

**T.C.  
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TOKSİKOLOJİ BİLİM DALI**

**KRONİK ETANOL MARUZİYETİNİN İNDÜKLEDİĞİ BEYİN HASARI ÜZERİNE  
ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Enis MACİT**  
Uzm.Ecz.Yzb.

**ANKARA  
2009**

**T.C.  
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TOKSİKOLOJİ BİLİM DALI**

**KRONİK ETANOL MARUZİYETİNİN İNDÜKLEDİĞİ BEYİN HASARI ÜZERİNE  
ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİLERİ**

**Enis MACİT**

Uzm.Ecz.Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nün  
Toksikoloji Bilim Dalı  
İçin öngördüğü  
**DOKTORA TEZİ**  
olarak hazırlanmıştır

**TEZ DANIŞMANI**

İ.Tayfun UZBAY

Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb.

**ANKARA**

**2009**

GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

“Kronik Etanol Maruziyetinin İndüklediği Beyin Hasarı Üzerine Antioksidanların Koruyucu Etkileri” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Toksikoloji Bilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez danışmanı :Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb.İ.Tayfun UZBAY

Üye : Doç.Tbp.Kd.Turgay ÇELİK

Üye Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb.Ahmet SAYAL

Üye : Prof.Dr.Ecz.Gönül ŞAHİN

Üye : Doç.Tbp.Kd.Bnb.Hüsamettin GÜL

ONAY:

Uzm.Ecz.Yzb. Enis MACİT (2000-Yd.3)'in 08 HAZİRAN 2009 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

M.Tahir ÜNAL

Prof.Tbp.Tuğg.

Sağ.Bil.Enst.Müdürü

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın planlanması, icraası, sonuçların değerlendirilmesi ve diğer tüm aşamalarda beni destekleyen, Doktora Tez danışmanlığımı üstlenen, maddi ve manevi hertürlü desteği sağlayan, bu zorlu süreçte bilgisinden ve hoşgörüsünden istifade ettiğim, değerli bilim insanı Sayın Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. İ.Tayfun UZBAY'a sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Her türlü desteği benden esirgemeyen, bölüm başkanım Sayın Doç.Tbp.Kd.Alb. Turgay ÇELİK'e ayrıca teşekkürlerimi sunarım;

Beni bu günlere getiren, yetiştiren Babam ve Anneme;

Bu zorlu süreçte beni manevi olarak destekleyen ve bana sabır gösteren eşim Elif MACİT ve çocuklarım Erdal Efe ve Filiz Ece'ye;

Bilgi ve becerisinden istifade ettiğim, deneysel çalışmaların yürütülmesinde tecrübelerini benimle paylaşan istatistiksel analizlerde ve antioksidan parametrelerin ölçümünde yanımda olan tüm Fizyoloji AD. Çalışanlarına ve özellikle Sayın Doç.Tbp.Bnb.Turgut TOPAL'a;

İleri tetkik analiz gerektiren laboratuvar çalışmalarında engin bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim Sayın Uzm.Tbp.Yzb. Zeki İlker KUNAK'a;

Laboratuvar çalışmalarında hertürlü desteği gösteren tüm Psikofarmakoloji laboratuvarı çalışanlarına, özellikle Sayın Uzm.Tbp.Hv.Yzb.K.Gökhan ULUSOY'a, Vet.Hek.Elvin AKDAĞ ve Selami ALAN'a ayrıca teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 105S387)

## ÖZET

### **Kronik Etanol Maruziyetinin İndüklediği Beyin Hasarı Üzerine Antioksidanların Koruyucu Etkileri**

Bu çalışmada kronik etanol alımında oluşan beyin hasarında antioksidan etkinliği bilinen maddelerden ebselen, proantosiyanidin, melatonin, C vitamini ve E vitaminin etanol norotoksitesinde etkili olup olmadıkları incelenmiştir ve etanolün neden olduğu beyin hasarı, GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri ölçümü ile değerlendirilmiştir.

Kronik etanol tüketimi beyinde pek çok bozukluğa neden olmaktadır. Hasardan en çok etkilenen bölgelerin hipokampus, frontal korteks ve serebellum olduğu bildirilmiştir. Bu hasarlardan biri de beyin nörodejenerasyonudur. Bu hasarın birincil olarak etanolün nöroselüler ve nörovasküler etkilerinden ileri geldiği düşünülmektedir. Bazı durumlarda tiamin eksikliğinin ve diğer beslenme şekline bağlı bozukluklar da burada rol oynamaktadır. Yapılan pek çok çalışmaya rağmen etanole bağlı beyin hasarının etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır.

Çalışmada 70 adet Wistar türü erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlara 21 gün boyunca süt içerisinde etanol diyeti verilerek, beyin hasarı oluşturulmuştur. Daha sonra antioksidan maddeler 7 gün boyunca oral gavaj ile uygulanmıştır. Kan etanol konsantrasyonları Headspace metodu kullanılarak değerlendirilmiş, beyin dokularında MDA, GSH-Px ve SOD değerleri ölçülmüştür.

Sonuç olarak kronik etanol kullanımında korumasız bir bölge olan, bellek ve öğrenmede önemli roller üstlenen hipokampusta oluşan oksidatif stres kaynaklı toksisiteye karşı antioksidan kullanımının etkili olduğu görülmüştür. Özellikle melatonin, ebselen ve proantosiyanidin, E ve C vitaminine göre daha etkili bulunmuştur. Ancak bu moleküller üzerinde daha geniş araştırmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Etanol, beyin hasarı, antioksidan, ebselen, melatonin, proantosianidin, vitamin E, vitamin C

## **SUMMARY**

### **Protective effects of antioxidants on chronic ethanol-induced brain damage**

The aim of this study is to evaluate the therapeutic efficacy of antioxidants melatonin, vitamin E, vitamin C, ebselen and proanthocyanidin on ethanol-induced brain damage on rats. Brain damage was evaluated with GSH-Px, SOD and MDA levels in the brain tissue.

Chronic ethanol consumption originates a wide spectrum of disorders, including brain neurodegeneration. The most affected brain regions seem to be superior frontal cortex, hippocampus and cerebellum. This damage originates initially ethanol's neurocellular and neurovascular effects. In some cases, vitamin deficiency and nutritional status plays a great role in some of these disorders. The exact metabolism of the ethanol degradation in brain is still unclear even in most of studies performed on animal models.

Seventy adult male Wistar rats weighting 200–230 g were used in experiments. Ethanol-induced brain damage was performed for 21 days with an ethanol in liquid diet. Antioxidants were applied with the help of gavage for 7 days period. Blood alcohol levels with Headspace technique in whole blood, and MDA, SOD, GSH-Px levels were measured in brain tissue.

As a result, antioxidants may be effective on vulnerable, most responsible part of memory and learning brain region hippocampus on ethanol-induced toxicity. Especially melatonin, ebselen and proanthocyanidin were found to be more efficient than those of vitamin E and vitamin C. However, But further studies need to be performed on these molecules.

**Keywords:** Ethanol, brain damage, antioxidant, ebselen, melatonin, proanthocyanidin, vitamin E, vitamin C

## İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| Onay Sayfası .....                                                    | iii  |
| Teşekkür .....                                                        | iv   |
| Özet .....                                                            | v    |
| İngilizce Özet .....                                                  | vi   |
| İçindekiler .....                                                     | vii  |
| Simgeler ve Kısaltmalar .....                                         | ix   |
| Şekiller Dizini .....                                                 | xi   |
| Tablolar Dizini .....                                                 | xiii |
| 1. GİRİŞ .....                                                        | 14   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                               | 17   |
| 2.1. Etanolün Farmakokinetiği .....                                   | 20   |
| 2.2. Etanolün Nöronal Etki Mekanizmaları.....                         | 23   |
| 2.3. Etanolün Oluşturduğu Beyin Hasarını Ölçümde Kullanılan Yöntemler | 27   |
| 2.4. Etanol Bağımlılığı ve Kronik Etanol Zehirlenmesi.....            | 28   |
| 2.5. Etanol ve Madde Kullanımında Erken Tanının Önemi .....           | 29   |
| 2.6. Rakamlarla Etanol .....                                          | 30   |
| 2.7. Oksidan-Antioksidan Kavramı .....                                | 33   |
| 2.8. Reaktif Oksijen Türevlerinin Oluşumu .....                       | 37   |
| 2.9. Melatonin.....                                                   | 38   |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 2.10. E Vitamini .....        | 41 |
| 2.11. Ebselen .....           | 44 |
| 2.12. C-Vitamini .....        | 45 |
| 2.13. Proantosianidin .....   | 50 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....      | 51 |
| 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ ..... | 61 |
| 5. SONUÇLAR.....              | 61 |
| 6. TARTIŞMA .....             | 67 |
| 7. KAYNAKLAR .....            | 74 |

## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

|                       |   |                                           |
|-----------------------|---|-------------------------------------------|
| <b>5-HTOL</b>         | : | 5-Hidroksitriptofol                       |
| <b>AC</b>             | : | Adenilil Siklaz                           |
| <b>ALT</b>            | : | Alanin aminotransferaz                    |
| <b>AST</b>            | : | Aspartat Aminotransferaz                  |
| <b>BEC</b>            | : | Kan Etanol Konsantrasyonu                 |
| <b>BH<sub>4</sub></b> | : | Tetrahidrobioplerin                       |
| <b>CAT</b>            | : | Katalaz                                   |
| <b>DTI</b>            | : | Difüzyon Tensor Görüntüleme               |
| <b>EDRF</b>           | : | Endotelial Türevi Gevşeme Faktörü         |
| <b>EEG</b>            | : | Elektroensefalografi                      |
| <b>EtG</b>            | : | Etil Glukuronat                           |
| <b>EtOH</b>           | : | Etanol                                    |
| <b>EtS</b>            | : | Etil Sülfat                               |
| <b>FAD</b>            | : | Flavin Adenin Dinükleotid                 |
| <b>FAEE</b>           | : | Yağ Asiti Etil Esterleri                  |
| <b>FAM</b>            | : | Flavin Adenin Mononükleotid               |
| <b>FID</b>            | : | Alev İyonizasyon Dedektörü                |
| <b>GABA</b>           | : | Gamaaminobutirik asit                     |
| <b>GC</b>             | : | Gaz Kromatografisi                        |
| <b>GGT</b>            | : | Gama-glutamil transfereraz                |
| <b>GR</b>             | : | Glutasyon Redüktaz                        |
| <b>GSH-Px</b>         | : | Glutasyon Peroksidaz                      |
| <b>MAO</b>            | : | Monoamino Oksidaz                         |
| <b>MCV</b>            | : | Ortalama Kan Küresi Hacmi                 |
| <b>MDA</b>            | : | Malondialdehit                            |
| <b>MPTP</b>           | : | 1-metil–4-fenil–1,2,3,6-tetrahidropiridin |

|              |   |                                       |
|--------------|---|---------------------------------------|
| <b>MRI</b>   | : | Manyetik Rezonans Görüntüleyici       |
| <b>NADPH</b> | : | Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat |
| <b>nM</b>    | : | Nanometre                             |
| <b>NMDA</b>  | : | N-metil-D-aspartik asid               |
| <b>NO</b>    | : | Nitrik Oksit                          |
| <b>NOS</b>   | : | Nitrik Oksit Sentaz                   |
| <b>NPY</b>   | : | Nöropeptit Y                          |
| <b>PET</b>   | : | Positron Emisyon Tomografisi          |
| <b>Peth</b>  | : | Fosfatdiletanol                       |
| <b>ROS</b>   | : | Reaktif Oksijen Türleri               |
| <b>SOD</b>   | : | Süperoksit Dismutaz                   |
| <b>TBA</b>   | : | Tio Barbütirik asit                   |
| <b>TCA</b>   | : | Trikloro Asetik Asit                  |

## **ŞEKİLLER DİZİNİ**

**Şekil 2.1:** Etanolün yıkım yolları

**Şekil 2.2:** Etanolün hücre içerisindeki siklusu

**Şekil 2.3:** Etanolden etkilenen major norotransmitter sistemler

**Şekil 2.4:** Etanol Maruziyetine bağlı, noranal mekanizmalar

**Şekil 2.5:** Etanol/ nikotin bağımlılığına ve psikiyatrik bozukluklarına katılan beyin bölümleri

**Şekil 2.6:** 1960-2007 yılları arasında 15 yaş üzeri kişi başına düşen etanol tüketim miktarları

**Şekil 2.7:** Reaktif Oksijen Türevlerinin Oluşumu ve Organizmanın Buna Oksidan Cevabı. Bu cevapta, organizmanın endojen antioksidan enzimleri olan, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) etkin rol oynamaktadır

**Şekil 2.8:** Melatonin kimyasal yapısı. Asetil ve metoksi grupları, melatoninin antioksidan özelliğinden sorumlu tutulmaktadır

**Şekil 2.9:** E-Vitamini aktivitesine sahip ana yapılar

**Şekil 2.10::** Ebselen molekül yapısı

**Şekil 2.11:** C-vitamini kimyasal yapısı

**Şekil 2.12:** Askorbatın kimyasal süreci

**Şekil 3.1:** Örnek etanol ve IS piki

**Şekil 3.2:** GC-FID sistemi Headspace ünitesi

**Şekil 4.1:** Tüm gruplarda MDA sonuçları

**Şekil 4.2:** Tüm gruplarda SOD sonuçları

**Şekil 4.3:** Tüm gruplarda GSH-Px sonuçları

## **TABLolar DİZİNİ**

**Tablo 2.1:** Kandaki etanol konsantrasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan santral etkiler

**Tablo 2.2:** Etanol kullanımında, kötüye kullanımında ve muhtemel bağımlılığa yatkınlıkta biyokimyasal markörlere örnekler

**Tablo 3.1:** Kronik etanol uygulamasında kullanılan sıvı diyetin içeriği ve uygulama süreleri

**Tablo 3.2:** GSH-Px ölçümünde kullanılan maddeler ve miktarları

**Tablo 3.3:** Headspace Etanol Ölçümü Isı ve Enjeksiyon Programı

**Tablo 4.1:** Oksidan ve antioksidan parametre sonuçları (Ortanca  $\pm$  Standart sapma)

## 1. GİRİŞ

Etanol, kafein ve nikotinden sonra batı toplumlarında oldukça geniş kullanımı olan sosyal bir içecektir. Herhangi bir yolla alındığında, insanlarda psikososyal durumunda ve beyin işlevlerinde değişiklik oluşturan maddelerin tümüne genel anlamı ile bağımlılık yapıcı maddeler denir (8, 53). Madde bağımlılığı ise, geniş anlamda eksojen kimyasal maddelere ruhsal, fiziksel ya da hem ruhsal hem fiziksel olarak düşkün olmak veya günlük yaşam içinde bu maddelere yer ayırmak anlamına gelmektedir. Bağımlılık yapma risk oranı en düşük olan ağrı kesici ve yatıştırıcı ilaçlar, en yüksek ise afyon, eroin ve uyarıcılarla birlikte etanol olarak tanımlanmaktadır.

Günümüzde etanol bağımlılığı görülme sıklığı, özellikle batı toplumlarında oldukça yüksektir. 1998 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde etanol kullanımının ekonomik maliyeti 185 milyar dolar olarak bildirilmiştir (52). Etanol bağımlılığı yılda 100.000'den fazla ölüme neden olmaktadır (77). Yine Amerika Birleşik Devletlerinde 2002–2004 yılları arasında % 7.6 12 yaş ve üzerinde (18.2 milyon) insanın etanol bağımlısı olduğu bildirilmiştir (62).

Etanol kullanımı, zor yürüme, bulanık bakış, hasarlı hafıza, yavaş reaksiyon zamanı, anlaşılmayan konuşma gibi belirtilerle açıkça görüldüğü gibi beyni etkilemektedir. Bu kusurların bir kısmı düşük etanol miktarı ile ortaya çıkarken bir kısmı yüksek miktarda alınması ile ortaya çıkmaktadır. Aslında etanolün beyni nasıl etkilediği ve yaptığı beyin hasarı konusu etanol üzerine yapılan araştırmaların ilgi odağını oluşturmaktadır.

Etanol kronik düşük ve akut yüksek miktarda alım ile beyinde intoksikasyona sebep olmaktadır. Alkolizm, beyin ve davranışı pek çok farklı yönde etkileyebilir. Bilinen pek çok toksik madde gibi etanol de hücresel oksidatif strese sebep olmakta ve sistolik serbest kalsiyum konsantrasyonunu artırmakta, hücre içi

morfolojik değişikliklerle hücre ölümü oluşturmaktadır. Etanolün pre-inflamatuar etkilere, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna sebep olarak hücresel oksidatif stress artışına ve devamında lipid peroksidasyonuna, superoksid dismutaz (SOD) artışına yol açmaktadır. Etanol ile indüklenen beyin hasarında nöroinflamasyonun rolü net değildir. Fakat etanolün sosyal bir içim ile dahi beyin hücrelerini öldürdüğü, hafızayı etkilediği, reaksiyon zamanına etkisi olduğu bilinmektedir.

İnsanda etanole bağlı oluşabilecek beyin hasarları doğrudan beyin bölgelerine ya da beyindeki sistemlere bağlı olarak gelişebilen hasarlardır. Bunlar etanolün nörotoksik etkilerine bağlı olan, tüm beyinde özellikle de kortekste görülen, hipotalamusun belli bölgelerinde kan damarlarının dejenerasyonu ile tiyamin eksikliği sonucu oluştuğu düşünölen beyin atrofi, limbik sistemin, talamusun ve hipotalamusun etkilendiği yine tiyamin eksikliğine bağlı olduğu düşünölen Wernicke-Korsakoff amnestik hastalığı, koordinasyon ilişkileri gibi özelliklerin kontrol edildiği sağ-yarım kürenin daha çok hasar alabilmesi ve etanolün nörotransmitter (örn gamaaminobutirik asit [GABA], glutamat, dopamin, asetilkolin, serotonin) sistemlerin aktivitesini değiştirebileceği ve nöronal eksitasyon ve inhibisyon görevlerine karışarak hasar oluşturduğu bilinmektedir (98).

Etanolün nörotoksik etkileri, eritrosit membran hasarının göstergesi olarak eritrosit antioksidan enzim düzeyi ve lipid peroksidasyon son ürünü olan plazma malondialdehit sistemi üzerinden değerlendirilebileceği gibi, çeşitli antioksidanlar uygulanarak bu sistem üzerinde yeni tedavi yaklaşımları da değerlendirilebilir.

Bu çalışmada, etanolün oluşturduğu hasarı incelemek amacı ile sıçanlarda kronik etanol uygulaması ile etanolün-indüklediği beyin hasarı oluşturulmuştur. Etanolün oluşturduğu beyin hasarı, serbest radikaller olan GSH-Px, SOD, MDA düzeylerinin ölçümü ile değerlendirmiştir. Daha sonra antioksidan etkinliği bilinen maddelerden ebselen, proantosiyandin, melatonin, C vitamini ve E vitaminin

etanol nörotoksitesinde iyileştirici etkilerinin olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Bu alışma, Silahlı Kuvvetlerin sağlık alanında eğitim, araştırma ve tedavi kuruluşu olan GATA Tıp Fakóltesi Eęitim Hastanesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Psikofarmakoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Alkol, hidrojen atomunun hidroksil grubu ile yer değiştirdiği hidrokarbon bileşimlerinin genel adıdır. Genel formülü R-OH' dır. burada R aromatik bir kökü temsil eder. Günlük hayatta çoğu kez pek çok alkolle karşılaşılır. Örneğin; Etanol (etil alkol)  $[CH_3-CH_2OH]$  içkilerde, 2 propanol (izopropil)  $[(CH_3)_2CHOH]$  antibakteriyel olarak, metanol (Metil alkol)  $[-CH_3OH]$  otomobillerde yakıt donanımı antifriz olarak kullanılır. Bütün bu bileşikler laboratuarda ve sanayide çözücü ve çıkış maddesi olarak kullanılır (58).

Alkol kelimesi genel olarak kimyada etil alkolü belirtmek amacı ile kullanılır. Etil alkolün dışında bir dizi başka alkolde bulunduğundan, bilimsel tanımlamalarda alkol kelimesi yalnız başına kullanılamaz. Alkoller türedikleri halkanın sonuna -ol eki getirilerek adlandırılırlar. Konuşma dilinde ise yanlış olarak farklı alkolleri de belirtmekte kullanılır. Örneğin; sağlığa zararlı metil alkol için alkol kelimesi yanlış anlamlara ve zehirlenmelere sebep olabilmektedir. Halk arasında ispiroto olarak bilinen etil alkol, şekerli ve şekere dönüştürülebilen ham maddelerin fermentasyonu sonucu oluşan alkollü meşenin damıtılması ile elde edilir. Eldeki belgeler göre, alkol fermentasyonunun çok eski yıllardan beri bilindiği ve alkolün kullanıldığı anlaşılmaktadır. Örneğin, MÖ. 4200 yıllarında Mezopotamya'da alkol fermentasyonunun bilindiği; M.Ö. 2800 yıllarında Babil' de bira üretiminin yaygın olduğu arkeolojik araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Arapça "El -Küle" sözcüğu de ilk kez İtalyan kimyager Paracelsus tarafından "alkol" olarak Avrupa literatüre sokulmuştur. Yunan, Roma uygarlıklarında ve eski Mısır'da bazı hastalıkların tedavisinde reçete tabletlerine alkolün yazıldığı görölmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi alkol tarihçesinin M.Ö. 3000–4000 yıllarına kadar uzandığı görölmektedir (60, 117).

Madde bağımlılığı, geniş anlamda eksojen kimyasal maddelere ruhsal, fiziksel ya da hem ruhsal hem fiziksel olarak düşkün olmak, günlük yaşam içinde bu maddelere yer ayırmak anlamına gelmektedir. Başka bir deyişle, insanların yetersizliklerini gidermek için dışarıdan alınan kimyasal maddelerden destek

arama çabalarıdır. Sıralamada, tehlike oranı en düşük olan ağır kesici ve yatıştırıcı ilaçlar, en yüksek ise afyon, eroin ve uyarıcılardır. Ayrıca ilaç tanımına uyabilen farmakolojik özelliklere sahip maddelerin santral sinir sistemi (SSS) arasındaki bir etkileşmeden kaynaklanan maddeyi devamlı ya da periyodik olarak alma isteği olarak da tanımlanabilir (39).

Madde bağımlılığında etanol, suistimale en çok açık olan maddelerin başında sıralanabilir. Günümüzde etanol bağımlılığı görülme sıklığı batı toplumlarında oldukça yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1998 yılı etanol kullanımının genel ekonomik maliyeti 185 milyar dolar olarak tahmin edilmiştir (53). Ayrıca etanol bağımlılığı yılda 100.000'den fazla ölüme neden olmaktadır (8). Etanol insan gastrointestinal sisteminde fermentasyonla eser miktarda üretilen ve sindirim sistemi mukozasında alkol dehidrogenaz tarafından hızla metabolize edilen etil alkol gözardı edilecek olursa, tamamen eksojen bir maddedir.

Kimyasal olarak bakıldığında "alkol" olarak adlandırılan grup, alifatik hidroksil gruplarına sahip bileşiklerdir ve özellikle içki yapımı için kullanılan etil alkolün tütün ve kafeinden sonra dünyada en yaygın kötüye kullanılan psikostimülan olduğu görülmektedir.

Tıbbi yönden önem arzeden belirgin akut toksik etkiye sahip ve toksikoloji yönünden önemli olan, alifatik yapılı alkoller metanol ve etilenglikol'dür.

Amerikan literatüründe "içki" (drink) birimi ile ifade edilir ve bir "içki" 13 g (yaklaşık 16 ml) etanole eşdeğer alkollü içki miktarını ifade etmektedir. Buna göre, viskinin veya rakının yaklaşık 35 ml'si veya bir küçük şişe rakının 1/10'u, şarabın 120 ml'si veya biranın 360 ml'si bir "içki" sayılmaktadır (121).

Etanolün ve taşıt kullanmanın çağımızda çok kişinin günlük yaşamına girmesi nedeniyle, alkollü iken taşıt kullanmaya bağlı kazalar önemli bir sosyal sorun oluşturmakta, trafik kazalarının büyük bir oranında sürücünün veya yayanın etanol almış olduğu saptanmıştır (121). Trafik kazası yapma olasılığı, kan etanol konsantrasyonuna bağlı olarak eksponensiyel bir şekilde artar. Taşıt

kullanamayacak kadar sarhoş olmanın sınırını, sarhoşluğun hafif kademesinde psikolojik testler veya basit nörolojik muayenelerle saptamaya olanak yoktur. Bu sınırın yasal olarak saptanması, birçok ülkede kanda etanol konsantrasyonunun ölçülmesi suretiyle yapılır. Buna olanak yoksa nefeste veya idrarda etanol ölçümü yapılır. İngiltere gibi bazı ülkelerde söz konusu sınır kanda 80 mg/100ml'dir. Bazı yerlerde de bu sınır 150 mg/100ml gibi nisbeten yüksek bir değerdir. Sonuncu değer, alkollü durumda taşıt kullananlara karşı gereksiz bir hoşgörüyü yansıtır. Türkiye'de 16.6.1985 gün ve 18786 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Karayolları Trafik Yönetmeliğinin 110. maddesine göre, sürücülerin kanda 50 mg/100ml (yönetmelikteki ifadesiyle 0,5 promil) sınırını aşmayacak kadar alkollü içki almalarına müsaade edilir.

**Tablo 2.1:** Kandaki etanol konsantrasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan santral etkiler (121)

| <b>Kandaki konsantrasyon<br/>(mg/100 ml)</b> | <b>Etkiler</b>                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 50–80                                        | Öfori, hafif motor bozukluklar, zihinsel etkinlikte azalma                                                                                                                                 |
| 80–100                                       | Nistagmus, beceri isteyen işlerin yapılmasında aksama, araba sürme yeteneğinin bozulması, EEG'de alfa dalgalarının aktivasyonu                                                             |
| 100–200                                      | Emosyonel düzensizlik, motor koordinasyonun ileri derecede bozulması (ataksi, yalpalama), EEG'de alfa dalgaların frekansının azalması, daha sonra yavaş dalga periyodlarının belirlenmesi. |
| 200–300                                      | Konfüzyon, geveleyerek konuşma, amnezi.                                                                                                                                                    |
| 300–400                                      | Stupor ve koma.                                                                                                                                                                            |
| 400–500                                      | Koma, ileri derecede solunum depresyonu, bazen ölüm.                                                                                                                                       |
| 500 >                                        | Kesinlikle ölüm.                                                                                                                                                                           |

### 2.1. Etanolün Farmakokinetiği

Ağız yolundan alınan etanol, mide–barsak kanalından pasif difüzyonla hızlı bir şekilde ve tam olarak absorbe edilir. Absorpsiyon hızının yüksekliği,

- Sıvı olmasına,
- Molekülünün ufak daltona sahip olmasına
- İyonize olmamasına bağlıdır.

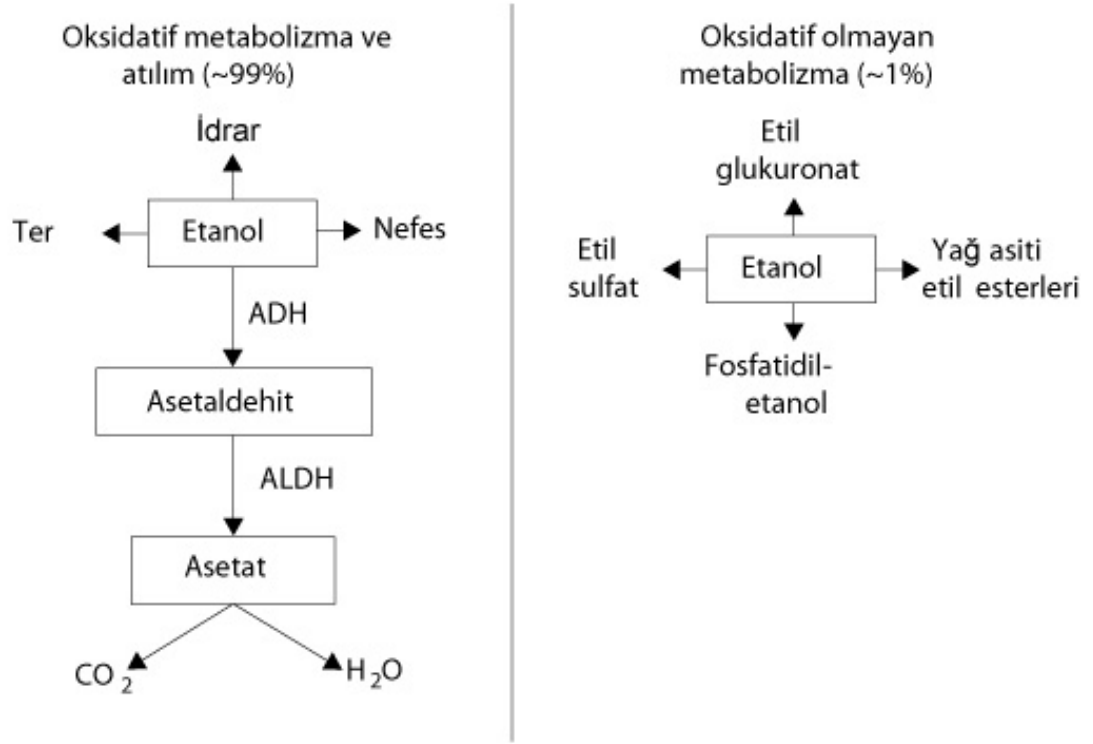
Alındıktan beş dakika sonra kanda belirir. Aç karna alındığında içilen miktarın yaklaşık %20'si mideden, geri kalanı ince barsaktan absorbe edilir. İnce barsaktan olan absorpsiyonun hızı, mideden olana göre daha fazladır. Normal bir kimsede tek bir dozdan sonra maksimum kan konsantrasyonuna 40–60 dakikada eriştiği halde, gastrektomili hastalarda bu süre yaklaşık 20 dakikadır. Mide dolu olduğu takdirde, mideden absorpsiyon yavaşlar; ayrıca bu durumda midenin boşalma süresinin uzaması nedeniyle ince barsağa geçiş gecikir. İnce barsağa gelen etanolün hepsi buradan absorbe edilir; etanol kolona erişemez (121).

Alınan etanolün gradientine bağlı olarak absorpsiyon hızı farklılık göstermektedir. İçkiadaki etanol oranı çok yüksek seviyede olursa, etanolün ince barsağa geçişi engellendiğinden absorpsiyon hızında düşme gözlemlenir. Etanol plazma proteinlerine bağlanmaz ve vucüttaki tüm sıvı kompartmanlara kolay bir şekilde difüze olur. Kandaki orana yakın olarak aköz hümör ve BOS gibi diğer sıvılarda hemen hemen aynı konsantrasyona sahiptir (162).

Alınan etanolün %98'yarlaşık olarak elimine edilir. Kalan kısmı ter bezlerinden, akciğerlerden ve böbreklerden itrah edilir. Ekspire edilen havada etanol konsantrasyonu, kan konsantrasyonu ile koreledir ve aradaki oran 1:1300 kadardır. Bundan dolayı etanol tayinini bu havadan yapmak kolay ve gerçeği yansıtmaktadır (121).

Temel olarak etanol karaciğerde metabolize olur. Daha sonra mide mukozası

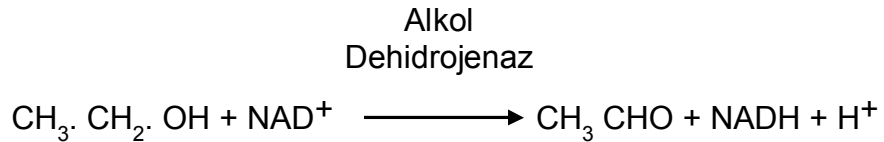
gelmektedir. Sıfır derece kinetiğe göre gerçekleşen etanol metabolizması iki yolak üzerinden cereyan eder (121).



Şekil 2.1: Etanolün yıkım yolları (162).

#### a. Alkol dehidrojenaz (ADH) yolağı

Bir karaciğer enzimi olan ADH, çinko içerir ve sitoplazma içerisinde bulunur. Etanol vucuda normal dozda alındığında metabolizma bu yolak üzerinden gerçekleşir. Enzim 0,26-2 nM arasında bir Km değerine sahiptir (162).



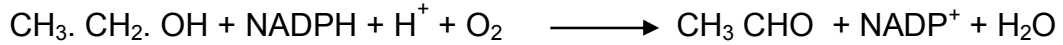
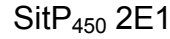
Etanolün oksidasyonu, nikotinamid adenin dinükleotid kofaktörü'nün (NAD<sup>+</sup>'nin), NADH'ye indirgenmesi olayına bağlıdır. İndirgenmiş NADH'nin

NAD<sup>+</sup>'ye rejenere olması, etanolün biyotransformasyonunda hız–kısıtlayıcı faktörü oluşturmaktadır. Bundan dolayı bu olaya bağlı yukarıdaki reaksiyon etanol mekanizmasındaki hız kısıtlayıcı basamaktır (162).

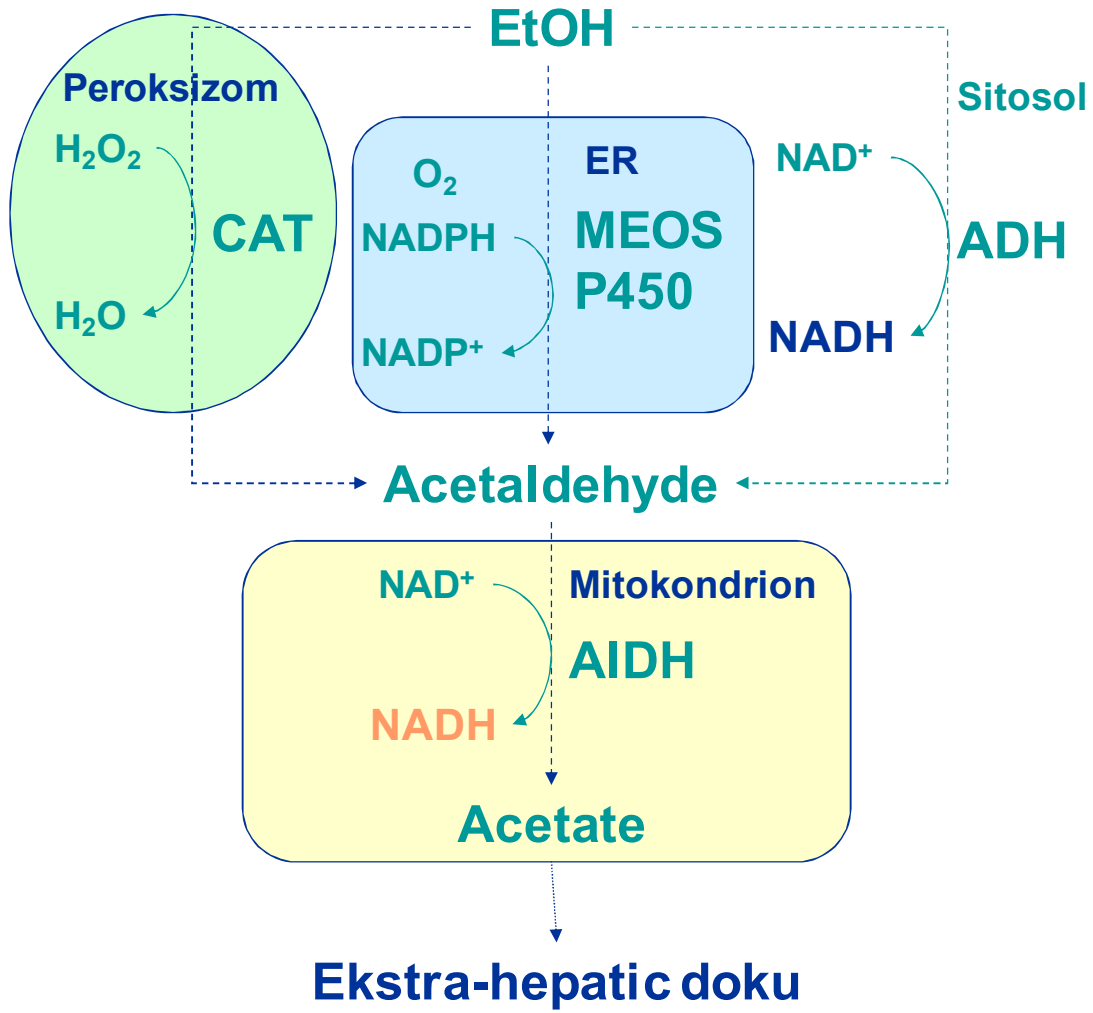
Etanol alındığında hepatositlerdeki piruvat / laktat oranının 6,5 kat azalması, NADH'nin oksidlenmesi sonucu piruvatın laktata, oksaloasetatin malat'a indirgenmesinden kaynaklanmaktadır. Kronik etanol alımında hepatositlerde oksijen ve ATP tüketimi hızlanır.

#### **b. Mikrozomal karma fonksiyonlu oksidazlar**

Karaciğerde endoplazmik retikulumda yerleşmiş olan bu enzimlerin etanolün oksidasyonunu yapan bölümüne, mikrozomal etanol oksidleyici sistem (MEOS) adı verilmiş ve daha sonra bunun SitP<sub>450</sub> 2E1 enzimi olduğu anlaşılmıştır. Bu enzimler yüksek K<sub>m</sub> değerine sahip olduklarından dolayı az veya orta dozda vucuda alınan etanolün oksidasyonuna katkılarından ziyade etanol konsantrasyonu yükseldiğinde devreye girerler.



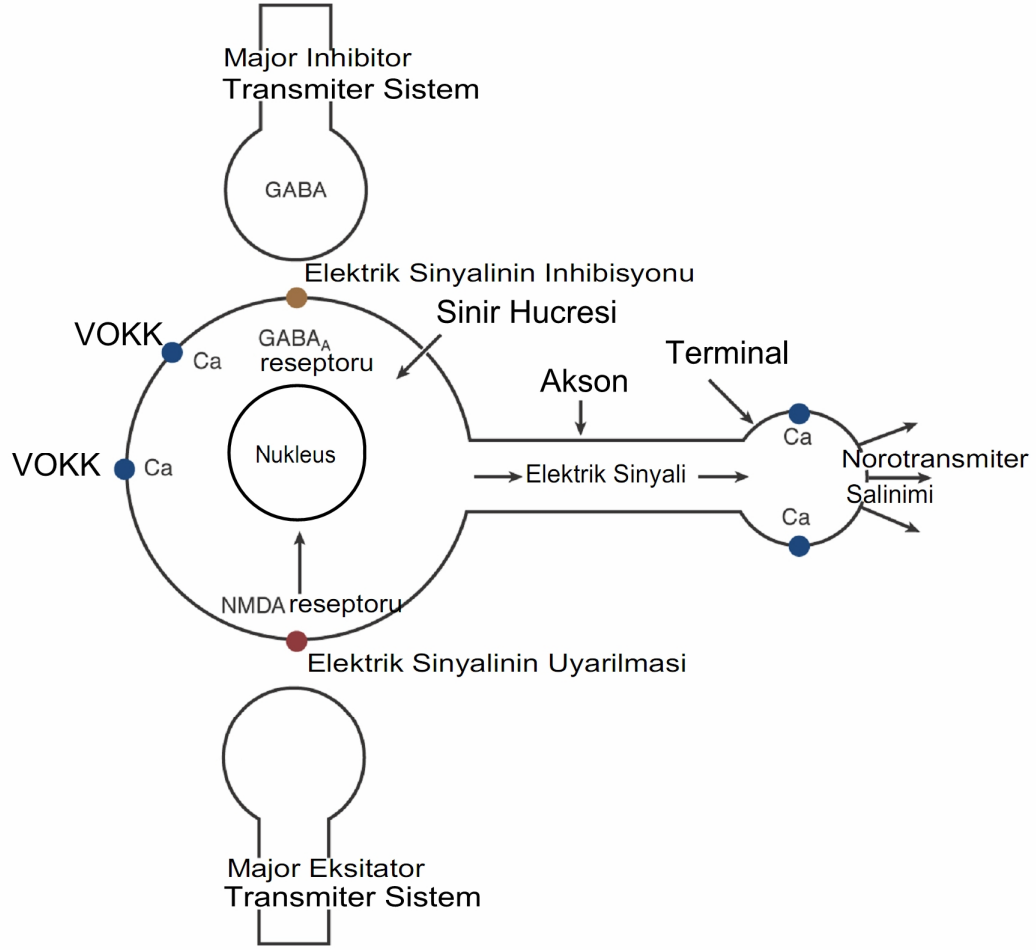
Asetaldehidin asetik aside dönüşümü, etanolün oksidasyonunda ikinci basamaktır. Asetaldehidin %90'dan fazlası bu reaksiyona girer. Olayı NAD'ye bağımlı mitokondriyel bir enzim olan aldehyd dehidrojenaz (ALDH) kataliz etmektedir. İkinci basamaktaki dönüşümün hızı, birincininkinden çok daha fazla olduğundan dolayı etanol alımı sonrası vücutta asetaldehit birikimi olmaz (162).



**Şekil 2.2:** Etanolün hücre içerisindeki siklusu.

## 2.2. Etanolün Nöronal Etki Mekanizmaları

Etanol tarafından etkilenen reseptörler içerisinde en fazla incelenenler GABAA ve Eksitator Amino Asit (EAA) reseptörleri yer almaktadır. Etanol glutamat NMDA ve EAA reseptörlerini antogonize eder. Kronik etanol maruziyeti sonucunda bu reseptörlerde “upregülasyon” (reseptör sıklığında artış) gözlemlenir. Kronik etanol maruziyetinin ortadan kalkmasından sonra ise ortaya çıkan etanol yoksunluk sendromuna hipereksitasyon eşlik eder (78).



**Şekil 2.3:** Etanolden etkilenen major norotransmitter sistemler (78)

### **GABA reseptörleri / Klorür Kanal Sistemi**

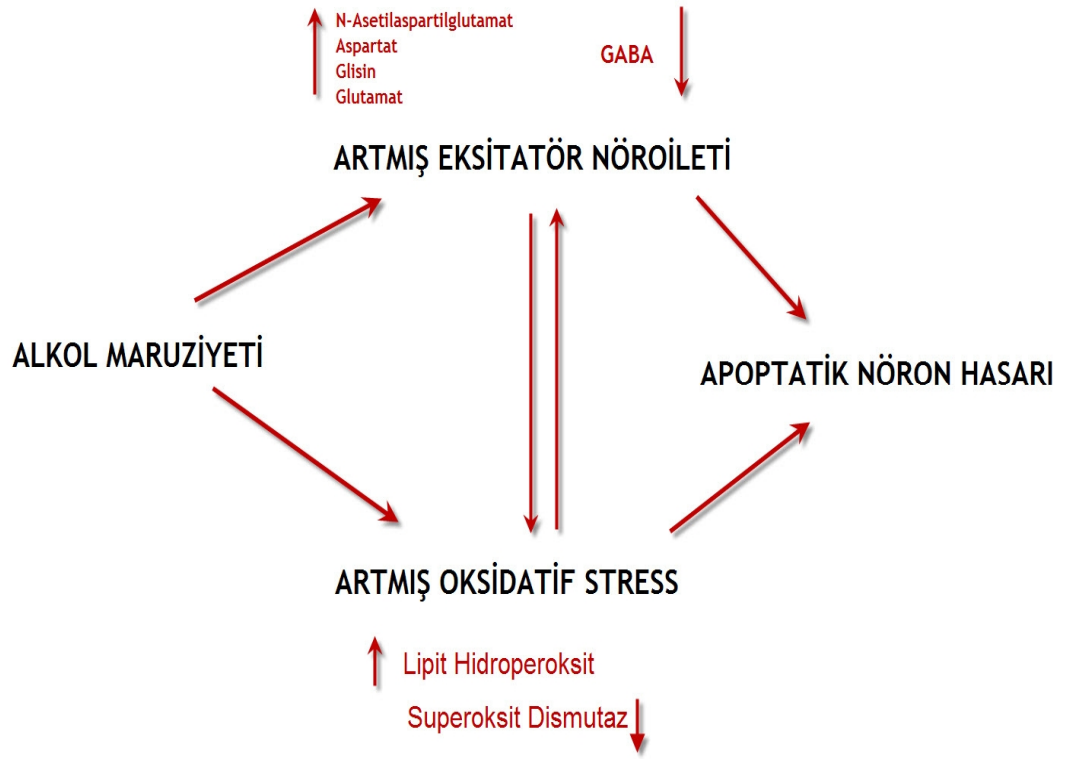
Etanol, beyinde ana inhibitör nöromediyatör olan GABA'nın GABA<sub>A</sub> tipi reseptörlerini indirekt olarak aktive eder. Etanolün GABA sistemi üzerine etkilerinin onun pekiştirici etkisi ile bir şekilde ilişkili olduğu düşünülmekte ve GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin pozitif allosterik modülatörü olarak rol oynamaktadır. Akut etanol yoksunluğunda merkezi GABA etkinliğindeki azalma, ödül eşiğinin yükselmesine bağlı olumsuz duygulanımın en önemli nedenlerinden biridir (71). GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> GABA'nın esas 2 ana reseptörüdür. GABA'nın baskılayıcı bir reseptör olmasının esas sebebi reseptör kompleksinin klorid kanalına

bağlanarak, hücre içine klor iyonu geçişinin düzenlenmesi ile klor kanalının açılarak hücrenin hiperpolarize olmasından dolayıdır. Bu olay nöronların çoğunda GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin uyarılması ile gerçekleşir. GABA<sub>B</sub> reseptörü ise G proteinine bağlı çalışan reseptörlerdendir (18).

Etanolün daha çok beyin korteksindeki ve medial septal nöronlarda ve hipokampal nöronların bir kısmında GABA<sub>A</sub>'nın baskılayıcı etkisini artırdığı bilinir (35).

Kronik etanol alımı sonucunda GABA<sub>A</sub> reseptöründe reseptör alt birimlerinin gen ifadesinde azalmaya bağlı olarak zamanla bir aşağı-ayarlama (down regulation) olduğu düşünülmektedir (18, 82).

NMDA reseptör aktivasyonu, stimüle edici özelliğe sahiptir. Bu mekanizmanın etanol yoksunluk krizi döneminde ortaya çıkan eksitatör belirtilerden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (144). Deney hayvanlarında nitrik oksit sentaz enzimini bloke ederek NO etkinliğini azaltan ajanların etanol yoksunluk sendromu belirtilerini hafifletici etkilerinin NO prekürsörü L-arginin verilmesi ile önlenmesi (142) ve etanol yoksunluğundaki sıçanlarda striatum ve hipokampus gibi önemli beyin bölgelerinde cAMP konsantrasyonlarının yüksek bulunması da (141) bu görüşü destekler niteliktedir.



**Şekil 2.4:** Etanol maruziyetine bağlı, nöranal mekanizmalar (44).

Etanol ile hasarın oluştuğu diğer sistemler;

1. Glutamat, NMDA reseptörü, ve kalsiyum kanalları,
2. Mono aminerjik norotransmitter sistemi ve
3. Nörohormon ve noropeptit sistemi dir.

### **2.3. Etanolün oluşturduğu beyin hasarının ölçümünde kullanılan yöntemler**

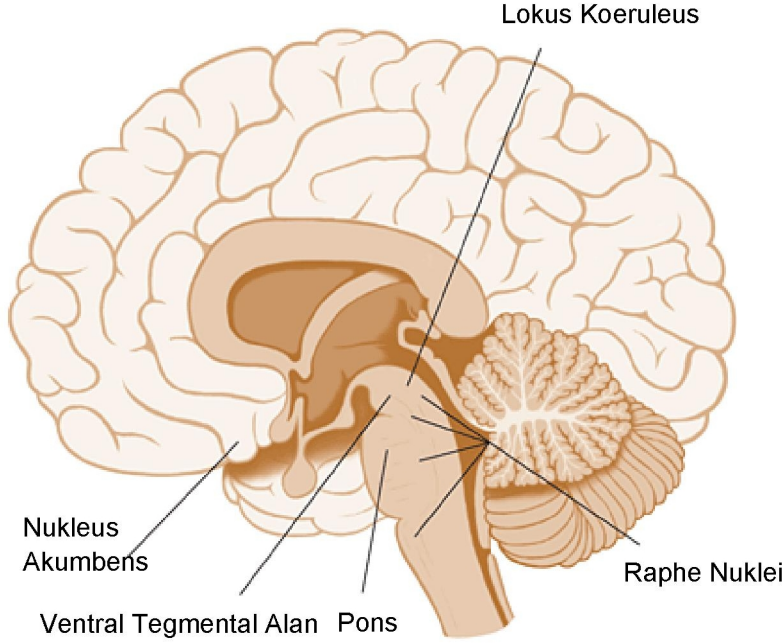
Araştırmacılar etanolün beyinde oluşturduğu hasarı anlayabilmek ve tanımlayabilmek için manyetik rezonans görüntüleyici (MRI), difüzyon tensor görüntüleme (DTI), pozitron emisyon tomografisi (PET) ve elektrofizyolojik beyin haritası gibi cihaz ve teknikler kullanmaktadırlar. Bu cihazlar beyin içerisinde etanolün nasıl etki yaptığı ile alakalı değerli bilgiler vermektedirler.

Uzun süreli ağır içicilik beyin atrofisine sebep olmakta ve beyin hücreleri (gri madde) arasında bilgi alışverişini sağlayan beyaz maddede hasara sebep olmaktadır. MRI ve DTI birlikte ağır içicilerin içkiyi bıraktıkları ilk andan itibaren ve içki bırakıldıktan sonraki uzun bir periyottan muhtemel bir geriye dönüş olup olmayacağı incelemek için kullanılmaktadır (119). Hafıza oluşumu ve geri kazanımı dikkat ve motivasyon gibi faktörlerden önemli derecede etkilenebilir. (70).

MRI kullanılarak yapılan çalışmalar araştırmacılara hafıza ve dikkatin uzun süreli etanol yoksunluğu yaşayan hastalarda ve hasta tekrar etanole başladığında nasıl düzeldiği hakkında bilgi vererek yardımcı olmaktadır. Bu çalışmaların ana amacı ise içki bırakılığında, etanolla indüklenen beyin hasarında hangi hasarların kalıcı, hangilerinin geri dönüşümlü olabileceği konusunda bilgi vermektir.

PET görüntülemesi canlı beyinde ağır etanol tüketimi sonunda oluşabilecek beyin hasarı hakkında bilgi vermektedir (156). Bu beyin fonksiyonlarının “enstantane” si çeşitli sinir hücreleri arasındaki iletim sistemine (örn: nörotransmitter sistem) etanolün nasıl bir etki yaptığı, beyin hücre metabolizması ve beyindeki kan akımı hakkında bilgi almamızı mümkün kılmaktadır. Bu çalışmalar ile alkoliklerdeki özellikle öğrenme ve hafıza ile ilgili olan frontal lobta; hareket ve koordinasyon ile alakalı serebellumda oluşan hasarlar ortaya konulmuştur. PET etanol tedavisi ve yoksunluğunda hasarlı bölgelerinin monitorizasyonunda ve etanol bağımlılığı olan hastalarda kimyasal bozukluklar

için yeni ilaç geliştirmede kullanılabilecek bir tekniktir. Diğeri bir cihaz ise, beyin elektrik sinyallerini kaydeden elektroensefalografidir (EEG) (107).



**şekil 2.5:** Etanol/ nikotin bağımlılığına ve psikiyatrik bozukluklarına katılan beyin bölümleri.

#### **2.4. Etanol Bağımlılığı ve Kronik Etanol Zehirlenmesi**

Diğeri bağımlılık tiplerinden farklı olarak etanol bağımlılığında karaciğeri, beyin, myokard ve çizgili kaslarda anatomopatolojik bozukluklar da gelişir. Bu nedenle etanol bağımlılığı aynı zamanda kronik etanol zehirlenmesidir.

Alkoliklerde; etanolle ilgili semptomlar, kalıtım kalıbı ve kişilik yapısı bakımından iki alt-grup ayırt edilmiştir (22). Bunlar tip 1 ve tip 2 alkolizm diye adlandırılmıştır;

**Tip 1 bağımlılık:** Kişide devamlı etanol arama davranışı vardır; alkolik olmaktan suçluluk ve korku duymalarına rağmen içerler; antisosyal değildirler,

olaya ve şiddete genellikle neden olmazlar.

**Tip 2 etanol bağımlılığı:** Daha çok gençlerde görülür ve genellikle 25 yaştan önce başlar; bu tür bağımlılar etanolden uzun süre uzak durabilirler fakat bir kez başladılar mı aşırı miktarda alırlar.

Alkolik aşağıdaki dört nedenden dolayı tıbbi sorun oluşturur:

- (i) Kronik toksik belirtiler
- (ii) Akut etanol intoksikasyonu
- (iii) Etanol yoksunluğu sendromu
- (iv) Etanol etkisi altında kaza yapma

Alkolizme eşlik eden kronik organik toksik belirtiler genellikle etanolün hücreler üzerindeki direkt toksik etkisine bağlıdır.

## **2.5. Etanol Ve Madde Kullanımında Erken Tanının Önemi**

Madde kullanımının bağımlılığa dönüşme sınırının çok iyi fark edilmesi ve müdahale edilmesi gerekmektedir. Kişide zararlı etanol kullanımının bulunduğunu gösterir belirtiler iyi bir şekilde tespit edilmeli ve erken müdahale edilmelidir. Fiziksel zararlara rağmen içmeye devam etmek, Sarhoş oluncaya kadar içmek, hızlı içmek, işe ve sorumluluklarına geç kalmak, alkollü araç kullanmak, yalnız başına içmek, kesmek ya da azaltmak gerektiğini düşünmek, eleştirilere öfkelenmek ve suçluluk duygularını etanol alımı ile ilgili yaşamak gibi göstergeler kronik etanol bağımlılığın temel gösterimleri sayılabilmektedir (121).

Etanol her ne kadar sigara kadar taşınabilirliği olmasa da, toplum için, özellikle genç popülasyonda ciddi bir problem teşkil etmektedir. Etanol alımında ilk etki davranışsaldır. Aşırı hareketlilik ve abartılı neşe hali meydana gelir. Daha sonra, konuşma bozukluğu, solunum zorlanması gibi aşamalar seyreder. Bunların dışında kronik dönemde mide koruyucu duvarının zedelenmesi, mide barsak sisteminin bozulması, erkeklik hormonunu baskılayarak impotense sebep olması

gibi daha pek çok sayılabilecek zararlara sebep olabilir (34, 91).

Etanol farklı mekanizmalarla çeşitli hematolojik ve biyokimyasal değişikliklere (mesela; gamma glutamil transferaz-GGT ve MCV artışı) neden olmaktadır. Deneysel ve klinik bilgiler göstermiştir ki; etanol intoksikasyonu esnasında fibrinojende artış olurken etanol kesildiğinde ise fibrinojen düzeyi normale dönmektedir (2).

**Tablo 2.2:** Etanol kullanımında, kötüye kullanımında ve muhtemel bağımlığa yatkınlıkta biyokimyasal markörlere örnekler (69).

|                      |                                                                                                                                                                 |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Akut biyomarkörler   | Etanol<br>5-Hidroksitriptofol (5HTOL)<br>Etil glukuronat (EtG)<br>Etil Sülfat (EtS)<br>Yağ asiti etil esterleri (FAEE)                                          |
| Durum biyomarkörleri | gama-glutamil transfereraz (GGT)<br>Alanin aminotransferaz (ALT)<br>Aspartat aminotransferaz (AST)<br>Ortalama kan küresi hacmi (MCV)<br>Fosfatdiletanol (Peth) |
| Özgün biyomarkörler  | Monoamino oksidaz (MAO)<br>Adenilil siklaz (AC)<br>Nöropeptit Y (NPY)                                                                                           |

## 2.6. Rakamlarla Etanol

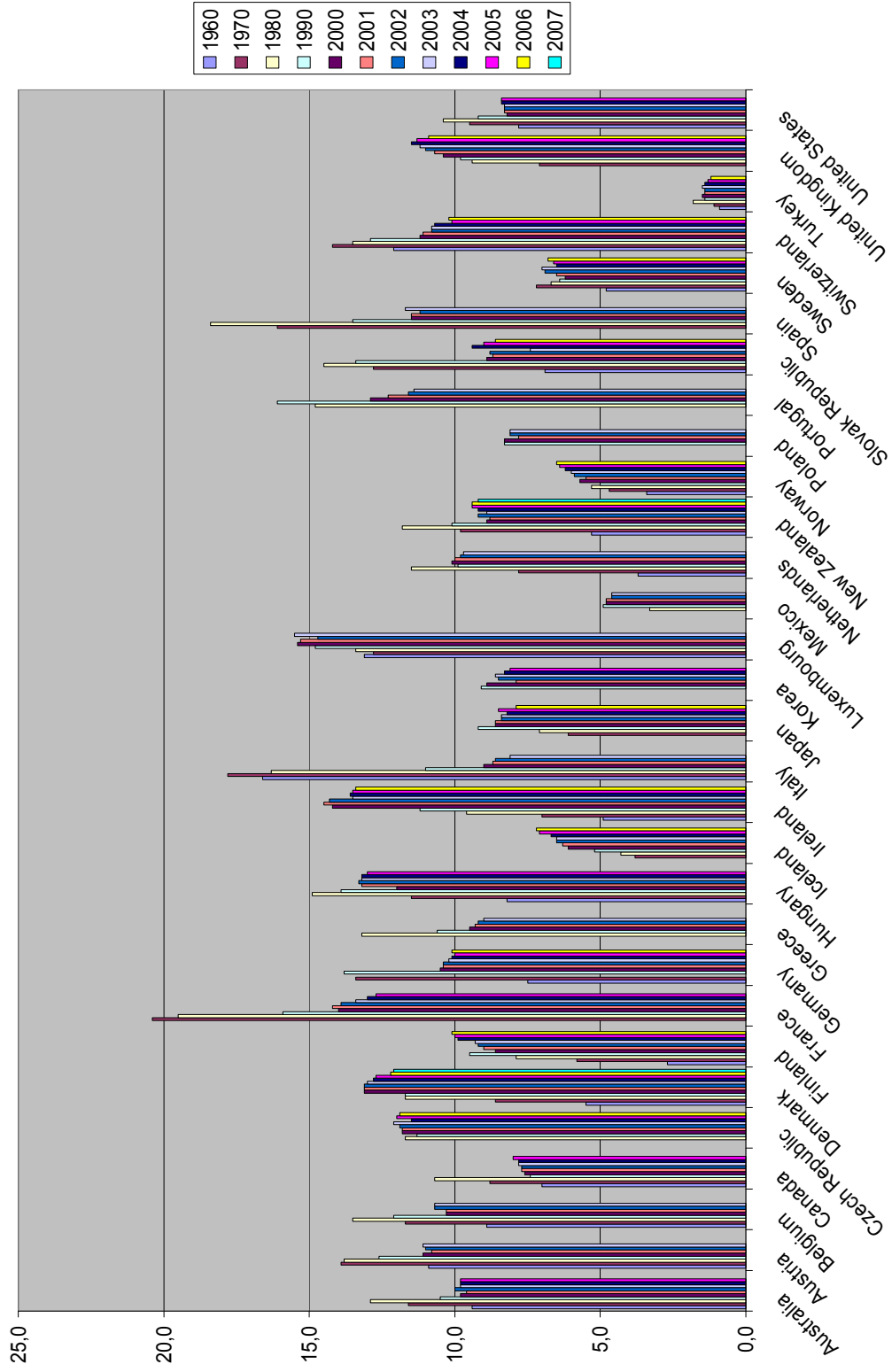
1999 yılında, 12 yaş ve üzeri 10.3 milyon insan (%4.7 Amerikan nüfusunu kapsamaktadır) etanol ve madde bağımlısı olarak bildirilmiştir (59). 1998 yılında 19.000 kişinin hayatını etanole bağımlı sebeplerden dolayı kaybettiği açıklanmış (87) 1993 yılında ise 13.984 insanın etanole bağlı araç kazalarından dolayı öldüğü bildirilmiştir (56). 1992 senesinde etanol ve ilaç bağımlılığının ekonomik tutarı ise 246 milyon \$ olarak kayıtlara geçmesi ve 1995 senesinde bu rakamın

276 milyon \$ olarak verilmesi kaybın ne kadar ciddi boyutlarda olduğunu göstermektedir (51).

Avrupalılar Dünyanın en çok etanol tüketen insanları olarak bilinmektedirler. Ağır içicilik özellikle Kuzey Avrupalıların kültürlerinin bir parçası haline gelmiştir. Avrupa topluluğunun 25 üyesi içerisinde öğrencilerin 15-16 yaş arasında olanların % 90 civarı hayatlarının bir noktasında etanol kullanmışlardır. Bu durum Amerika Birleşik Devletlerinde bildirilenden oldukça fazla bir miktardır.

Kopenhag üniversitesinde yapılan bir çalışmada Ortalama olarak içmeye 12 yaşında başlamaktadırlar ve ilk sarhoş olma zamanları ise 14 yaşındadır. 15 yaşındaki gençlerden erkeklerin % 50'si kızların ise % 37'si her hafta içmektedir.

2007'de yayımlanan bir raporda İrlanda'da içki tüketiminin geçtiğimiz 11 yıla göre % 17 oranında artış göstermiştir. Bu da etanole bağlı hastalık ve ölümleri arttırmaktadır. Buna göre 1.775 ölüm sayısında artış gözlemlenmiştir.



Şekil 2.6: 1960-2007 yılları arasında 15 yaş üzeri kişi başına düşen etanol tüketim miktarları (63).

## 2.7. Oksidan-Antioksidan Kavramı

Reaktif serbest oksijen radikalleri fizyolojik olarak meydana gelebilmekte ve toksisiteye sebep olabilmektedirler. Bu serbest radikaller içinde, hidroksil radikalleri pek çok biyolojik molekül ile etkileşime girebilecek potansiyele sahiptir. Bunların içerisinde hidroksil radikalleri pekçok biyolojik molekül ile reaksiyona girebilecek kapasiteye sahiptir. Bu gruba lipoperoksitler ve hücre membranındaki bozulmalar da dahil edilebilir. Lipid perosidasyonu bu yüzden serbest radikal mekanizması sonucu oluşan hücre hasarında esas belirleyici faktör olabilmektedir. Buna rağmen, hücrelerde bu toksik saldırıya karşı bir antioksidan savunma mekanizması bulunmaktadır (46). Bu mekanizma düşük molekül ağırlıklı bileşiklerden (glutatyon, tokoferoller, vitamin E gibi) kompleks yapılı bileşiklere (superoksit dismutaz (SOD), katalaz gibi) kadar uzanmaktadır. hücresel prooksidan / antioksidan dengesini bozabilecek herhangi bir faktör oksidatif strese sebep olabilmektedir (90, 128).

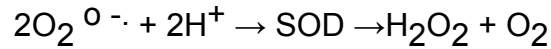
Yapılarında bulundurdıkları uyarılmış elektronlar nedeniyle, kolayca elektron alışverişi yaparak etkileşime girdikleri moleküllerin yapısını bozan moleküller 'serbest radikaller' adı ile adlandırılırlar. Bu serbest radikaller içerisinde ise sıkça karşılaştığımız, moleküler oksijen üzerindeki değişiklikler ile meydana gelen serbest oksijen radikalleri veya diğer adıyla "reaktif oksijen türevleri"dir. Radikal oluşuktan sonra tek elektronunu başka bir moleküle verebilir (redükler), başka bir molekülden elektron alıp çift hale gelebilir (oksitler); ya da radikal olmayan bir yapıya eklenebilir; her durumda sonuçta nonradikal yapı radikal hale gelmektedir (11).

Serbest radikaller; oksijen türevi (süperoksit radikali, peroksinitrit radikali, hidroksil radikali vb.), karbon türevi (karbon tetraklorür, aromatik hidrokarbonlar) veya sülfür türevi (glutatyon radikali) olarak sınıflandırılabilirler.

1. Hücrede oluşan radikallerin detoksifikasyonu başlıca enzimattir. Enzimatik antioksidanlar aktif merkezlerinde bakır, çinko, mangan, demir, selenyum gibi metaller içerirler. Antioksidan savunmanın önemli bir kesimini süperoksit ve

hidrojen peroksiti temizleyen spesifik enzimler oluşturur. Bunların başlıcaları olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) sayılabilir (10).

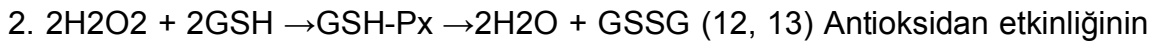
SOD, süperoksitin hidrojen peroksit'e dismutasyonunu katalize eden bir metalloenzimdir:



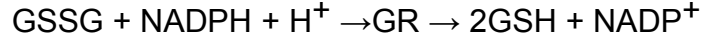
İnsan vücudunda 3 farklı SOD enzimi bulunur

- a. Sitozolik SOD bir bakır-çinko enzimidir.
- b. CuZnSOD vasküler endotele bağlıdır ve ekstraselüler SOD olarak adlandırılır. CuZnSOD'un aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur (47).
- c. Mitokondrial SOD ise mangan içerir. Mn formu, mitokondrial matriks dışında kısmen sitoplazmada da fonksiyon gösterebilir (84).
- d. Katalaz, konsantrasyonu değişmekle birlikte bütün hücre tiplerinde bulunan bir enzimdir. Sitozolde ve daha çok peroksisomlarda lokalizedir. Ekstraselüler mesafede ya çok az bulunur ya da hiç bulunmaz. *Katalaz*, kendisi radikal olmasa da en reaktif ROT olarak kabul edilen hidroksil radikalinin öncüsü olan, hidrojen peroksit moleküllerinin suya redüksiyonunu sağladığı için önemlidir. Hidrojen peroksiti, düşük oluşum hızlarında peroksidatik reaksiyonla, yüksek oluşum hızlarında ise katalitik reaksiyonla suya dönüştürerek temizler (11, 129).

GSH-Px de  $H_2O_2$ 'yi katalitik reaksiyonla redükte eder. Bu reaksiyonda redükte glutatyon (GSH) işleme girerek okside glutatyona (glutatyon disülfid; GSSG) dönüşür:



devam edebilmesi için okside glutatyonun tekrar indirgenmesi gereklidir; bu işlem NADPH bağımlı bir enzim olan glutatyon redüktaz (GR) tarafından yerine getirilir:



3. NADPH'ın rejenerasyonu için ise glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G-6-PDH) enzimi gereklidir. Sonuçta hücre içi savunmada glutatyon, GR ve G-6-PDH'in da rolü vardır (11, 129).

NO organizmada L-Arjininden NO Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenen yarı ömrü 10–20 saniye olan renksiz inorganik bir gazdır. NO sentezlendikten sonra depolanmaksızın dokulara difüzyon yoluyla dağılır (102). NO ilk kez endotel hücrelerinden salınan düz kas gevşetici özelliği olan bir molekül olarak tanımlanmıştır. Endotelden kaynaklanan bu maddeye Endothelial Derived Relaxing Factor (EDRF) adını verilmiştir. NOS enzimi L-arginin amino asitini, O<sub>2</sub> ve nikotinamid adeninin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanarak sitrüllin oluştururken NO da ortaya çıkar. Flavin adenin mononükleotid (FAM), flavin adenin dinükleotid (FAD), tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) ve kalmodulin kofaktörlerdir (10, 72).

NO'in radikal özelliği oksidatif hasar için yeterli değildir. NO; O<sub>2</sub>, süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ile etkileşerek NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrit), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrat) ve ONOO<sup>-</sup> (nitrojen peroksit, peroksinitrit) oluşturabilir. Bu reaksiyonlarla oluşan ONOO<sup>-</sup> NO'den daha reaktif olan bir ara üründür. NO, ROT'ları ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturarak hasar yaratabilir. *Peroksinitritler*, karbonhidrat, sülfhidril, lipid ve DNA bazları ile etkileşerek onları okside edebilir. Bu arada ONOO<sup>-</sup>, toksisitesi sayesinde bakterilerin ölmesini de sağlar. Aynı zamanda NO; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup> gibi reaktif oksijen türevleri ile kısa sürede reaksiyona

girerek antioksidan etki gösterip hücreleri oksidatif hasara karşı da korur (100).

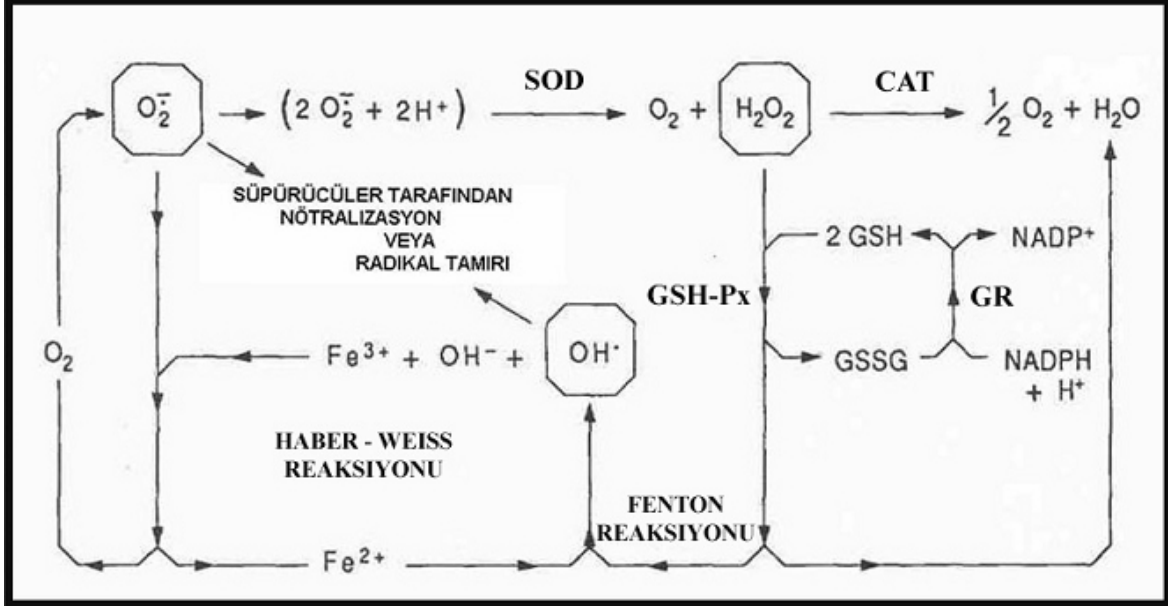
NOS'un 3 farklı izoformu vardır (118, 120).

Endotelial NOS (eNOS) : Başlıca endotel hücrelerinde bulunur damar endotelinden bazal NO salgısından sorumludur. Hücre içi  $Ca^{+2}$  artışına bağımlı olarak aktivite gösterir. Daha çok kan basıncı üzerindeki etkileri ön plandadır.

Nöronal NOS (nNOS) : İlk olarak nöronlarda gösterilmiştir, yapısal olarak bulunur ve  $Ca^{+2}$  bağımlıdır.

İndüklenebilir NOS (iNOS) : Özellikle makrofajlarda lokalizedir. Yapısal olarak bulunmaz,  $Ca^{+2}$  bağımlı değildir. Yapımı için zaman gerekli olup diğer NOS izoformlarından çok daha fazla NO sentezler.

## 2.8. Reaktif Oksijen Türevlerinin Oluşumu



**Şekil 2.7:** Reaktif Oksijen Türevlerinin Oluşumu ve Organizmanın Buna Oksidan Cevabı. Bu cevapta, organizmanın endojen antioksidan enzimleri olan, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) etkin rol oynamaktadır (137).

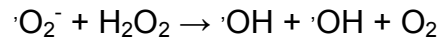
Oksijen molekülü tetravalan indirgenme (yani her iki oksijen atomundan gelen dört eşleşmemiş elektronun da indirgenmesi) sırasında çeşitli reaktif türevlere yönlenebilmektedir. Oluşan bu türevler de daha sonra biyolojik sistemlerde hasara yol açabilmektedir (47, 10).

Bu şekilde oluşabilen başlıca ROT, süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikalidir ( $OH^\cdot$ ). Bu reaksiyonlar ile oluşabilecek radikallerin önüne geçebilmek için çeşitli oksidatif enzimler gelişmiştir; bu enzimler reaktif oksijen türevlerinin yaşayan organizmaya zarar oluşturabilecek miktarlarda oluşmasını engellerler. Hücresel metabolizma sırasında dar sınırlarda oluşan reaktif oksijen türevleri bu savunma sistemleri yoluyla etkisiz hale getirilmektedir (47, 69).

Doğal  $O_2$  molekülünün, çevresindeki herhangi bir molekülden bir elektron

almasıyla süperoksit molekülü oluşur. Eşleşmemiş bir elektron içeren süperoksit bütün radikaller gibi kararlı hale geçmeye, yani eşleşmemiş elektronundan kurtulmaya çalışır. Süperoksit, bir serbest radikal olduğu halde çok toksik değildir. Asıl etkisini daha güçlü reaktif oksijen metabolitlerinin açığa çıkmasına yol açarak gösterir. Doğal O<sub>2</sub>, çevresindeki moleküllerden 2 elektron aldığı anda veya süperoksit molekülüne bir elektron eklendiğinde ise peroksit molekülü oluşur. Peroksit molekülünün 2 H<sup>+</sup> atomu ile birleşmesi sonucunda da hidrojen peroksit meydana gelir (47, 69).

Oksijen molekülünün yalnızca bir atomu bir H<sup>+</sup> iyonu ile birleşecek olursa en reaktif, yani en toksik radikal olarak kabul edilen hidroksil radikali meydana gelir. Süperoksit ve ondan oluşan hidrojen peroksitin hidroksil radikalini meydana getirmesi, demir veya bakırın katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonu ile olur. Bu reaksiyon iki basamaklıdır: Birinci basamak ferrik (Fe<sup>+3</sup>) veya kuprik (Cu<sup>+2</sup>) iyonların süperoksit tarafından redüksiyonu, ikinci basamak ise redükte metal iyonlarının (ferröz veya kupröz, Fe<sup>+2</sup> veya Cu<sup>+1</sup>) hidrojen peroksit ile reaksiyona girmeleri ve hidroksil radikalini oluşturmalarıdır (reaksiyonun bu ikinci basamağına Fenton tepkimesi de denir). Bu durumda net Haber-Weiss reaksiyonu şu şekilde gerçekleşmiş olur:

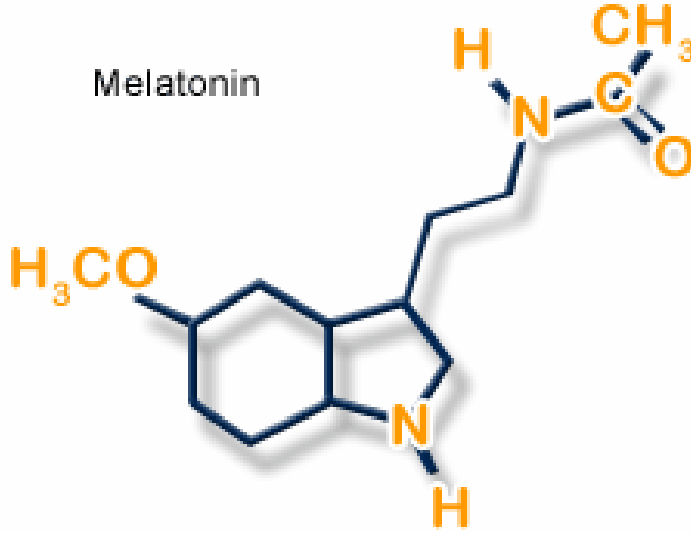


Hidroksil radikali en kısa ömürlü, ancak buna karşılık en reaktif serbest oksijen radikalidir.

## 2.9. Melatonin

Melatoninin antioksidan bir özelliğinin olduğu ilk kez 1991 yılında Lanas ve arkadaşları tarafından bahsedilmiştir (73). Daha sonra yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar bu görüşü desteklemiştir. Melatonin antioksidan etkisini üç şekilde gösterir.

- Direkt antioksidan etki
- Antioksidan enzim aracılı etki
- Prooksidan enzim aracılı etki



**Şekil 2.8:** Melatonin kimyasal yapısı. Asetil ve metoksi grupları, melatoninin antioksidan özelliğinden sorumlu tutulmaktadır (114).

Yapısında bulunan metil grubu molekülün yüksek stabilitesini sağlarken, yan zincirindeki asetil grubu ise molekülün hidroksil radikali yakalayıcı özelliğini sağlar. Yapılan in vitro bir çalışmada melatonin hidroksil radikalini glutatyondan 5 kat, mannitolden 15 kat ve peroksit radikalini nötralize etme özelliğinin E vitamininden 2 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir (135).

Melatonin; askorbat, alfa-tokoferol ve glutasyon gibi zincir reaksiyonlarını kırabilen diğer antioksidanlardan farklı olarak peroksi radikalini yakalayarak reaksiyonu sonlandırabilmektedir (49). İskemi-reperfüzyon durumlarında serbest radikaller aracılığı ile oluşan lipid peroksidasyonun ve nötrofil infiltrasyonunun melatonin verilerek önemli ölçüde azaltıldığı saptanmıştır (28).

Organizmanın başlıca antioksidan enzimleri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve GSH-Px'dir. Melatonin bu enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırarak oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (5). Melatoninin direkt antioksidan etkisi reseptör bağımsız olmasına rağmen antioksidan enzimler üzerindeki etkilerinin reseptör bağımlı olduğu düşünülmektedir.

Melatonin bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu azaltabilir. Melatoninin fizyolojik konsantrasyonlarında NOS enzimini inhibe ettiği bildirilmiş olup beyin iskemi-reperfüzyon modelinde de NOS inhibisyonuna bağlı düzeltici etkilerinin olabileceği öne sürülmüştür (43).

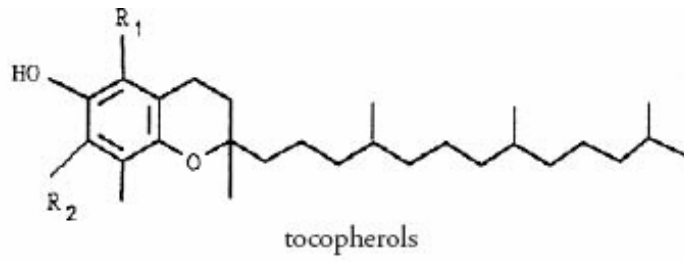
Melatonin, hem suda hem de lipitte çözünür olması, organizmada çok yaygın bir alanda antioksidan etki göstermesine neden olur. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçen melatonin için hiçbir fizyolojik bariyerin olmaması melatoninin tüm intrasellüler bölümlere kolaylıkla ulaşmasını sağlamaktadır. Böylece melatonin hücre zarını, çekirdeği ve organelleri serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Melatonin hücre membran fosfolipitlerinin polar fosfat bölümlerinin yanı sıra lipitlerin yüzey bölümlerinde de lokalize olabilmekte ve böylece radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eden bir kalkan görevi üstlenebilmektedir (37, 38).

**Antioksidan Etkileri:** Yapılan çalışmalarla, melatoninin serbest radikallerin yüksek etkinlikli bir süpürücüsü ve genel bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (106, 111, 113, 136). Melatoninin, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, hipoklorik asit (HOCl), süperoksit radikali, singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve peroksinitrit anyonu ( $ONOO^-$ ) veya peroksinitröz asit'in ( $OHOOH$ ) dâhil olduğu toksik oksijen ve nitrojen kökenli reaktif molekülleri direkt olarak etkisizleştirdiği düşünülmektedir (110). Ayrıca melatonin, glutatyon (GSH) benzeri diğer önemli intrasellüler antioksidanların sentezini stimüle ederek indirekt antioksidan etkilere de neden olduğu ortaya konmuştur. Melatonin, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazı (CAT) kapsayan diğer antioksidan enzimlerin işlevsel özelliklerini destekler.

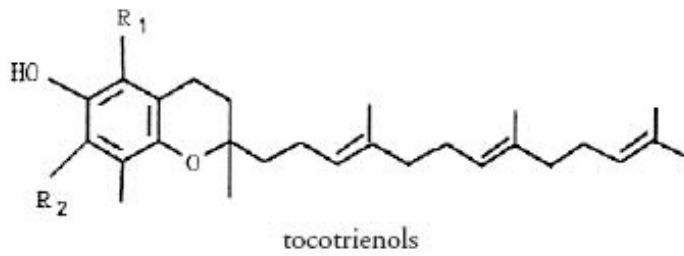
Melatonin aynı zamanda elektron kaçağını azaltmak suretiyle mitokondri içinde serbest radikal oluşumunu azaltarak ATP üretimini daha verimli hale getirir (110). Serbest radikal hasarı ile oluşan geniş bir hastalık grubuna ait deneysel modellerde, melatoninin koruyucu etkinliği ortaya konmuştur. Buna örnek olarak çeşitli dokularda (beyin, kalp, barsak, karaciğer, akciğer, mesane) oluşan iskemi-reperfüzyon hasarı, toksik ilaç maruziyeti, bakteriyel toksin maruziyeti, şistozomiasis, ağır metal toksisitesi, amiloid- $\beta$  protein maruziyeti (Alzheimer hastalığı modeli), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) maruziyetini (Parkinsonizm modeli) düzelttiği ortaya konmuştur (87). Melatonin aynı zamanda sepsiste ve geçici iskemi-reperfüzyonu olan yenidoğanlarda, bir tamamlayıcı tedavi olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bunun yanında, melatonin ile ultraviyole radyasyonu maruziyeti sonucu gelişen deri eritemi, demir ve eritropoetin uygulamasından kaynaklanan oksidatif stres ve tardiv diskinezide de iyi yönde sonuçlar alınmıştır (110). Melatonin insan ve hayvanlarda, fizyolojik ve farmakolojik miktarlarda uygulanmıştır ve toksik olmayan bir molekül olduğuna dair yaygın bir görüş birliği mevcuttur. Ayrıca melatonin, serbest radikal üretiminin bir sonucu olarak, toksik ilaçlar tarafından indüklenen doku hasarını sınırlar (113). Bu bilgilerden yola çıkarak, melatonin patolojik süreçlerdeki serbest radikal hasarına karşı insanlarda uzun yıllar kullanılmaya aday bir molekül olarak gösterilebilir.

## **2.10. E Vitamini**

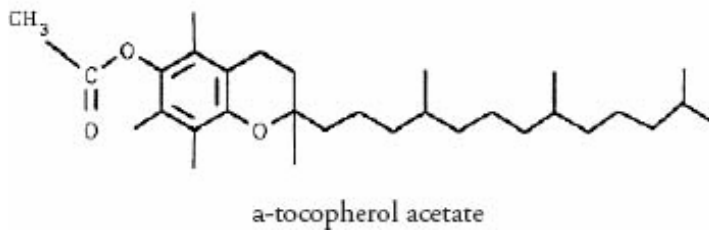
E vitamini ilk kez 1920'lerde Herbert Evance tarafından kimyasal yapısı tanımlanmış tokoferol yapısında yağda çözünen bir vitamindir (32). E vitamini ilk kez buğday çimlenme yerinden izole edilmiştir. Bu madde farelerde üreme fonksiyonlarında denenmiştir. Tokoferol'ün yunanca açılımı tokos: doğurma ve phero: taşımak, gebe olmak anlamlarına gelen sözcüklerden oluşmaktadır.



| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  |                     |
|-----------------|-----------------|---------------------|
| CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | α-tocopherol (α- T) |
| CH <sub>3</sub> | H               | β-tocopherol (β- T) |
| H               | CH <sub>3</sub> | γ-tocopherol (γ- T) |
| H               | H               | δ-tocopherol (δ- T) |



| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  |                                    |
|-----------------|-----------------|------------------------------------|
| CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | α-tocotrienol (α- T <sub>3</sub> ) |
| CH <sub>3</sub> | H               | β-tocotrienol (β- T <sub>3</sub> ) |
| H               | CH <sub>3</sub> | γ-tocotrienol (γ- T <sub>3</sub> ) |
| H               | H               | δ-tocotrienol (δ- T <sub>3</sub> ) |



**Şekil 2.9:** E-Vitami aktivitesine sahip ana yapılar

E vitamini aktivitesi gösteren 8 adet doğal tokoferol vardır. Alfa-tokoferol bunlar içinde en yaygın bulunanı ve en aktif olanıdır. Isıya dayanıklı olmasına rağmen yağda kızartmak ve derin dondurucuda dondurmak E vitamini yapısını bozabilir (31, 33).

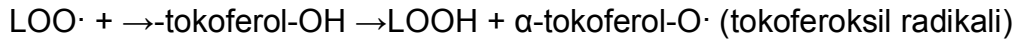
Buğday filizi, ayçiçeği tohumu ve ayçiçeği yağı, mısır, yerfıstığı, badem, pamuk yağı, keten tohumu ve soya yağı E vitamini için iyi bir kaynaktır. Alfa-tokoferolün günlük gereksinimi erkeklerde 10 mg kadınlarda 8 mg'dır. E vitamini görünüş olarak renksiz olup suda erimeyen bir yapıya sahiptir. Yağda, aseton, eter, etanol ve kloroformda çözünebilir. Havadaki oksijenle okside olarak rengi kırmızıya döner (14, 118).

Diyetle yağda çözünmüş olarak alınan E vitamini yağ sindirimi sırasında serbestleşir ve emilir. Emilmesi için safra ve pankreas salgısının normal olması lazımdır. Emilmesi için herhangi bir taşıyıcı sisteme gerek duyulmaz, pasif difüzyonla emilir. Kanda şilomikron yapısı içinde taşınır. Şilomikronlar, lipoprotein lipaz enzimi olan dokularda hidrolize edilirken mevcut E vitaminin bir kısmı dokulara geçer. E vitaminin bir bölümü şilomikron kalıntıları ile karaciğere ulaşır. Daha sonra hepatik VLDL içerisinde tekrar dolaşıma salınır ya da HDL'ye transfer edilir. E vitamini en çok LDL'de mevcuttur. Bir LDL molekülünde 6 tane alfa-tokoferol bulunur. E vitaminin depolanma yeri yağ dokusudur (1, 118).

Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma zarlarının fosfolipidleri,  $\alpha$ -tokoferole afinite gösterir. Bundan dolayı vitamin bu noktalarda yoğunlaşır. Böylece sellüler ve subsellüler zar fosfolipidlerinde bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı, ilk savunma hattı E vitamini tarafından sağlanmış olur. Bir molekül alfa-tokoferol 100 molekül çoklu doymamış yağ asitinin peroksidasyonunu engelleyebilir. Glutatyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikal etkisine karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. GSH-Px oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırır, E vitamini sentezlerini engeller. Ayrıca GSH-Px'ın yapısına katılan  $\text{Se}^{+2}$  'un organizmadan kaybını önler ve enzimi aktif şekilde tutar (65).

E vitaminin yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır.

Vitamin E  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ , singlet oksijen, lipid peroksil ( $LOO^{\cdot}$ ) radikallerini ve diğerk radikalleri nötralize edebilir. Lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Lipid peroksi radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir: sonuçta oluşan tokoferoksil radikali ( $\alpha$ -tokoferol- $O^{\cdot}$ ) stabildir ve kendi kendine lipid peroksidasyonu başlatmak için yeterince reaktif değildir. Glukronik asitle oksidasyona uğrayarak safra yolu ile atılır (65).

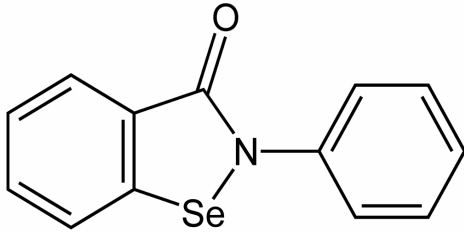


E vitamini okside olduktan serbest radikal haline dönüşmektedir. Radikal E vitamini membran yüzeyine doğru yükselerek C vitamini ile reaksiyona girmektedir. C vitamini, radikal E vitaminine bir elektron vererek E vitaminini indirgemekte böylece E vitamini radikal özelliğini yitirerek tekrar işlev kazanmaktadır. Bu işlem glutatyon vasıtasıyla da olabilmektedir (65).



### 2.11. Ebselen

Ebselen yada diğerk adı ile 2-fenil-1,2 benzisoselenazol-3(2H)-on (PZ 51 veya DR 3305 olarakta adlandırılır) glutatyon peroksidazı taklit eder ve aynı zamanda peroksinitrit ile reaksiyona girebilir (103, 124). Reperfüzyon hasarı ve strok tedavisinde muhtemel tedavi yöntemi olarak araştırılmaktadır (103, 161).



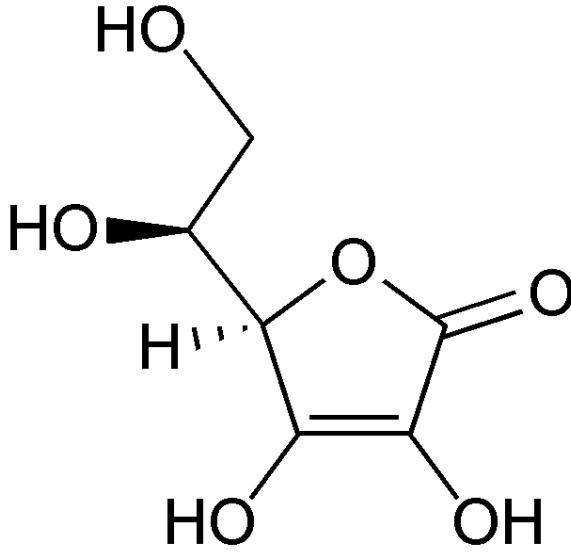
**Şekil 2.10::** Ebselen molekül yapısı.

Ebselen başta antioksidan etki olmak üzere, sitoprotektif, nöroprotektif ve anti-inflamatuar gibi terapötik etkilere sahip bir maddedir (88). Çeşitli faktörlerle oluşan beyin hasarında reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile lipid peroksidasyona ve DNA hasarına yol açan iskemi/reperfüzyon ile oluşan hasarda oksidatif stresin büyük bir rol oynadığı bilinmektedir (20). Ebselen ilk olarak anti-inflamatuar bir ajan olarak geliştirilmiştir. Daha sonra antioksidan etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Bu etkiyi de glutatyon peroksidaz ve fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz taklidi yaparak gerçekleştirmektedir (25, 36, 81, 92).

Ebselenin oral formunun noroprotektif etkisi olduğu ve özellikle serebral iskemi modellerinde gri-madde hasarında ve özellikle faz klinik strok vakalarında etkili olduğu gösterilmiştir fakat optimal uygulama intravenöz olarak sağlandığından dolayı, kontrollü ve hızlı bir salınım için ebselenin yeni bir intravenöz formülü geliştirilmiştir.

## **2.12. C-Vitamini**

C vitamini, askorbik asit olarak da bilinir, suda eritilebilen ve birçok görevi olan bir vitamindir. Çoğu hayvanlar ve bitkiler, kendi C vitaminlerini glukozdan üretebilirler. İnsanlar, bazı meyve yarasaları, hint domuzu ve insan benzeri primatlar C vitamini üretmediklerinden bunu besinlerden almak zorundadırlar. Bu durum yaklaşık 40 milyon yıl önce mutasyon ile L-gulono-  $\gamma$ -lakton oksidaz enziminin inaktivasyonundan ileri gelmektedir (96).



**Şekil 2.11:** C-vitamini kimyasal yapısı

Bütün taze sebze, meyve ve etler bir miktar C vitamini içerir. Ancak C vitamini ısıya hassas olduğundan pişirme esnasında hızla bozulur. Askorbik asit üzerinde ilk bilimsel araştırmalar 1907'de Holst ve Frolich tarafından yapılan deneylerle başlar. Araştırmalarını sürdüren Holst ve Frolich birçok besin maddesinin ve bu arada özellikle yeşil sebze ve meyvelerin skorbüt hastalığını önleyici etkileri olduğunu bulmuşlardır. Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapıca glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Renksiz, beyaz, dikdörtgen kristallerdir. Çok hafif özel bir kokusu vardır. Ekşi tatlı ve asit reaksiyondadır. Optikçe aktiftir. Polarize ışığı sağa çevirir. Asetonda çok zor çözünür. Eter, petrol eteri, benzen, kloroform ve yağlarda çözünmez (96).

C vitamini (askorbik asit) omurilik, akciğer ve göz gibi pek çok hayvansal dokunun sulu bölümlerinde oldukça yüksek yoğunlukta (milimolar ve üstü) bulunur. Bazı meyveler yüzde 1'den fazla (~6 mM) içerebilir. İnsan kanı plazmasında normal olarak 0,1 mM düzeyinde bulunur. Çoğu organizma C vitaminini sentezleyebilmesine rağmen, insanlar dahil birkaçı onu diyetle almak zorundadırlar. Eneiol yapısından ötürü, hayli düşük bir ilk pKa sergiler (4,2 civarında) ve buna bağlı olarak da çoğu dokularda monoanyon olarak varolur.

3- pozisyonundaki hidrojen de, ki en asidik olanıdır, tek elektronlu oksidasyon reaksiyonlarında çıkarılan hidrojen atomudur (96).

C vitamininin kesin ölçümü hem onun biyokimyasal hem de farmakokinetik özellikleri için zorunludur. Biyolojik sistemlerde askorbik asidin rolü, C vitamininin in vivo fonksiyon ve gerekleri iki faktörle birlikte ele alınmalıdır:

- Birincisi, C vitamininin hem antioksidan hem de bir enzim kofaktörü olarak hareket etme yeteneği dahil biyokimyasal özellikleridir.
- İkincisi, bağırsakta emilmeyi, serum konsantrasyonunu, hücresel dağılımı, kullanım ve dışarı atılımını içeren farmakokinetiğidir.

Askorbik asit oksijen tutma özelliğine sahip olması nedeniyle antioksidan olarak kullanılır. Yağların ve yağlı besinlerin uzun süre saklanabilmesi, beyaz renkteki sebze ve meyvelerin kararmasının önlenmesi için kullanılır. Sadece tek yanlı zincir hidroksil grubunun konfigürasyonunda değişiklik gösteren sentetik izomer eritorbik asit de kuvvetli bir antioksidandır fakat tam tersine pek az vitamin aktivitesi vardır. Bundan başka askorbik asit birçok preparatlarında, besin ve içeceklerin vitamince zenginleştirilmesinde kullanılır. Askorbik asit kuvvetli bir indirgeyici ajandır; 280 mV'lık düşük bir redoks potansiyeline sahip olması onun hemen tüm diğer okside olan serbest radikallerle reaksiyona girme termodinamik potansiyelinin varolduğu anlamına gelir (96).

Demir ve bakır tuzlarının askorbattan  $H_2O_2$  ve hidroksil radikallerinin oluşumunu desteklediği iyi bilinir. Bu muhtemelen onun bazı koşullarda sitotoksik olabilmesi veya prooksidan olarak davranmasıyla ilgilidir (27). Askorbik asit tipik peroksil radikallerle suda tepkimeye girer (94); daha aktif triklorometilperoksil radikaliyle 100 kat daha hızlı tepkimeye girer (130). Askorbat molü başına yakalanan peroksil radikallerinin sayısı, düşük askorbat yoğunluklarında 2'den, yüksek askorbat yoğunluklarında 0'a kadar değişiklik gösterir (125). Bunun nedeni

yüksek askorbat seviyelerinde radikal yakalamayla rekabet eden kendi kendini sonlandıran reaksiyonlardır.

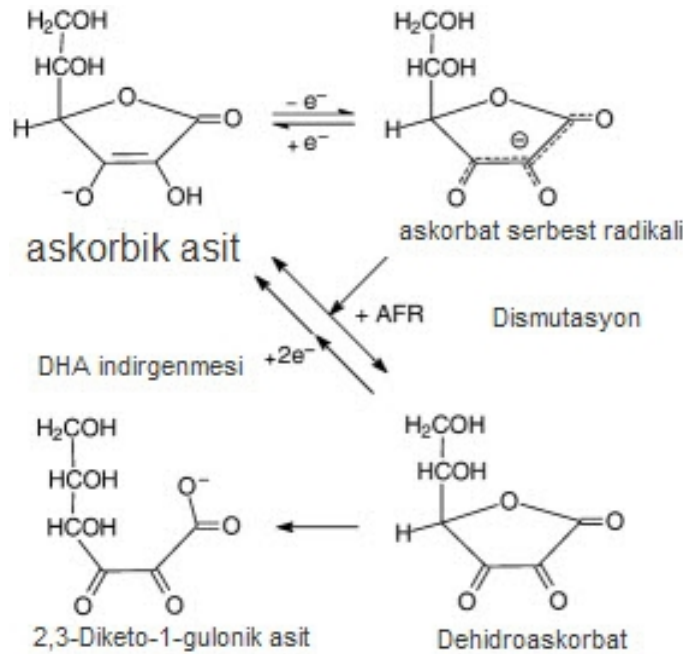
C vitaminin birincil absorpsiyon küçük barsağın distalinde aktif transport ile sodyum-bağlı Vitamin C taşıyıcı-tip 1 adı verilen bir askorbat taşıyıcısı ile gerçekleşmektedir (SVCT1, slc23a1'nin gen ürünü) (138). Bu taşıyıcı aynı zamanda renal proksimal tübüllerde filtrelenmiş askorbatı reabsorbe etmek için de bulunmaktadır. Askorbat kanda 30-60  $\mu\text{M}$  oranında sirküle edilmesine rağmen bazı hücrelerde konsantrasyonu çok daha yüksektir. Bunun sebebi ise SVCT2 adı verilen (slc23a2'nin gen ürünü) tarafından sağlanan aktif transport olayına bağlıdır (138). SVCT2 vucutta beyin, karaciğer, akciğer, kardiyak ve iskelet kasları gibi pek çok dokuda bulunmaktadır (138). Askorbatın plazma konsantrasyonu absorpsiyonun saturasyonu, dokulara geri Emilimi böbrekte reabsorpsiyonun tamamlanamaması gibi nedenlerden ötürü 120  $\mu\text{M}$  ile sınırlıdır. Kadınlar için izin verilen günlük dozu 75 mg ve erkekler için ise 90 mg olarak belirlenmiştir. Belirtilen bu dozların üzerinde bir alım sonrasında (60 mg/gün) askorbat idrarda görülmeye başlar (76). Askorbat pek çok önemli enzim reaksiyonlarına katılmaktadır. Bunların başında norepinefrin, karnitin, kolesterol, amino asitler ve birkaç peptid hormonunun sentezi gelmektedir (24) Bu işlemlerin pek çoğunda askorbat dioksijenaz enzimleri katalizörlüğünde co-faktör olarak ve elektron donorü olarak görev almaktadır (6).

Ancak, askorbatın radikal türler ile oluşan akut ve kronik inflamasyondan hücrelerin ve dokuların korunmasını antioksidan özellikleri üzerine daha büyük bir ilgi vardır. Askorbat radikal türlerini direkt olarak nötralize eden bir antioksidandır. Askorbat hidrojen peroksit gibi sık meydana gelen hücresel antioksidanlar yerine, daha çok hidrojen peroksitin yıkım ürünleri ile reaksiyona girer (68). Oysa askorbat bu çeşit oksidanları süpürebilecekken, aynı zamanda serbest ferik ve kuprik iyonlara elektron donorlülüğü yaparak bunların redoks siklusunu arttırır ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına sebep olur (45, 68).

Hücrede mitokondrial oksijen metabolizması ile meydana gelen ana radikal superoksittir. Her ne kadar superoksiti süpürmede askorbatın istenilen konsantrasyonu 100  $\mu\text{M}$  ve daha üst seviyelerde olması istenilse de nükleuslu hücrelerde daha düşük milimolar düzeylerde bulunmaktadır (66). Askorbat yüksek intraselüler konsantrasyonuna bağlı olarak pro-oksidan olarak görev yapabildiği gibi protein, lipit ve DNA'nın oksidan hasardan korunmasında da rol yapabilmektedir (19). Askorbat aynı zamanda E vitaminin ve  $\alpha$ -tokoferolün radikal formundan döngüsünü sağlayabilmektedir (95).

### Askorbat kimyası

Askorbat 2 ve 3'üncü karbonunda peroksitler, superoksit ve azot tabanlı serbest radikalere hidrojen atomu vermek için paylaşılmış hidroksil gruplarına sahip olduğundan antioksidan özellik gösterebilmektedir (17). Askorbat oksidasyonu geri dönüşümlüdür ve okside formlarından geri kazanılabilir.



**Şekil 2.12:** Askorbatın kimyasal süreci

Askorbat dioksijenaz enzimlerinde radikal türleri süpürmede ve ferrik demiri indirgemede tek-elektron donörüdür. Askorbatın tek-elektron oksidize formu,

genellikle Askorbat Serbet Radikali (AFR) olarak adlandırılır, şaşırtıcı olarak stabildir ve 10 nM konsantrasyonda biyolojik materyalde elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi ile tespit edilebilmektedir (16, 23, 86). DHA fizyolojik pH'da stabil değildir ve 6 dakikalık yarılanma ömrüne sahiptir (155). DHA'daki halkanın açılması sonucu vitamin bozulmakta ve hücreler DHA'yı askorbata çevirmek için normalden fazla mekanizma geliştirmişlerdir.

### **2.13. Proantosianidin**

Proantosianidin (diğer adları ile prosianidin oligometrik proantosianidin (OPC), piknogenol, leukosianidin, veya yoğun tannin) flavanollerin bir grubu olarak bilinmektedirler. proantosianidinler kateşinler gibi flavanoidlerin esansiyel polimer zincirleridir (61). İlk olarak 1936 yılında Profesör Jacques Masquelier tarafından bulunmuş ve Vitamin P adıyla adlandırılmıştır. Bu isimlendirme resmi kategori sınıfına girmediğinden dolayı zaman içerisinde kullanım dışı kalmıştır. Belli bitkilerden bu maddenin ilk ekstraksiyonunu da Masquelier gerçekleştirmiştir.

Avrupada 1980'li yıllardan beri satışı bulunan proantosianidinler tedavi desteği ve gıda ürünü olarak satılmaktadır. proantosianidinler başta elma, üzüm çekirdeği, kakao, tarçında bulunduğu gibi kırmızı şarap yapımında kullanılan Vitis vinifera'da yüksek miktarda bulunur. Yeşil ve siyah çay ve diğer bitkiler de aynı zamanda bu flavanoidleri içermektedir (41, 42, 160).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney hayvanları

Çalışmada deney hayvanları olarak yetişkin (3-4 aylık), erkek Wistar sıçanları kullanıldı. Sıçanlar 'basit rastgele örnekleme' yöntemiyle toplam 7 gruba ayrıldı:

**Sham Grubu (SM):** Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir uygulama yapılmadı. Bu grupta yapılan ölçümler ile bakılacak parametrelerin fizyolojik normal değerlerin saptanması hedeflenmiştir.

**Kontrol grubu (KG):** Bu gruptaki hayvanlara 21 günlük etanol bağımlılığı ile beyin hasarı oluşturulduktan herhangi bir tedavi uygulaması yapılmadı. Bu grupta yapılan ölçümler ile bakılacak parametrelerin fizyolojik normal değerlerin saptanması hedeflenmiştir.

**Melatonin grubu (MG) :** Bu gruptaki hayvanlara 21 günlük etanol bağımlılığı ile beyin hasarı oluşturulduktan sonra 4 mg/kg/gün oral gavaj ile melatonin etken maddesi uygulandı.

**Proantosianidin grubu (PG):** Bu gruptaki hayvanlara 21 günlük etanol bağımlılığı ile beyin hasarı oluşturulduktan sonra 100 mg/kg/gün oral gavaj ile melatonin etken maddesi uygulandı.

**C-vitamini grubu (CVG) :** Bu gruptaki hayvanlara 21 günlük etanol bağımlılığı ile beyin hasarı oluşturulduktan sonra 100 mg/kg/gün oral gavaj ile melatonin etken maddesi uygulandı.

**E-vitamini grubu (EVG) :** Bu gruptaki hayvanlara 21 günlük etanol bağımlılığı ile beyin hasarı oluşturulduktan sonra 100 mg/kg/gün oral gavaj ile melatonin etken maddesi uygulandı.

**Ebselen grubu (EG):** Bu gruptaki hayvanlara 21 günlük etanol bağımlılığı ile

beyin hasarı oluşturulduktan sonra 20 mg/kg/gün oral gavaj ile melatonin etken maddesi uygulandı.

Gruplardaki deneklerin doğum tarihleri arasında yaklaşık olarak 2 haftalık bir zaman vardı.

Yapılan tüm çalışmalar Helsinki Bildirgesi ve Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün 1996 yılında yayınladığı kitapta bulunan etik kurallar çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. İlave olarak Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Hayvan Araştırmalar Etik Kurulunda onay alınmıştır (Tarih: 20/02/2009; Karar No: 2009-09/20 K).

### **3.2. Laboratuvar**

Etanol bağımlılığı ile beyin hasarının oluşturulduğu deneyler 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık periyodunun sağlandığı (07:00 – 19:00, aydınlık), sıcaklığın  $22 \pm 2^{\circ} \text{C}$ , bağıl nemin ise  $\%60 \pm 5$ 'te sabit tutulduğu, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Psikofarmakoloji Araştırma Ünitesi'nde, kan etanol düzeyi ölçümü Toksikoloji Bilim Dalı laboratuvarında, antioksidan enzim aktivitesi ve beyin dokusunun homojenizasyonu işlemleri ise Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirmiştir.

### **3.3. Kimyasallar**

Etanol bağımlılığı modeli ile sıçan beyinde hasar oluşturabilmek için etanol (Sigma, % 96,5) daha önceden tanımlanan modifiye sıvı diyet tekniği ile (149) deney hayvanlarına verildi. Melatonin (Sigma), E-vitamini (Sigma), C-vitamini (Sigma), Proantosianidin (Sigma), Ebselen (Sigma), oral gavaj uygulaması ile etanol uygulamasında hemen sonra hayvanlara verildi.

### 3.4. Yapılan Testler ve Uygulanan Test Yöntemleri

#### 3.4.1. Kronik etanolik sıçan modelinin oluşturulması

Bu model Tıbbi Farmakoloji laboratuvarında geliştirilmiştir ve başarı ile kullanılmaktadır (122, 123, 150, 151, 145, 146, 147, 148, 149, 151, 152, 153). Önce sıçanlar kafeslere tek tek ayrılarak 1 hafta boyunca su yerine süt verildi. Takip eden haftanın ilk 3 gününde % 2.4 (v/v/), sonraki 4 gününde ise % 4.8 (v/v) etanol içeren sıvı diyet verildi. Takip eden 2 hafta boyunca ise sıçanlar % 7.2 (v/v) etanol içeren sıvı diyet aldılar. Modifiye sıvı diyet her sabah belirli bir saate hazırlanarak sıçanlara verildi. Bu esnada günlük diyet tüketim miktarı ve ağırlık ölçümü yapılarak etanol tüketim miktarı g/kg olarak hesaplandı.

**Tablo 3.1:** Kronik etanol uygulamasında kullanılan sıvı diyetin içeriği ve uygulama süreleri

| <b>UYGULAMA GÜNLERİ</b>         |                |                |                 |
|---------------------------------|----------------|----------------|-----------------|
|                                 | <b>Gün 1–3</b> | <b>Gün 4–7</b> | <b>Gün 8–21</b> |
| <b>Pastörize inek sütü (ml)</b> | 97,6           | 95,2           | 92,8            |
| <b>Şeker (g)</b>                | 10,9           | 5,8            | 0.7             |
| <b>Etanol (ml)</b>              | 2,4            | 4,8            | 7.2             |
| <b>Toplam enerji (KKal/L)</b>   | 1266           | 1266           | 1266            |

### 3.4.2. Biyokimyasal Analizler:

Oluşan lipid peroksidasyonu düzeyinin tayini için MDA, antioksidan cevabın derecesinin belirlenmesi için ise süperoksit radikale karşı oluşan SOD ve hidrojen peroksit ile savaşılan GSH-Px'in beyin dokusu düzeylerinin ölçümü yapıldı. Ayrıca kan etanol düzeyi ölçümü içinde Headspace metodu kullanılarak kan etanol konsantrasyonları (BEC) ölçüldü. Bu tetkiklere ait sonuçları sayısal olarak ifade edebilmek için, ek olarak doku protein düzeyleri de hesaplandı.

#### Beyin Homojenizasyonu

Tüm bu tetkiklerden önce, eldeki beyin dokularının analizleri için hazır hale getirilmesi gerektiğinden, dokular derin dondurucudan çıkarılarak çözünmesi sağlandıktan sonra 'fosfat tampon' ile  $\frac{1}{9}$  hacim oranında karıştırılarak Retsch marka "Mixer Mill MM 400" model homojenizatör ile homojenize edildi ve bir kısmı MDA bakılması için ayrıldı. GSH-Px ve SOD analizleri sırasıyla süpernatant ve ekstrede bakıldığından, elde edilen homojenizatların diğer kısmı, 700 devirde 10 dk santrifüj edilerek süpernatantlar, süpernatantlarında kloroform-etanol (3:5 oranında) karışımı ile santrifüjlerinden ekstratlar elde edildi. Fosfat tampon (50 mM); distile sudaki 6,8 g/l oranındaki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi üzerine pH 7,4 olana kadar yine distile suda 7,1 g/l oranında çözünmüş  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ilave edilerek hazırlandı.

#### Protein Ölçümü

Lowry'nin tarif ettiğİ yöntem kullanılmıştır (84). Protein ölçümleri; MDA için homojenatta, GSH-Px için süpernatanda, SOD için ise ekstrede ayrı ayrı yapıldı.

Protein ölçümü için; kimyasal bileşikler olarak  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{Sitrat}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOH}$  ve *Phenol-Folin-Ciocalteu* reaktifleri kullanıldı. Bunlar aşağıdaki oranlarda hazırlanarak A, B, C ve D reaktifleri hazırlandı.

**A reaktifi:** 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve 1 g  $\text{Na}_3\text{Sitrat}$  (susuz) 100 ml distile suda çözüldü.

**B reaktifi:** 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 4 g  $\text{NaOH}$ , 1 l distile suda çözüldü.

**C reaktifi:** 50 ml B çözeltisine, 1 ml A çözeltisi ilave edildi. A ve B reaktifleri hazırlandıktan sonra numune sayısına göre C reaktifi hemen taze olarak hazırlanıp bekletilmeden kullanıldı.

**D reaktifi:** *Phenol-Folin-Ciocalteu* reaktifi

Her numuneden 10 µl, distile sudan 490 µl, C reaktifinden 2500 µl alınarak 10 ml'lik cam tüplere alındı ve 10 dk beklendi. Kör tüpüne ise numune konulmayıp distile su ilave edildi. Daha sonra bunların üzerine 250 µl D reaktifi eklenerek vortekslendi. 20–30 dk oda ısısında inkübe edilerek her bir tüpten 300 µl *Elisa* kuyucuklarına pipetlenerek 700 nm'de köre karşı okundu.

### **Lipid Peroksidasyonu Düzeyinin Tayini**

Meydana gelen lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için MDA ölçümü yapılmıştır (48). Bu amaçla için %10'luk trikloro asetik asit (TCA) ve % 0,675'lik tiobarbitürik asit (TBA) kullanıldı. Vidalı kapaklı 10 ml'lik deney tüplerine 2,5 ml %10'luk TCA ve bunun üzerine 0,5 ml numune (homojenat) ilâve edilerek 3–5 sn vortekslendi. Tüpün ağzı kapatılarak 90°C'de 15 dakika inkübe edildi. Soğuk çeşme suyu ile soğutuldu. 3000 devirde 20 dk santrifüj edildi. Bu şekilde elde edilen süpernatantlardan 2 ml alınarak üzerlerine 1 ml %0,675'lik TBA eklendi ve tekrar vortekslendi. Tüplerin ağzı kapatılarak yeniden 90°C'de 15 dk inkübe edildi. Soğuk çeşme suyu ile soğutulduktan sonra 532 nm'de köre karşı okundu. Hesaplama, TBA-MDA kompleksinin ekstinksiyon katsayısından ( $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ) yararlanılarak mmol/g-prot cinsinden MDA değerleri hesaplandı.

### **Total Süperoksit Dismutaz Aktivitesi**

SOD aktivitesi, Sun ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntemle ölçüldü (134). Bu yöntem spektrofotometride 560 nm'de mavi renkli formazon oluşumunun belirlenmesi ilkesine dayanır. Bunun için ilk önce 0,3 mmol/L ksantin, 0,6 mmol/l EDTA, 150 µmol/l NBT, 400 mmol/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 1g/L *bovine serum albumin* (BSA) karışımından oluşan ölçüm reaktifi hazırlandı ve koyu renkli cam bir şişe içinde kullanılmak üzere depolandı.

Daha sonra ise, 0,8 mmol/l  $\text{CuCl}_2$ , 2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Amonyum sülfat) ve amonyum sülfat içinde 167 U/l ksantin oksidaz (XO) hazırlandı. Son olarak, homojenatlar 3220 devirde  $+6^\circ\text{C}$ 'de 30 dk santrifüj edilerek süpernatantları elde edildi. Süpernatantlar ile kloroform-etanol solusyonu cam tüplerde 1:1 oranında karıştırılarak vortekslendi ve 3220 devirde  $+4^\circ\text{C}$ 'de 40 dk santrifüj edilerek, elde edilen etanol fazından cam tüpler içine 50'şer  $\mu\text{l}$  konuldu. Bunların üzerine yine 1425  $\mu\text{l}$  ölçüm reaktifi ve 25  $\mu\text{l}$  167 U/l XO ilave edildi. Kör tüpüne ise etanol fazı yerine distile su ilave edilerek,  $25^\circ\text{C}$ 'de 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir numuneden 200  $\mu\text{l}$  *Elisa* kuyucuklarına alınarak üzerlerine 100  $\mu\text{l}$  0,08 mM/l  $\text{CuCl}_2$  eklenerek reaksiyon durduruldu ve distile suya karşı absorbans sıfırlanarak körden başlanarak numuneler 560 nm'de okundu. Bulunan absorbans değerleri aşağıdaki formüle konarak SOD aktivitesi hesaplandı (79):

$$[(K-N) / N] \times D \times 20 / E = \text{U/g-protein}$$

K: körün absorbansı

N: numune absorbansı

D: dilüsyon miktarı

E: ekstrakt protein miktarı (g/ml)

### **Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi**

GSH-Px enziminin aktivitesi, Paglia'nın tarif ettiği yöntem ile hesaplanmıştır (101). Yöntemde, GSH-Px tamponu (pH 7, 50 mM fosfat tamponu + 5 mM EDTA'lı), 3,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Amonyum Sülfat), 150 mM redükte glutasyon (GSH), 8 mM redükte NADPH, 1 M  $\text{NaN}_3$  (Sodyum Azid), GSH-Redüktaz enzimi ve 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  kullanıldı. Her numune için, cam tüplere aşağıdaki miktarlarda olmak üzere, dokulardan elde edilen süpernatant ve kimyasal madde konularak 30 dk oda ısısında inkübe edildi

**Tablo 3.2:** GSH-Px ölçümünde kullanılan maddeler ve miktarları

| KULLANILAN REAKTİF                        | MİKTAR (mL) |
|-------------------------------------------|-------------|
| Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM) 5 mM EDTA'lı | 2,65        |
| 150 mM redükte GSH                        | 0,10        |
| 8 mM NADPH                                | 0,10        |
| GSH-Redüktaz                              | 0,01        |
| 1 M NaN <sub>3</sub>                      | 0,01        |
| Numune (süpernatant)                      | 0,02        |

30 dakika oda ısısında inkübasyon sonunda her bir cam tüpteki numuneler 290 µl olmak üzere *Elisa* kuyucuklarına pipetlenerek, üzerlerine 10 µl 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi ve dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış *Elisa* okuyucuda numunelerin absorbans değerleri 5 dk boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının olduğu absorbans aralığının 1 dk'lık süresi esas alınarak hesap yapıldı. Değerler U/g-protein olarak ifade edildi.

#### **3.4.3. Gaz kromatografisi Alev İyonizasyon Dedektör (GC-FID) ile Kan Etanol Düzeylerinin ölçümü**

Kapiller kolon kullanılarak headspace ekstraksiyonu ile GC-FID'de kan etanol düzeyleri ölçümü yapıldı.

#### **Kimyasallar ve hazırlanışları**

- 10 µL etanol 10 mL distile suda çözüldü (0.1 %, v/v).
- 10 µL n-propanol 10 mL of distile suda çözüldü (0.1 %, v/v).
- 10 µL tert-butanol (internal standard, IS) 10 mL of distile suda çözüldü (0.1 %, v/v). Anılan tüm kimyasallar GC grade olarak kullanılmıştır.

**Tablo 3.3:** Headspace Etanol Ölçümü Isı ve Enjeksiyon Programı

|                           |                                                          |
|---------------------------|----------------------------------------------------------|
| Enjektör ısısı (°C)       | 70                                                       |
| Enjektör portu ısısı (°C) | 170                                                      |
| Ajitatör ısısı (°C)       | 70                                                       |
| Ajitatör hızı (rpm)       | 500                                                      |
| Enjeksiyon hızı(ml/sn)    | 0.1                                                      |
| <b>Gaz Kromatografisi</b> |                                                          |
| Fırın programı            | 40 °C→ 5 °C/dk→ 70 °C (5 dk)→ 20 °C/dk→ 280 °C           |
| Enjeksiyon türü           | Splitless                                                |
| Gaz akışı                 | 5 ml/dk                                                  |
| Gaz türü                  | Helyum (mobil faz)                                       |
| Enjeksiyon miktarı        | 1 ml                                                     |
| Kolon tipi                | TRB-1701 Teknokroma polar kolon (30m x 0.53 mm x 2.0 µm) |
| FID ısısı (°C)            | 290                                                      |

**Prosedür**

- Toplanan kan örnekleri daha önce % 3 florür içeren tüpler içinde +4 °C’de buzlodabında analiz süresine kadar saklandı.
- 0.5 mL tam kan numunesi 4 mL hacimli vialle alındı.
- 0.2 ml IS (İnternal standart) solüsyonu ve 0.2 ml distile su ilave edildi.
- Hava geçirmeyen bir septum konuldu ve vidalı kapak ile kapatıldı.
- Başka bir vialle (standart çözelti), 0.5 ml % 0.1’lik etanol çözeltisi, 0.2 ml IS

çözeltisi ve % 0.1'lik n-propanol konuldu.

- f. Hava geçirmeyen bir septum konuldu ve vidalı kapak ile kapatıldı.
- g. Her iki vialde karıştırıcı içinde bulunan termal ısı bloğu ile 55 °C'de 15 dakika ısıtıldı.
- h. Bu esnada otoenjektör de 70 °C ısıya çıkarıldı.
- i. Vial içerisindeki gaz 1 ml hacim olarak çekildi ve GC-FID enjeksiyonu yapıldı.

**Hesaplama:**

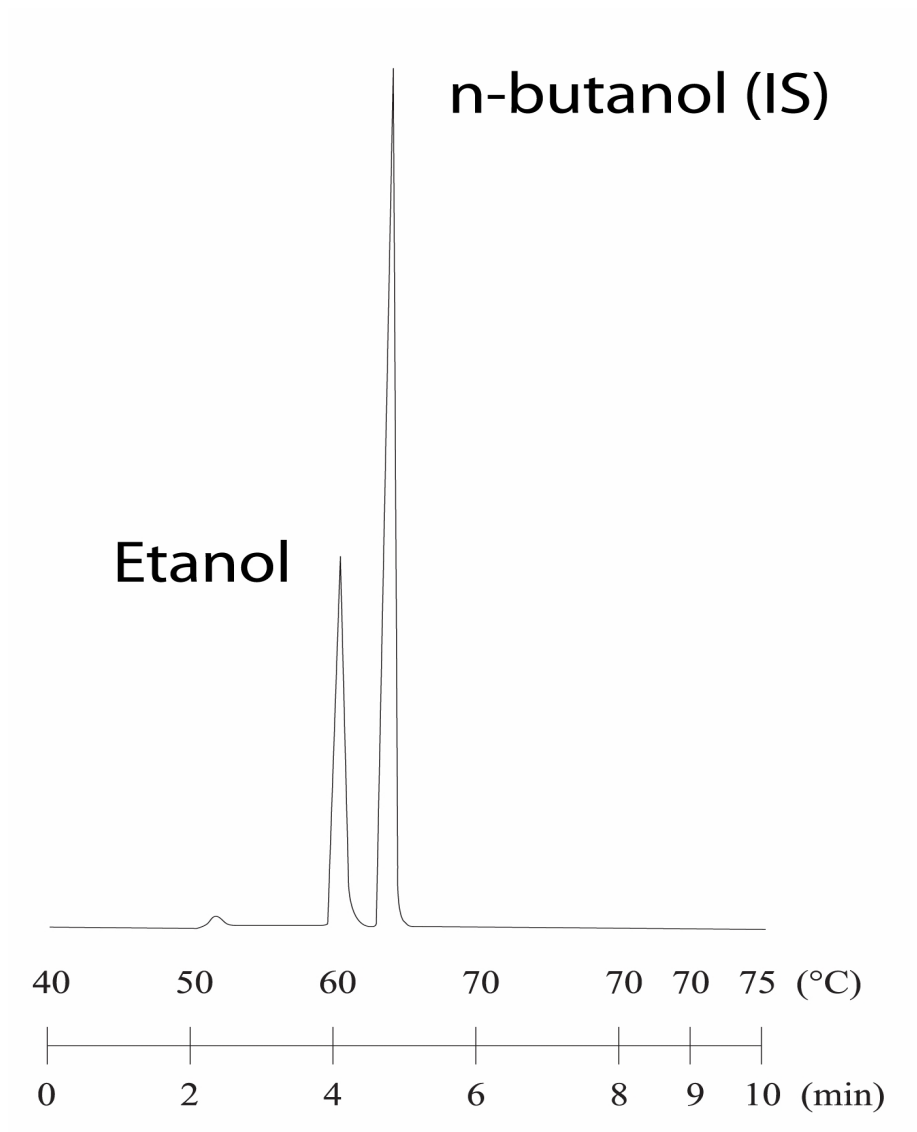
$$\text{Etanol (mg/ml)} = 0.1 \times [P(\text{Etanol})_s / P(\text{IS})_s] \times [P(\text{IS})_{ss} / P(\text{Etanol})_{ss}]$$

**P(etanol)s:** örnekteki etanolün pik alanı

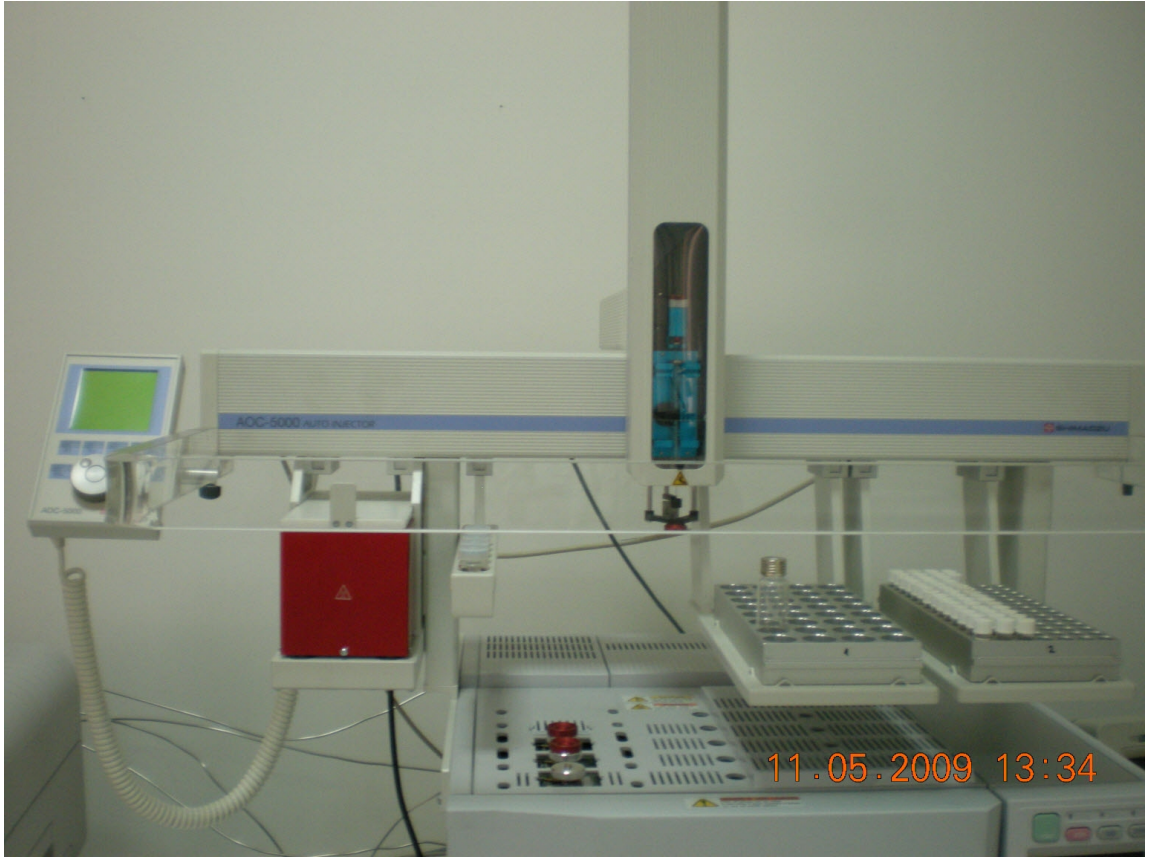
**P(IS)s:** örnekteki IS'ın pik alanı

**P(etanol)ss:** standart çözeltideki etanolün pik alanı

**P(IS)ss:** IS'nin standart çözeltideki pik alanı



**Şekil 3.1:** Örnek etanol ve IS piki



**Şekil 3.2:** GC-FID sistemi Headspace ünitesi.

#### **4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Tüm istatistiksel analizler SPSS 11.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL., USA) istatistik paket programı ile yapılmıştır. Önce “Kruskal wallis” testi ile analiz yapıldıktan sonra, anlamlı sonuç veren grupların ikişerli olarak karşılaştırılmalarında denek sayısına uygun olarak nonparametrik bir yöntem olan “Mann Whitney-U” testi kullanılmıştır. Sonuçta  $p < 0.05$  seviyesi anlamlı kabul edilmiştir.

#### **5. SONUÇLAR**

Kontrol grubunda yapılan kan etanol konsantrasyonu ölçümünde, grubun ortalama BEC değeri 80-100 mg/dl olarak tespit edilmiştir.

MDA sonuçlarına baktığımızda kontrol grubu değerleri sham grubuna göre anlamlı olarak artmıştı ( $p<0.05$ ). Tüm deney gruplarında ise (Melatonin, ebselen, proantosiyanidin, E vitamini, C vitamini) kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlemlendi ( $p<0.05$ ).

Ayrıca melatonin grubuna göre E vitamini ve C vitamini gruplarındaki MDA seviyeleri anlamlı fazlaydı ( $p<0.05$ ). Bunun yanında hem ebselen grubuna hem de proantosiyanidin grubuna göre C vitamini grubundaki MDA seviyeleri anlamlı fazla bulundu ( $p<0.05$ ).

SOD seviyeleri incelendiğinde kontrol grubu değerleri sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı ( $p<0.05$ ). Tüm deney gruplarında ise kontrol grubuna göre anlamlı artma gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Ayrıca melatonin, ebselen, proantosiyanidin gruplarına göre E vitamini ve C vitamini gruplarındaki SOD seviyeleri anlamlı düşük bulundu ( $p<0.05$ ).

GSH-Px düzeyleri incelendiğinde de kontrol grubu değerleri sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı ( $p<0.05$ ). Ancak deney gruplarından sadece melatonin, ebselen ve proantosiyanidin gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artma gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Ayrıca melatonin grubuna göre E vitamini ve C vitamini gruplarındaki GSH-Px seviyeleri anlamlı düşüktü ( $p<0.05$ ).

Yukarıda belirtilen tüm sonuçlar ve ayrıntılı istatistiksel karşılaştırmalar Tablo'da özetlenmiştir. Ayrıca tüm gruplara ait MDA, SOD, GSH-Px seviyeleri ise sırasıyla şekil 4.1., 4.2., ve 4.3.'de sunulmuştur.

**Tablo 4.1:** Oksidan ve antioksidan parametre sonuçları (Ortanca  $\pm$  Standart sapma)

| <b>Gruplar</b>          | <b>MDA<br/>(mmol/gprotein)</b>    | <b>SOD<br/>(U/gprotein)</b>         | <b>GSH-Px<br/>(U/gprotein)</b> |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Sham</b>             | 0.25 $\pm$ 0.05                   | 144.69 $\pm$ 15.014                 | 0.26 $\pm$ 0.05                |
| <b>Kontrol</b>          | 1.17 $\pm$ 0.14 *                 | 28.13 $\pm$ 3.83 *                  | 0.08 $\pm$ 0.03 *              |
| <b>Melatonin</b>        | 0.39 $\pm$ 0.07 $\Psi$            | 111.38 $\pm$ 16.69 $\Psi$           | 0.16 $\pm$ 0.03 $\Psi$         |
| <b>Ebselen</b>          | 0.48 $\pm$ 0.11 $\Psi$            | 100.38 $\pm$ 8.83 $\Psi$            | 0.16 $\pm$ 0.05 $\Psi$         |
| <b>Proantosiyanidin</b> | 0.44 $\pm$ 0.13 $\Psi$            | 90.89 $\pm$ 15.59 $\Psi$            | 0.14 $\pm$ 0.05 $\Psi$         |
| <b>E vitamini</b>       | 0.59 $\pm$ 0.09 $\Psi \Delta$     | 55.83 $\pm$ 13.85 $\Psi \Delta a b$ | 0.08 $\pm$ 0.05 $\Delta$       |
| <b>C vitamini</b>       | 0.70 $\pm$ 0.12 $\Psi \Delta a b$ | 63.57 $\pm$ 11.48 $\Psi \Delta a b$ | 0.08 $\pm$ 0.04 $\Delta$       |

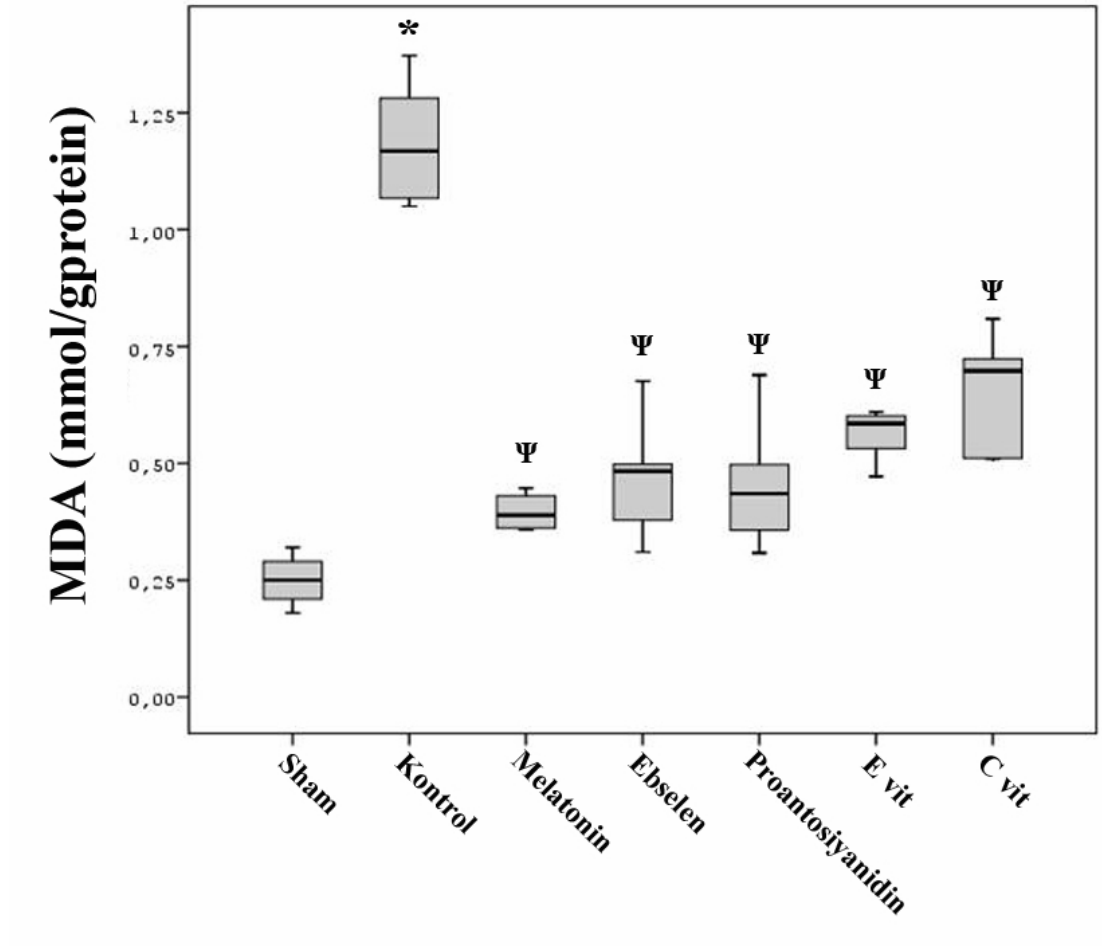
\* p<0.05 Kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı artma veya azalma

$\Psi$  p<0.05 Deney gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artma veya azalma

$\Delta$  p<0.05 Melatonin grubuna göre diğer deney gruplarında anlamlı artma veya azalma

<sup>a</sup> p<0.05 LA grubuna göre diğer deney gruplarında anlamlı artma veya azalma

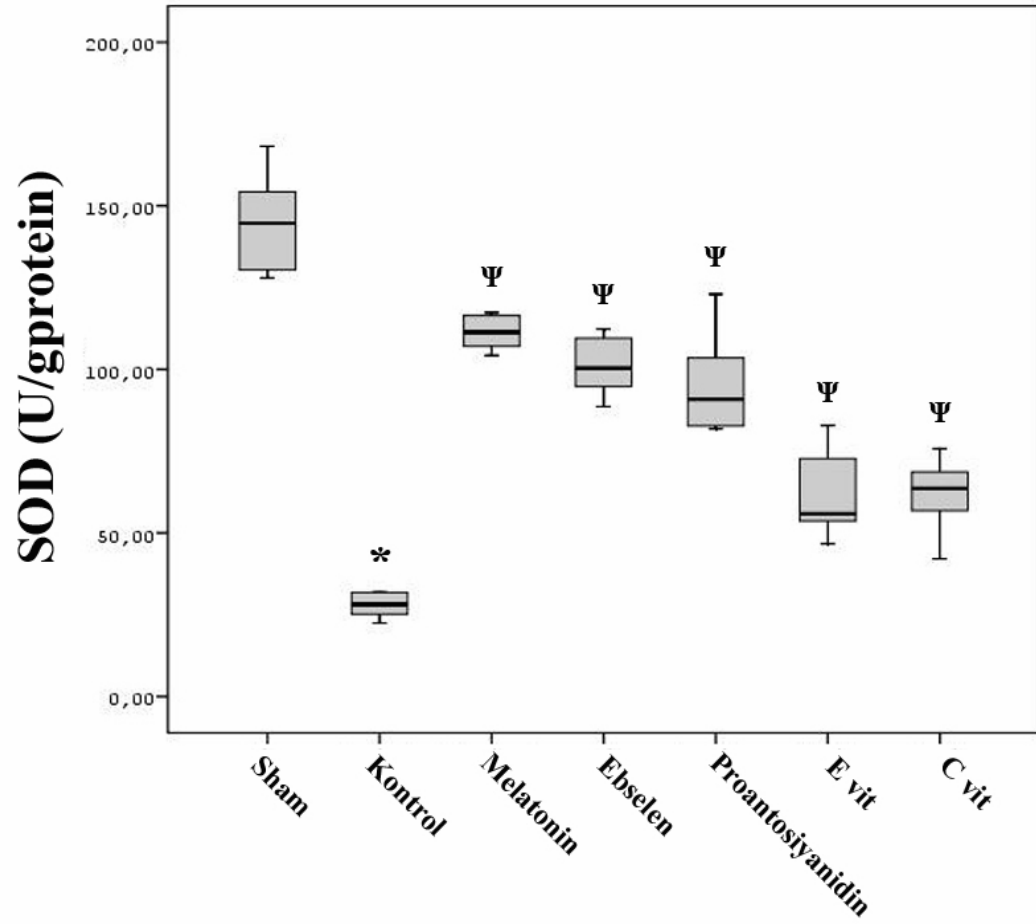
<sup>b</sup> p<0.05 Proantosiyanidin grubuna göre diğer deney gruplarında anlamlı artma veya azalma



**Şekil 4.1:** Tüm gruplarda MDA sonuçları

\*  $p < 0.05$  Kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı artma

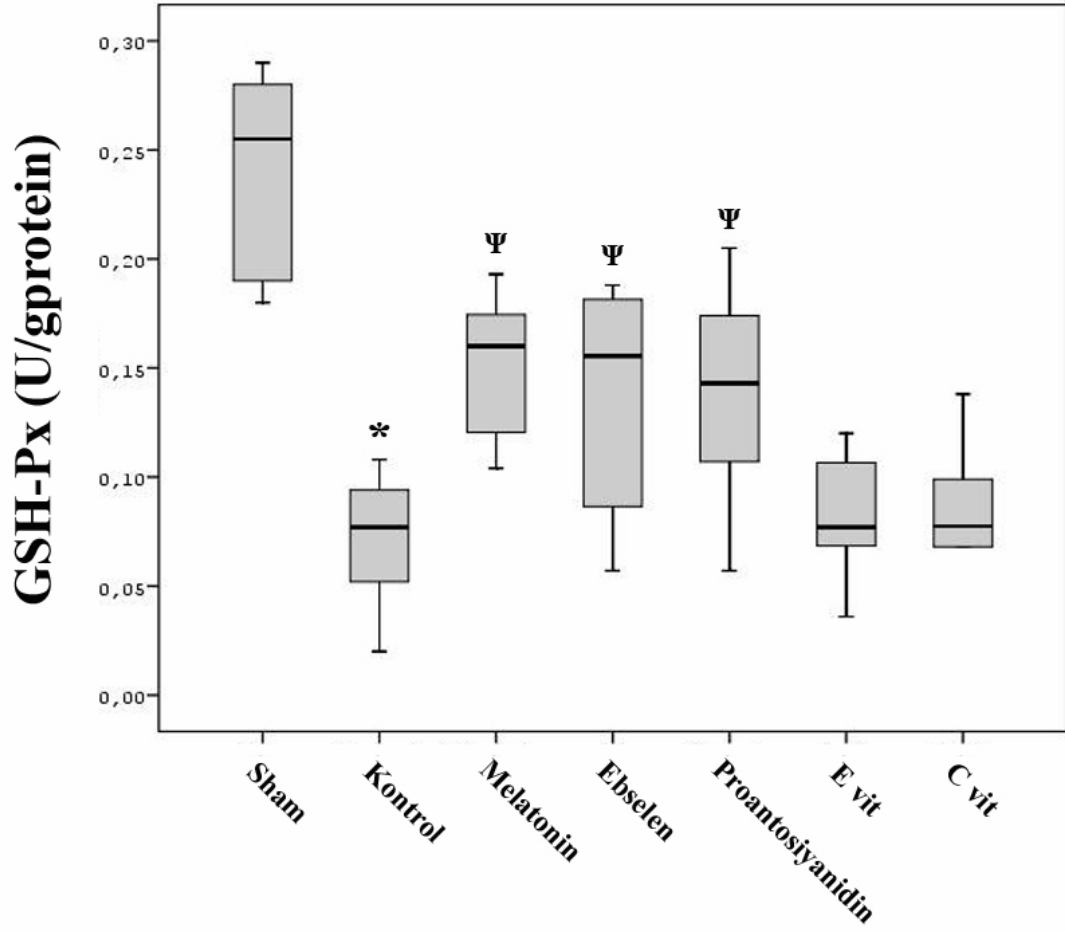
Ψ  $p < 0.05$  Deney gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı azalma



**Şekil 4.2 :** Tüm gruplarda SOD sonuçları

\*  $p < 0.05$  Kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı azalma

Ψ  $p < 0.05$  Deney gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artma



**Şekil 4.3:** Tüm gruplarda GSH-Px sonuçları

\*  $p < 0.05$  Kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı azalma

Ψ  $p < 0.05$  Deney gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artma

## 6. TARTIŞMA

Bu çalışmanın ana amacı; kronik etanol maruziyetinde etanolün beyinde oluşturduğu hasarlara karşı uygulanacak olan antioksidan tedavisinin bir etkisinin olup olmayacağını deneysel olarak irdelenmesidir. Çalışmada antioksidan aktivitesi olduğu bilinen melatonin, ebselen, C-vitamini, E-vitamini ve proantosianidin maddeleri kullanılmış ve oluşan hasara karşı etki beyin dokusundan ölçülerek değerlendirilmiştir. Çalışma şu basamaklarda gerçekleştirilmiştir; seçilen gruplardaki sıçanlara kronik etanol maruziyet modeli uygulanarak beyin hasarının oluşturulması, beyin hasarı oluşturulduktan sonra 5 farklı antioksidan maddenin uygulanması, uygulanan bu maddelere bağlı olarak oluşabilecek sonuçların irdelenmesi için oksidatif stres parametrelerinin analizi.

Çalışmada deney hayvanı olarak, fizyolojik özellikleri insan organizmasına en yakın canlı türlerinden biri kabul edilen sıçanların wistar türü kullanılmıştır. Çalışmamızda etanol ve oksidan parametreler sıçanlardan alınan tam kan örneklerinde ve beyin homojenatında değerlendirilmiştir.

Kronik etanol kullanımı beyin nörodejenerasyonuna sebep olduğu iyi bilinmektedir (64). Bu hasarın birincil olarak etanolün nöroselüler ve nörovasküler etkilerinden ileri geldiği düşünülmektedir. Bazı durumlarda tiyamin eksikliğinin ve diğer beslenme şekline bağlı bozuklukları bu konuda rol oynamaktadır (133). Yapılan pekçok çalışmaya rağmen etanole bağlı beyin hasarı tam olarak açıklanamamıştır. Eksitoksisite için her ne kadar in-vitro markörler bulunsada (50, 108) in-vivo olarak yapılan çalışmalar etanolün indüklediği nörodejenerasyona bağlı olduğu düşünülen N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptör aktivitesinin artışı göstermek için yapılan çalışmalar genellikle başarısız olmuştur.

Maruziyetin süre ve şekline bağlı olarak oluşabilecek hasar da farklılık göstermektedir. Santral sinir sisteminde oluşturulacak hasar için, beyin hasarı modeli olarak farklı iki metot kullanılmaktadır. Birinci model, sıvı diyet içerisinde

belli bir kan-etanol konsantrasyonu sağlanarak daha uzun süreli bir modeldir ve uygulanması süre açısından daha zahmetlidir (116, 154). İkinci model olarak ise “binge etanol modeli” dir ki daha kısa süreli ve daha yüksek kan etanol konsantrasyonu sağlanmaktadır (26, 163). Oral gavaj uygulamasındaki travma riskinden dolayı ve insandaki alkolizmi daha iyi taklit ettiği için biz laboratuvarımızda başarı ile uygulanan (122, 123, 143, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153) birinci modeli seçtik. Bu modellerin dışında nörodejenerasyonu tespit etmek amacı ile ayrıca in vitro (kültür) olarak çalışılan modeller de bulunmaktadır (133).

Etanol diyeti sonunda kontrol grubunda kan etanol konsantrasyonu seviyesi 80-100 mg/dl olarak ölçülmüştür. Uygulanan kronik alkolizm modellerinin sinir sisteminde ve özellikle hipokampal bölgede hasar oluşturduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (127, 140).

Beynin farklı bölgelerinde, etanolün uygulanma şekli ve dozu doğrultusunda SOD aktivitesinde artış (131), herhangi bir değişme olmaması (40) ve az miktarda bir azalma (74) gibi farklı görüşler bildirilmiştir. Ayrıca etanolün sıvı diet içerisinde 2 hafta boyunca sıçanlara uygulanması sonucunda prefrontal korteks ve hipokampus haricindeki beynin belli bölgelerinde SOD aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir (15). Sonuçlarda görülen bu farklılıklar deney türlerinin farklılığından, etanol uygulama şekli ve dozuna bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Bizim çalışmamızda SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre özellikle melatonin ve ebselen maddelerinin uygulandığı gruplarda anlamlı bir artış, buna paralel olarak melatonin ve ebselen grubunda daha az olarak yine anlamlı bir artış diğer 3 grupta da (E-vitamini, C-vitamini, proantosianidin) gözlemlenmiştir. Ayrıca prefrontal korteks ve hipkampus bölgesinde SOD seviyelerindeki artış ayrıca gösterilmiştir (40). Superoksit Dismutaz  $O_2^{\cdot-}$  'yi  $H_2O_2$  ' ye indirgenmesini kataliz ettiğinden dolayı etanol ile indüklenen oksidan hasarı bu şekilde onarmış olabileceği düşünülebilir.

Hipokampusün etanol ile indüklenen oksidatif strese bağlı oluşan hasarda

beynin diğer bölgelerine göre daha savunmasız olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (115). Buna bağlı olarak etanolün hipokampus bölgesinde prefrontal korteksten daha fazla hasar oluşturması beklenebilir.

Epidemiyolojik çalışmalar ve deneysel hayvan çalışmaları göstermiştir ki kronik etanol kullanımı karaciğer, kardiyovasküler sistem ve sinir sistemini içine alan çoklu organ yetmezliği ile karakterize önemli bir sağlık sorundur. Bu sorunun fizyopatolojik temelinde ise vücut için önemli olan bu sistemlere ait hücrelerde meydana gelen hasar yatmaktadır. Uzun süredir bu konu üzerinde yapılan bilimsel araştırmalar etanolün yol açtığı hücre hasarının sebebini tam olarak ortaya koyamamıştır. Ancak son dönemde yapılan çalışmalar etanol ile meydana gelen hücre hasarının ortaya çıkışında oksidatif stresin önemli rolünün olduğunu ortaya koymaktadır (159).

Oksidatif stresi oluşturan reaktif oksijen türevleri veya bunların öncülü maddeler insan organizmasının normal fizyolojisinde var olan ve görev alan maddelerdir. Ancak reaktif maddeler normal şartlarda da vücuttaki antioksidan korunma sistemleri ile kontrol altında tutulurlar. Buna oksidan-antioksidan denge denir ki yaşayan organizmaların hayatının sürdürülmesinde homeostazisin bir parçasıdır. Ancak antioksidan koruma sistemlerinin de her fizyolojik sistemde olduğu gibi koruma sınırları mevcuttur. Kronik etanol kullanımı gibi patolojik durumlarda ise bu sınırlar zorlanabilir veya aşılabılır. Bu durumda organizmada oksidatif stres ortaya çıkabilir ve birçok fizyolojik mekanizmaları aksatabilir. Oksidatif stres temelde hücre zarı ve DNA hasarı gibi çeşitli hücre seviyelerinde etki ederek birçok hasara yol açar (3, 7, 24, 30, 80, 93, 104, 109, 157, 158).

Etanol vücutta iki aşamada metabolize olur. Birinci basamakta “alkol dehidrojenaz” enzimi ile alkol asetaldehite dönüştürülür ki bu madde toksik ve reaktif bir maddedir. İkinci basamakta ise “aldehit dehidrojenaz” enzimi ile asetaldehit asetata dönüştürülür. Belirtilen iki basamakta nikotinamid adenin dinükleotid redükte form (NADH) dediğimiz solunum reaksiyonunu artırarak oksijen kullanımının ve oksijen radikallerinin artışına neden olabilecek maddeyi

ortaya çıkarır. Bunun yanında etanol tüketimi ince barsaklardan demir emilimini ve karaciğerde birikimini artırır. Bilindiği üzere süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türevlerinin hidroksil radikali olarak adlandırılan aktivitesi dolayısıyla hücre hasarına yol açma gücü yüksek olan tehlikeli bir radikale dönüşümünde demir gibi bazı geçiş metalleri büyük rol oynar (45, 139). Ayrıca etanolün kemotaktik faktörlerin, büyüme faktörlerinin, proteolitik enzimlerin, lipooksijenaz, siklooksijenazın salınımını artırması ve antiproteolitik enzimleri inaktive etmesi sonucu inflamasyona da yol açtığı gösterilmiştir. Etanolün inflamasyona yol açarken reaktif oksijen türevlerini ikincil mesajcı gibi kullandığı sanılmaktadır. Tabi inflamasyon da diğer inflamasyonla seyreden birçok patolojik durumda olduğu gibi oksidatif stresin vücutta yaygınlaşmasında önemli rol oynar. Çünkü inflamasyonun kendisi de oksidatif strese yol açar ve böylece patolojik bir kısır döngüye girilmiş olur (75).

Sinir sistemi üzerindeki toksik etkilerine de birçok araştırma yapılmasına rağmen tam açıklık getirilememiştir (12). Ancak hücre seviyesinde proapoptotik/anti apoptotik protein dengesini değiştirerek hücrenin ölüme gidişini artırması, koruyucu endojen antioksidan seviyelerini düşürmesi, zararlı reaktif oksijen seviyelerini yükseltmesi ve nörotrofik faktörlerin seviyelerini veya reseptör miktarlarını artırması konuları üzerinde durulmaktadır. Bunların yanında kronik etanol kullanımıyla nöronların fizyolojik yaşam ortamının sağlanmasında önemli rol oynayan astrositlerin ve de glial hücrelerin miktarlarında artışlar görülmüştür. Nöronları korumaya çalışan bu hücrelerin artışının da toksik ortama bir cevap olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (29, 55, 97, 99, 105, 132).

Etanolün sinir sistemi üzerinde gösterdiği oksidatif toksisiteye karşı çeşitli antioksidanlar kullanılmış ve birçoğundan da umut verici sonuçlar alınmıştır. Bunların arasında bizim de çalışmamızda kullandığımız E-Vitamini, C-Vitamini, Ebselen ve melatonin gibi birçok antioksidan madde bulunmaktadır. Ancak kronik etanol toksisitesinde kullanılabilecek ayrı özelliklere sahip bu

antioksidanların etkinliklerini birbiri ile bu kadar geniş anlamda karşılaştıran çalışma yok denebilir.

Melatonin direk radikal süpürücü özelliği ve indirekt antioksidan sistem aktivatörü özellikleri ile güçlü antioksidan karaktere sahip bir maddedir. Direkt antioksidan süpürücü özelliği kimyasal yapısında taşıdığı metil ve asetil gruplarından ileri gelir. Bu özelliği ile süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, peroksinitritler gibi oksidan maddelere elektron sağlayarak etkisiz hale getirir. Bunun yanında indirekt antioksidan sistem aktivasyonu özelliği ile de vücutta bulunan antioksidanlardan olan süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzimlerin sentezlerini artırarak sağlar (112). Ethanol'ün beyin üzerinde gösterdiği oksidatif etkiler konusunda yapılan bir araştırmada Baydaş ve ark.'ları (12) sıçanlarda ethanol uygulamasıyla hipocampal bölgede lipid peroksidasyonu düzeylerinin arttığını, glutatyon düzeylerinin azaldığını, öğrenme ve hafızanın etkilendiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte melatonin kullanarak bu etkilerin belli oranlarda düzeltildiğini göstermiştir (12). Bu sonuçlara çok benzer sonuçlar Gönenç ve ark.'ın (40) yaptığı benzer bir çalışmada da ortaya konmuştur . Bizim çalışmamızda da bu verileri destekleyici sonuçlar alındı. Oksidatif stresi düzeyini ifade eden MDA seviyeleri alkolik grupta anlamlı olarak artarken melatonin uygulamasıyla azaltılmıştı. Ayrıca antioksidan sistemin göstergeleri olan SOD ve GSH-Px alkolik grupta anlamlı olarak azalırken melatonin kullanımı ile normal değerlere yaklaşmıştı.

Ebselen, endojen bir antioksidan yapı olan glutatyonun etkilerini taklit eden hem oksidatif hem de nitrosatif strese karşı etkili bir antioksidan ajandır (25, 36, 92, 81). Etanol kullanımının beyin üzerindeki toksik etkileri üzerine ebselenin etkilerini araştıran Johnsen-Soriano ve ark.'ları (67) sıçanlarda yapılan bir araştırmada kronik etanol uygulamasının hipokampal bölgede MDA düzeylerini artırdığını, glutatyon seviyelerini ve hafızayla ilişkili yetileri azalttığını göstermiştir. Ebselen uygulamasıyla da bu parametrelerin düzeldiğini ortaya

koymuştur. Aynı şekilde Herrera ve ark.'larının (57) yaptıkları bir çalışmada sıçanlara kronik etanol uygulamasıyla ortaya çıkan hipokampal hücre dejenerasyonunun ebselen ile geri döndüğünü bunun da oksidatif ve nitrosatif stresin engellenmesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Bizim de sonuçlarımız da bu çalışmaları destekler niteliktedir. Biz de beynin hipokampal bölgesinde kronik etanol uygulanan grupta MDA artmış, SOD ve GSH-Px azalmış olarak bulduk. Ebselen uygulamasıyla da bu değerler normal değerlere yaklaşmıştı. Bu bağlamda sadece oksidatif stres kriterlerini incelemiş olmamız ve nitrosatif stres kriterlerini incelememiş olmamız çalışmamızın zenginleşmesini engelledi. Çünkü ebselenin iyi bir peroksinitrit süpürücüsü olması, oksidatif stres yanında nitrosatif stresi de engelleyerek etkisini göstermiş olabileceği gerçeğini ortaya çıkarmaktadır. Bunun yanında acaba “Etanolün beyin üzerindeki radikal hasarı üzerine oksidatif stres mi yoksa nitrosatif stres mi daha etkili?” sorusuna bir yanıt verilebilirdi.

Proantosiyanidin elma, üzüm çekirdeği, kakao, tarçın gibi besin maddelerinde yaygın olarak bulunan flavonoid grubu bir antioksidandır (41, 42, 160). Büyük oranda etkisini direk süpürücü özelliği ile gösterir. Bu etkisini özellikle süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksil radikallerini etkisiz hale getirerek yapar. Ayrıca direkt süpürücü etkisi E ve C vitamininden onlarca kat daha fazladır (126). Literatürde proantosiyanidin ile yapılmış verilerimizi karşılaştırabileceğimiz benzer çalışma bulunmamaktadır. Ancak bizim elde ettiğimiz verilerden yola çıkarak ethanoln kronik kullanımıyla beynin hipokampal bölgesinde ortaya çıkan hasarı proantosiyanidin geri çevirmekte olduğu söylenebilir. Bu etkisi de daha önce tartıştığımız melatonin ve ebselen kadar güçlüdür.

E ve C vitaminleri uzun senelerdir bilinen ve kullanılan vücudun önemli antioksidanlarındandır. Bu iki vitamin antioksidan olarak antioksidan sistemde birlikte iř grrleri. E-Vitamini lipid fazda elektron vererek radikalleri sprrek kendisi daha az zararlı E-Vitamini radikaline dönüşür. Bu radikal yapı da C

vitamininden bir elektron alarak suda çözünen C vitaminini radikale dönüştürür. Bu yapı da sıvı fazda yani idrarla atılarak vücut dengesi için zararlı olabilecek bir radikalden zincirleme reaksiyonla kurtulunmuş olur (32). Yapılan in vitro çalışmalar E ve C vitamininin ethanolle vücutta oluşan radikallere karşı etkili olduğunu hatta E vitaminin C vitamini göre iki kat daha etkili olduğunu ortaya koymuştur (93). Ayrıca embriyonik sıçan hipokampal kültürlerinde yapılan bir çalışmada E vitaminin ethanol toksisitesine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (89). Bunun yanında yenidoğan sıçanlarda yapılan çalışmalar serebellar purkinje hücrelerinde ethanolün oluşturduğu toksisiteye karşı yüksek dozdaki vitamin E koruma sağlamış ancak düşük doz koruma sağlamamıştır (54). Hem C hem de E vitamini ile yapılan bir çalışmada ise farelere ethanol uygulamasından belli bir süre önce uygulanan vitaminlerin mitokondrial DNA hasarı oluşturma düzeyleri araştırılmıştır. E vitamininin koruma sağladığı ancak C vitaminin koruma sağlamadığı ortaya konmuştur (83). Bu bilgiler ışığında bizim verilerimiz değerlendirilecek olursa: Hem E hem de C vitamini uyguladığımız diğer antioksidanlar gibi sadece etanol uyguladığımız gruba göre MDA seviyelerini azaltıp, SOD seviyelerini artırdı. Ancak GSH-Px seviyelerinde herhangi bir değişiklik yapmadı. Bunlara ek olarak Tablo 4.1’de açıkça belirtildiği gibi C vitamininin oksidan ve antioksidan sonuçlarının tümü melatonin grubundan, MDA ve SOD sonuçları ise ebselen ve proantosiyanidin gruplarından farklıydı yani etkinliği azdı. E vitamininin ise oksidan ve antioksidan sonuçlarının tümü melatonin grubundan, SOD sonuçları ise ebselen ve proantosiyanidin gruplarından farklıydı yani daha az etkiliydi.

Sonuç olarak kronik ethanol kullanımında korumasız bir bölge olan, bellek ve öğrenmede önemli roller üstlenen hipokampusta oluşan oksidatif stres kaynaklı toksisiteye karşı antioksidan kullanımı etkili gibi görünmektedir. Özellikle melatonin, ebselen ve proantosiyanidin, E ve C vitaminine göre daha etkili bulunmuştur. Bu bağlamda özellikle erişilmesi ve ekonomik alınabilirliği daha kolay olan melatonin ve proantosiyanidin daha ön plana çıkmaktadır. Ancak bu moleküller üzerinde daha geniş araştırmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR:

1. Akkuş, İ., Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, 1995.
2. American Psychiatric Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed. Washington, D.C, Am Psychiatric Assoc, 195-204, 1994.
3. Andican, G., Gelisgen, R., Unal, E., Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis, World J Gastroenterol, 11, 2340–5, 2005.
4. Andriessen, M., Van Bergen, B., Spruijt, K., Go, I., Schalkwijk, J., Van De Kerkhof, P., Epidermal Proliferation is not Impaired in Chronic Venous Ulcers, Acta Derm. Venereol, 75, 459-462, 1995.
5. Antolin, I., Obstet, B., Burkhardt, S., Hardeland, R., Antioxidatif Protection in a High-Melatonin Organism: The Dinoflagellate *Gonyaulax Polyedra* is Rescued from Lethal Oxidative Stress by Strongly Elevated, but Physiologically Possible Concentrations of Melatonin. J Pineal Res, 23, 182-190, 1997.
6. Arrigoni, O., De Tullio M.C., Ascorbic acid: much more than just an antioxidant, Biochim Biophys Acta, 1569, 1-3, 1-9, 2002.
7. Badger, T.M., Ronis, M.J., Seitz, H.K., Albano, E., Ingelman-Sundberg, M., Lieber, C.S., Alcohol metabolism: role in toxicity and carcinogenesis, Alcohol Clin Exp Res, 27, 336–47, 2003.
8. Baer, J.S., Sampson, P.D., Barr, H.M., Connor, P.D., Streissguth, A.P., A 21-year longitudinal analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on young adult drinking, Arch Gen Psych , 60, 377–385, 2003.

9. Baron, A.D., The Coupling of Glucose Metabolism and Perfusion in Human Skeletal Muscle, The Potential Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide, *Diabetes*, 45, 11, 105-109, 1996.
10. Bast, A., Haenen, G.R., Doelman, C.J., Oxidants and Antioxidants: State of The Art, *Am J Med*, 3C, 2S-13S, 1991.
11. Başağa, H.S., Biochemical Aspects of Free Radicals, *Biochem Cell Biol*, 68, 989-998, 1990.
12. Baydas, G., Yasar, A., Tuzcu, M., Comparison of the impact of melatonin on chronic ethanol-induced learning and memory impairment between young and aged rats, *J Pineal Res*, 39, 4, 346-52, 2005.
13. Bendich, A., Shapiro, S.S., Effect of beta-carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat, *J Nutr*, 116, 11, 2254-62, 1986.
14. Bieri, J., Corash, L., Hubbard, V., Medical Uses of Vitamin E, *N Engl J Med* 308,18, 1063-1071, 1983.
15. Bondy, S.C., Guo, S.X., Effect of an NMDA receptor antagonist and a ganglioside GM1 derivative upon ethanol-induced modification of parameters of oxidative stress in several brain regions, *Brain Res*, 716, 165-170, 1996.
16. Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A., Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study, *Free Radic Biol Med*. 14, 1, 49-55, 1993.
17. Buettner, G.R., The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate, *Arch Biochem Biophys*, 300 ,2 ,535-43 , 1993.

18. Cagetti, E., Liang, J., Spigelman, I., Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors, *Mol Pharmacol*, 63, 53-64, 2003.
19. Carr, A.C., Frei, B., Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans, *Am J Clin Nutr*, 69, 6, 1086-107, 1999.
20. Chan, P.H., Role of oxidants in ischemic brain damage, *Stroke*, 27, 1124–1129, 1996.
21. Chatterjee, K., Vasodilator Therapy for Heart Failure, *Annals of Internal Medicine*, *Am Coll Physicians*, 83, 3, 421-423, 1975.
22. Cloninger, C.R., Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism, *Science*, 236, 4800, 410-6, 1987.
23. Coassin, M., Ursini, F., Bindoli, A., Antioxidant effect of manganese, *Arch Biochem Biophys*, 299, 2, 330-3, 1992.
24. Cohen-Kerem, R., Koren, G., Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity, I: review of the experimental data and implications to humans, *Neurotoxicol Teratol*, 25, 1–9, 2003.
25. Cotgreave, I.A., Johansson, U., Westergren, G., Moldeus, P.W., Brattsand, R., The anti-inflammatory activity of ebselen but not thiols in experimental alveolitis and bronchiolitis, *Agents Actions*, 24, 313–319, 1988.
26. Crews, F.T., Braun, C.J., Hoplight, B., Switzer R.C., 3rd, Knapp, D.J., Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats, *Alcohol Clin Exp Res*, 24, 11, 1712-23, 2000.

27. Davidson, J.M., Animal Models for Wound Repair, Arch Dermatol Res, 290, S1-11,1998.
28. De La Lastra, C.A., Cabeza, J., Motilva, V., Martin, M.J., Melatonin Protects Against Gastric Ischemia-Reperfusion Injury in Rats, J Pineal Res, 23, 2, 47-52, 1997.
29. De la Monte, S.M., Ganju, N., Banerjee, K., Brown, N.V., Luong, T., Wands, J.R., Partial rescue of ethanol-induced neuronal apoptosis by growth factor activation of phosphoinositol-3-kinase, Alcohol Clin Exp Res, 24, 716–726, 2000.
30. Deugnier, Y., Iron and liver cancer, Alcohol, 30, 145–50, 2003.
31. Dunne, L.J., Nutrition Almanac, Mcgraw-Hill Publishing Company, New York, 1990.
32. Ellman, G.L.T., Tissue Sulphydryl Groups, Arch Biochem Biophys 82,1, 70-77, 1959.
33. Ellozy, M., Nutrition, The Upjohn Company, Michigan, 1980.
34. Emanuele, M.A., Emanuele, N., Alcohol and the male reproductive system, Alcohol Res Health, 25, 4, 282-7, 2001.
35. Faingold, C.L., N’Gouemo, P., Riaz, A., Ethanol and neurotransmitter interactions – from molecular to integrative effects, Prog Neurobiol, 55, 509-535, 1998.
36. Gao, J.X., Issekutz, A.C., The effect of ebselen on polymorphonuclear leukocyte and lymphocyte migration to inflammatory reactions in rats, Immunopharmacology, 25, 239 – 251, 1993.
37. Garcia, J.J., Reiter, R.J., Guerrero, J.M., Escames, G., Yu, B.P., Oh, C.S., Munoz-Hoyos, A.: Melatonin Prevents Changes in

Microsomal Membrane Fluidity During Induced Lipid Peroxidation, *FEBS Letters*, 408, 297-300, 1997.

38. Garcia, J.J., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Oh, C.S., Tang, K., Yu, B.P., Escames, G.: Melatonin Enhances Tamoxifen's to Prevent the Reduction in Microsomal Membran Fluidity Induced by Lipid Peroxidation, *J Membr Biol*, 162:59-65, 1998.
39. Genevieve, P.K., Substance abuse and dependence, *The Gale Encyclopedia of Medicine*, Second Edition. Jacqueline L. Longe, Ed. 5 vols, Farmington Hills, MI: Gale Group, 2001.
40. Gonenc, S., Uysal, N., Acikgoz, O., Kayatekin, B.M., Sonmez, A., Kiray, M., Aksu, I., Gulecer, B., Topcu, A., Semin, I., Effects of melatonin on oxidative stress and spatial memory impairment induced by acute ethanol treatment in rats, *Physiol Res*, 54, 341–348, 2005.
41. Gu, L., House, S.E., Wu, X., Ou, B., Prior R.L., Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products, *J Agric Food Chem*, 31, 54, 11, 4057-61, 2006.
42. Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden ,J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R.L., Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption, *J Nutr*, 134, 613-617, 2004.
43. Guerrero, J.M., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Pablos, M.I., Sewerynek, E., Chuang, J.I., Melatonin Prevents Increases in Neural Nitric Oxide and Cyclic GMP Production After Transient Brain Ischemia and Reperfusion in The Mongolian Gerbil (*Meriones Unguiculatus*), *J Pineal Res*, 23, 1, 24-31, 1997.
44. Guochuan, E., Tsai, M.D., Ragan, P., Chang, R., Chen, S., Linnoila M.V., Joseph T. Coyle, T.J., Increased Glutamatergic

- Neurotransmission and Oxidative Stress After Alcohol Withdrawal, *Am J Psychiatry*, 155, 726-732, 1998.
45. Halliwell, B., Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end, *Free Radic Res*, 31, 261–72, 1999.
  46. Halliwell, B., Oxidants and human disease: some new concepts, *FASEB J*, 1, 5, 358-64, 1987.
  47. Halliwell, B., Reactive oxygene species In living systems, *Am J Med* 91, 3C, 14-22, 1991.
  48. Hammouda, A.R., Khalil, M.M., Salem, A., Lipid peroxidation products in pleural fluid for seperation of transudates and exudates, *Clin Chem*, 41, 1314-1315, 1995.
  49. Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X., The Significance of the Metabolism of the Neurohormone Melatonin: Antioxidative Protection and Formation of Bioactive Substances, *Neurosci Biobehav Rev*, 17, 3, 347-357, 1993.
  50. Haris, B.R., Gibson, D.A., Prendergast, M.A., Blanchard, J.A., Holley, R.C., Hart, S.R., The neurotoxicity induced by ethanol withdrawal in mature organotypic hippocampal slices might involve cross-talk between metabotropic glutamate type 5 receptors and N-methyl-D-aspartate receptors, *Alcohol Clin Exp Res* 27, 1724–1735 , 2003.
  51. Harwood J.H., U.S. Dept of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2004.
  52. Harwood, H., Updating estimates of the economic costs of alcohol abuse in the United States: Estimate Report prepared by the Lewin Group for the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2000.

53. Hasin, D., Liu, X., & Paykin, A., DSM-IV alcohol dependence and sustained reduction in drinking: Investigation in a community sample, *J Studies Alcohol*, 62, 509–517, 2001.
54. Heaton, M.B., Mitchell, J.J., Paiva, M., Amelioration of ethanol-induced neurotoxicity in the neonatal rat central nervous system by antioxidant therapy, *Alcohol Clin Exp Res*, 24, 512-518, 2000.
55. Heaton, M.B., Mitchell, J.J., Paiva, M., Overexpression of NGF ameliorates ethanol neurotoxicity in the developing cerebellum, *J Neurobiol*, 45, 95– 104, 2000.
56. Heien, D., The relationship between alcohol consumption and earnings, *J Stud Alcohol*, 57, 5, 536-42, 1996.
57. Herrera, D.G., Yague, A.G., Johnsen-Soriano, S., Bosch-Morell, F., Collado-Morente, L., Muriach, M., Romero, F.J., Garcia-Verdugo, J.M., Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13, 7919-24, 2003.
58. <http://en.wikipedia.org/wiki/Etanol>
59. <http://ncadi.samhsa.gov/govstudy/bkd376/TableofContents.aspx>, National Household Survey on Drug Abuse, U.S. Department of Health and Human Services Substance Abuse and Mental Health Services Administration Center for Mental Health Services Center for Substance Abuse Prevention, 1999.
60. <http://www.1911encyclopedia.org/Alcohol> Alıntılanma tarihi: 20.05.2009.
61. <http://www.herbalchem.net/PhenolicsInterm.htm>. Alınma tarihi: 2009-03-17.

62. <http://www.oas.samhsa.gov/2k6/alcDepend/alcDepend.cfm>.  
[alıntılanma tarihi: 20.05.2009.](#)
63. [http://www.oecd.org/document/30/0,3343,en\\_2649\\_34631\\_129687\\_34\\_1\\_1\\_1\\_37407,00.html](http://www.oecd.org/document/30/0,3343,en_2649_34631_129687_34_1_1_1_37407,00.html), OECD Health Data 2008, alıntı tarihi 20.05.2009.
64. Hunt, W.A., Are binge drinkers more at risk of developing brain damage? Alcohol, 10, 559–561, 1993.
65. Işımer, A., Sayal, A., Aydın, A., Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı, GATA Basımevi, Ankara, 2001.
66. Jackson, T.S., Xu, A., Vita, J.A., Keaney, J.F., Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations, Circ Res, 83, 9, 916-22, 1998.
67. Johnsen-Soriano, S., Bosch-Morell, F., Miranda, M., Asensio, S., Barcia, J.M., Roma, J., Monfort, P., Felipo, V., Romero, F.J., Ebselen prevents chronic alcohol-induced rathippocampal stress and functional impairment, Alcohol Clin Exp Res, 31, 3, 486-92, 2007.
68. Jurkiewicz, B.A., Buettner G.R., EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human, Photochem Photobiol, 64, 6, 918-22, 1996.
69. Karch S.B., Biochemical Tests For Acute And Chronic Alcohol Consumption p: 93, Forensic Issues in Alcohol Testing, CRC Press, NY, 2008.
70. Kensinger, E.A., Clarke, R.J., Corkin, S., What neural correlates underlie successful encoding and retrieval? A functional magnetic resonance imaging study using a divided attention paradigm, J Neurosci, 23, 6, 2407–2415, 2003.

71. Koob, G.F., Alcoholism: allostasis and beyond, *Alcohol Clin Exp Res*, 27, 232-243, 2003.
72. Lambert, L.E., French, J.F., Whitten, J.P., Baron, B.M., McDonald, I.A.: Characterization of Cell Selectivity of Two Novel Inhibitors of Nitric Oxide Synthesis, *Eur J Pharmacol*, 216, 1, 131-134, 1992.
73. Lanas, O., Olinescu, R., Badescu, I.: Melatonin Involvement in Oxidative Processes, *Endocrinologie*, 29, 147-153, 1991.
74. Ledig, M., M'Paria, J.R., Mandel, P., Superoxide dismutase activity in rat brain during acute and chronic alcohol intoxication, *Neurochem Res*, 6, 385–390, 1981.
75. Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X., Metal-induced oxidative stress and signal transduction, *Free Radic Biol Med*, 37, 1921–42, 2004.
76. Levine, M., Wang, Y., Padayatty, S.J, Jason Morrow, M., A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women *PNAS*, 98, 17, 9842-9846, 2001.
77. Lippi, G., Fedi, S., Grassi, M., Acute phase proteins in alcoholics with or without liver injury, *Ital J Gastroenterol*, 24,383-5, 1992.
78. Littleton, J., Neurochemical mechanisms underlying alcohol withdrawal, *Alcohol Health Res World*, 22, 1, 13–24, 1998.
79. Lowry, O., Rosebrouck, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J., Protein measurement with the Folin Phenol reagent, *J Biol Chem*, 193, 265-275, 1951.
80. Luczaj, W., Waszkiewicz, E., Skrzydlewska, E., Roszkowska-Jakimiec R., Green tea protection against age-dependent ethanol-induced oxidative stress, *J Toxicol Environ Health*, 67, 595–606, 2004.

81. Maiorino, M., Roveri, A., Coassin, M., Ursini, F., Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51), *Biochem Pharmacol*, 37, 2267–2271, 1988.
82. Malcolm, R.J., GABA systems, benzodiazepines, and substance dependence, *J Clin Psychiatry*, 64, 3, 36-40, 2003.
83. Mansouri, A., Demeilliers, C., Amsellen, S., Pessare, D., Fromenty, B., Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse, liver, brain, heart and skeletal muscles: protective effects of antioxidants, *J Pharmacol Exp Ther*, 298, 737-743, 2001.
84. Marklund, S.L., Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissues and Human Cell Lines, *J Clin Invest*, 74, 1398-1403, 1984.
85. Mayo, J.C., Sainz, R.M., Tan, D.X., Antolín, I., Rodríguez, C., Reiter, R.J., Melatonin and Parkinson's disease, *Endocrine*, 27, 2, 169-78, 2005.
86. Mehlhorn, R.J., Ascorbate- and dehydroascorbic acid- mediated reduction of free radicals in the human erythrocyte, *J Biol Chem*, 266, 5, 2724-31, 1991.
87. Miniño, A.M., Arias, E., Kochanek, K.D., Murphy, S.L., Smith, B.L., Deaths: final data for 2000, *Natl Vital Stat Rep*, 50, 15, 1-119, 2002.
88. Miorelli, S.T., Rosa, M.R., Moura, J.D., Rocha, C.J., Lobo, L.A.C., Henriques, J.A.P., Saffi, J., Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells, *Mutagenesis*, 23, 2, 93–99, 2008.
89. Mitchell, J.J., Paiva, M., Heaton, M.B., The antioxidants vitamin E and b-Carotene protect against ethanol-induced neurotoxicity in embryonic rat hippocampal cultures, *Alcohol*, 17, 163-168, 1999.

90. Montoliu, C., Vallés, S., Renau-Piqueras, J., Guerri, C., Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption, *J Neurochem*, 63, 5, 1855-62, 1994.
91. Mukamal, K.J., Rimm, E.B., Alcohol's effects on the risk for coronary heart disease, *Alcohol Res Health*, 25, 4, 255-61, 2001.
92. Müller, A., Cadenas, E., Graf P., Sies, H., A novel biologically active selenoorganic compound-I: glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen), *Biochem Pharmacol*, 33, 3235–3239, 1984.
93. Navasumrit, P., Ward, T.H., Dodd, N.J.F., O'Connor, J., Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure, *Carcinogenesis*, 21, 93–9, 2000.
94. Niki, E., Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals, *Am J Clin Nutr*. 1991 54, 6, 1119-1124, 1991.
95. Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., Gotoh, N., Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene, *Am J Clin Nutr*, 62, 6, 1322-1326, 1995.
96. Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K., Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem*, 269, 18, 13685-8, 1994.
97. Nordmann, R., Alcohol and antioxidant systems, *Alcohol Alcohol*, 29, 513– 522, 1994.
98. Oscar-Berman, M., K, Marinkovic, K., Alcoholism and the Brain: An Overview, *Alcohol Res Health*, 27, 2, 125-134, 2003.

99. Ostrowska, J., Luczaj, W., Kasacka, I., Rozanski, A., Skrzydlewska, E., Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs, *Alcohol*, 32, 25– 32, 2004.
100. Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev*, 87, 1, 315-424, 2007.
101. Paglia, D.E., Valentine, W.N., Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J Lab Clin Med*, 70, 1, 158-169, 1967.
102. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S., Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide from L-Arginine, *Nature*, 333, 6, 174, 64-666, 1988.
103. Parnham, M., Sies, H., Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia, *Expert Opin Investig Drugs* 9, 3, 607–19, 2000.
104. Petersen, D.R., Alcohol, iron-associated oxidative stress, and cancer, *Alcohol*, 35, 243–9, 2005.
105. Pirlich, M., Kiok, K., Sandig, G., Lochs, H., Grune, T., Alpha-lipoic acid prevents ethanol-induced protein oxidation in mouse hippocampal HT22 cells, *Neurosci Lett*, 328, 93– 96, 2000.
106. Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C., Barlow-Walden, L.R., Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro, *Ann N Y Acad Sci*, 738, 419-20, 1994.
107. Porjesz, B., Begleiter, H., Alcoholism and human electrophysiology, *Alcohol Res Health*, 27, 2, 153–160, 2003.

108. Prendergast, M.A., Haris, B.R., Mullholland, P.J., Blanchard, J.A., Gibson, D.A., Holley, R.C., Hippocampal CA1 region neurodegeneration produced by ethanol withdrawal requires activation of intrinsic polysynaptic hippocampal pathways and function of N-methyl-D-aspartate receptors, *Neuroscience*, 124, 869–877, 2004.
109. Purohit, V., Khalsa, J., Serrano, J., Mechanism of alcohol-associated cancers: introduction and summary of the symposium, *Alcohol*, 35, 155–60, 2005.
110. Reiter, R.J., Melatonin: clinical relevance, *Best Practice Res Clin Endoc Met*, 17, 273–285, 2003.
111. Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Qi, W., Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species, *Cell Biochem Biophys*, 34, 237–256, 2001.
112. Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E, Action of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress, *J Biomed Sci*, 7, 444-58, 2000.
113. Reiter, R.J., Tan, D.X., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Lopez-Burillo, S., Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs, *J Pharm Pharmacol*, 54, 1299–1321, 2002.
114. Reiter, R.J., The indoleamine melatonin as a free radical scavenger, electron donor, and antioxidant, in vitro and in vivo studies, *Adv Exp Med Biol*, 398, 307-13, 1996.
115. Renis, M., Calabrese, V., Russo, A., Calderone, A., Barcellona, M.I., Riza, V., Nuclear DNA strand breaks during ethanol-induced oxidative stress in rat brain, *FEBS Lett*, 390, 153-156, 1996.
116. Riikonen, R., Salonen, I., Partanen, K., Verho, S., Brain perfusion SPECT and MRI in foetal alcohol syndrome, *Dev Med Child Neurol*, 41, 10, 652-9, 1999.

117. Roach, J., 9,000-Year-Old Beer Re-Created From Chinese Recipe, NationalGeographicNews.[http://news.nationalgeographic.com/news/2005/07/0718\\_050718\\_ancientbeer.html](http://news.nationalgeographic.com/news/2005/07/0718_050718_ancientbeer.html). Alıntılanma tarihi: 20.05.2009.
118. Robert, K.M., Daryl, K.G., Wictor, W.R., Peter, A.M., Harper'ın Biyokimyası. Nobel Kitabevi, 647-48, 1999.
119. Rosenbloom, M., Sullivan, E.V., Pfefferbaum, A., Using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging to assess brain damage in alcoholics, Alcohol Res Health, 27, 2, 146–152, 2003.
120. Rowe, A., Farrell, A.M., Bunker, C.B., Constitutive Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthase in Inflammatory Dermatoses, Br J Dermatol, 136, 1, 18-23, 1997.
121. S. Oğuz KAYAALP, İ.Tayfun UZBAY, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 61. Konu ALKOLLER, 11. Baskı, Hacettepe-Taş, Ankara, 2005.
122. Saglam, E., Kayir, H., Çelik, T., Uzbay, T., Effects of escitalopram on ethanol withdrawal syndrome in rats, Progress in Neuropsci Bio Psys, 30,1027-1032, 2006.
123. Saglam, E., Uzbay, T, Kayir, H., Çelik, T.,Beyazyürek M., Effects of velafaxine on ethanol withdrawal syndrome in rats, Fundamental Clin Pharmacol, 18, 693-698, 2004.
124. Schewe, T., Molecular actions of ebselen an antiinflammatory antioxidant, Gen Pharmacol 26, 6, 1153–69, 1995.
125. Scott, B.C., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O.I., Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins, Free Radic Res Commun., 19 ,4 ,241-53 ,1993.

126. Shi, J., Yui, J., Pohorly, J.E., Kakuda, Y., Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality, *J Med Food*, 6, 4, 291-9, 2003.
127. Shoemaker, W.J., The neurotoxicity of alcohols, *Neurobehav Toxicol Teratol*, 3, 4, 431-6, 1981.
128. Sies, H., Cadenas, E., Oxidative stress: damage to intact cells and organs, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 311, 1152, 617-31, 1985.
129. Sies, H., Oxidative Stress: from Basic Research to Clinical Application, *Am J Med.*, 3C, 31S-38S, 1991.
130. Simic, M.G., Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis, *Mutat Res*, 202, 2, 377-86, 1988.
131. Somani, S.M., Husain, K., az-Phillips, L., Lanzotti, D.J., Karet, K.R., Trammell, G.L., Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat, *Alcohol*, 13, 603–610, 1996.
132. Somani, S.M., Husain, K., Schlorff, E.C., Interaction of ethanol and nicotine on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in subregions of rat brain, *Res Commun Alcohol Subst Abuse*, 19, 75– 90, 1998.
133. Sripathirathan, K., Brown, J., Neafsey, E.J., Collins M.A., Linking binge alcohol-induced neurodamage to brain edema and potential aquaporin-4 upregulation: evidence in rat organotypic brain slice cultures and in vivo, *J Neurotrauma*, 26, 2, 261-73, 2009.
134. Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase, *Clin Chem*, 34, 497-500, 1998.

135. Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Melatonin: A Potent, Endogenous Hydroxyl Radical Scavenger, *Endocrine J*, 1, 57-60, 1993.
136. Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., Yan, M.T., El-Sawi, M., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Allegra, M., Hardeland, R., Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger, *Curr Top Med Chem*, 2, 181–198, 2002.
137. Topal, T., Endojen Olarak Salınan veya Eksojen Olarak Verilen Melatoninin Antioksidan Etkinliği ve Hiperbarik Oksijen Uygulaması İle Etkileşimi, *GATA Fizyoloji A.D. Tıpta Uzmanlık Tezi*, 2002.
138. Tsukaguchi, H., Tokui T., Mackenzie, B., Berger V.U., Chen Z.X, Yangxi Wang, Y., Brubaker R.F, Hediger M.A., A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters, *Nature*, 399, 70-75, 1999.
139. Tsukamoto, H., Horne, W., Kamimura, S., Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron, *J Clin Invest*, 96, 620–30, 1995.
140. Tufan, A.C., Akdogan, I., Turgut, G., Adiguzel, E., Increased tunel positive cells in CA1, CA2, and CA3 subfields of rat hippocampus due to copper and ethanol co-exposure, *Int J Neurosci*, 118, 5, 647-56, 2008.
141. Uzbay, I.T., Alkol ve madde bağımlılığı nörobiyolojisine giriş. 1. Ulusal Alkol ve Madde Bağımlılığı Kongresi kitabı, Antalya, 24-28, 2004.
142. Uzbay, I.T., Erden, B.F., Tapanyigit, E.E., Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats, *Life Sci*, 61, 2197-2209, 1997.

143. Uzbay, İ.T., Kayir, H., Çelik, T., Yüksel, N., Acute and chronic tianeptine treatments attenuate ethanol withdrawal syndrome in rats, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30, 478-485, 2006.
144. Uzbay, İ.T., Oglesby, M.W., Nitric oxide and substance dependence, *Neurosci Biobehav Rev*, 25: 43-52, 2001.
145. Uzbay, İ.T., Akarsu, E.S., Kayaalp, S.O., Effects of bromocriptine and haloperidol on ethanol withdrawal syndrome in rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 49, 969-974, 1994.
146. Uzbay, İ.T., Çelik, T., Aydın, A., Kayir, H., Tokgöz, S., Bilgi, C., Effects of chronic ethanol administration and ethanol withdrawal on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) levels in the rat brain, *Drug Alcohol Depend*, 74, 55-59, 2004.
147. Uzbay, İ.T., Erden, B.F., Attenuation of ethanol withdrawal signs by high doses of L-arginine in rats, *Alcohol Alcohol*, 38, 213-218, 2003.
148. Uzbay, İ.T., Erden, B.F., Tapanyigit, E.E., Kayaalp, S.O., Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats, *Life Sci*, 61, 2197-2209, 1997.
149. Uzbay, İ.T., Kayaalp, S.O., A modified liquid diet of chronic ethanol administration: Validation by ethanol withdrawal syndrome in rats, *Pharmacol Res*, 31, 37-42, 1995.
150. Uzbay, İ.T., L-NAME precipitates catatonia during ethanol withdrawal in rats, *Behav Brain Res*, 119, 71-76, 2001.
151. Uzbay, İ.T., Sağlam, E., Kayir, H., Çelik, T., Beyazyürek, M., Effects of fluoxetine on ethanol withdrawal syndrome in rats. *J Psychiatr Res*, 38, 445-450, 2004.

152. Uzbay, İ.T., Usanmaz, S.E., Tapanyığit, E.E., Aynacıoğlu, Ş., Akarsu, E.S., Dopaminergic and serotonergic alterations in the rat brain during ethanol withdrawal: Association with behavioral signs, *Drug Alcohol Depend*, 53, 39-47, 1998.
153. Uzbay, İ.T., Yeşilyurt, Ö., Çelik, T., Ergün, H., Işimer, A., Effects of agmatine on ethanol withdrawal in rats, *Behav Brain Res*, 107, 153-159, 2000.
154. Walker, D.W., Barnes, D. E., Zornetzer, S. F., Hunter, B. E. Kubanis, P., Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats, *Science*, 209, 711–713, 1980.
155. Winkler, B.S., In vitro oxidation of ascorbic acid and its prevention by GSH *Biochim Biophys Acta*, 925, 3, 258-64, 1987.
156. Wong, D.F., Maini, A., Rousset, O.G., Brašić, J.R., Positron emission tomography—A tool for identifying the effects of alcohol dependence on the brain, *Alcohol Res Health*, 27, 2, 161–173, 2003.
157. Wu, D., Cederbaum, A.I., Alcohol, oxidative stress, and free radical damage, *Alcohol Res Health*, 27, 277–84, 2003.
158. Wu, D., Cederbaum, A.I., Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1, *Toxicol Appl Pharmacol*, 207, 570–76, 2000.
159. Wu, D., Zhai, Q., Shi, X., Alcohol-induced oxidative stress and cell responses, *J Gastroenterol Hepatol*, 21, 3, 26-9, 2006.
160. Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., McKay, S., Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia* and *Sambucus* and their antioxidant capacity, *J Agric Food Chem*, 52, 26, 7846-7856, 2004.

161. Yamaguchi, T., Sano, K., Takakura, K., Saito, I., Shinohara, Y., Asano T., Yasuhara, E., Ebselen in acute ischemic stroke: A placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group, *Stroke*, 29,1,12–7, 1998.
162. Zakhari, S., Overview: how is alcohol metabolized by the body?, *Alcohol Res Health*, 29, 4, 245-54, 2006.
163. Zou, J.Y., Martinez, D.B., Neafsey, E.J., Collins, M.A., Binge ethanol-induced brain damage in rats: effect of inhibitors of nitric oxide synthase, *Alcohol Clin Exp Res*. 20, 8, 1406-11, 1996.