalışma gruplarının oluşturulması

Protein İzolasyonu: Numune hazırlık aşamaları her zaman buz üzerinde gerçekleştirildi. Lizasyon için RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) Lizis Buffer kiti (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) kullanıldı. Kit içeriğindeki fenil metil sülfonil florid (PMSF), sodyum ortovanadat, proteaz inhibitöründen 10 µL ve 3 farklı deterjan (sodyum deoksikolat, NP-40, SDS) içeren RIPA Lizis Buffer'dan 2970 µL alınarak karışım hazırlandı. Her grubun ependorfunu 500 µL bu karışımdan eklenerek 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Numuneler +4 °C'de 14.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi (MR22i Jouan, France). Süpernatant yeni ependorfa aktarıldı ve örnekler 1/20 dilüe edildi.

Protein Düzeylerinin Analizi: Protein düzeyleri Qubit™ Protein Assay Kit (Kat No: Q33211, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak DeNovix QFX florometre (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) ile 485/590 nm'de analiz edildi. Özetle; organik boya içeren Qubit Buffer Mixi ve Bovin serum albumin (BSA) içeren standartlar prosedüre uygun şekilde hazırlandı. Florometre cihazının kalibrasyonu yapıldı (0, 10 ve 20 µg/mL) ve Qubit Buffer Mixi (198µL) ile 2 dakika inkübe edilen numuneler (2µL) analiz edildi. Protein konsantrasyonları µg/µL olarak belirlendi. Sonuçlar dilüsyon katsayısı 20 ile çarpıldı.

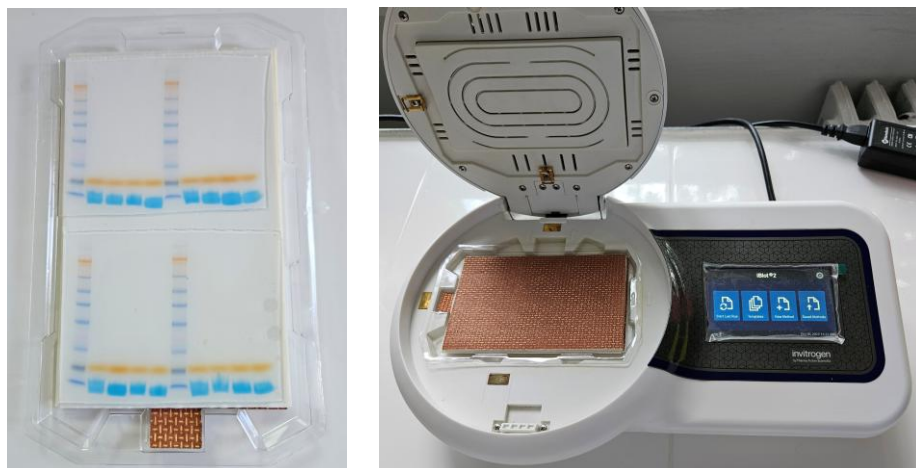
Örneklerin Hazırlanması ve Yürütme İşlemi: Her deney grubundan 50 µg protein içerecek hacimde numune alındı. Numunelerin üzerine 2,5 µL LDS Sample Buffer, 1 µL Sample Reducing Agent (Ref/Kat: 2090501, Novex, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA) ve 10 µL ye tamamlayacak hacimde distile su eklenerek eşit hacimde olmaları ve eşit miktarda protein içermeleri sağlandı. Hazırlanan numuneler 70°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası işaretleyici (SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard, Ref No: LC5925; 3 kDa–200 kDa, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ve numuneler jele pipetlendi. İşaretleyici ve numunelerin yürütülmesi işlemi Bolt™ MES SDS Running Buffer 20X (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA) solüsyonu ile Bolt™ % 4-12 Bis-Tris Plus Jelde (Ref No: NW04120BOX, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) 200

voltta 25-30 dakikada mini jel tank'ta (Ref No: A25977, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) çift olarak gerçekleştirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Western blot analizi yürütme işlemi

Membrana Transfer İşlemi: Sandviç şeklindeki membran aktarım sistemi IBlot™ 2 NC Regular Stacks (Ref No: IB230001, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Kiryat Shmona, İsrail) ve Thermo Fisher Scientific IBlot 2 Dry Blotting System (Ref No: IB21001, Invitrogen, Thermo Fisher Israil Ltd, İsrail) kullanılarak 20 voltta 7 dakikada gerçekleştirildi (Şekil 3.5).



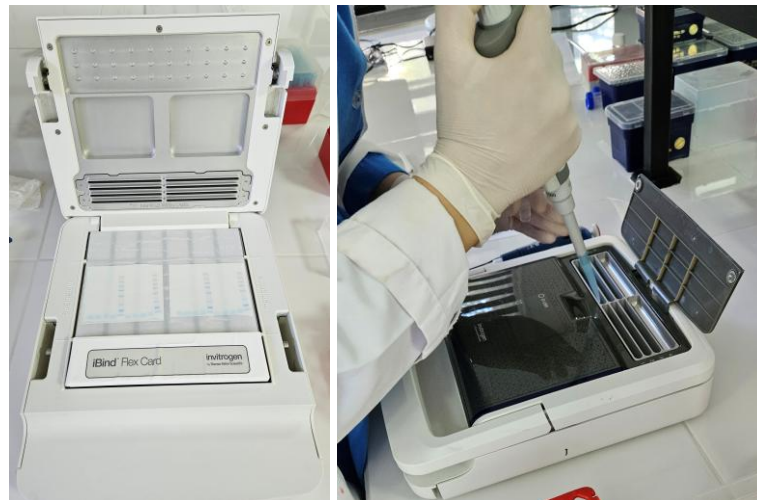
Şekil 3.5. Western blot analizi membrana transfer işlemi

Membrana transfer işleminden sonra iBind™ Flex Solution Kiti (Ref No: SLF2020, Invitrogen, Life Technologies Corp, Carlsbad, CA, USA), 10 mL 5X Buffer, 500 µL 100X Additive Solüsyonu ve 40 mL distile su kullanılarak bloklama solüsyonu hazırlandı ve membrana 5 dakika uygulandı.

Antikor Uygulama: Her biyobelirteç için primer (GPx4, SLC7A11/xCT, 4-HNE) ve sekonder antikorlar hazırlandı (Tablo 3.2). iBind™ Flex kart (Ref No: SLF2010, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Kiryat Shmona, İsrail) üzerine bloklama solüsyonu uygulandı. Primer ve sekonder antikor uygulama ve yıkama işlemi Invitrogen™ iBind™ Flex Western (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc.) cihazında 3 saatte gerçekleştirildi (Şekil 3.6).

Tablo 3.2. Antikorlar ve işaretleyiciler

Beta Aktin	1:1000, AC026, ABclonal, Çin
GPx4	1:1000, A1933, ABclonal, Çin
SLC7A11	1:1000, A13685, ABclonal, Çin
4-HNE	1:1000, A26085, ABclonal, Çin
Sekonder Antikor	HRP goat anti-rabbit IgG (H+L), 1:1000, AS014, ABclonal, Wuhan, Çin
İşaretleyici	SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard, Ref no: LC5925; 3 kDa–200 kDa, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA

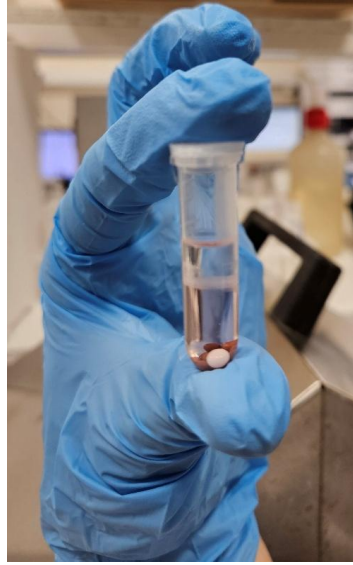


Şekil 3.6. Primer ve sekonder antikorların uygulanması

Görüntüleme: 3 saatin sonunda 1 mL luminol/enhancer ve 1 mL peroksidaz ile hazırladığımız ECL (sekonder antikora özgü substrat) solüsyonu (Cat No: 170-5061, Bio-Rad, USA) membran üzerine uygulandı ve 5 dakika inkübe edildi. Bantların görüntülenmesi işlemi için GEN-BOX ImagER Cfx (ER Biyoteknoloji Ürünleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, Ankara, Türkiye) kemilüminesan görüntüleme sistemi kullanıldı. Cihazda tabloya yerleştirilen membran görüntüleri Image Studio Lite (version 5.2.5) ile alındı ve negatifleri oluşturuldu. Protein bantlarının yoğunluğu ImageJ programı ile 3 kez kantite edilerek elde edildi ve ortalamaları alındı. Sonuçlar β -Aktin değerleri ile normalize edilerek rölatif protein ekspresyonları belirlendi.

Kantitatif Real Time PCR Analizleri

RNA izolasyonu: A.B.T.TM RNA Purification Kit (I02-01-10, ABT, Ankara, Türkiye) ile kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. 10-20 mg spinal kord numunesi üzerine 100 μ L PBS (Kat No: 20012027, GibcoTM PBS, pH 7.2, USA), 10 μ L Proteinaz K (20mg/mi, Kat. No: EO0491; Thermo Fisher Scientific, USA), 400 μ L LIZIS buffer eklendi ve homojenize edildi. Homojenat 2 mL'lik tüpe aktarıldı ve 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 500 μ L Buffer P ilave edilip vorteksle karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. Üzerine 200 μ L kloroform izoamilalkol (49:1, 516726, Merck Isoamyl Alcohol) karışımı eklendi. Alt-üst ederek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dk daha bekletildi. Karışım 4 °C'de 12000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası en üstte bulunan sıvı fazdaki süpernatant (yaklaşık 400 μ L) yeni bir tüpe aktarıldı (Şekil 3.7). Süpernatant üzerine 400 μ L etanol (%96-100) ilave edildi ve karıştırıldı. 700 μ L lizat kolona aktarıldı ve oda sıcaklığında 12000 g'de 20 sn santrifüj edildi. Tüm lizatların kolona transfer edilmesi için bu basamak bir kez daha tekrarlandı.



Şekil 3.7. RNA izolasyonu sırasında fazların oluşumu

Daha sonra sırasıyla kolonun üzerine 700 μL wash buffer 1 solusyonu eklendi, oda sıcaklığında 12000 g'de 20 sn santrifüj edildi. Tüp boşaltıldı ve kolon tekrar tüp üzerine yerleştirildi. Kolonun üzerine 600 μL Wash Buffer 2 solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 12000 g'de 20 sn santrifüj edildi. Tüp döküldü ve kolon tekrar tüp üzerine yerleştirildi. Kolonun üzerine tekrar 600 μL Wash Buffer 2 solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 12000 g'de 20 sn santrifüj edildi. Tüp döküldü ve kolon tekrar tüp üzerine konuldu. Kolon 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi ve 1,5 mL'lik ependorf üzerine yerleştirildi. Kolonun merkezine 50-100 μL , 65-70 °C'de nükleaz free su (Kat No: L0015-BC, Biochrom AG Ultra Pure Water, Sterile, Suitable for HPLC) konularak oda sıcaklığında 12000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. NanoDrop 1000 spektrofotometre (ND-1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Almanya) ile numunelerdeki RNA'ların kantitasyonu yapıldı ve 260/280 nm optik dansiteler ile saflıkları değerlendirildi.

cDNA Sentezi: A.B.TTM cDNA synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) (Kat No: C03-01-20, ABT, Ankara, Türkiye) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Nanodrop 1000 spektrofotometrede ölçülen değerler ng/ μL cinsinden olduğu için reaksiyon 1000 ng üzerinden planlandı. Ependorflara her numuneden eşit miktarda RNA içerecek hacimde alındı (örneğin nandropta 250 ng/ μL ölçülen numuneden 4 μL

alındı) ve template hacmi RNase free su ile 10 μ L ye tamamlandı. Kit içeriğindeki diğer maddeler (10X reaksiyon bufferı, 20 dNTP (2,5 mM) mix, random hexamer (50 μ M), reverse transcrpitase (200 u/ μ L), RNase inhibitörü (40 u/ μ L), RNase free su) prosedüre uygun olarak eklenerek toplam hacim 20 μ L ye tamamlandı. Numuneler SimpliAmp Thermal Cycler (Ref No: A24812, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Holdings, Singapur) cihazına yüklenerek kit prosedürüne uygun olarak (sırasıyla 25⁰C’de 10 dakika, 37⁰C’de 120 dakika, 85⁰C’de 5 dakika ve devamı 4⁰C’de) cDNA sentezi gerçekleştirildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. cDNA sentezi protokolünün uygulanması

Primerlerin Hazırlanması: Stok primerler (forward ve reverse, 100 nmol HPLC Grade) (Tablo 3.3) nükleaz free su ile 10uM olacak şekilde dilüe edildi.

Tablo 3.3. qRT-PCR analizi için kullanılan forward ve reverse primerler

Primer Adı	Dizi	Uzunluk (Bç)
GPx4 f	TGA ACC TGG ACG CCA AAG TC	20
GPx4 r	GGG TTC AAA GGC TCC CCA AT	20
SLC7A11 f	ACC ATC CCC CTT GCA ATC TG	20
SLC7A11 r	AGA GGG CAA CAA AGA TCG GG	20
NRF2 f	TCA GTC TTC ACC ACC CCT GA	20
NRF2 r	TCC TGC CAA ACT TGC TCC AT	20
Beta Aktin f	GGG CAA CAT AGC ACA GCT TCT	21
Beta Aktin r	GCT TCA CCA CCA CAG CTG AGA	21

f: forward r: reverse Bç: Baz çifti

Kantitatif Real Time PCR Analizi: qRT-PCR analizi A.B.T.TM 2x qPCR SYBRGreen Master Mix (With ROX), (Cat No: Q03-02-05, Ankara, Türkiye) ticari kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Numuneler 100 ng/μL cDNA içerecek şekilde dilüe edildi. Her numunenin analizi için 5 μL master mix, 0,35 μL primerler (f ve r), 2 μL cDNA alındı ve hacmi RNase free su ile 10 μL'ye tamamlanıp kuyucuklara yerleştirildi. Her bir primer için: 95°C'te 5dk; 95°C'te 15s, 60°C'de 30s, 72°C'de 30s; 40 döngü şeklinde qRT-QPCR protokolü StepOnesPlusTM Real-Time PCR (Ref No: 4376592, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Holdings, Singapur) sisteminde uygulandı. Gen ekspresyon düzeyleri, β-aktin kontrol geninin ortalama kritik eşik değerlerine (CT) göre normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile değerlendirildi.

3.8. Histolojik Analizler

3.8.1. Hematoksilen-Eozin ve Nissl Boyama

K, E, S ve SE gruplarını oluşturan tüm sıçanların medulla spinalis numunelerinin, ışık mikroskopik düzeyde histolojik değerlendirmelerinin yapılabilmesi için %10'luk formalin fiksatifine alınarak 24-48 saat süre ile fiks edildi. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat su ile yıkandı. Su ile yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'şer dakika ksilolde bekletildi. Medulla spinalis örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı metal kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile 60°C de bekletildi. Preparatlar 10'ar dakika süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandı. Deparafinizasyonu yapılan doku kesitleri 5'er dakika %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi.

Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyama için 2 dakika hematoksilen ile ve 10 dakika eozin ile boyandı. Distile su ile fazla boyası alınan kesitler alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki farklı ksilolde 10'ar dakika tutularak şeffaflaştırıldı. Şeffaflanan dokular entellan ile kapatıldı. Nissl Boyama için ise aynı ön işlemlerin ardından Cresyl Violet boyasında 10 dakika bekletildi. Hızlıca distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kesitler alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki farklı ksilolde 10'ar dakika tutularak şeffaflaştırıldı. Şeffaflanan dokular entellan ile kapatıldı. Preparatlar ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile medulla spinalis numuneleri incelendi ve incelemelerin ardından görülen etkiler skorlandı. Medulla spinalis örneklerini içeren tüm preperatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar:

Eosin Y solüsyonu (Ref No: BS-009, Histomed medikal, Ankara, Türkiye)
 Hematoksilen Solüsyonu (Ref No: BS-001, Histomed medikal, Ankara, Türkiye)
 Cresyl Violet Aqueous Solution (Kat No: 129999.0250, Advanced Diagnostics & Research, Mediko Kimya, Türkiye)
 Etil alkol (%96, Alagöz Kimya ve Sağlık Ürünleri San. Tic. A.Ş, Afyonkarahisar)
 Xylene (28973.363, VWR Chemicals, Fransa)
 Sub-X mounting medium (3801740, Surgipath, UK)
 Citadel™ 2000 Wax Bath (69810051, Thermo Electron Corporation, UK)
 Leica Autostainer XL

3.8.2. Geçirimli Elektron Mikroskopi

Geçirimli elektron mikroskobik (TEM) değerlendirme için alınan spinal doku örnekleri 1 mm³'lük parçalara ayrılarak % 2,5'luk gluteraldehitli PBS solüsyonuna alındı ve bir gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün 3 kez 15 dakika PBS solüsyonu ile yıkanan dokular PBS ile hazırlanmış %1'lik osmiyum tetraoksit solüsyonunda iki saat oda ısısında rotatorda karıştırılarak tespit edildi. Daha sonra tekrar 3 kez 15 dakika PBS solüsyonu ile yıkandı. Sonraki aşamalarda aşağıdaki basamaklar izlenildi:

- %30'luk alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %50'lik alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %70'lik alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %90'lık alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %95'lik alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %100'lük alkolde +4°C'de 30 dakika 1 defa
- %100'lük alkolde oda ısısında 30 dakika 1 defa

Bu basamaklar ile dehidrasyon aşaması tamamlandı. Bu aşamadan sonra yapılacak işlemler oda ısısında gerçekleştirildi. Dehidrasyon sonrasında şeffaflaştırma işlemi için 2 defa propilen oksitte 30 dakika bekletildi. Daha sonra eş miktarda karıştırılmış propilen oksit ve resin CY212 solüsyonunda 2 saat rotatorda karıştırılıp, bu aşama sonrasında saf resin CY212 içerisine alınarak bir gece rotatorda

karıştırılmaya bırakıldı. Ertesi gün gömme materyali bulunan kuyucuklara gömme işlemi yapıldı ve 60°C’de 48 saat polimerizasyon işlemine bırakıldı.

Ultramikrotom (Leica UltraCutR) kullanılarak elektron mikroskopik inceleme için 60 nm kalınlığında kesitler bakır gridler üzerine alındı. Gridler metanol içerisinde hazırlanan %5’lik uranil asetat boyası ve Reynold kurşun boyası ile boyandı. Hitachi HT 7800 TEM altında incelendi ve görüntülemeler yapıldı.

3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen deneysel verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics Versiyon 27.0 programı deneme sürümü kullanılarak gerçekleştirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasında karşılaştırma yapmak için normal dağılım gösteren verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve istatistiksel anlamlılık olduğunda ikili karşılaştırmalar için Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen verilerde Kruskal-Wallis testi uygulandı, istatistiksel anlamlılık olduğunda ikili karşılaştırmalar için Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Gruplar arasında kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Monte Carlo Exact Pearson Ki-kare testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki korelasyonun belirlenmesinde Pearson korelasyon analizi kullanıldı. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapmayla, normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenler median (25.-75. çeyreklik), kategorik/nitel veriler ise yüzde (%) olarak verilmiştir. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal bulgular

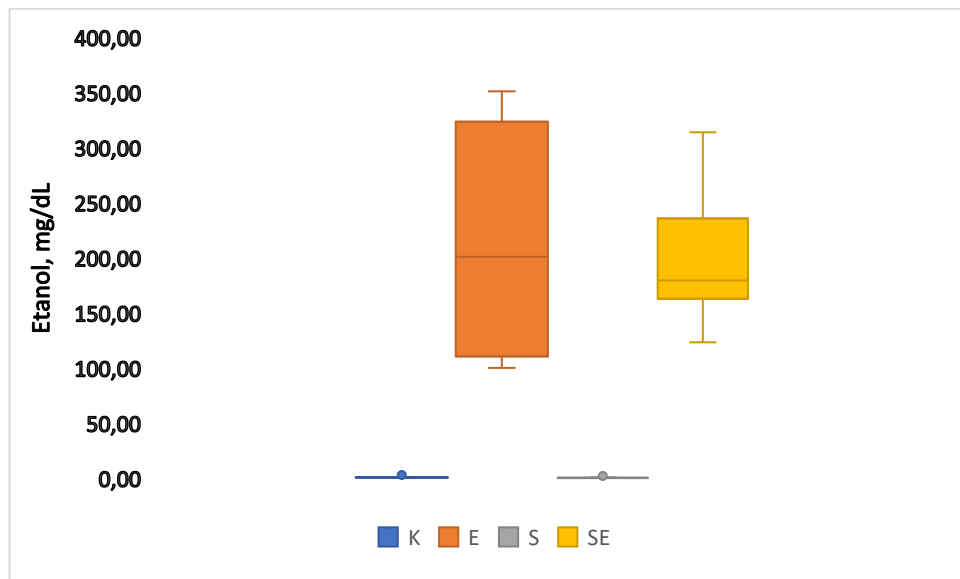
4.1.1. Etanol Düzeyleri

Serum etanol düzeyleri incelendiğinde, K grubu ile E ve SE grupları arasında (sırasıyla $p=0,014$, $p=0,016$) ve S grubu ile E ve SE grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$). Etanol uygulanmayan K ile S grubu arasında ve etanol uygulanan E ile SE grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (sırasıyla $p=1$, $p=1$) (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Serum etanol düzeyleri (mg/dL)

Gruplar (n=8)	K	E	S	SE
Medyan	1,13	201,4	0,78	179,83
(%25 - %75)	(0,9-1,35)	(121,2-319,4)***	(0,6-0,98)	(165,1-226,3)***

*: K grubu ile arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık (sırasıyla E ve SE grubu $p=0,014$, $p=0,016$), **: S grubu ile arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık (sırasıyla E ve SE grubu $p<0,001$, $p<0,001$).



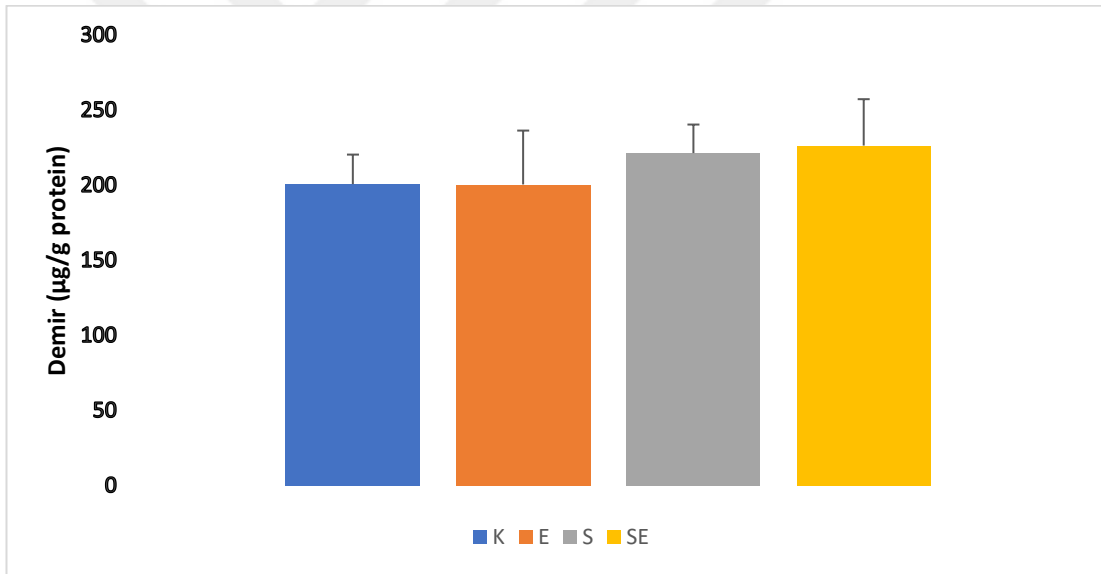
Şekil 4.1. Serum Etanol Düzeyleri.

4.1.2. Total Demir Düzeyleri

Spinal kord doku total demir düzeyleri incelendiğinde, K grubuna göre S ve SE gruplarında bir miktar artış izlenmekle birlikte, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p= 0,139$) (Tablo 4.2, Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Spinal kord doku demir düzeyleri ($\mu\text{g/gprotein}$)

Gruplar (n=8)	K	E	S	SE
Ortalama $\pm$ Standart Sapma	200,7 $\pm$ 19,7	200,5 $\pm$ 35,9	221,4 $\pm$ 19	226,4 $\pm$ 30,9



Şekil 4.2. Spinal Kord Doku Demir Düzeyleri.

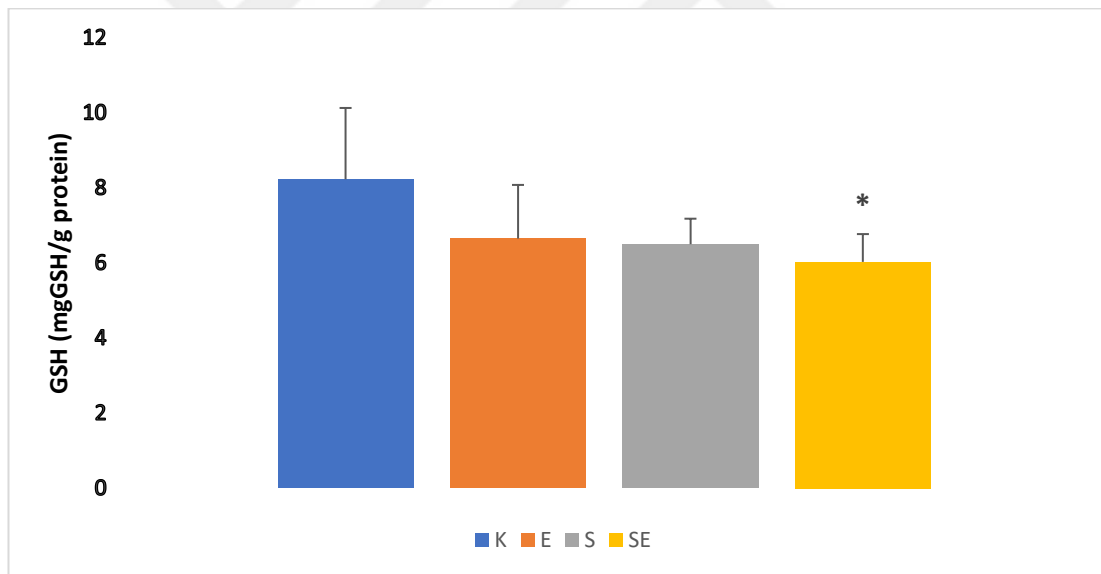
4.1.3. GSH Düzeyleri

Spinal kord doku GSH düzeyleri incelendiğinde, K grubu ile SE grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p= 0,01$) (Tablo 4.3, Şekil 4.3).

Tablo 4.3. Spinal kord doku GSH düzeyleri (mgGSH/gprotein)

Gruplar (n=8)	K	E	S	SE
Ortalama $\pm$ Standart Sapma	8,23 $\pm$ 1,9	6,65 $\pm$ 1,43	6,50 $\pm$ 0,68	6,03 $\pm$ 0,74*

*: K grubu ile arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p= 0,01$).



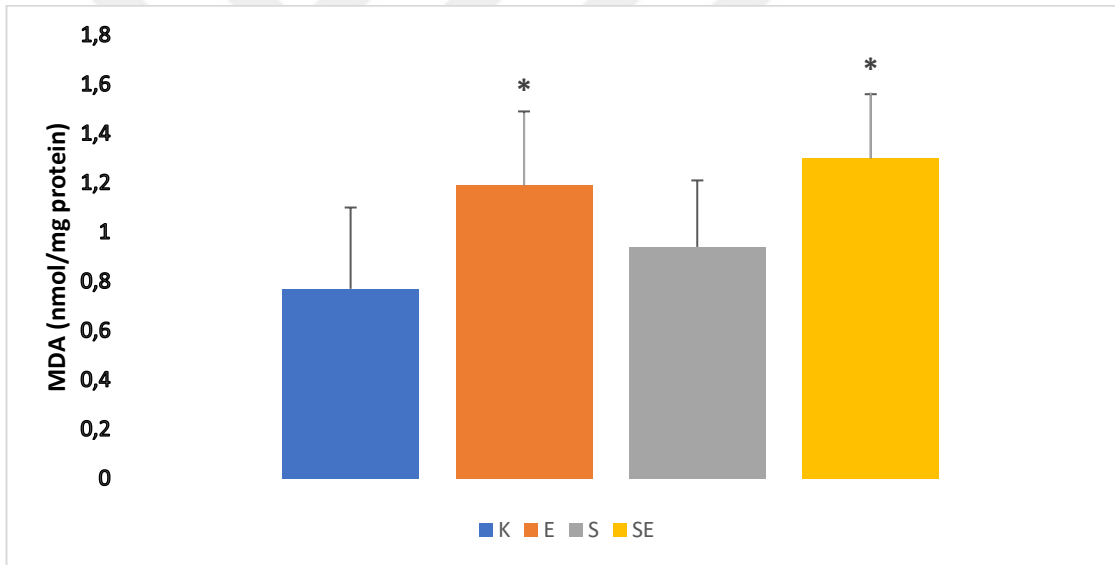
Şekil 4.3. Spinal kord doku GSH düzeyleri. *: K grubu ile arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p= 0,01$).

4.1.4. MDA Düzeyleri

Spinal kord doku MDA düzeyleri incelendiğinde, K grubu ile E ve SE grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (sırasıyla $p=0,037$ ve $p=0,007$) (Tablo 4.4, Şekil 4.4).

Tablo 4.4. Spinal kord doku MDA düzeyleri (nmol/mgprotein)

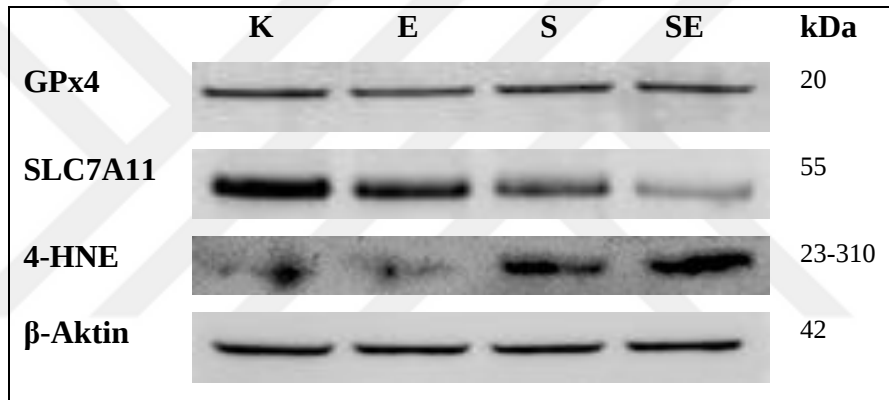
Gruplar (n=8)	K	E	S	SE
Ortalama $\pm$ Standart Sapma	$0,77 \pm 0,33$	$1,19 \pm 0,30$	$0,94 \pm 0,27$	$1,30 \pm 0,26$



Şekil 4.4. Spinal kord doku MDA düzeyleri. *: K grubu ile arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık (sırasıyla E ve SE grubu $p= 0,037$, $p=0,007$).

4.1.5. Western Blot Analiz Sonuçları

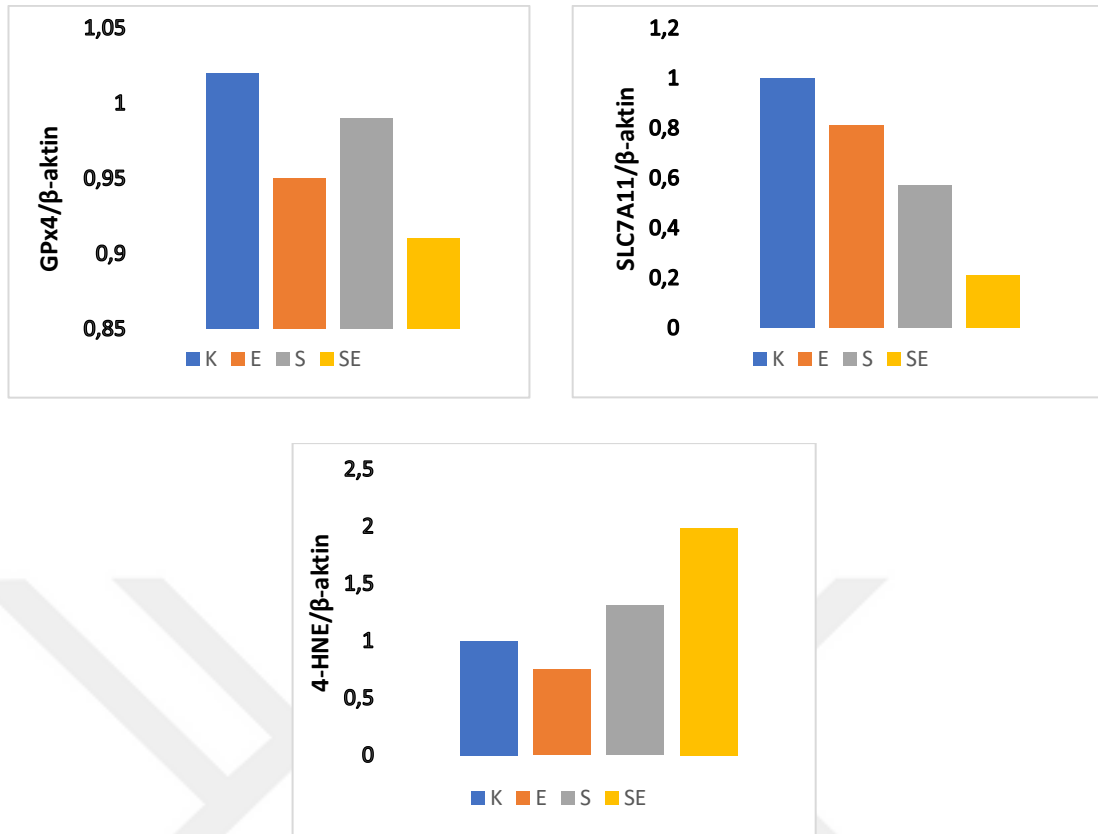
Western blot analizi rölatif protein ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, SLC7A11 protein ekspresyonlarının K grubuna kıyasla E, S ve SE gruplarında azaldığı ve bu azalmanın en belirgin SE grubunda olduğu görüldü. GPx4 protein ekspresyonlarındaki değişim belirgin olmamakla birlikte, K grubuna kıyasla E, S ve SE gruplarında düşme eğilimindeydi ve SE grubunda daha belirgindi. 4-HNE düzeyleri değerlendirildiğinde ise K grubuna kıyasla E grubu 4-HNE düzeylerinde azalma gözlenirken, SE grubunda daha belirgin olmak üzere, S ve SE grubu 4-HNE düzeylerinde artış görüldü (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Tablo 4.5).



Şekil 4.5. Western blot analizi

Tablo 4.5. GPx4, SLC7A11 ve 4-HNE rölatif protein ekspresyon düzeyleri

	K	E	S	SE
GPx4	1,02	0,95	0,99	0,91
SLC7A11	1	0,81	0,57	0,21
4-HNE	1	0,75	1,31	1,99



Şekil 4.6. GPx4, SLC7A11 ve 4-HNE rölâtif protein ekspresyon düzeyleri

4.1.6. Kantitatif Real Time PCR Analiz Sonuçları

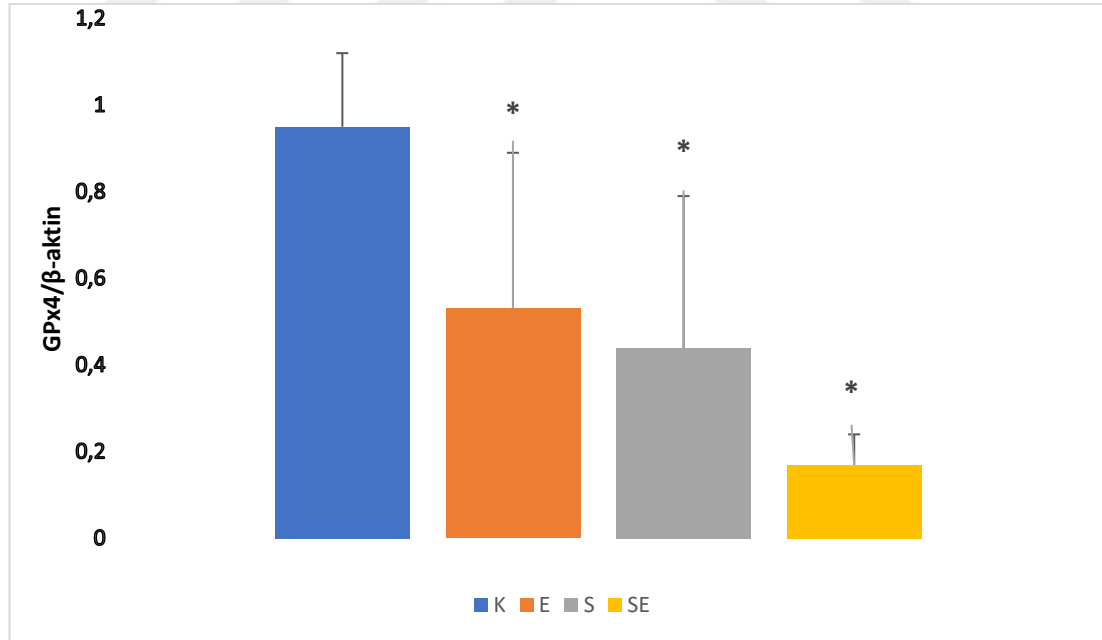
GPx4 Ekspresyon Düzeyleri

GPx4 rölatif gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, K grubu ile E, S ve SE grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (sırasıyla $p=0,022$, $p=0,04$ $p<0,001$) (Tablo 4.6, Şekil 4.7).

Tablo 4.6. Spinal kord doku GPx4 gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar (n=8)	K	E	S	SE
Ortalama $\pm$ Standart Sapma	$0,95 \pm 0,17$	$0,53 \pm 0,36^*$	$0,44 \pm 0,35^*$	$0,17 \pm 0,07^*$

*: K grubu ile E, S ve SE grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık sırasıyla ($p = 0,022$, $p=0,04$ $p<0,001$)



Şekil 4.7. Spinal kord doku GPx4 gen ekspresyon düzeyleri. *: K grubu ile E, S ve SE grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık sırasıyla ($p = 0,022$, $p=0,04$ $p<0,001$)

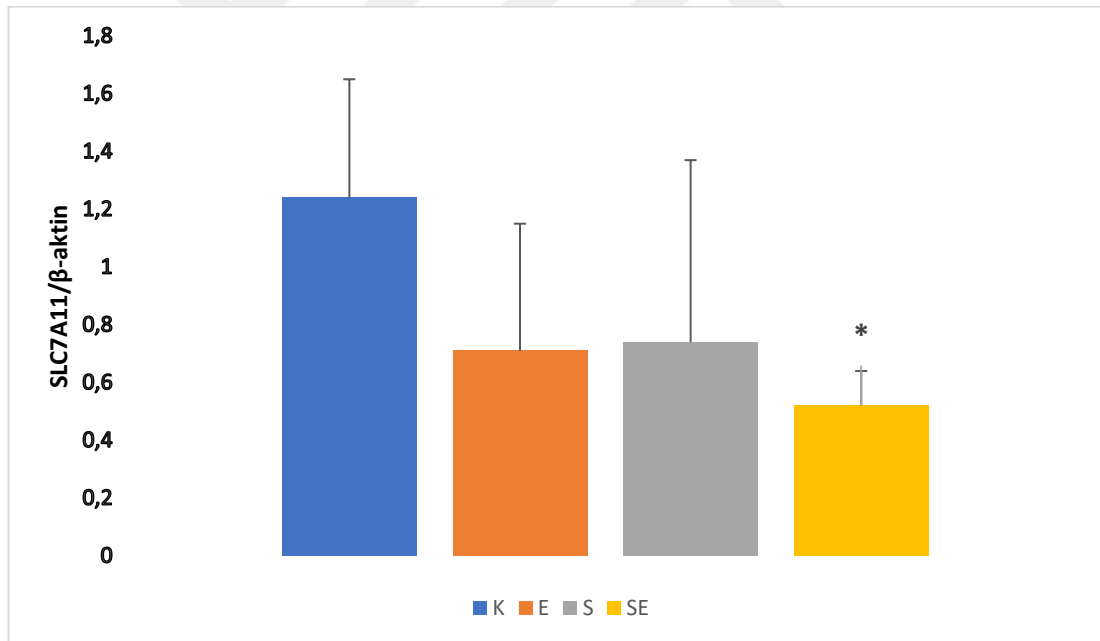
SLC7A11/xCT Ekspresyon Düzeyleri

SLC7A11/xCT rölatif gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, K grubu ile SE grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0,014$) (Tablo 4.7, Şekil 4.8).

Tablo 4.7. Spinal kord doku SLC7A11/xCT gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar (n=8)	K	E	S	SE
Ortalama $\pm$ Standart Sapma	1,24 $\pm$ 0,41	0,71 $\pm$ 0,44	0,74 $\pm$ 0,63	0,52 $\pm$ 0,12*

*: K grubu ile arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p=0,014$)



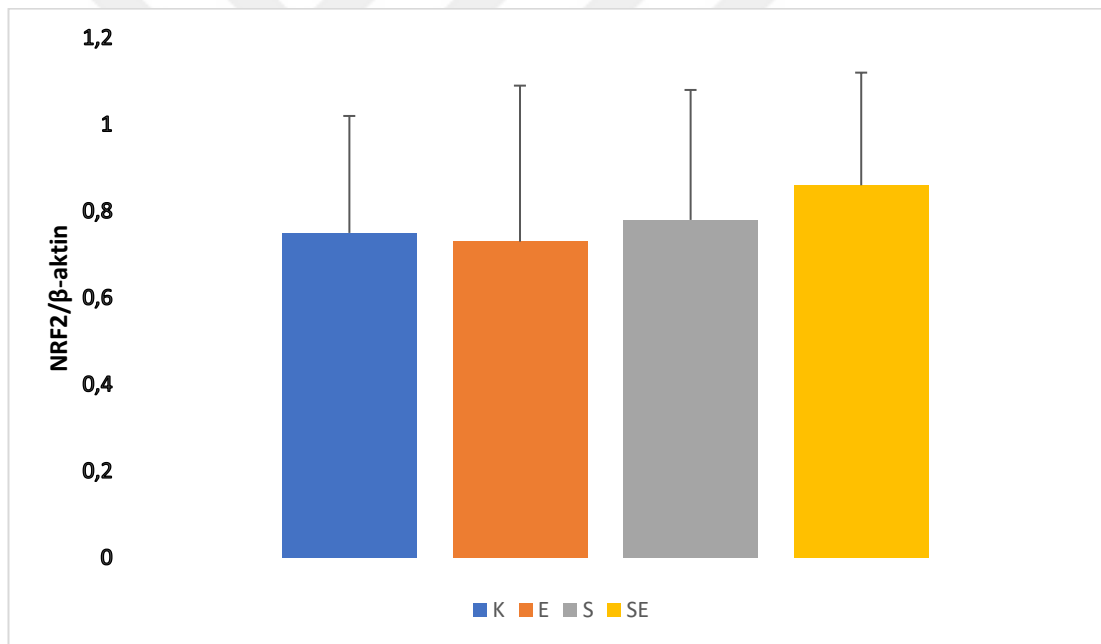
Şekil 4.8. Spinal kord doku SLC7A11/xCT gen ekspresyon düzeyleri *: K grubu ile arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p=0,014$)

NRF2 Ekspresyon Düzeyleri

NRF2 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.8, Şekil 4.9).

Tablo 4.8. Spinal kord doku NRF2 gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar (n=8)	K	E	S	SE
Ortalama ± Standart Sapma	0,75 ± 0,27	0,73 ± 0,36	0,78 ± 0,30	0,86 ± 0,26

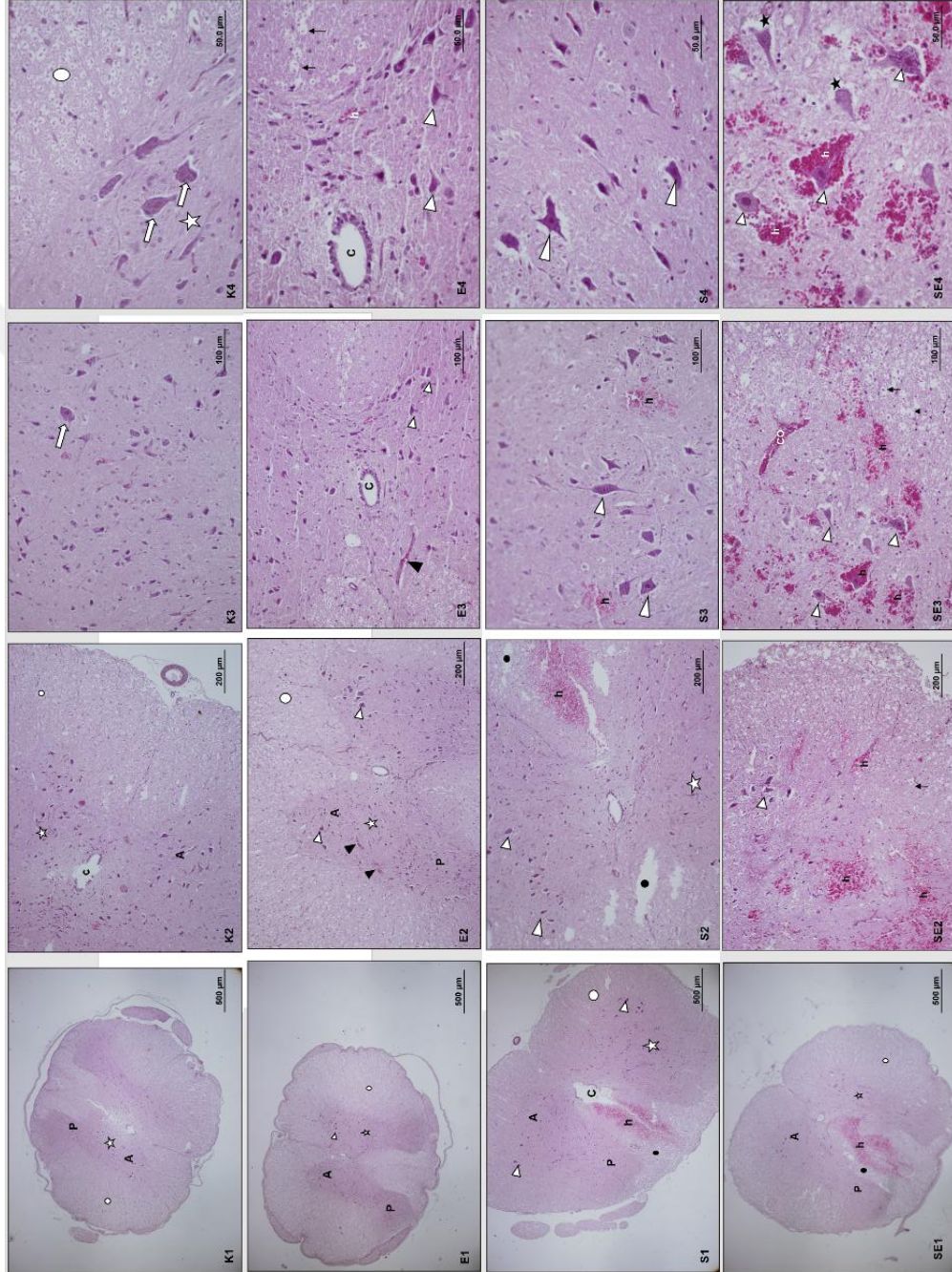


Şekil 4.9. Spinal kord doku NRF2 gen ekspresyon düzeyleri.

4.2. Histolojik Bulgular

4.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

K, E, S ve SE gruplarına ait hematoksilen-eozin boyama kesitleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Grupları temsil eden sıçanların medulla spinalislerinin ışık mikroskopik görüntüleri.

K grubu: Işık mikroskopik incelemelerde farklı büyütmelerde medulla spinalisin kanalis sentralis (c), ön boynuz (A) ve arka boynuz (P) yapıları ile gri cevher (☆), ökromatik çekirdek yapısı ve hücre gövdeleriyle birlikte ön boynuzda bulunan multipolar motor nöronlar ($\Rightarrow$) ile beyaz cevherde yer alan aksonlar ve miyelin kılıfları (○) normal yapıda görülmekte (K1-K4), (bar:500µm, bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, HE).

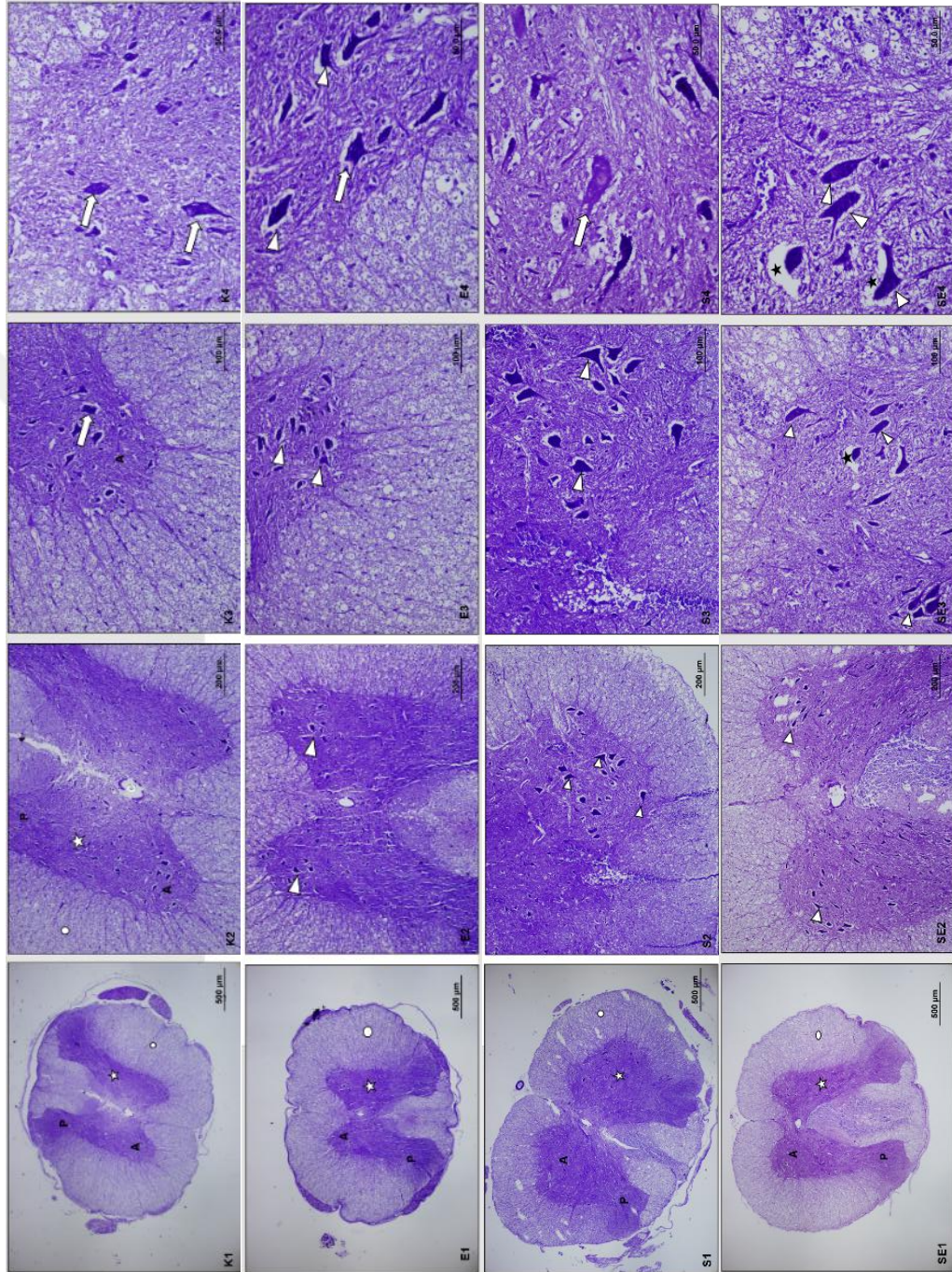
E grubu: Işık mikroskopik incelemelerde farklı büyütmelerde medulla spinalisin gri cevher ön boynuzdaki (A) motor nöronlarda iskemi ($\triangleright$), sentral kanaldaki ependim hücrelerinde dökülmeler (c), gri cevher (☆) ve beyaz cevherdeki (○) bazı alanlarda hemoraji (h) ve vasküler kongesyon ($\blacktriangleright$) görülmekte. Ayrıca beyaz cevherdeki bazı alanlarda miyelinlerde ($\rightarrow$) hasar dikkat çekmekte (P:arka boynuz) (E1-E4), (bar:500µm, bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, HE).

S grubu: Işık mikroskopik incelemelerde farklı büyütmelerde medulla spinalisin gri cevher ön boynuzdaki (A) motor nöronlarda iskemi ($\triangleright$), sentral kanaldaki ependim hücrelerinde dökülmeler (c), gri cevher (☆) ve beyaz cevherdeki (○) bazı alanlarda hemoraji (h) görülmekte. Ayrıca beyaz cevherdeki bazı alanlarda hasar (●) dikkat çekmekte (P:arka boynuz) (S1-S4), (bar:500µm, bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, HE).

SE grubu: Işık mikroskopik incelemelerde farklı büyütmelerde medulla spinalisin gri cevher ön boynuzdaki (A) motor nöronlarda iskemi ($\triangleright$), perinöral dejenerasyon (★), gri cevher (☆) ve beyaz cevherdeki (○) birçok alanda hemoraji (h) ve vasküler kongesyon (co) görülmekte. Ayrıca beyaz cevherdeki bazı alanlarda hasar (●) ve miyelin dejenerasyonu ($\rightarrow$) dikkat çekmekte (P:arka boynuz) (S1-S4), (bar:500µm, bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, HE).

4.2.2. Nissl Boyama

K, E, S ve SE gruplarına ait nissl boyama kesitleri Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Grupları temsil eden sıçanların medulla spinalislerinin nissl boyama görüntüleri

K grubu: Işık mikroskopik incelemelerde farklı büyültmelerde medulla spinalisin kanalis sentralis (c), ön boynuz (A) ve arka boynuz (P) yapıları ile gri cevher (☆), ökromatik çekirdek yapısı ve hücre gövdeleriyle birlikte ön boynuzda bulunan multipolar motor nöronlar (⇒) ile beyaz cevherde (○) yer alan aksonlar ve miyelin kılıfları normal yapıda görülmekte (K1-K4), (bar:500µm, bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, cresyl viyole).

E grubu: Işık mikroskopik incelemelerde farklı büyültmelerde medulla spinalisin gri cevher (☆) ön boynuzdaki (A) motor nöronlarda iskemik (▷) ve normal görümlü nöronlar (⇒) görülmekte (beyaz cevher (○), P:arka boynuz) (E1-E4), (bar:500µm, bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, cresyl viyole).

S grubu: Işık mikroskopik incelemelerde farklı büyültmelerde medulla spinalisin gri cevher (☆) ön boynuzdaki (A) motor nöronlarda iskemik (▷) ve normal görümlü nöronlar (⇒) görülmekte (beyaz cevher (○), P:arka boynuz) (S1-S4), (bar:500µm, bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, cresyl viyole).

SE grubu: Işık mikroskopik incelemelerde farklı büyültmelerde medulla spinalisin gri cevher ön boynuzdaki (A) motor nöronlarda iskemik nöronlar (▷) ve perinöral dejenerasyon (★) dikkat çekmekte (beyaz cevher (○), P:arka boynuz) (SE1-SE4), (bar:500µm, bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, cresyl viyole).

Hematoksilen-Eozin ve cresyl violet boyama (nissl boyama) sonrası yapılan mikroskopik incelemelerde numuneler; Hasar yok: 0 , Az hasar: 1 , Orta hasar: 2 ve Yoğun hasar: 3 olarak kategorize edilmiştir. Histolojik değerlendirmeler ve yapılan skorlamaların analiz sonuçları tablo 4.9'da gösterilmiştir. Hemoraji, iskemik hücre, perinöral dejenerasyon, miyelin hasarı gibi hasar bulguları ile nöron sağkalımı değerlendirildiğinde, tüm parametrelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir ($p<0,001$). Tüm parametrelerde K grubunda intaktken, hasar bulgularının sırasıyla E, S ve SE gruplarında artma eğiliminde olduğu görüldü. Nöron sağkalımı değerlendirildiğinde ise diğer bulgularla uyumlu olarak ters yönde bir eğilim izlendi.

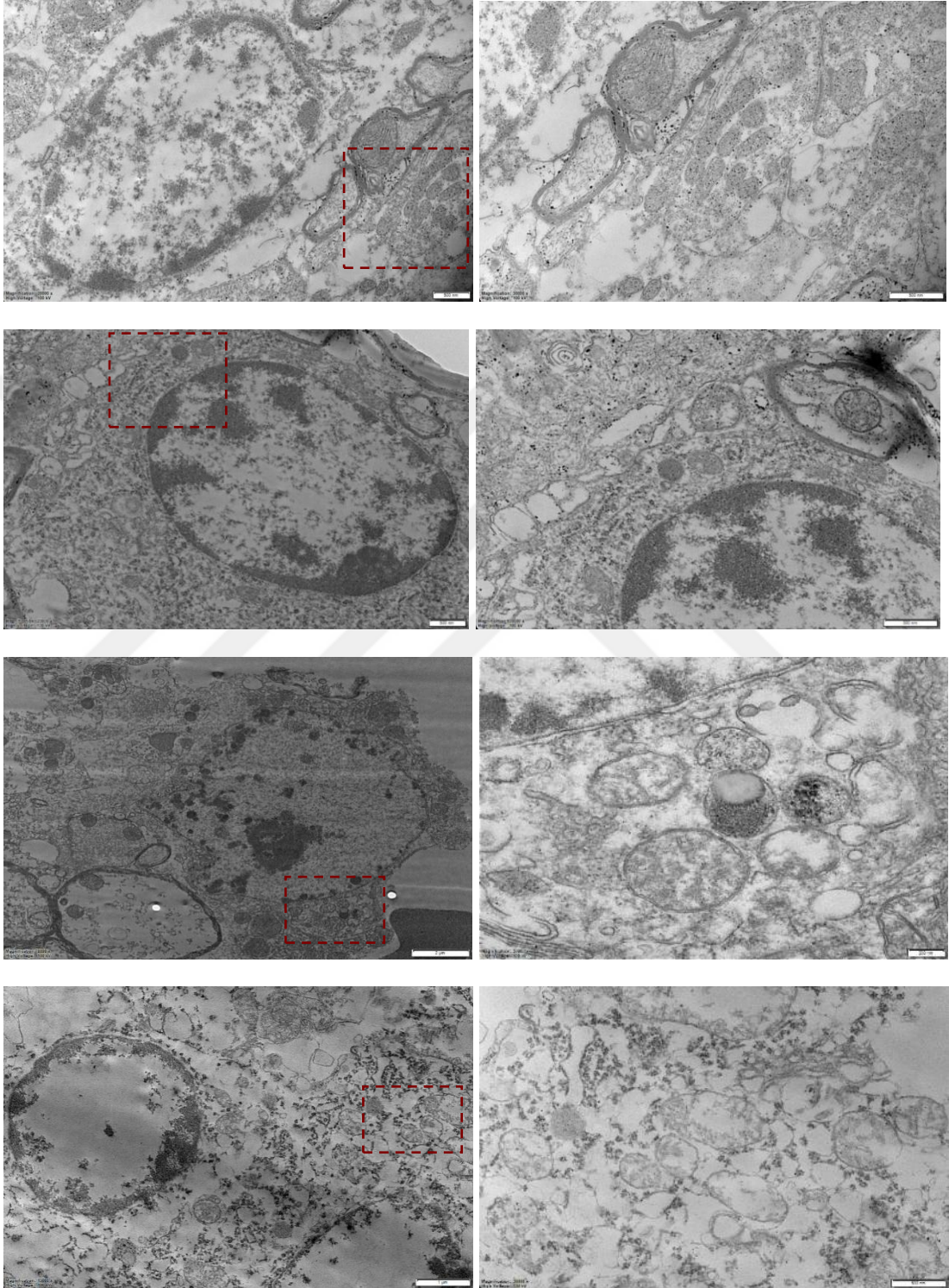
Tablo 4.9. Histolojik değerlendirmeler ve skorlamalar

Parametre	Skor		K	E	S	SE
Hemoraji*	0	Say1	7	0	0	0
		%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	1	Say1	0	1	3	0
		%	0,0%	14,3%	42,9%	0,0%
	2	Say1	0	6	4	0
		%	0,0%	85,7%	57,1%	0,0%
	3	Say1	0	0	0	7
		%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
İskemik Hücre*	0	Say1	7	0	0	0
		%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	2	Say1	0	5	5	0
		%	0,0%	71,4%	71,4%	0,0%
	3	Say1	0	2	2	7
		%	0,0%	28,6%	28,6%	100,0%
Perinöral Dejenerasyon*	0	Say1	7	5	0	0
		%	100,0%	71,4%	0,0%	0,0%
	1	Say1	0	2	4	0
		%	0,0%	28,6%	57,1%	0,0%
	2	Say1	0	0	3	1
		%	0,0%	0,0%	42,9%	14,3%
	3	Say1	0	0	0	6
		%	0,0%	0,0%	0,0%	85,7%
Myelin Hasarı*	0	Say1	7	0	0	0
		%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	1	Say1	0	3	3	0
		%	0,0%	42,9%	42,9%	0,0%
	2	Say1	0	4	4	0
		%	0,0%	57,1%	57,1%	0,0%
	3	Say1	0	0	0	7
		%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
Nöron Sağkalımı*	0	Say1	0	0	1	6
		%	0,0%	0,0%	14,3%	85,7%
	1	Say1	0	1	6	1
		%	0,0%	14,3%	85,7%	14,3%
	2	Say1	0	6	0	0
		%	0,0%	85,7%	0,0%	0,0%
	3	Say1	7	0	0	0
		%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%

*: Monte Carlo Exact Pearson Ki-kare testi (p<0,001)

4.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM)

K, E, S ve SE gruplarının TEM kesitleri Şekil 4.12’de sırası ile gösterilmiştir.



Şekil 4.12. K, E, S ve SE gruplarını temsil eden TEM kesitleri (yukarıdan aşağıya).

İşaretlenen alanlar sağ taraftaki kesitlerde yakından gösterilmektedir.

TEM incelemeleri değerlendirildiğinde, K grubuna ait mitokondrilerin korunduğu ve herhangi bir hasar bulgusunun olmadığı görüldü. E, S ve SE grubu mitokondrilerinde ise büzüşme, kristalarda azalma/kaybolma ve mitokondriyal dış membran bütünlüğünde bozulma gibi ferroptosisin karakteristik morfolojik bulguları izlendi. E, S ve SE gruplarındaki hasarın şiddeti karşılaştırıldığında ise, E ve S gruplarında mitokondriyal hasar bulguları benzer şiddetteyken, SE grubunda hasarın daha şiddetli olduğu görüldü.



5. TARTIŞMA

Yaklaşık her üç travmatik spinal kord yaralanmasından biri alkol tüketimi sırasında veya hemen sonrasında meydana gelmektedir (69, 70). Her ne kadar akut etanol intoksikasyonu SKH vakalarının yaklaşık üçte birinde görülse de, klinik sonuçlar ve iyileşme üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar arasında spinal kord hasarı öncesi veya sırasında etanol kullanımının, spinal kord hasarı fizyopatolojisine etkilerini ve spinal kord hasarının etanol metabolizması üzerindeki etkilerini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Kan alkol konsantrasyonlarının SKH üzerindeki etkisini araştıran klinik çalışmalar sensorimotor iyileşme, morbidite ve mortalite açısından farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Crutcher ve ark.'nın (71) retrospektif bir vaka incelemesi, spinal kord travmalı hastalarda hastaneye kabul sırasında kan alkol konsantrasyonları 80 mg/dL üzerinde olan bireylerin, hastanede ve yoğun bakım ünitesinde kalış sürelerinin daha uzun olduğunu ve komplikasyon riskinin arttığını, ancak mortalite riskinin artmadığını bildirmiştir. Furlan ve ark. (72), kan alkol konsantrasyonları 80 mg/dL'nin üzerinde olan SKH'lı hastaları 6 hafta, 6 ay ve 1 yıl sonra değerlendirmiş ve acil servise başvuru anındaki kan alkol konsantrasyonlarının, SKH sonrası motor ve duysal fonksiyon ile mortalite üzerinde bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Volovetz ve ark. (73) ise akut etanol intoksikasyonunun SKH sonrası motor iyileşme üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu, ancak duysal hafif dokunma ve duysal propriyosepsiyon üzerinde bir etkisi olmadığını göstermiştir. Glaser ve ark. (69) farelere 3g/kg etanol uygulayarak oluşturdukları alkol alımı sonrası SKH modelinde, SKH anında etanol varlığının uzun dönem fonksiyonel ve anatomik sonuçlarını 6 hafta sonra değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada yaralanma sırasında akut etanol intoksikasyonu varlığının lokomotor iyileşmeyi ve ısı hiperaljezisini değiştirmediği gözlemlenmekle birlikte, doku kaybını şiddetlendirdiği görülmüştür. Bu nedenle yaralanma sırasındaki akut alkol intoksikasyonunun spinal kord yaralanmalarında nöropatolojik sonuçlara katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, spinal kord hasarının etanol metabolizmasını değiştirmediği gösterilmiştir. Sıçan, gelincik ve kedi SKH modellerinde yapılan pre-klinik çalışmalar, etanol intoksikasyonunun hemoraji, motor iyileşme ve doku hasarının biyokimyasal belirteçleri üzerinde zararlı bir etkisi olduğunu bildirmektedir (74–76). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise,

travmatik beyin hasarında yüksek doz etanolün (3 g/kg) zararlı, düşük ve orta dozun (1 g/kg ve 2,5 g/kg) ise lezyon hacmi ve nöroprotektif bir etkisi olduğu bildirilmiştir (77).

Etanolün hepatositlerde, SKH'nin ise medulla spinaliste ferroptosis'e neden olduğunu gösteren in vivo ve in vitro çalışmalar literatürde yer almaktadır (11, 54, 64, 78). Spinal kord hasarı anında yüksek kan alkol konsantrasyonlarının ferroptotik mekanizmalar üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışma ise literatürde bulunmamaktadır. Ayrıca mevcut spinal kord hasarı ve ferroptosis ilişkisini inceleyen çalışmaların ağırlıklı olarak hasardan günler veya haftalar sonrasındaki biyokimyasal, histopatolojik değişiklikler ve lokomotor iyileşmeye odaklandığı görülmektedir. Bu sebeplerle çalışmamızda etanol alımı sonrası spinal kord hasarı gerçekleştiğinde erken dönemdeki ferroptotik değişiklikleri biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelemeyi amaçladık.

Amerikan Alkolizm ve Madde Bağımlılığı Enstitüsü (NIAAA), binge drinking'i (aşırı alkol alımını), "yaklaşık 2 saatlik bir zaman diliminde, erkeklerde 5 içki ve kadınlarda 4 içki alma (14 gram saf alkol içeren içki)" olarak tanımlar. Ayrıca, bunun kan alkol seviyesini yaklaşık 80 mg/dL veya daha yukarıya çıkaracağını belirtir (79). Etanolün etkisinin araştırıldığı pre-klinik çalışmalarda, kullanılan deneğin yaşı, ağırlığı, cinsi ve cinsiyeti, uygulanan etanolün konsantrasyonu ve veriliş biçimi, uygulayan personelin tecrübesi gibi bir çok etken, ulaşılan maksimum etanol konsantrasyonunu ve ulaşma süresini etkileyebilir (80, 81). Sprague Dawley sıçanlar ve C57BL/GJ fareler kullanılarak intraperitoneal ve intragastrik uygulanan etanol konsantrasyonlarının zaman bağımlı karşılaştırıldığı bir çalışmada, farelerde maksimum kan etanol konsantrasyonlarına daha hızlı ulaşıldığı ve ardından nispeten hızlı bir düşüş yaşandığı görülürken, buna karşılık, sıçan kan alkol konsantrasyonları hızlı bir yükseliş, ardından pik konsantrasyonlara daha kademeli bir yükseliş ve daha sonra nispeten kademeli bir düşüş yaşandığı gösterilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada Sprague-Dawley cinsi ratlara intraperitoneal etanol uygulandığında maksimum etanol konsantrasyonuna yaklaşık 120 dakika sonra ulaşıldığı gösterildi (81). Başka bir çalışma ise aşırı alkol alımı modeli oluşturmak için farelerde sık kullanılan tek doz 3-6 g/kg doz etanolün, insanlardaki 1,5-3,0 g/kg etanol maruziyeti

ile benzer pik konsantrasyonları sağladığını göstermektedir (82). Bu nedenle aşırı alkol alımı davranışını taklit etmek amacıyla, literatürdeki uygulamalara benzer şekilde çalışmamızda sıçanlara 3g/kg etanol uygulandı (69, 83, 84). Hedef konsantrasyonlara daha hızlı ve düşük etanol miktarları ile ulaşabilmek için intraperitoneal uygulama tercih edildi.

Etanol uygulanan gruplarda sıçanların etanole aynı düzeylerde maruz kaldığının doğrulanması amacıyla sakrifikasyon sırasında (105. dk) alınan serum örneklerinden etanol analizi yapıldı. Etanol sonuçları değerlendirildiğinde, E ve SE grupları etanol konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=1$). Bu sonuçlar ile etanol uygulanan iki grup arasındaki değerlendirmelerde etanol konsantrasyonu kaynaklı oluşabilecek farklılıklar dışlandı. Ayrıca E ve SE grubu etanol konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması, Glaser ve ark.'nın (69) çalışması ile uyumlu olarak, spinal kord hasarının etanol metabolizması üzerinde önemli bir etkisi olmadığını desteklemektedir.

Literatürde alkolün farklı dokularda demir birikimine neden olduğunu gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır. Tan ve ark. (85) ile Juhás ve ark.'nın (86) alkol kullanım bozukluğunda demir düzeylerini değerlendirdiği klinik çalışmalarda, alkol kullanımının beyinde demir birikimine neden olduğu gösterilmiştir. Song ve ark.'nın (87) farelerde alkolün tetiklediği kardiyotoksisite ile ferroptosis ilişkisini incelediği çalışmasında, alkol dozu arttıkça kardiyak doku demir düzeylerinde artış izlenmiştir. Xue ve ark.'nın (88) sıçanlarda alkol maruziyeti sonrası oluşan demir yükü ve fucoidanın ferroptosis üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmasında, alkol alımı ile karaciğer dokusunda demir yükü oluştuğu görülmektedir. Anderson'un (76) gelinciklerde etanolün spinal kord hasarı üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, sadece etanol uygulanan grupta, etanol sonrası 3. saatte spinal doku demir düzeylerinin değişmediği gösterildi. Diğer yandan etanol uygulanmadan spinal kord hasarı gerçekleştirilen grupta, hasar sonrası 3. saatte spinal doku demir düzeyleri artarken, etanol uygulamasının ardından spinal kord hasarı gerçekleştirilen grupta ise demir düzeylerindeki artışın her iki gruptan daha fazla olduğu gösterildi. Aynı çalışmada benzer şekilde 1. ve 2. saat sadece SKH ve Etanol+SKH uygulanan grupların spinal

doku demir düzeyleri karşılaştırıldığında SKH'den önce etanol varlığının spinal kord doku demir düzeylerini daha fazla artırdığı gösterilmiştir (76).

Yao ve ark.'nın (6) bir demir şelatörü olan deferoksaminin, SKH sonrası oluşan ferroptosis üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, spinal kord hasarı gerçekleştirilen sıçan spinal kord dokularında 1, 4 ve 24. saatlerde analiz edilen spinal doku total demir düzeylerinin sham grubuna göre arttığı ve deferoksamin ile azaldığı bildirilmiştir. Vahabi ve ark.'nın (89) çalışmasında oluşturan spinal kord hasar modelinde, sıçanlarda SKH sonrası 24 ve 72. saat ile 6. haftada yapılan spinal kord doku Fe^{+2} düzeylerinin analizinde, demir düzeylerinin zamanla arttığı görülmüştür. Chen ve ark.'nın (53) sıçanlarda oluşturduğu SKH modelinde ise demir düzeylerinin 1. günde arttığı, 3 ve 7. günlerde ise artışın daha az olduğu görülmektedir. Literatürde demir düzeylerinin SKH sonrası farklı zaman dilimlerinde yükseldiğini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır (41, 57). Ryan ve ark.'nın (90) ferroptosis inhibitörlerinin spinal kord hasarı üzerindeki erken ve geç dönem etkilerini farelerde araştırdığı çalışmasında, spinal doku total demir düzeyleri, Fe^{2+}/Fe^{3+} oranı ve ferritin demir yükü 1, 7, 14 ve 35. günlerde kapiller elektroforez indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometri (CE-ICP-MS) ile değerlendirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, SKH sonrası 1. günde total demir düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değilken, Fe^{2+}/Fe^{3+} oranında 2,5 kat artış izlenmiştir. 7, 14 ve 35. günlerde doku total demir düzeylerinde artış görülürken, Fe^{2+}/Fe^{3+} oranlarının da yüksek olduğu görülmektedir. Ferritin demir yükünde ise sadece 7. günde istatistiksel olarak anlamlı artış izlenmiştir. Bu çalışmada analizi gerçekleştirilen diğer ferroptosis biyobelirteçleri 1. günde ferroptosis gerçekleştiğini desteklemektedir. Aynı zamanda çalışmada, insanlarda spinal kord hasarı sonrası BOS'ta hemoglobin α ve hemopeksin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Liu ve ark.'nın sıçanlarda spinal kord hasarında demirin rolü ve radikal oluşumuna etkisini araştırdığı çalışmasında ise, SKH sonrası mikrokanül ile ekstrasellüler alandan alınan perfüzatta total demir düzeylerini incelediğinde, SKH sonrası 20. dakikada ekstrasellüler total demir düzeylerinin pik yaptığı ve hızlıca azalıp 1. saatte başlangıç düzeylerine döndüğü gösterilmiştir (91).

Çalışmamızda SKH sonrası 1. saatte analizi gerçekleştirilen total demir düzeyleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır

($p=0,139$). Literatür verileri etanolün ve SKH'nin total demir düzeylerini farklı zamanlarda artırdığını göstermekle birlikte, spinal kord dokusunda erken dönemi değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızdan farklı olarak Anderson ve ark.'nın gelinciklerde gerçekleştirdiği çalışması SKH sonrası 1. saatte etanol varlığının SKH'de demir düzeylerini artırdığını, Yao ve ark. çalışması ise sıçanlarda SKH sonrası 1. saatte spinal doku total demir düzeylerinde artış gerçekleştiğini bildirmektedir. Diğer yandan Ryan ve ark.'nın çalışmasında SKH sonrası 1. gün total demir düzeylerinde değişim izlenmezken, Fe^{2+}/Fe^{3+} oranının reaktif demir, Fe^{2+} , lehine değişebileceğini göstermişlerdir. Çalışmamızda total demir düzeylerinde sham grubuna göre anlamlı düzeyde değişim olmaması, deney modelinin akut bir dönemi değerlendirmesi, demirin ortamda hemoglobinden serbestleşmemiş olması veya farklı formlarda bulunmasından kaynaklanıyor olabilir. Fe^{2+}/Fe^{3+} oranı çalışmamızda değerlendirilmediğinden, etanol ve SKH'nin demir düzeyleri üzerindeki etkisinin farklı çalışmalar ile zaman bağımlı olarak total demir, Fe^{2+}/Fe^{3+} oranı ve diğer bağlı demir formlarının analizi ile doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

Rodrigues ve ark.'nın (92) aerobik fiziksel egzersizin, aşırı alkol alımının spinal kortta tetiklediği oksidatif strese etkisini araştırdığı çalışmada, sıçanlara 4 hafta boyunca haftanın 3 ardışık günü 3g/kg 20% w/v etanolün intragastrik olarak verilmesinin ardından analiz edilen spinal doku MDA düzeyleri, etanol uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Ren ve ark.'nın (93) etanolün spinal kord gelişimine etkisini araştırdıkları çalışmasında, farelere postnatal 7. günde 2,5g/kg 20% v/v subkutan (kan alkol konsantrasyonu 338 mg/dL) etanol uygulandı. Uygulamadan 8 saat sonra farelerin spinal kord dokularında western blot ve ELISA yöntemleri ile gerçekleştirilen 4-HNE analizleri, etanol uygulanan farelerde spinal doku 4-HNE düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermiştir. Bardag-Gorce ve ark.'nın (94) etanolün indüklediği CYP2E1'in, proteozom aktivitesine etkisini ve 4-HNE'nin rolünü araştırdığı çalışmasında, sıçanlara 13 g/kg/gün etanol 1, 3, 7, 15 ve 30 gün süreyle intragastrik yol ile uygulanmış ve sıçan karaciğerinde 4-HNE analizleri 3, 15 ve 30. günde gerçekleştirilmiştir. Bulgular etanolün karaciğer homojenatlarında 3, 15 ve 30. günlerde giderek arttığını

göstermiştir. Ayrıca çalışmada karaciğer 4-HNE düzeylerinin CYP2E1 düzeyleri ile pozitif korele olduğu gösterilmiştir.

Literatürde sıçanlarda spinal kord hasarı sonrası 1, 2, 3 ve 7. günler ile 6. haftada, spinal doku 4-HNE protein ekspresyonlarının ve MDA düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalar, SKH sonrası lipid peroksidasyonu oluşumunu desteklemektedir (6, 53, 89, 95). Huang ve ark. (52) connexin 43'ün spinal kord hasarlı sıçanlarda ferroptosis SLC7A11/GPx4 yolağı üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, SKH sonrası 3. gün spinal doku western blot analizlerinde 4-HNE protein ekspresyonlarının önce artış sonra azalış trendinde olup en fazla 3. günde olmak üzere SKH sonrası 1, 2, 3, 7, 14 ve 28. günlerde arttığını bildirmişlerdir.

Literatür verileri etanol ve SKH'nin tek başına lipid peroksidasyonuna neden olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda spinal doku 4-HNE düzeyleri değerlendirildiğinde, K grubuna kıyasla E grubunda azalma izlenirken, S ve SE gruplarında ise artış olduğu görüldü ve artış SE grubunda daha belirgindi. 50 mg ve tekrarında 100 mg protein miktarları ile gerçekleştirdiğimiz western blot analizi protokolü sonucunda elde ettiğimiz, 4-HNE düzeylerini ifade eden bantların kalitesi, optimum değerlendirme için yeterli kalitede değildi (özellikle E grubunda). E grubunda 4-HNE düzeylerinin K grubuna göre düşük bulunması literatür ile çelişmekteydi ve analitik hata kaynaklı olabileceği düşünüldü. Bu nedenle lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için ayrıca MDA analizi gerçekleştirildi. Spinal doku MDA düzeyleri değerlendirildiğinde K grubuna göre E, S ve SE gruplarında artış izlenirken, E ve SE gruplarındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ve artış SE grubunda daha belirgindi. S grubu spinal doku MDA düzeylerinde artış görülmekle birlikte K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması verilerin heterojen dağılımı ile ilgili olabilir. Elde ettiğimiz 4-HNE ve MDA analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, etanol ve SKH'nin spinal kortta tek başına lipid peroksidasyonuna neden olmasının yanı sıra, yüksek kan alkol konsantrasyonları ile gerçekleşen spinal kord travmasında (SE grubu), lipid peroksidasyonunun daha şiddetli olduğunu ve 1 saat gibi erken bir dönemde gerçekleştiğini göstermektedir.

Chen ve ark.'nın (78) selenyumun etanolün tetiklediği karaciğer hasarındaki etkisini incelediği çalışmada, hepatositlere in vitro etanol uygulanmıştır. Etanol

uygulanan hepatositlerin SLC7A11 ve GPx4 mRNA ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma izlenmiştir. Xue ve ark.'nın (88) sıçanlarda oluşturduğu alkolik karaciğer hasarı modelinde, 16 hafta alkol maruziyeti sonrası fucoidanın ferroptosis üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma etanolün karaciğerde SLC7A11 mRNA ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığını göstermektedir.

Liu ve ark.'nın (96) beclin-1 eksikliğinin ferroptosis inhibisyonu yaparak alkolün tetiklediği kardiyak disfonksiyonu iyileştirdiğini gösterdiği çalışmada, farelere 1 hafta boyunca 2 g/kg/gün intraperitoneal etanol 1, 3 ve 7. günlerde uygulanmış, son enjeksiyondan 4 saat sonra SLC7A11 ve GPx4 western blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları doğal tip fare myokardiyumlarında etanolün SLC7A11 ve GPx4 protein ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğunu göstermektedir. Rodrigues ve ark.'nın (92) çalışmasında, sıçanlarda oluşturulan kronik aşırı alkol modelinde, 4 haftanın sonunda etanolün spinal kord doku GSH düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığını gösterilmiştir.

Spinal kord hasarı sonrası spinal doku SLC7A11 ve GPx4 gen ekspresyonlarının 1, 2, 3, 7 ve 14. günlerde azaldığı literatürdeki farklı çalışmalarda bildirilmiştir (12, 41, 53, 57). Huang ve ark. (52) connexin 43'ün spinal kord hasarlı sıçanlarda ferroptosis SLC7A11/GPx4 yolağı üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, SKH sonrası 3. gün spinal doku GSH düzeylerinde azalmanın yanı sıra, 1, 2, 3, 7, 14 ve 28. günlerde spinal kord doku örneklerinde yapılan western blot analizlerinde, SLC7A11 ve GPx4 protein ekspresyonlarının önce azalış ve daha sonra artış eğiliminde olduğu ve en fazla 3. günde olmak üzere tüm örneklerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca SLC7A11 ve GPx4 mRNA ekspresyonları incelendiğinde western blot analizleri ile benzer eğilim görülmüş olup her iki gen ekspresyonundaki azalma en belirgin 3. günde izlenmiştir. Vahabi ve ark. (89) çalışmasında, sıçanlarda SKH sonrası spinal kord doku havuzunda gerçekleştirdikleri western blot analizlerinde, SKH sonrası 1. gün, 3. gün ve 6. hafta GPx4 protein ekspresyonları ve GSH düzeylerinde sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma izlenmiştir. Ni ve ark.'nın (9) farelerde resveratrolün ferroptosis NRF2/GPx4 yolağı üzerindeki etkisini incelediği çalışmada, SKH oluşturulan

farelerde SLC7A11 ve GPx4 protein ekspresyonları ile GSH düzeylerinin SKH sonrası 3. günde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gösterildi.

Çalışmamızda ferroptosis ana regülatör yolağı olan SLC7A11/GPx4/GSH yolağını değerlendirmek amacıyla, SLC7A11 ve GPx4 mRNA ve protein ekspresyonları ile GSH düzeyleri analiz edildi. Bildiğimiz kadarıyla literatürde etanolün spinal kord dokusundaki SLC7A11 ve GPx4 mRNA ve protein ekspresyonlarına etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Farklı dokulardaki in vivo veya in vitro çalışmalar ise etanolün SLC7A11 ve GPx4 mRNA ve protein ekspresyonlarını azalttığını bildirmektedir. Çalışmamızdaki qRT-PCR analizi sonuçları değerlendirildiğinde, K grubuna kıyasla E, S ve SE grupları GPx4 mRNA ekspresyonlarında görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi ve SE grubunda daha belirgindi. SLC7A11 mRNA ekspresyonları değerlendirildiğinde ise E ve S grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azalma görülürken, SE grubundaki azalma daha belirgin ve istatistiksel olarak anlamlıydı. Western blot GPx4 analiz sonuçları değerlendirildiğinde, E, S ve SE gruplarındaki GPx4 protein ekspresyonları K grubu ile kıyaslandığında belirgin değişim izlenmemekle birlikte azalma eğilimindeyken, azalmanın SE grubunda daha belirgin olduğu görülmektedir. SLC7A11 protein ekspresyonları değerlendirildiğinde ise benzer şekilde K grubuna göre E ve S gruplarında azalma görülürken, SE grubundaki azalma daha belirgindi. GSH sonuçları değerlendirildiğinde, K grubu ile kıyaslandığında E ve S gruplarında görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı değilken, SE grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görüldü. E ve S grubu SLC7A11 mRNA ekspresyonları ve GSH düzeylerinin azalma eğiliminde olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmayışı verilerin heterojen dağılımı ile ilişkili olabilir. Analiz sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak etanol ve SKH'nin tek başına SLC7A11, GPx4 mRNA ve protein ekspresyonları ile GSH düzeylerinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca yüksek kan alkol konsantrasyonlarında SKH oluşması durumunda (SE grubu) SLC7A11/GPx4/GSH yolağının daha fazla baskılandığının gösterilmesi literatüre katkı sağlamaktadır. SLC7A11 düzeylerinde görülen baskılanma hücre içine sistin alımının azalmasına sebep olacağından GSH düzeylerindeki azalma ve dolayısıyla 4-HNE ve MDA düzeylerindeki artış ile uyumludur. Ayrıca GSH bağımlı bir enzim olan GPx4

düzeylerindeki baskılanma da deney modelinde ferroptosis oluşumunu desteklemektedir.

Li ve ark.'nın (97) yağlı diyet ve etanolün tetiklediği karaciğer hasarında taraxasterolün etkisini araştırdığı in vitro çalışmasında, etanolün HepG2 hücrelerinde NRF2 mRNA ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir. Tice ve ark.'nın (98) aşırı alkolün fare iskelet kasında NRF2 ilişkili antioksidan cevabı uyardığını gösterdiği çalışmasında, farelere 5g/kg etanol uygulanmasının ardından 4 saat aralıklarla ve 48 saat boyunca gastroknemius kasında NRF2 gen ekspresyonları analiz edilmiştir. Etanol uygulaması sonrası 12, 16 ve 20. saatlerde elde edilen NRF2 mRNA ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış bulunurken, ilk 8 saatte ve 20. saatten sonra istatistiksel olarak anlamlı değişim izlenmemiştir. Wang ve ark.'nın (99) etanolün tetiklediği karaciğer hasarında curcumin ve baicalin'in NRF2/HO-1 yolağı üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, kronik olarak artan dozda (2-8 g/kg) etanol uygulanan sıçanların karaciğer dokularında yapılan NRF2 analizlerinde, NRF2 mRNA ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalırken, uyumsuz olarak western blot analizinde NRF2 protein ekspresyonlarının anlamlı düzeyde arttığı görülmektedir. Song ve ark. (87) alkolün tetiklediği kardiyotoksistide ferroptosis NRF2/NQO1 yolağının rolünü, farelerde ve H9c2 kardiyomiyositlerde in vivo ve in vitro değerlendirmiştir. 14 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda etanol verilmesinin ardından gerçekleştirilen western blot analizi sonuçları hem fare kardiyak dokusunda hem de H9c2 kardiyomiyositlerde etanol dozu arttıkça NRF2 protein ekspresyonlarının azaldığını göstermektedir (87).

Ge ve ark.'nın (8) farelerde spinal kord hasarı sonrası çinkonun ferroptosis ilişkili NRF2/GPx4 yolağı üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, SKH sonrası 3. günde NRF2 gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir. Zhang ve ark.'nın (100) NRF2'nin gasdermin D ilişkili piropitosisteki rolünü araştırdığı çalışmada, SKH oluşturulan sıçanlarda NRF2 mRNA ve protein düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı azalmış ve pcDNA3.1-NRF2 enjeksiyonu ile NRF2 gen ekspresyonu artırıldığında SKH patolojisinin iyileştiği gösterilmiştir. Shen ve ark.'nın (57) celastrolün SKH sonrası sıçan oligodendrosit ve nöronlarında oluşan

ferroptosis üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, sıçan spinal kord dokusunda SKH sonrası 2 ve 7. günlerde yapılan analizlerde NRF2 protein ekspresyonlarında azalma izlenmiştir. Wang ve ark. (95)'nin çalışmasında ise sıçanlarda SKH sonrası 14. günde NRF2 protein ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir. Ni ve ark.'nın (9) SKH sonrası oluşan ferroptosiste resveratrolün NRF2/GPx4 yolağı üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, SKH oluşturulan sıçanlarda hasar sonrası 3. gün spinal kord dokusundan yapılan western blot analizlerinde NRF2 protein ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir.

Görüldüğü gibi literatürde etanol ve spinal kord hasarının NRF2 gen ekspresyonlarına etkisini inceleyen çalışmalar farklı sonuçlara sahiptir. Bizim çalışmamızda NRF2 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Çalışmamızda özellikle SE grubunda SLC7A11/GPx4 yolağında belirgin baskılanma izlenirken NRF2 mRNA ekspresyonlarında değişim gözlemlenmemesi, bu yolağın bir çok antioksidan mekanizmada rol oynayan NRF2 geni ile regüle edilmediği anlamına geliyor olabilir. Bildiğimiz kadarıyla etanolün spinal kord dokusunda NRF2 gen ekspresyonlarına etkisini gösteren ilk çalışmayı gerçekleştirdik. Bu nedenle sonuçların farklı etanol dozlarında ve zaman bağımlı analizler ile doğrulanmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca çalışmamızda yer almayan, NRF2 protein ekspresyonlarının ve NRF2'nin regülasyonunda rol oynayan KEAP-1'in eş zamanlı çalışılması NRF2 ilişkili yolların değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

Rodrigues ve ark. (92) etanolün sıçan medulla spinalis servikal bölgesinde motor nöron yoğunluğunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığını, torakal ve lomber bölgelerde ise etkilemediğini bildirmiştir. Fernandes ve ark.'nın (101) yüksek doz kronik alkolün adölesan ve yetişkin sıçan spinal kord üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, cresyl violet ile gri cevher ön motor nöronları değerlendirilmiştir. Gri ve beyaz cevher incelemeleri servikal ve torakal spinal kord segmentlerinde motor nöron sayısında azalmanın yanı sıra servikal segmentlerin hasara daha duyarlı olduğu göstermiştir.

Nissl boyama ile SKH sonrası spinal kord ön boynuz motor nöronlarının değerlendirildiği bir çalışmada, normal nöronlar yuvarlak ve koyu boyanırken, SKH sonrası 3. günde nöronlar atrofik ve soluktu. Ayrıca nissl (+) hücrelerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma izlendi (52). Spinal kord hasarlı sıçanlarda eritropoietinin ve transkraniyal alternatif akım stimülasyonunun ferroptosis üzerindeki etkisinin incelendiği 2 farklı çalışmada, SKH sonrası 14. günde hematoksilen-eozin ve nissl boyama ile doku hasarı ve nöron sağkalımı değerlendirilmiştir (12, 41). İncelemeler sham grubuna göre spinal kord hasarı oluşturulan sıçanların medulla spinalislerinde belirgin hasar, yapısal dezorganizasyon, kavitasyon, geniş vakuoler değişiklikler ve nissl pozitif hücrelerde azalmayı göstermektedir. Ge ve ark. (8). çalışmasında, SKH sonrası 4. haftada hematoksilen-eozin ve nissl boyama ile histopatolojik incelemeler, spinal kord hasarı oluşturulan sıçanlarda doku ödemi ve kavitelerin yanı sıra medulla spinalis ön boynuzunda nöron sayılarının azaldığını göstermektedir. Başka bir çalışmada, SKH sonrası 35. günde yapılan hematoksilen-eozin boyama incelemelerinde, spinal kord hasarı oluşturulan farelerde hemorajik ve nekrotik alanlar görülürken, nissl boyama ile ise sham grubuna göre nöron sayılarının azaldığı, hücre boyutlarının küçüldüğü ve çekirdeklerin piknotik hale geldiği gösterilmiştir (9).

Akut etanol intoksikasyonu sonrası 3. saatte (100 mg/dL) gerçekleşen servikal spinal kord hasarına etanolün etkisinin incelendiği gelinciklerde yapılan bir pre-klinik çalışmada elde edilen bulgular, post kontüzyon hemorajinin lezyon bölgesinde ve rostro-caudalinde akut etanol intoksikasyonu ile önemli derecede arttığını göstermiştir (76). Etanolün santral sinir sistemi travmalarına etkilerinin değerlendirildiği kediler üzerinde gerçekleştirilen başka bir pre-klinik çalışmada, etanol infüzyonu sonrası 3. saatte (119 mg/dL) spinal kord hasarı oluşturulan grup, etanol uygulanmayan grup ile karşılaştırıldığında daha yaygın hemorajik alanlar görülmüştür (75).

Bizim çalışmamızda hematoksilen-eozin ve nissl boyama ile gerçekleştirilen spinal doku incelemelerinde, hemoraji, iskemik hücre, perinöral dejenerasyon, myelin hasarı ve nöron sağkalımı değerlendirildi. Sham grubu nöronları intakt iken, literatür bulguları ile uyumlu olarak E, S ve SE gruplarında hemoraji izlendi. SE grubunda

görülen hemorajinin E ve S gruplarından daha belirgin olması, etanol ve spinal kord hasarının spinal kord hasarındaki sinerjistik etkisini göstermektedir. Ayrıca hücre hasarı ile ilişkili değerlendirilen diğer parametreler E ve S gruplarına kıyasla SE grubunda daha belirgin, uyumlu olarak nöron sağkalımı SE grubunda en az düzeydeydi.

Luo ve ark.'nın (11) farelerde etanolün tetiklediği hepatik hücre ölümüne ferroptosisin etkisini araştırdığı çalışmasında, kronik etanol alımı sonrası fare karaciğerlerinde yapılan TEM incelemelerinde, mitokondrilerde küçülme ve dış membran rüptürü izlenmiştir. Zhao ve ark.'nın (102) etanolün tetiklediği karaciğer hasarında melatoninin etkisini araştırdığı çalışmasında, farelere 10 gün boyunca 5g/kg 5% etanol diyeti uygulanmasının ardından karaciğerde yapılan TEM incelemelerinde, mitokondrilerde büzüşme ve kristalarda neredeyse kaybolma görülmüştür. Lin ve ark. (103) quercetin'in farelerde etanolün tetiklediği hepatik ferroptosis üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında, kronik aşırı alkol alımı modeli oluşturulduktan sonra fare karaciğerlerinde yapılan TEM incelemelerinde, hepatosit mitokondrilerinde kristalarda azalma, mitokondriyal membranlarda yoğunlaşma ve bozulmuş mitokondriyal membranlar izlenmiştir. Başka bir çalışmada, HepG2 ve HL7702 hücrelerinde yapılan TEM incelemelerinde, etanol ve asetaldehitin mitokondri sayılarını artırdığı gösterilmiştir. Bulgular disfonksiyonel mitokondrilerdeki artışın mitofaji inhibisyonu ile ilişkili olabileceği ve ROT birikimine neden olarak ferroptosis'e neden olabileceğini düşündürmüştür (104).

Yao ve ark.'nın (6) çalışmasında travmatik SKH oluşturulan sıçanlarda hasar sonrası 1 ve 24. saate TEM analizi gerçekleştirilmiştir. SKH sonrası 1. saatte ve daha yaygın olarak 24. saatte hemoliz izlenmiştir. Sham grubunda hemoliz görülmemiştir ve mitokondri morfolojisi normal olarak değerlendirilmiştir. SKH sonrası 1. saatten itibaren ferroptosis sürecindeki tipik morfolojik bulgulardan büzüşmüş mitokondri ve mitokondriyal dış membran hasarı izlenmiştir. 1 ve 24. saatlerde apoptoz bulguları ise izlenmemiştir. Chen ve ark. (53) çalışmasında sıçanlarda SKH sonrası 24. saatte SKH grubunda hemoliz ve büzüşmüş mitokondri, artmış membran yoğunluğu ve bozulmuş mitokondriyal dış membran gibi tipik morfolojik özellikler izlenmiştir. Apoptotik cisimcikler gibi tipik apoptoz bulguları ise görülmemiştir. SKH sonrası 3 ve 7.

günlerde TEM analizlerinin gerçekleştirildiği başka iki farklı çalışmada, mitokondriyal büzüşme, mitokondriyal membran yoğunluğunda artma, kristalarda azalma veya tamamen kaybolma ve dış mitokondriyal membran rüptürü gibi tipik ferroptosis morfolojik bulguları izlenmiştir (9, 41). Huang ve ark. (12) çalışmasında oluşturmuş oldukları sıçan SKH modelinde ise 14. günde yapılan TEM analizinde mitokondrilerde şişme ve rüptür görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada ferroptosis bulgularının yanı sıra apoptoz bulguları izlenmiştir.

Çalışmamızda SKH'dan 1 saat sonra spinal dokuda TEM incelemeleri gerçekleştirildi. Yapılan incelemelerde, K grubunda mitokondrilerin intakt olduğu görüldü. E ve S gruplarında mitokondrilerde büzüşme, mitokondriyal kristalarda azalma ve mitokondriyal membran rüptürü gibi ferroptosisin karakteristik morfolojik bulguları benzer şiddette izlendi. SE grubunda ise mitokondriyal hasar ve tipik morfolojik ferroptosis bulguları E ve S gruplarına göre daha belirgindi. Bu bulgular etanolün ve spinal kord hasarının ferroptosise yol açmasının yanı sıra yüksek alkol konsantrasyonlarında gerçekleşen spinal kord hasarında ferroptosisin daha şiddetli gerçekleştiğini göstermektedir. Çalışmamızda apoptosis ve diğer regüle hücre ölüm formlarının TEM bulguları ise değerlendirilmemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Etanol ve spinal kord hasarının farklı dokularda ferroptosis'e yol açtığını gösteren çalışmalar literatürde mevcutken, spinal kord hasarı anında yüksek kan etanol konsantrasyonlarının ferroptosis mekanizmalarına etkisini inceleyen bir araştırma bulunmamaktadır. Spinal kord travmalarının yaklaşık üçte birinin alkollüyen gerçekleştiği göz önünde bulundurulduğunda, bu hastaların tedavisine sağlayacağı potansiyel katkılar için etanolün nöron ölüm ve iyileşme süreçlerine etkisinin araştırılması önemlidir.

Spinal kord hasarı sonrası ferroptosis süreçlerinin ve tedavi edici ajanların etkisinin incelendiği çalışmalarda biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler ağırlıklı olarak SKH'den günler ya da haftalar sonrasını değerlendirmektedir. Çalışmamızda oluşturulan sıçan modelinde SKH sonrası 1. saatte ferroptosis ölüm yolağı ile ilişkili biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler gerçekleştirildi. Elde ettiğimiz bulgular spinal kord hasarında gerçekleşen ferroptosis ve etanolün etkisi ile ilgili literatürdeki en erken biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri göstermektedir. Ayrıca etanolün spinal kord dokusu ve spinal kord hasarındaki ferroptotik süreçlere etkisini gösteren bazı analizlerimiz bildiğimiz kadarıyla literatürde ilk kez gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda gerçekleştirmiş olduğumuz biyokimyasal analizler ve histopatolojik incelemeler, etanolün ve spinal kord hasarının tek başına medulla spinaliste ferroptosis'e neden olduğunu göstermenin yanı sıra, alkollüyen spinal kord hasarı geçirildiğinde ferroptotik hasarın daha şiddetli olduğunu ve 1 saatten daha kısa bir süre içerisinde gerçekleştiğini göstermektedir. Bu bulgular özellikle ilk başvuru anında kan alkol konsantrasyonlarında yükseklik tespit edilen spinal kord travmalı hastalar için hasarın daha şiddetli olabileceğini göstermektedir. Ayrıca sonuçlar, akut dönemde ferroptosis inhibisyonu ile nöron sağ kalımına yönelik akut tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin, günümüzde kullanılan medikal tedavi yöntemlerine alternatif olabileceğini düşündürmektedir. Bu amaçla spinal kord hasarı sonrası ferroptosis mekanizmalarını akut dönemde değerlendiren ve ferroptosis inhibitörleri ile günümüzde kullanılan medikal tedavilerin zaman bağımlı etkisini gösteren çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Anjum A, Yazid MD, Daud MF, Idris J, Hwei Ng AM, et al. 2020. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 7533. 21(20):7533
2. Jin LY, Li J, Wang KF, Xia WW, Zhu ZQ, et al. 2021. Blood-Spinal Cord Barrier in Spinal Cord Injury: A Review. *J Neurotrauma*. 38(9):1203–24
3. Chen Y, Liu S, Li J, Li Z, Quan J, et al. 2020. The Latest View on the Mechanism of Ferroptosis and Its Research Progress in Spinal Cord Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2020:
4. Eli I, Lerner DP, Ghogawala Z. 2021. Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurol Clin*. 39(2):471–88
5. Li QS, Jia YJ. 2023. Ferroptosis: a critical player and potential therapeutic target in traumatic brain injury and spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 18(3):506
6. Yao X, Zhang Y, Hao J, Duan HQ, Zhao CX, et al. 2019. Deferoxamine promotes recovery of traumatic spinal cord injury by inhibiting ferroptosis. *Neural Regen Res*. 14(3):532
7. Ge H, Xue X, Xian J, Yuan L, Wang L, et al. 2022. Ferrostatin-1 Alleviates White Matter Injury Via Decreasing Ferroptosis Following Spinal Cord Injury. *Mol Neurobiol*. 59(1):161–76
8. Ge M hao, Tian H, Mao L, Li D yong, Lin J quan, et al. 2021. Zinc attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury by activating Nrf2/GPX4 defense pathway. *CNS Neurosci Ther*. 27(9):1023–40
9. Ni C, Ye Q, Mi X, Jiao D, Zhang S, et al. 2023. Resveratrol inhibits ferroptosis via activating NRF2/GPX4 pathway in mice with spinal cord injury. *Microsc Res Tech*. 86(10):1378–90
10. Glaser EP, Stewart AN, Jagielo-Miller JE, Bailey CS, Prendergast MA, Gensel JC. 2023. Effects of Acute Ethanol Intoxication on Spinal Cord Injury Outcomes in Female Mice. *J Neurotrauma*
11. Luo J, Song G, Chen N, Xie M, Niu X, et al. 2023. Ferroptosis contributes to ethanol-induced hepatic cell death via labile iron accumulation and GPx4 inactivation. *Cell Death Discovery* 2023 9:1. 9(1):1–13
12. Huang K, Fang J, Xiao S, Wang W, Zhang G, et al. 2025. Transcranial alternating current stimulation inhibits ferroptosis and promotes functional recovery in spinal cord injury via the cGMP-PKG signalling pathway. *Life Sci*. 362:
13. Shi Z, Yuan S, Shi L, Li J, Ning G, et al. 2021. Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy. *Cell Prolif*. 54(3):
14. Hu X, Xu W, Ren Y, Wang Z, He X, et al. 2023. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 8(1):
15. Das SK, Vasudevan DM. 2007. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci*. 81(3):177–87

16. Sies H, Belousov V V., Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, et al. 2022. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2022 23:7. 23(7):499–515
17. Mukherjee A, Ghosh KK, Chakraborty S, Gulyás B, Padmanabhan P, Ball WB. 2024. Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Infection and Immunity. *Biomolecules*. 14(6):
18. Winterbourn CC. 1990. [26] Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol*. 186(C):265–72
19. Fenton HJH. 1894. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 65(0):899–910
20. Tang Z, Zhao P, Wang H, Liu Y, Bu W. 2021. Biomedicine meets Fenton chemistry. *Chem Rev*. 121(4):1981–2019
21. Gaschler MM, Stockwell BR. 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 482(3):419–25
22. Ursini F, Maiorino M. 2020. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med*. 152:175–85
23. Tang D, Kroemer G. 2020. Ferroptosis
24. Milkovic L, Zarkovic N, Marusic Z, Zarkovic K, Jaganjac M. 2023. The 4-Hydroxynonenal-Protein Adducts and Their Biological Relevance: Are Some Proteins Preferred Targets?
25. Riahi Y, Cohen G, Shamni O, Sasson S. 2010. Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 299(6):879–86
26. Schaur RJ, Siems W, Bresgen N, Eckl PM. 2015. 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules*. 5(4):2247–2337
27. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, et al. 2010. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products
28. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014:
29. Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR. 2003. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*. 3(3):285–96
30. Yang WS, Stockwell BR. 2008. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol*. 15(3):234–45
31. Yagoda N, Von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang WS, et al. 2007. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*. 447(7146):864–68

32. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, et al. 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 149(5):1060–72
33. Li J, Cao F, Yin H liang, Huang Z jian, Lin Z tao, et al. 2020. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death & Disease* 2020 11:2. 11(2):1–13
34. HAMURCU Z. 2022. Hücre Ölüm Mekanizmaları. *Turkiye Klinikleri Pediatric Rheumatology - Special Topics*. 3(3):39–47
35. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, et al. 2016. Ferroptosis: process and function. *Cell Death & Differentiation* 2016 23:3. 23(3):369–79
36. Moujalled D, Strasser A, Liddell JR. 2021. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death Differ*. 28(7):2029–44
37. Stockwell BR, Jiang X. 2020. The Chemistry and Biology of Ferroptosis
38. Xu L, Liu Y, Chen X, Zhong H, Wang Y. 2023. Ferroptosis in life: To be or not to be. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 159:114241
39. Abe C, Miyazawa T, Miyazawa T. 2022. Current Use of Fenton Reaction in Drugs and Food. *Molecules*. 27(17):5451
40. Chen X, Yu C, Kang R, Tang D. 2020. Iron Metabolism in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*. 8:590226
41. Kang Y, Zhu R, Li S, Qin KP, Tang H, et al. 2023. Erythropoietin inhibits ferroptosis and ameliorates neurological function after spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 18(4):881
42. Hou W, Xie Y, Song X, Sun X, Lotze MT, et al. 2016. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy*. 12(8):1425–28
43. Li Q, Han X, Lan X, Gao Y, Wan J, et al. 2017. Inhibition of neuronal ferroptosis protects hemorrhagic brain. *JCI Insight*. 2(7):
44. Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. 2016. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(34):E4966–75
45. Xie Y, Zhu S, Song X, Sun X, Fan Y, et al. 2017. The Tumor Suppressor p53 Limits Ferroptosis by Blocking DPP4 Activity. *Cell Rep*. 20(7):1692–1704
46. Yang WH, Huang Z, Wu J, Ding CKC, Murphy SK, Chi JT. 2020. A TAZ-ANGPTL4-NOX2 axis regulates ferroptotic cell death and chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Molecular Cancer Research*. 18(1):79–90
47. Zou Y, Li H, Graham ET, Deik AA, Eaton JK, et al. 2020. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. *Nature Chemical Biology* 2020 16:3. 16(3):302–9
48. Dixon SJ, Stockwell BR. 2019. The hallmarks of ferroptosis. *Annu Rev Cancer Biol*. 3(1):35–54

49. Dixon SJ, Olzmann JA. 2024. The cell biology of ferroptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 25(6):424–42
50. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25(3):486–541
51. Zheng Q, Wang D, Lin R, Xu W. 2025. Pyroptosis, ferroptosis, and autophagy in spinal cord injury: regulatory mechanisms and therapeutic targets. *Neural Regen Res.* 20(10):
52. Huang Q, Sha W, Gu Q, Wang J, Zhu Y, et al. 2023. Inhibition of Connexin43 Improves the Recovery of Spinal Cord Injury Against Ferroptosis via the SLC7A11/GPX4 Pathway. *Neuroscience.* 526:121–34
53. Chen YX, Zuliyaer T, Liu B, Guo S, Yang DG, et al. 2022. Sodium selenite promotes neurological function recovery after spinal cord injury by inhibiting ferroptosis. *Neural Regen Res.* 17(12):2702
54. Bai XY, Liu XL, Deng ZZ, Wei DM, Zhang D, et al. 2023. Ferroptosis is a new therapeutic target for spinal cord injury. *Front Neurosci.* 17:
55. Liu Y, Lu S, Wu L lei, Yang L, Yang L, Wang J. 2023. The diversified role of mitochondria in ferroptosis in cancer. *Cell Death Dis.* 14(8):
56. Wu KC, Liu J, Klaassen CD. 2012. Role of Nrf2 in preventing ethanol-induced oxidative stress and lipid accumulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 262(3):321–29
57. Shen W, Li C, Liu Q, Cai J, Wang Z, et al. 2024. Celastrol inhibits oligodendrocyte and neuron ferroptosis to promote spinal cord injury recovery. *Phytomedicine.* 128:155380
58. Kubiak-Tomaszewska G, Tomaszewski P, Pachecka J, Struga M, Olejarz W, et al. 2020. Molecular mechanisms of ethanol biotransformation: enzymes of oxidative and nonoxidative metabolic pathways in human. *Xenobiotica.* 50(10):1180–1201
59. Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. 2019. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. *Drug Metab Rev.* 51(4):545–61
60. Le Daré B, Gicquel T. 2019. Therapeutic Applications of Ethanol: A Review. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 22:525–35
61. Jones AW. 2019. Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science.* 1(5):e1340
62. Wilson DF, Matschinsky FM. 2020. Ethanol metabolism: The good, the bad, and the ugly. *Med Hypotheses.* 140:109638
63. Prokopieva VD, Vetlugina TP. 2023. Features of oxidative stress in alcoholism. *Biomed Khim.* 69(2):83–96
64. Liu CY, Wang M, Yu HM, Han FX, Wu QS, et al. 2020. Ferroptosis is involved in alcohol-induced cell death in vivo and in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem.* 84(8):1621–28

65. Shi JF, Liu Y, Wang Y, Gao R, Wang Y, Liu J. 2023. Targeting ferroptosis, a novel programmed cell death, for the potential of alcohol-related liver disease therapy. *Front Pharmacol.* 14:
66. Rivlin AS, Tator CH. 1978. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol.* 10(1):38–43
67. Özdemir B. 2009. Akut omurilik hasarı oluşturulmuş sıçanlarda rekombinant insan eritropoietininin doza bağımlı etkisinin araştırılması. *Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroşirüji Kliniği*
68. Khan M, Griebel R. LE JOURNAL CANADIEN DES SCIENCES NEUROLOGIQUE Acute Spinal Cord Injury in the Rat: Comparison of Three Experimental Technique
69. Glaser EP, Stewart AN, Jagielo-Miller JE, Bailey CS, Prendergast MA, Gensel JC. 2023. Effects of Acute Ethanol Intoxication on Spinal Cord Injury Outcomes in Female Mice. *J Neurotrauma*
70. Levy D, Mallonee S, Miller T, Smith GS, Spicer R, et al. 2004. Alcohol involvement in burn, submersion, spinal cord, and brain injuries. *Medical Science Monitor*
71. Crutcher CL, Ugiliweneza B, Hodes JE, Kong M, Boakye M. 2014. Alcohol Intoxication and Its Effects on Traumatic Spinal Cord Injury Outcomes. [https://home.liebertpub.com/neu.31\(9\):798–802](https://home.liebertpub.com/neu.31(9):798-802)
72. Furlan JC, Fehlings MG. 2013. Blood alcohol concentration as a determinant of outcomes after traumatic spinal cord injury. *Eur J Neurol.* 20(7):1101–6
73. Volovetz J, Roach MJ, Kelly ML. 2020. Blood Alcohol Concentration is Associated with Improved AIS Motor Score After Spinal Cord Injury. *Neurosurgery.* 67(Supplement_1):
74. Halt PS, Swanson RA, Faden AI. 1992. Alcohol Exacerbates Behavioral and Neurochemical Effects of Rat Spinal Cord Trauma. *Arch Neurol.* 49(11):1178–84
75. Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Tomasula JJ, De Crescito V, Ransohoff J. 1977. Ethanol potentiation of central nervous system trauma. *J Neurosurg.* 46(3):328–35
76. Anderson TE. 1986. Effects of acute alcohol intoxication on spinal cord vascular injury. *Cent Nerv Syst Trauma.* 3(3):183–90
77. Kelly DF, Lee SM, Pinanong PA, Hovda DA. 1997. Paradoxical effects of acute ethanolism in experimental brain injury. *J Neurosurg.* 86(5):876–82
78. Chen F, Li Q, Xu X, Wang F. 2024. Selenium Attenuates Ethanol-induced Hepatocellular Injury by Regulating Ferroptosis and Apoptosis. *Turk J Gastroenterol.* 35(10):
79. Niaaa. What Colleges Need to Know Now - An Update on College Drinking Research
80. Walker BM, Ehlers CL. Age-related Differences in the Blood Alcohol Levels of Wistar Rats
81. Livy DJ, Parnell SE, West JR. 2003. Blood ethanol concentration profiles: A comparison between rats and mice. *Alcohol.* 29(3):165–71

82. Pruett S, Tan W, Howell GE, Nanduri B. 2020. Dosage scaling of alcohol in binge exposure models in mice: An empirical assessment of the relationship between dose, alcohol exposure, and peak blood concentrations in humans and mice. *Alcohol*. 89:9–17
83. Nogales F, Rua RM, Ojeda ML, Murillo ML, Carreras O. 2014. Oral or intraperitoneal binge drinking and oxidative balance in adolescent rats. *Chem Res Toxicol*. 27(11):1926–33
84. Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Wezeman FH, Brownson K. 2009. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcif Tissue Int*. 84(6):474–84
85. Tan H, Hubertus S, Thomas S, Lee AM, Gerhardt S, et al. 2023. Association between iron accumulation in the dorsal striatum and compulsive drinking in alcohol use disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 240(2):249–57
86. Juhás M, Sun H, Brown MRG, MacKay MB, Mann KF, et al. 2017. Deep grey matter iron accumulation in alcohol use disorder. *Neuroimage*. 148:115–22
87. Song C, Li D, Huang L, Zhang J, Zhao X. 2024. Role of Ferroptosis Regulation by Nrf2/NQO1 Pathway in Alcohol-Induced Cardiotoxicity In Vitro and In Vivo. *Chem Res Toxicol*. 37(6):1044–52
88. Xue M, Tian Y, Sui Y, Zhao H, Gao H, et al. 2022. Protective effect of fucoidan against iron overload and ferroptosis-induced liver injury in rats exposed to alcohol. *Biomed Pharmacother*. 153:
89. Vahabi A, Öztürk AM, Kılıçlı B, Birim D, Kaftan Öcal G, et al. 2024. Silibinin promotes healing in spinal cord injury through anti-ferroptotic mechanisms. *JOR Spine*. 7(3):
90. Ryan F, Blex C, Ngo TD, Kopp MA, Michalke B, et al. 2024. Ferroptosis inhibitor improves outcome after early and delayed treatment in mild spinal cord injury. *Acta Neuropathol*. 147(1):
91. Liu D, Liu J, Sun D, Alcock NW, Wen J. 2003. Spinal cord injury increases iron levels: catalytic production of hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med*. 34(1):64–71
92. Rodrigues A do N, da Silva DCB, Baia-da-Silva DC, Mendes PFS, Ferreira MKM, et al. 2023. Aerobic Physical Training Attenuates Oxidative Stress in the Spinal Cord of Adult Rats Induced by Binge-like Ethanol Intake. *Antioxidants (Basel)*. 12(5):
93. Ren Z, Wang X, Yang F, Xu M, Frank JA, et al. 2017. Ethanol-induced damage to the developing spinal cord: The involvement of CCR2 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1863(11):2746–61
94. Bardag-Gorce F, Li J, French BA, French SW. 2005. The effect of ethanol-induced CYP2E1 on proteasome activity: the role of 4-hydroxynonenal. *Exp Mol Pathol*. 78(2):109–15
95. Wang Z, Wu Z, Xie Z, Zhou W, Li M. 2022. Metformin Attenuates Ferroptosis and Promotes Functional Recovery of Spinal Cord Injury. *World Neurosurg*. 167:e929–39

96. Liu Y, You F, Song G, Ceylan AF, Deng Q, et al. 2022. Deficiency in Beclin1 attenuates alcohol-induced cardiac dysfunction via inhibition of ferroptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1866(12):130245
97. Li Z, Lian Y, Wei R, Jin L, Cao H, et al. 2020. Effects of taraxasterol against ethanol and high-fat diet-induced liver injury by regulating TLR4/MyD88/NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Life Sci*. 262:
98. Tice AL, Steiner JL. 2024. Binge alcohol induces NRF2-related antioxidant response in the skeletal muscle of female mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 714:
99. Wang X, Chang X, Zhan H, Zhang Q, Li C, et al. 2020. Curcumin and Baicalin ameliorate ethanol-induced liver oxidative damage via the Nrf2/HO-1 pathway. *J Food Biochem*. 44(10):
100. Zhang D, Mao F, Wang S, Wu H, Wang S, Liao Y. 2023. Role of Transcription Factor Nrf2 in Pyroptosis in Spinal Cord Injury by Regulating GSDMD. *Neurochem Res*. 48(1):172–87
101. Fernandes RM, Nascimento PC, Bittencourt LO, de Oliveira ACA, Puty B, et al. 2018. Chronic ethanol forced administration from adolescence to adulthood reduces cell density in the rat spinal cord. *Tissue Cell*. 55:77–82
102. Zhao Y, Zhang R, Wang Z, Chen Z, Wang G, et al. 2022. Melatonin Prevents against Ethanol-Induced Liver Injury by Mitigating Ferroptosis via Targeting Brain and Muscle ARNT-like 1 in Mice Liver and HepG2 Cells. *J Agric Food Chem*. 70(40):12953–67
103. Lin H, Guo X, Liu J, Tang Y, Chen L, et al. 2024. Ethanol-Induced Hepatic Ferroptosis Is Mediated by PERK-Dependent MAMs Formation: Preventive Role of Quercetin. *Mol Nutr Food Res*. 68(7):2300343
104. Song XY, Liu PC, Liu WW, Zhou J, Hayashi T, et al. 2022. Silibinin inhibits ethanol- or acetaldehyde-induced ferroptosis in liver cell lines. *Toxicol In Vitro*. 82:

