



T.C

MALATYA TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ
EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**PENTİLENTETRAZOL İLE EPİLEPTİK NÖBET OLUŞTURULAN ALKOLİK
ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)’NDA BEYİN VE KAS DOKUSUNUN OKSİDATİF
STRES PARAMETRELERİNDEKİ DEĞİŞİMLER**

Aytakin BABİROVA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANA BİLİM DALI**

AĞUSTOS 2024

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Pentilentetrazol İle Epileptik Nöbet Oluşturulan Alkolik Zebra Balığı (*Danio rerio*)’nda Beyin Ve Kas Dokusunun Oksidatif Stres Parametrelerindeki Değişimler” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Aytakin BABİROVA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PENTİLENTETRAZOL İLE EPİLEPTİK NÖBET OLUŞTURULAN ALKOLİK ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)’NDA BEYİN VE KAS DOKUSUNUN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNDEKİ DEĞİŞİMLER

Aytekin BABİROVA

Malatya Turgut Özal Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Su Ürünleri Anabilim Dalı

51 + XII Sayfa

2024

Danışman: Prof. Dr. Ünal İSPİR

Epilepsi, tüm dünyada yaygın olarak her yaştan insanı etkileyen ve kronik olarak seyreden nörolojik bir bozukluktur. Birçok faktörden kaynaklanıp tekrarlayan nöbetlerle karakterizedir. Uzun veya aşırı alkol kullanım sonrası aralıksız süren nöbetlere yol açabilmektedir. Alkol tüketim sonrasında beyinde ve kas dokusunda meydana gelecek fizyolojik olayların açıklanması bu hastalığa karşı alınabilecek önlemlere yardımcı olmak açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında alkol kullanımı sonrasında, epilepsi benzeri nöbetlerin oluşmasına neden olan pentilentetrazol kullanılarak zebra balıklarında oluşturulan epilepsi benzeri nöbetlerde oluşan oksidatif stres parametrelerindeki değişimin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada; zebra balıkları %1, %1,5 ve %3 dozunda etil alkole günlük olarak 1 saat için maruz bırakıldı ve 28 günlük uygulama sonrasında 15mM pentilentetrazol (PTZ) uygulanarak epileptik nöbet oluşturuldu. Daha sonrasında beyin ve kas dokusu alınarak malondialdehit (MDA), total glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi oksidatif stres parametreleri ile antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler araştırıldı.

Çalışmada alkol, PTZ ve alkol+ PTZ uygulanan gruplarda MDA düzeyinde istatistiki olarak anlamlı olan bir artış görülmüşken SOD, CAT ve GSH seviyelerinde doza bağlı olarak değişmekle beraber önemli derecede bir düşüş tespit edildi. En fazla olumsuz etki alkolün %3 dozu ve PTZ uygulanan gruptaki balıklarda saptandı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde hem alkol ve hemde alkol+PTZ gruplarında antioksidan mekanizmanın yıkımlandığı ve oksidatif stresin oluştuğunu söylemek mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Zebra balığı, *Danio rerio*, epilepsi, pentilentetrazol, oksidatif stres, antioksidan enzimler

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

CHANGES IN THE OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN BRAIN AND MUSCLE IN
PENTYLENETETRAZOLE INDUCED SEIZURE MODELS OF ALCOHOLIC ZEBRA
FISH (*Danio rerio*)

Aytakin BABIROVA

Malatya Turgut Özal University

Graduate Education Institute

Fisheries Department

2024

51+XII pages

Advisor: Prof. Dr. Ünal İSPİR

Epilepsy is a neurological disorder that is widespread globally and affects people of all ages, characterized by its chronic nature. It can be caused by many factors and is marked by recurring seizures. Excessive or prolonged alcohol use can lead to persistent seizures. Understanding the physiological events that occur in the brain and muscle tissue following alcohol consumption is crucial for developing preventive measures against this condition. Therefore, this thesis aims to investigate changes in oxidative stress parameters in epilepsy-like seizures induced by pentilentetrazole in zebrafish following alcohol use.

In this study, zebrafish were exposed to ethanol at doses of 1%, 1.5%, and 3% daily for 1 hour. After 28 days of treatment, epileptic seizures were induced by administering 15 mM pentilentetrazole (PTZ). Subsequently, brain and muscle tissues were collected, and changes in oxidative stress parameters such as malondialdehyde (MDA), total glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) as well as antioxidant enzyme activities were investigated.

In the study, a statistically significant increase in MDA levels was observed in the groups exposed to alcohol, PTZ, and alcohol+PTZ. Meanwhile, there was a dose-dependent decrease in SOD, CAT, and GSH levels, with significant reductions detected. The most pronounced adverse effects were observed in the group exposed to 3% alcohol and PTZ. Based on the results, it can be concluded that both the alcohol and alcohol+PTZ groups experienced degradation of the antioxidant mechanisms and the development of oxidative stress.

Key Words: Zebrafish, *Danio rerio*, epilepsy, pentylenetetrazole, oxidative stress, antioxidant enzymes

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında, sabırla ve ilgiyle bana yol göstererek desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam, Prof. Dr. Ünal İSPİR'e teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	16
2.1. Serbest Radikaller ve Epilepsi.....	16
2.2 Alkol Metabolizması ve Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu	18
2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	19
2.4.Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Etkileri	20
2.5.Oksidatif stres.....	21
2.6.Oksidatif stresin organlara etkisi	22
2.7. Antioksidanların etkileri.....	22
2.8.Epilepsi	23
2.9.Pentilentetrazol.....	23
2.10.Zebrabalığı.....	24
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1.Balık	27
3.2.Deneme Düzeni	27
3.3. Biyokimyasal parametreler.....	28
3.3.1. MDA Aktivitesinin Ölçülmesi.....	28
3.3.2. SOD Aktivitesinin Ölçülmesi	28
3.3.3. CAT Aktivitesinin Ölçülmesi	29
3.3.4. GSH Aktivitesinin Ölçülmesi	29
3.4. İstatistiksel Analizler	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	32
4.1. Bulgular	32
4.1.1. MDA Düzeyi.....	32
4.1.2. SOD Aktivitesi.....	33
4.1.3. CAT Aktivitesi.....	34
4.1.4. Glutatyon (GSH) Düzeyi	35
4.2. Tartışma.....	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

ROS	:	Reaktif oksijen türleri
MDA	:	Malondialdehit
SOD	:	Süperoksit dismutaz
CAT	:	Katalaz
GSH	:	Glutasyon
⁰ C	:	Santigrat Derece
cm	:	Santimetre
dk	:	Dakika
g	:	Gram
<	:	Küçük
mg	:	Miligram
mM	:	Milimolar
mm	:	Milimetre
rpm	:	Revolutions per minute (Dakikada devir)
sn	:	Saniye
µl	:	Mikrolitre
µg	:	Mikrogram
%	:	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Erkek ve dişi zebra balığı	25
Şekil 3.1. Deney düzeneği	30
Şekil 3.2. Zebra balığına anestezi madde uygulaması	30
Şekil 3.3. Anestezi altındaki zebra balıkları	31



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Alkol, PTZ ve kombinasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında MDA aktivitesi (nmol/mg protein).	32
Çizelge 4.2. Alkol, PTZ ve kombinasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında SOD aktivitesi (U/mg protein).	33
Çizelge 4.3. Alkol, PTZ ve kombinasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında CAT aktivitesi (U/mg protein).	34
Çizelge 4.4. Alkol, PTZ ve kombinasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında GSH aktivitesi (μmol/g protein).....	35



1.GİRİŞ

Alkol kullanımı, dünya genelinde önlenebilir ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Alkol, kan-beyin bariyerini aşarak beyne doğrudan erişim sağlayabilmektedir (Vore ve Deak, 2021). Alkole bağlı kusurlar doz, süre ve genetik faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Ungerer vd. 2013). Çevresel ve beslenme bozukluklarının alkolün beyin ve kaslar üzerindeki etkileri bilinmektedir. Zebra balığı, omurgalı gelişimi, gen ifadesi analizi, insan hastalıklarının modellenmesi, yeni ilaç preparatlarının geliştirilmesi ve toksikolojik ajanların etkilerinin ortaya konması gibi birçok alanda yapılan çeşitli araştırmalar için uygun bir model organizma durumundadır. Önceki araştırmalarda alkolün nöronlar üzerindeki etkisi için zebra balığının iyi bir model organizma olduğunu ortaya koymuştur. (Ali vd. 2011; Muralidharan, 2016; Muralidharan vd. 2015).

Kronik alkol tüketiminin etkileri hala tam olarak aydınlatılamamış olup patolojik ve fizyolojik etkilerini ortaya çıkarmak için birçok araştırma yürütmektedir. Deneysel çalışmalar, alkol kullanımının zararlı etkilerini ortaya koymak için tasarlanmakta ve insanlarda etkilerine paralel sonuçlar alınmaktadır (Hiller-Sturmhofel ve Spear, 2018). Alkolün zararlı etkilerini bilmek alkol; bağımlılığında ve aşırı tüketiminin vücutta çeşitli riskleri artırabileceği gerçeği, kronik alkol maruziyetinin etkisinin araştırılmasını dahada önemli bir duruma getirmektedir.

Reaktif oksijen türleri (ROS), alkole maruziyet sonucunda üretilebilir. (Zimatkin ve Buben, 2007) ve bunlar beyinde etanolün etkileri ile ilişkili olabilir.(Karahanian vd. 2011; Haorah vd. 2008), burada ROS ile ilişkili hasar oksidatif strese kaynaklanmaktadır (Haorah vd. 2008). Oksidatif dengenin sağlanması, biriken ROS miktarı ile antioksidan enzimlerin aktivitesi sonucudur. Beyinde antioksidan enzimler korteks, beyincik, hipotalamus, striatum ve omurilikte bulunur ve bunlar glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz ve peroksidoksin içerir (Shim ve Kim, 2013). Oksidatif dengenin bozulması durumunda, hücre üzerinde ayrıca proteinler, lipidler ve DNA üzerinde etkiler oluşturarak nörotoksikite veya nörodejenerasyona neden olan oksidatif stres gelişebilir.

Epilepsi, tüm korteksde ya da lokalize beyin bölgelerindeki sinir hücrelerinin aşırı uyarımı sonucu istemsiz olarak tekrarlayan nöbetlerle karakterize sinir sistemine ait bir bozukluktur (Liu vd.2010). Epilepsi epileptik nöbet oluşturmaya yatkınlık ile tanımlanır. Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneği (International League Against Epilepsy-ILAE) epileptik bir nöbeti “beyindeki aşırı veya senkron nöronal aktiviteden kaynaklanan, geçici semptomlar olarak” tanımlamaktadır (Fisher ve ark. 2005). Epilepsi, primer olarak beyin tespit edilebilen bir hasarı veya risk faktörü olmadan ortaya çıkabildiği gibi (primer epilepsiler), altta yatan başka nörolojik, sistemik, metabolik, toksik veya travmatik

nedenlerle sekonder olarak gelişebilir (semptomatik epilepsiler) (Forsgren ve ark. 2005). Epilepsinin dünya nüfusunun % 1'ini etkilediği ciddi bir hastalık olup yüksek ölüm oranlarına sahiptir. Türkiye'de ise yaklaşık 700 bin epilepsi hastası olduğu tahmin edilmektedir.

Zebra balıklarında alkol ve pentilentetrazolün vücuttaki fizyolojik olaylara etkisinin araştırıldığı bazı çalışmaların özetleri aşağıda verilmiştir.

Tiedeken ve Ramsdell (2007), yaptıkları çalışmada, Domoik asit (DA)'ın embriyonik maruziyetinin etkilerini karakterize etmek için zebra balığı kullanmış ve fetal kökenli yetişkin hastalıklarına yol açabilen çevresel kirleticileri taramak için alternatif bir tür model olarak kullanmışlardır. Embriyolar, döllenmeden saatler sonra DA konsantrasyonları (0,12 ile 1,26 ng/mg yumurta ağırlığı arasında) ile enjekte edilmiştir. Yedi gün sonra larvalar, kimyasal konvülzan pentylenetetrazol (PTZ) karşısında duyarlılık açısından karakterize edilmiştir. Tiedeken ve Ramsdell (2007), *in ovo* olarak DA maruziyetinin larval balıklarda kimyasal olarak indüklenen nöbetlere duyarlılığı azalttığını ve nöbet davranışının şiddetini artırdığını göstermişlerdir.

Rosemberg vd. (2010), Alkolün zararlı etkilerini oksidatif stres parametrelerindeki değişiklikler, sinyal iletim yolları ve nörotransmitter sistemleri ile ilişkilendirmek için bir çalışma planlamış ve EtOH tarafından indüklenen nörotoksositeye karşı taurinin potansiyel bir koruyucu rolünün olup olmadığını araştırmışlardır. Bu çalışmada, akut taurin eşzamanlı veya önceden (1 saat) uygulamasının, EtOH'ün zebra balığı beyinlerinde asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi ve oksidatif stres parametrelerindeki değişiklikleri önleyip önlemediği araştırmışlardır. EtOH maruziyetinin 1 saatlik süre boyunca AChE aktivitesini artırdığını, ancak taurin eşzamanlı uygulamanın bu artışı önlediğini göstermişlerdir. Balıklar taurin ile önceden tedavi edildiğinde de benzer koruyucu etki gözlenmiştir. Taurin tedavilerinin EtOH tarafından uyarılan süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesindeki değişiklikleri önlediği, ayrıca, taurinin tiyobarbitürik asit reaktif türler (TBARS) seviyelerini önemli ölçüde azalttı, ancak EtOH ile birlikte taurin eşzamanlı tedavi grubunda, EtOH tarafından indüklenen lipidperoksidasyonu önlemediğini ortaya koymuşlardır. Tüm bu veriler, EtOH'ün yetişkin zebra balığı beyinlerinde oksidatif stresi artırdığını ve bu omurgalının akut EtOH maruziyetine karşı taurinin faydalı etkilerini değerlendirmek için çekici bir alternatif model olduğunu gösterdiği vurgulanmıştır.

Braida vd. (2012), Oksitosin (OT)/ ve arginin-vasopressin (AVP) ile karşılaştırılarak yetişkin zebra balığında (PTZ ile indüklenmiş nöbetler üzerindeki etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Bu mekanizma, OT ve AVP reseptör antagonistleri kullanılarak incelenmiştir. Zebra balıkları, PTZ maruziyetinden 10 dakika önce artan dozlarda (0.1-40 ng/kg) neuropeptidlerle intramusküler olarak enjekte edilmiş ve çeşitli peptidlerin nöbet sayısını önemli ölçüde azalttığı tespit etmişlerdir.

Du vd. (2012), zebra balığına 28 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda 1-oktil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat iyonik sıvısını uygulamı ve karaciğerdeki antioksidan enzimlerin aktiviteleri (SOD ve CAT), reaktif oksijen türü seviyeleri ve DNA hasarına etkisini 7, 14, 21 ve 28 gün almış oldukları örnekler bu maddenin toksisitesini değerlendirmişlerdir. İyonik sıvının antioksidan enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiği, ROS birikimine ve DNA hasarına neden olduğunu ve bu durumun konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak ortaya koymuşlardır.

Banote vd. (2013), Gabapentin'in (GBP) oral olarak verilmesinin yetişkin zebra balıklarında PTZ ile indüklenen nöbet benzeri aktivite üzerindeki etkisini araştırmak için bir çalışma planlamışlardır. Oral olarak verilen GBP, PTZ tarafından neden olan nöbet benzeri lokomotor aktiviteyi ve sefalik alan potansiyelindeki güçlü yavaş dalga (~ 3 Hz) aktivitesini önemli ölçüde baskıladığını bulmuşlardır. Bu çalışma da yetişkin zebra balıklarında oral yoldan verilen bir antikonvülsanın etkinliğine dair ilk raporun olduğunu bildirmişlerdir.

Dong vd. (2013), 1-dekil-3-metilimidazolyum bromür ([C10mim]Br)'ün zebra balıklarında oksidatif stres ve DNA hasarı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Erkek ve dişi zebra balıkları ayrı ayrı olmak üzere beş farklı [C10mim]Br konsantrasyonuna (0, 5, 10, 20 ve 40 mg L⁻¹) maruz bırakmış ve 7., 14., 21. ve 28. günlerde örnek almışlardır. Kontrol gruplarına göre antioksidan enzimlerin aktiviteleri çoğu maruziyet aralığında belirgin şekilde azaldığını bulmuşlardır. Bu azalmış aktivite zebra balığı karaciğerinde fazla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine ve malondialdehit (MDA) içeriğinin artmasına neden olmuştur.

Mussulini vd. (2013), yetişkin zebra balıklarında PTZ ile indüklenen nöbetin detaylı zamansal davranış profilini karakterize etmek istemiş ve balıkları PTZ banyosunda (5, 7.5, 10 ve 15 mM) 20 dakikalık süre boyunca muamele ettikten sonra yüzmede yavaşlama, yüzmede artış aktivitesi ve operküler hareketlerin sık frekansı, düzensiz hareketler, dairesel hareketler, klonik nöbet benzeri davranış, tankın dibine düşme ve tonik nöbet benzeri davranış ve ölüm gibi davranış profillerini araştırmışlardır. Farklı PTZ konsantrasyonlarına maruz kalan balıkların farklı nöbet profilleri, yoğunlukları sergilediklerini tespit etmişlerdir. Yalnızca 15 mM PTZ'ye maruz kalan balıklar, maruziyetten sonra normal davranışa dönme süresinde artış göstermiştir. %10 ve %15'te toplam ölüm oranları sırasıyla %33 ve %50 olarak belirlenmiştir. Tüm davranışsal parametreler göz önüne alındığında, sırasıyla düşük, orta ve yüksek şiddette nöbetler gözlenmiştir. Diazepam (DZP) öntedavisi nöbet şiddetini önemli ölçüde azaltmıştır. Son olarak, 5 ve 10 mM PTZ'ye batırılan yetişkin zebra balıklarının beyin PTZ düzeyleri, kemirgen modeli için tarif edilenlerle benzer olup, maruziyetten 20 dakika sonra pik yapmıştır. PTZ'ye 2.5 dakika ve maruziyetten 60 dakika sonra beyin düzeyleri benzer bulunmuştur. Tüm bu bulgular, yetişkin zebra balıklarında PTZ epileptik nöbet modelinin detaylı zamansal davranış karakterizasyonunu gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Pineda vd. (2013), çalışmalarında epileptik nöbet aktivitesine yanıt olarak tetiklenen beyincik aktivasyonunun nöbetleri önleyip önleyemeyeceğini belirlemek istemişler ve bu araştırma için model organizma olarak zebra balığını kullanmışlardır. Beyinciğin elektriksel stimülasyonunun antikonvülsan etkisi olup olmadığını belirlemek için elektriksel stimülasyonunu kullanmışlardır. Beynin stimülasyonunun antikonvülsan etkisinin, nöbet aktivitesine yanıt olarak elektriksel stimülasyonların reaktif olarak tetiklenmesi ile potansiyelize edilebileceğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, stimülasyon tetikleme hızının doğrudan pentylenetetrazol konsantrasyonuna bağlı olduğunu ve stimülasyon hızının antikonvülsan valproik asit ve daha büyük stimülasyon akımları tarafından azaltıldığını tespit etmişlerdir.

Alkolizmin folat eksikliğine neden olduğu ve embriyonik anomaliler riskini artırdığı bilinmektedir. Bununla birlikte, etanol maruziyeti ile embriyonik folat durumu arasındaki etkileşim net değildir. Bu nedenle Hsiao vd. (2014), etanol maruziyetinin embriyonik folat durumu ve bir-karbon homeostazı üzerinde nasıl etki ettiğini araştırmak için zebra balığı embriyolarını etanolde inkübe etmiş ve embriyonik folat içeriğini ile folat enzim ifadesini analiz etmişlerdir. %2 etanola maruziyet embriyonik toplam folat içeriğini değiştirmedığını ancak tetrahidrofolat seviyesini yaklaşık olarak 1,5 kat artırdığını tespit etmişlerdir.

Yüksek düzeyde alkol tüketiminin neden olduğu kalp kaslarında meydana gelen bir zararın adı olan alkolik kardiyomiyopatiye karşı Selenyumun vücuttaki serbest radikallerin oluşumunu önleyerek hücreleri koruduğunu ortaya koymak için yapılan bir çalışmada; sodyum selenit ve Seleynum nanoproteinlerinin *in vitro* ve *in vivo* antioksidatif etkileri ortaya konulmuştur. Ayrıca, zebra balığı embriyolarında etanol tedavisi ile indüklenen perikardiyal ödemi önleyebilmiş ve apoptozu ve hücre ölümünü azaltmıştır. Sonuçlar, selenyumun ve Seleynum nanoproteinlerinin, alkolik içecek endüstrisinde kardiyomiyopatiyi kontrol etmek için bir katkı maddesi olarak potansiyel olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Kalishwaralal vd. 2015).

Siebel vd. (2015), çalışmalarında, adenozerjik sinyalleşimi modüle edebilen ilaçların yetişkin zebra balıklarında pentilentetrazol ile indüklenen nöbetler üzerindeki etkileri araştırmıştır. Adenozin A1 reseptör antagonistin ise nöbet aşamasının başlangıç süresini azalttığı; Adenozin A1 reseptör agonisti siklopentiladenozin (CPA), tonik-klonik nöbet aşamasına ulaşma süresini artırdığı; Adenozin A2A reseptör agonisti ve antagonist olan CGS 21680 ve ZM 241385 ise nöbet parametrelerinde değişikliklere neden olmadığını tespit etmişlerdir. Elde edilen bulgulara göre, adenozin A1 reseptörlerinin aktivasyonunun zebra balıklarında nöbet gelişimini kontrol etmek için önemli bir mekanizma oluşturduğunu göstermişlerdir.

Stancová vd. (2015), naproksenin yetişkin zebra balıklarında antioksidan enzimlerin gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Şaşırtıcı bir şekilde, 2 haftalık

maruziyet sonrasında karaciğerde hedef genlerin mRNA ekspresyonunda anlamlı bir etki bulunamamış fakat, üç genin mRNA düzeyleri barsakta önemli ölçüde değişti tespit edilmiştir. Antioksidan enzim katalaz (CAT) seviyesi her iki konsantrasyonda da belirgin şekilde yukarıya doğru regüle edildiği tespit edilmiştir.

Sutha vd. (2022), zebra balığı kullanılarak tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) 'nin toksik mekanizmalarını in vivo deney ve in-silico olarak ortaya koymak için bir deney tasarlamış ve balıkları statik yenileme yöntemi altında 28 gün boyunca 100 ve 1500 µg L⁻¹ konsantrasyonlarına maruz bırakmışlardır. Kronik maruziyet süresince, TCEP'ye maruz kalan grup kontrol grubuna göre plasma steroid hormonları olarak testosteron (T) ve 17β estradiol (E2), plasma vitellogenin (Vtg) ve antioksidan enzimler olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve lipid peroksidasyonun (LPO) gonadlarda anlamlı şekilde değiştiğini ortaya koymuşlardır.

Torres-Hernández vd. (2015), *Valeriana officinalis* bitkisinin ekstrelerinin antikonvülsan özelliklere sahip olup olmadığını ortaya koymak için yapmış oldukları bir araştırmada yetişkin zebra balığını antikonvülsan ilaçların incelenmesi için bir hayvan modeli olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır. Antikonvülsan aktivite testleri için zebra balıkları fenitoin, klonazepam, valerenik asit, veya etanolik valerian ekstreleri veya birbiriyle karışımları (fenitoin veya klonazepam ile valerenik asit veya valerian ekstreleri) ile çalışmalarını yürütmüşlerdir. Balıklar daha sonra PTZ ile indüklenmiş ve yetişkin zebra balıklarında PTZ tarafından indüklenen nöbetleri değerlendirmek için bir davranış ölçeği geliştirmişlerdir. PTZ'ye maruz kaldıktan sonra zebra balıkların, klonik benzeri hareket nöbetlerin ortaya çıkmasından önce stereotipik davranışlar sergilediği belirlenmiştir. Hem valerenik asit hem de valerian ekstreleri (sulu ve etanolik) yetişkin zebra balıklarında nöbet (konvülziyon) başlangıcına kadar geçen süreyi önemli ölçüde uzattığı bulunmuştur. Etanolik valerian ekstresi, sulu ekstreden daha güçlü bir antikonvülsan etkiye sahip olduğu ve valerenik asit şle valerian ekstreleri, klonazepam ile sinerjik olarak etkileşime girerek nöbet başlangıcına kadar geçen süreyi uzattığı raporlanmıştır. Böylelikle Torres-Hernández vd. (2015), bu çalışmalarında Valerenik asit ve valerian ekstrelerinin, yetişkin zebra balıklarında antikonvülsan özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Yan vd. (2015), nitenpiram tarafından indüklenen oksidatif stresin detoksifikasyon sistemindeki değişiklikler ve zebra balığındaki DNA hasarını ortaya koymayı amaçladığı çalışmalarında, zebra balıklarını dört farklı konsantrasyona (0.6, 1.2, 2.5 ve 5.0 mg/L) 28 gün boyunca maruz bırakmış ve daha sonra 7., 14., 21. ve 28. günlerde üçer kez örnek almışlardır. Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri, kontrol grubuna kıyasla çoğu maruziyet süresinde dramatik olarak inhibe edilmiş; yalnızca düşük konsantrasyonda (0.6 mg/L) nitenpiram için SOD ve 21. gününde CAT'te bu fark gözlenmemiştir. Bu farklılığın, zebra balığı karaciğerlerinde fazla reaktif oksijen türleri

(ROS) üretimi ve artmış malondialdehit (MDA) içeriğinden kaynaklandığını ortaya koymuşlardır. Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi, tedavi gruplarında kontrol grubuna göre yüksek konsantrasyonda artmıştır.

Barbalho vd. (2016), PTZ ile indüklenen nöbetler sonrası zebrabalığı beyinlerinde pro-inflamatuar sitokinler olan interleukin-1 beta (IL1 β) ve siklooksijenaz-2 (Cox2a ve Cox2b) transkript seviyelerini incelemişlerdir. Ayrıca, zebrabalıklarına PTZ uygulaması öncesi nonsteroidal anti-inflamatuar ilaç olan indometazin uygulamış ve bunun nöbet süresine etkisi, nöbet benzeri davranış sayısı ve IL1 β , Cox2b ve C-fos mRNA ekspresyonu üzerine etkisini belirlemişlerdir. IL1 β 'nin kısa süreli olarak yükseldiğini bulmuşlar ve nöbetlerden sonra Cox2b'nin, Cox2a'nın ise uyarılmadığını ortaya konulmuştur. PTZ ile indomethacin tedavisi öncesi IL1 β , Cox2b ve C-fos mRNA ekspresyonunu aşağı regüle ettiği ve indomethacin ile maruz kalan larvalarda nöbet gecikmesinin arttığını, nöbet benzeri davranışların azaldığını gözlemlemişlerdir. Yazarlar bu çalışma da, IL1 β ve Cox-2 transkriptlerinin zebrabalıklarında pentylenetetrazol ile tetiklenen nöbetlerden sonra arttığını göstermişlerdir.

Peng vd. (2016), Zebrabalıklarının ışık-karanlık geçişlerindeki hareketlilik değişiklikleri anksiyete düzeyini yansıtarak faydalı bir davranışsal ölçütün sağlandığı bilinmektedir. Zebrabalığı larvaları fertilizasyon sonrası 5 gün ve 7 gün farklı PTZ konsantrasyonları ile tedavi edilmiş ve hareketlilik ve thigmotaksi, sürekli aydınlatma altında veya ışık-karanlık döngüleri arasında (stresli koşullar) analiz etmişlerdir. 5 günlük ve 7 günlük zebrabalığı larvaları PTZ'ye farklı duyarlılıklar gösterdiğini tespit etmişlerdir. PTZ etkisi altındaki aydınlatma geçişlerine yanıt olarak ölçülen anksiyete düzeyi, karışık eğilimler sergilemiştir. 8mM PTZ alan zebrabalığı larvalarında karanlık-ışık geçişleri, anksiyeteyi işaret eden hareketliliği dramatik olarak artırmıştır. Bu çalışma, PTZ'nin nöronları aktive ederek duyarlılığı artırdığını ve bu durumun larvaların anksiyete düzeyini etkilemesini sağladığını önermektedir. Potansiyel anti-anksiyete ilaç taraması için faydalı kanıtlar sunmaktadır.

Torres-Hernández vd. (2016), Zebra balığı larvalarının yüzme davranışlarının otomatik kaydını kullanarak ışık ve karanlık periyotlarında bu davranışları tekrarlanabilir şekilde PTZ ile değiştirmişlerdir. PTZ ile değiştirilen yüzme davranışlarını, iyi tanımlanmış sentetik bir anksiyolitik ilaç olan valproik asit (VPA) ile birlikte eşzamanlı tedavi ile VPA'nın türetildiği *V. officinalis* (Val) bitkisinin crude kök ekstraktları kullanarak tersine çevirmeyi amaçlamışlardır. Ayrıca, Val varlığında PTZ tedavisi ile sinir aktivite düzenleyici genlerin (C-fos, NPAS4a ve BDNF) ekspresyonunun nasıl etkilendiğini değerlendirmişlerdir. Menezes ve Da Silva, (2017), Cinsiyetin, ağırlığın ve sıcaklık değişikliklerinin PTZ (10mM) ile indüklenen klasik nöbet durumlarına ulaşma süresine olan

etkisini değerlendirilmişlerdir. Cinsiyet ve ağırlık PTZ'ye yanıt profilini etkilememiştir. Su sıcaklığı 22'den 30°C'ye değiştirildiğinde, daha düşük sıcaklık nöbet durumlarına ulaşma süresini artırmış, daha yüksek sıcaklık ise kontrol grubunda tutulan 26°C'ye göre önemli ölçüde azaltmıştır. Bu çalışmada, yetişkin zebra balıklarında PTZ modelinin cinsiyet ve ağırlıktan etkilenmediğini, ancak su sıcaklığının PTZ'ye yanıtı doğrudan etkileyebildiğini vurgulamışlardır.

Duy vd. (2017), çalışmalarında yetişkin zebra balıklarının beyinlerinde tekrarlayan PTZ nöbetlerinin hücresel yanıtlarını araştırmışlardır. Zebra balıklara günde bir kez PTZ ile beş kez nöbet indüksiyonu uygulamışlar ve bu nöbetlerin hücresel sonuçlarını karakterize etmişlerdir. Tekrarlayan nöbetlere yanıt olarak, beyin dokusunda vazodilatasyon, perivasküler lökosit çıkışı ve lökosit proliferasyonuna dair histolojik kanıtlar bulmuşlardır, bunun da nöbet kaynaklı akut merkezi sinir sistemi inflamasyonundan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, artmış proliferasyon, nörogenez ve reaktif gliyozis bulgularında tespit etmişlerdir.

Tekrarlanan etanol kullanımı insanlarda nörolojik bozukluklara yol açar ve önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilir. EtOH'un fizyolojik etkileri doz ve zaman bağımlı olduğu ve e sosyal davranışlarda önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, alkolün indüklediği oksidatif stres, EtOH nörotoksitesinde anahtar mekanizmalardan biri olarak öne sürülmüştür. Müller vd. (2017), ilk kez tekrarlanan EtOH maruziyetinin zebra balıklarının sosyal davranışını değiştirdiğini ve beyin oksidasyon süreçlerini etkilediğini araştırmışlardır. Hayvanlar %1 EtOH'e 8 gün boyunca (günde 20 dakika) maruz bırakılmış ve 9. gününde sosyal davranışlar ve biyokimyasal parametreler değerlendirilmiştir. Beyin dokusunda SOD ve CAT aktiviteleri azalmıştır. Ayrıca, lipid peroksidasyon artarak oksidatif hasar oluşturmuştur. Müller vd. (2017), bu çalışmalarında translasyonel nörobilim perspektifinden, verilerinin zebra balıklarının aralıklı EtOH uygulamasının biyokimyasal ve davranışsal etkilerini anlamak için kullanışlı olduğunu vurgulamaktadır.

Agostini vd. (2018), çalışmada, zebra balığı beyinde etanol tüketiminin kolinerjik sisteme, oksidatif stres ve inflamatuvar parametrelere uzun vadeli etkilerini araştırmışlardır. Balıklar %0,5 etanol ile 7, 14 ve 28 gün boyunca maruz bırakılmış ve kolin asetiltransferaz aktivitesini 7 ve 14 gün sonra inhibe ettiği, ancak 28 gün sonra etkili olmadığını tespit etmişlerdir. Alkol maruziyetinden sonra tiyobarbiturik asit reaktif türleri ve diklorodihidroflöresin düzeylerinin arttığı bulunmuş ve CAT/SOD oranıyla desteklenen antioksidan aktivitenin değişti saptanmıştır. Bu nedenle de bu yazarlar EtOH'un zebra balığı beyinde oksidatif hasara yol açabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Jin vd. (2018), Gastrodin tedavisinin zebra larvalarında PTZ ile indüklenmiş nöbetler üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve anti-oksidatif savunma ile ilişkili altta yatan mekanizmayı araştırmışlardır. Gastrodin'e maruziyetten sonra anti-oksidatif aktivite,

antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü ve oksidatif stresle ilişkili genlerin ekspresyonu yoluyla PTZ ile indüklenmiş nöbetlerde gözlemlenmiştir. Gastrodinin PTZ ile indüklenmiş nöbetleri konsantrasyon bağımlı bir şekilde hafiflettiğini ve oksidatif stresi düzenleyerek larval zebra balığında daha fazla nöbetten potansiyel olarak koruduğunu göstermektedir.

Alkolik karaciğer hastalığının (ALK) erken bir aşaması olan hepatik steatoza karşı polidatinin etanol ile indüklenen karaciğer hasarını hafifletip hafifletmediğini ve altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak için yapılan bir çalışmada (Lai vd, 2018), 4 günlük zebra balık larvaları (dpf) 32 saat boyunca 350 mmol/L etanol ile muamele edilmiş, ardından polidatin ile 48 saat tedavi edilmiştir. Polidatin burada hepatik steatozu güçlü bir şekilde hafifletmiş ve CYP2Y3, CYP3A65, HMGCRa, HMGCRb ve FASN gibi alkol ve lipid metabolizması ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerini azaltmıştır. Ayrıca, polidatin karaciğerdeki oksidatif stresi floresan probuna göre inhibe etmiştir. Dahası, DNA hasarı ile ilişkili genlerin (CHOP, GADD45aa) önemli ölçüde yukarı regüle edilmiş ekspresyonu, polidatinin larvalarda hepatik apoptozu azalttığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, polidatin akut alkolik karaciğer hasarlı zebra balıklarının karaciğer fonksiyonunu, hepatik yağ birikimini azaltarak, lipid ve etanol metabolizmasını düzelterek, oksidatif stresi ve DNA hasarını azaltarak iyileştirebileceği ileri sürülmüştür (Lai vd, 2018).

Rishitha ve Muthuraman, (2018), Zebra balıklarında PTZ uygulamasının bilişsel bozulmanın tedavisinde katı lipid nanopartikül kuersetinin rolünü araştırmışlardır: Zebra balıklarında bellek bozulması, 7.5 mM PTZ solüsyonuna maruz bırakılarak indüklenmiştir. Katı lipid nanopartikül kuersetinin intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon ile uygulamışlardır. Öğrenme ve bellek seviyeleri; ışık ve karanlık odası testi, bölüm tercih testi ve üç bölmeli kompartman testi gibi farklı testlerle değerlendirilmişlerdir. Ayrıca, PTZ'nin beyin üzerindeki biyokimyasal değişiklikleri, asetilkolinesteraz aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve azalmış glutatyon düzeyleri açısından değerlendirilmişlerdir. Katı lipid nanopartikül kuersetinin, PTZ ile indüklenen nörolojik bozulmalarda hafifletici etki göstermiş ve biyokimyasal değişikliklerin düzeltilmesine yardımcı olmuştur. Dolayısıyla, bu katı lipid nanopartikül kuersetinin, potansiyel anti-oksidatif, anti-lipid peroksidatif ve asetilkolinesteraz inhibitör etkileri olduğunu bildirmişlerdir.

Zheng vd. (2018), Syntaxin 1b (STX1b) geninin beyinde yoğun olarak ifade edildiğini ve pentylenetetrazol (PTZ)-indüklenmiş nöbetli zebra balık modelinde nöbetlerle negatif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. PTZ'nin STX1b transkripsiyonunu inhibe ettiğini ancak geniş spektrumlu bir epilepsi tedavi ilacı olan valproat tarafından kurtarıldığını görmüşlerdir. PTZ-nöbetli zebra balık modelinde, STX1b knockdown larvalarda yüzme davranışını kötüleştirilmiş ve özellikle aydınlatma uyarımı altında anormal hareketlerin yörüngesini uyarılmış ve beyinde nöronal aktivite belirteci geni c-fos'un ekspresyon düzeyleri önemli ölçüde artmış bulunmuştur. Buna karşın, STX1b aşırı ifadesi, PTZ-indüklenmiş

nöbetler sonrası larvalarda nöbetleri hafiflettiği ve c-fos ekspresyon düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular ile, STX1B protein düzeylerinin nöbetlerle negatif korelasyon gösterdiğini ve PTZ-indüklenmiş nöbetli zebrabalık larvalarında fotosensitif yanıtın duyarlılığını azaltabildiğini, ayrıca STX1B'nin BBR'nin kısmen antikonvülsan etkisini aracılık edebileceğini ifade etmişlerdir.

Canzian vd. (2019), çalışmalarında PTZ'in tek bir maruziyet sonrasında zebra balıklarında saldırganlığı artırıp artırmadığını araştırmışlardır. Balıklar 10 mM PTZ'e 20 dakika boyunca maruz bırakılmış ve iyileşme döneminden sonra farklı zaman aralıklarında (1 saat, 3 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat) ayna karşısında gözlenen saldırganlık ölçülmüştür. Balıklar PTZ uygulamasından sonraki 1 saatten 48 saate kadar şiddetli saldırganlık göstermişler ve benzer alana giriş sayısında artış yaşanmıştır. Ancak, 72 saat sonra herhangi bir davranışsal fark gözlenmemişlerdir.

Fontana vd. (2019), Taurin (TAU) tedavisinin zebra balığının beyin dokusunda PTZ ile indüklenen davranışsal değişikliklerden ve oksidatif stresle ilişkili parametrelerden koruyup korumadığını değerlendirmişlerdir. Balıklar, 42, 150 ve 400 mg/L TAU ile (40 dakika) tedavi edilmiş ve daha sonra 10 mM PTZ'ye (20 dakika) maruz bırakılmıştır ve nöbet benzeri davranışları analiz edilmiştir. Test edilen tüm TAU konsantrasyonları, ilk 150 saniyede nöbet şiddetini azalttığı, 150 mg/L TAU'nun nöbet benzeri davranış skorlarını azalttığı, nöbet şiddetini düşürdüğü, klonik benzeri sıklığını azalttığı ve skor 4'e ulaşma süresini artırdığı gözlemlenmiştir. TAU (150 mg/L), PTZ'ye meydan okuyan balıklarda oksidatif stres önleyerek lipid peroksidasyonunu ve protein karbonilasyonunu azalttığını ve nonprotein tiyol düzeylerinde değişiklikleri önlediğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, TAU'nun zebra balıklarında PTZ ile indüklenen nöbet benzeri davranışları ve beyin oksidatif stresini azalttığını göstermişlerdir.

Mazumder vd. (2019), yaptıkları çalışmalarında LY294002'nin PTZ aracılı konvülsiyonları zebra balığı modelindeki antikonvülsan potansiyelini araştırmak için tasarlamışlardır. 7 günlük post-fertilizasyonda olan zebra balığı larvaları PTZ maruziyetinden önce farklı konsantrasyonlarda LY294002 ile inkübe etmişlerdir. Yetişkin zebra balığında intraperitoneal enjeksiyon sonrasında farklı LY294002 konsantrasyonları ile PTZ'ye maruz bırakılmış ve ardından beyinlerinde gen ekspresyon çalışmaları yapmışlardır. LY294002'ye maruz kalan larva grubunda kontrol grubuna kıyasla c-fos ekspresyonunda belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. 100 nM LY294002 ile tedavi edilen yetişkin zebra balıklarında PTZ tarafından tetiklenen nöbet şiddeti önemli ölçüde azaldığını, klonik benzeri nöbet başlangıç süresi ise arttırdığını tespit edilmiştir.

Sehonova vd. (2019), zebra balığının embriyonik gelişimi sırasında amitriptilin'in antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin mRNA ekspresyonu üzerine potansiyel etkisini değerlendirmişlerdir. Embriyoları, amitriptilin'in 300 ng/L ve 30 mg/L konsantrasyonlarına

maruz bırakmı ve döllemeden sonraki 24, 48, 96 ve 144 saatlerde (hpf) örnekler almışlardır. Sitokrom P450 1A1, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz mRNA ekspresyonları değerlendirilerek antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin zaman içindeki değişimleri incelemişlerdir. Embriyonik gelişim sırasında mRNA ekspresyonları karakteristik değişiklikler gösterdi ve genellikle çıkış sonrası geçici değişikliklere neden olduğu; ancak amitriptilin uygulamasının, 144 saat sonrasında yalnızca 30 mg/L konsantrasyonunda CAT üzerinde anlamlı bir etki oluşturduğunu ve bu enzim önemli ölçüde yükseltilğini rapor etmişlerdir.

Cong vd. (2020), Dimetil ftalat (DMP)'ın balıklar üzerindeki toksikolojik etkileri ortaya koymak için yetişkin zebra balıklarının karaciğerinde akut toksisite, oksidatif hasar, antioksidan enzim aktiviteleri ve göreceli gen ekspresyon desenleri araştırılmışlardır. Katalaz (CAT) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri, yüksek DMP konsantrasyonlarının 96 saat maruziyetten sonra önemli ölçüde azaldığı ve ilgili transkripsiyonel ekspresyonun yukarı veya aşağı regülasyon gösterdiği raporlanmıştır.

Gawel vd. (2020), Palmatin (PALM)'in zebra balıklarında PTZ ile indüklenmiş nöbet modelindeki etkisini berberin (BERB) ile birlikte değerlendirmişlerdir. PALM, EEG analizi ile doğrulanan anti-nöbet özellik sergilediğini ve PTZ ile tedavi edilen larvalarda c-fos ve bdnf seviyelerini azalttığını bulmuşlardır. PALM ve BERB'nin 1:2,17 oranında kombinasyonunun saf ekstaktın aktivitesini taklit ettiğini ve bu iki aktif bileşiğin antikonvülsan aktivitesinden sorumlu olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak, yaptıkları çalışmada PALM'ın antikonvülsan aktivitesini ilk kez ortaya koymuşlar ve PALM ile BERB kombinasyonunun ayrı kullanımından daha yüksek terapötik değere sahip olabileceğini önermişlerdir.

Jin vd. (2020), yaptıkları çalışmada α -Asaronun metabolik ürünü olan α -asaronolün, PTZ ile indüklenen nöbetler üzerindeki antikonvülsan etkileri zebra balıkları modelinde değerlendirilmiş ve altında yatan mekanizmalar araştırılmışlardır. α -Asaronol, konsantrasyon bağımlı bir şekilde nöbetleri hafifletmiş, nöbet latansını artırmış, nöbet benzeri davranışları ve C-fos ekspresyonunu azaltmış, ayrıca anormal nöronal deşarjları azaltmıştır. Nöbet geçiren zebra balıkları ve α -Asaronol ön tedavi edilmiş zebra balıklarının gen ekspresyon profillerini karşılaştırmışlar ve α -Asaronol'ün nöbetleri PPAR- γ ekspresyonunu artırarak azalttığını bulmuşlardır.

Zhang vd. (2020), berberinin (BBR) iki türevi olan BBR-D1 ve BBR-D2 sentezlemiş ve bunların zebra balığı modelinde pentylenetetrazol ile indüklenmiş nöbetlerdeki etkileri karşılaştırmışlardır. Türevlerin hidrofilik/hidrofobik bileşimine bağlı olarak antikonvülsan aktiviteleri arasında bir ilişkisi bulmuşlardır. Ayrıca, nöbet sırasındaki anti-inflamatuvar etkileriyle ilgili mekanizmayı da araştırmışlardır. BBR ve türevleri, PTZ uygulaması sonrası nöbet başlangıç süresini artırmış ve nöbet benzeri davranışları baskılamıştır. BBR ve

türevleri ile muamele edilmiş zebra balığı larvaları, nöbetler sırasında C-fos ekspresyonunda ve nöronal deşarjda iyileşme göstermiştir. Nöbet ilerlemesi sırasında inflamatuvar yanıtlar, makrofaj ve nötrofillerin toplanması ile birlikte tümör nekroz faktörü alfa (TNF α), interleukin 1 beta (IL1 β) ve interleukin 6 (IL6) gibi moleküllerin yukarı regülasyonunu içerdiğini bildirmişlerdir. Bu etki, BBR ve türevlerinin uygulanması ile önemli ölçüde baskılanmıştır. BBR ve türevlerinin PTZ-indüklenmiş nöbetleri hafiflettiğini ve zebra balığında daha fazla nöbetin oluşmasından potansiyel olarak koruyacak şekilde anti-inflamatuvar etkiyi düzenlediğini ileri sürmüşlerdir.

Aksakal vd. (2021), 8 hafta boyunca arı sütü beslenen balıklarda süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz enzim aktiviteleri ve ekspresyon profilleri üzerindeki etkileri araştırdıkları bir çalışmada; kas, karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen örneklerde, enzim aktivitelerinde artılar ve azalmaların olduğunu gözlemişlerdir. Ancak, gen ekspresyonu ile enzim aktivitesi arasında tüm dokularda anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir.

Gawel vd. (2021), *Zingiber officinale* metanolik ekstraktının PTZ uygulanmış larval zebra balıklarında antikonvülsan aktivite gösterdiğini araştırmışlardır. Daha sonra, *Z. officinale* rizomunun önemli bir bileşeni olan 6-gingerol (6-GIN)'ü larval zebra balıklarında PTZ ile indüklenen hiperlokomosyon nöbet denemesinde doza bağımlı antikonvülsan aktivite gösterdiğini elektroensefalografik olarak ortaya koymuşlardır. 6-GIN PTZ ile tedavi edilen balıklarda GLU seviyesini azalttığını ve sadece PTZ uygulanmış balıklarla karşılaştırıldığında GLU/GABA oranını azalttığını bildirmişlerdir.

Hacke vd. (2021), çalışmasında *Cymbopogon citratus*'un yapraklarından elde edilen esansiyel yağ (EO) ve hidroalkolik ekstraktın (E1) yanı sıra, bu bitkinin ilgili bileşikler sitral (CIT) ve geraniolün (GER) pentylenetetrazol (PTZ) ile indüklenen nöbetlerin zebra balıklarında antikonvülsan ve nörokoruyucu etkilerini incelemişlerdir. Örneklerin antikonvülsan özelliklerini değerlendirmek için yetişkin balıklar esansiyel yağlara ve ardından PTZ çözeltisine maruz bırakılmıştır. Oksidatif stres belirteçleri malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), katalaz (CAT) ve nitrik oksit (NO), PTZ maruziyetinden sonra zebrafish beyin homojenatlarında değerlendirmişlerdir. Yazarlar, *C. citratus*'dan elde edilen EO, E1, CIT ve GER'in zebra balıklarında antikonvülsan etkilere sahip olduğunu ve epilepsi tedavisi için umut verici bir yardımcı terapötik strateji olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Issac vd. (2021), morinin zebra balığı larva modelindeki 1 mM H₂O₂ ile oksidatif stres oluşturarak olası bir antioksidan ve nörokoruyucu olarak oksidatif stres (H₂O₂) etkilerini incelemiş ve balıkların SOD, CAT, glutatyon, glutatyon peroksidaz aktivitesi, glutatyon S transferaz, asetilkolinesteraz aktivitesi ve nitrat düzeyi gibi enzim düzeylerini tespit etmişlerdir. Çalışmada, morinin 20 ile 60 μ M konsantrasyonları arasında larvalara

zarar vermediği, ancak 80 ile 100 μM arasında olmayan ölümcül deformiteler oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca, antioksidan enzimlerin lipid peroksidasyona karşı nörokoruyucu etkisinin olduğu bulunmuştur. Apoptoz ve hücrel ROS düzeyleri, morin ile birlikte inkübe edildiğinde larvalarda azalmıştır. Morin tedavisinin, oksidatif stres karşısında antioksidan enzimleri regüle ettiğini tespit etmişlerdir.

Kim vd. (2021), GM-90432'nin nörokimyasal profil tabanlı bir yaklaşım ile pentylenetetrazol (PTZ) ile indüklenmiş epileptik nöbet görülen zebra balık modelindeki antiepileptik etkilerini araştırmışlardır. GM-90432, beyin dokusunda 5-hidroksitriptamin, 17- β -östradiol, dihidrotestosteron, progesteron, 5 α -dihidroprogesteron ve allopregnanolon düzeylerini artırmış ve normetanefrin, gamma-aminobütirik asit ve kortizol düzeylerini azaltarak PTZ ile indüklenmiş epileptik davranışları etkili bir şekilde düzeltmiştir. GM-90432 ayrıca PTZ ile indüklenen oksidatif stres ve zebrafish ölümüne karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Perumal vd. (2021), Bir sekoiridoid glikozit maddesini zebra balıklarındaki toksisitesini araştırmışlar ve balık embriyolarında morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Ayrıca, yetişkin zebra balıklarında bu bileşiğin balık karaciğerine etkisi belirlenmiştir. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, indirgenmiş glutatyon seviyeleri, glutatyon S-transferaz, laktat dehidrojenaz, glutamik oksaloasetik transaminaz, lipid peroksidasyon ve glutamik pirüvik transaminaz enzim profillemesi değerlendirilmiştir. Bu maddenin düşük konsantrasyonlarda (40 μM) güvenli bir ilaç olduğunu görülmüştür.

Raju vd. (2021), *Channa striatus*'un kas transkriptomundan elde etmiş olduğu ve RM12 adı verilen bir antioksidan peptidi, in vivo olarak antioksidan özelliklerini tespit etmek için zebra balığı embriyosunda denemiş ve embriyoları 5 mM H_2O_2 stresi altında intraselüler ROS seviyesi ile değerlendirerek apoptoz inhibisyonu incelemişlerdir. H_2O_2 stresli zebra balığı embriyosundan antioksidan enzimler ekstrakte edilmiş ve intraselüler ROS RM12 tarafından azaltıldığı saptanmıştır.

Sharma vd. (2021), yaptıkları çalışmada, hesperidin'in PTZ ile indüklenmiş konvülsiyonlar üzerindeki antikonvülsan etkisini araştırmışlardır. Sağlıklı zebra balığı larvaları, PTZ'ye maruz kalmadan önce hesperidin (1, 5 ve 10 μM) ile 1 saat muamele edilmiş ve nöbetlerin gecikmesini önemli ölçüde artırmıştır. PTZ'ye maruz kalan larvalarda hesperidin inkübasyonunu takiben sinirsel uyarılmanın baskılanmasını destekleyen c-fos ekspresyonunda önemli bir azalma gözlenmiştir.

Velayutham vd. (2021), NV14 adı verilen ve *Arthrospira platensis* 'den sentezlenen yeni bir peptidin H_2O_2 'e maruz bırakılmasıyla zebra balığı larvalarında yapılan in vivo tedavisi gelişimsel toksisite belirtileri göstermediğini ortaya koydukları çalışmaların da süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığını; ayrıca malondialdehit (MDA) seviyelerini anlamlı şekilde azalttığını ve süperoksit

radikal aktivitesini artırdığını tespit etmişlerdir. NV14 peptidi önceden tedavi edilen zebra balığı larvalarında, H_2O_2 ile indüklenen genel oksidatif stres sırasında glutatyon peroksidaz, γ -glutamil sistein sentaz ve glutatyon S-transferaz gibi antioksidan enzim genlerinin ekspresyonunun arttığı ortaya konulmuştur.

Torres vd. (2021), zebra balığında EtOH tüketiminin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerini incelemek için planlamış oldukları bir çalışmada, altın nanoparçacıkları (GNP) 'nın zebra balığı beyinlerinde EtOH tarafından indüklenen asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini eşzamanlı veya önceden tedavi ile önleyip önlemediğini araştırmışlardır. Yetişkin zebra balıklarına EtOH uygulamasından 1 saat önce 2.5 mg/L GNP ile önceden tedavi yapılmış ve aynı süre boyunca her iki maddeye eşzamanlı olarak tedavi edilmiştir. GNP ile önceden tedavi, EtOH tarafından indüklenen asetilkolinesteraz aktivitesindeki artışı önlememiş, ancak 2.5 mg/L GNP ile eşzamanlı tedavi bu artışa karşı koruma sağlamıştır. GNP, EtOH ile eşzamanlı olarak tedavi edildiğinde tiyobarbitürik asit reaktif türler ve dihidrodiklorofloresin seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ve GNP, EtOH tarafından indüklenen süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesindeki artışı önlediği tespit edilmiştir. Bu bulgular sonrasında, zebra balığının alkolün kötüye kullanımı ile ilişkili bozukluklara karşı nanoparçacıkların incelenmesi için ilginç bir perspektif sunduğunu ve model organizma olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Alkol metabolizması reaktif oksijen türleri (ROS) ürettiği bilinmektedir. Bu nedenle alkol kötüye kullanımının beyin üzerinde zararlı bir etkisi vardır. Zebra balığı, toksik maddelerin taraması ve akut etanol maruziyeti modellerinde sıkça kullanılan bir omurgalıdır. Baldin vd. (2022), Gallik asid öntedavisinin (24 saat) zebra balığı beyinindeki akut etanol maruziyeti (1 saat) tarafından uyarılan purinerjik sinyal yollarındaki değişiklikleri, hücre dışı nükleotidlerin parçalanması ve oksidatif stres yoluyla değerlendirdikleri bir çalışmada etanol tarafından artırılan lipid peroksidasyonu ve diklorodihidroflüorescein (DCFH) seviyelerini önlediğini ve etanolün süperoksit dismutaz (SOD) üzerindeki etkilerine karşı olumlu bir şekilde düzenlediği gösterilmiştir, ancak katalaz (CAT) üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir.

Li vd. (2022), Procamburus clarkii kabuk protein hidrolizatlarının (PCSPHs) diyet takviyesinin zebra balığındaki büyüme performansı, kas biyokimyasal göstergeleri ve histolojik özellikleri üzerine etkilerini analiz etmişlerdir. Ayrıca kas antioksidan kapasitesi ve sirkadiyen saat genlerinin ekspresyon değişiklikleri de değerlendirmişlerdir. Besleme sonrası, PCSPHs takviyesi ile beslenen zebra balıklarının son vücut ağırlığı, ağırlık artış oranı ve spesifik büyüme oranı normal diyetten beslenenlere göre önemli ölçüde yüksekti ve kas trigliserit ve aspartat aminotransferaz içerikleri azaldığını ve aynı zamanda, PCSPHs takviyesi ile beslenme, zebra balıklarının toplam amino asit içeriğini ve miyofiber yapısını

iyileştirdiği, antioksidan enzim aktiviteleri olan toplam süperoksit dismutaz (T-SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon (GSH) içeriği arttığı bulunmuştur.

Song vd. (2022), antioksidan potansiyele sahip doğal bir polifenol bileşiği olan kurkuminin (CUR), , transgenik zebra balıklarında karaciğer ile karaciğer hasarı modeli oluşturmak için %2 etanol (ETH) kullanılarak oluşturdıkları çalışmalarında döllenmeden sonraki 144 saatte (hpf) artmış bir vakuol oranı görülmüş, bu da önerilen modelin karaciğer hasarını indüklemekte etkili olduğunu doğrulamıştır. Ancak, etanol kurkumin ile birlikte maruz kalındığında, floresan alanı ve sinyal yoğunluğu ile vakuol oranı kontrol grubundaki seviyelerle benzer olduğu ve glutatyon metabolizması ile ilgili genlerin (gsr, gpx1a, gstp1, gstol1, ve idh1a) ekspresyon modelini değiştirdiğini gösterdi. CUR ayrıca, etanol maruziyeti sonucu azalan glutatyon (GSH) seviyesini artırdığını tespit etmişlerdir.

Zhao vd. (2022), tıbbi ve yenilebilir bitki olan *Penthorum chinense* (PCP)'nin etanol tarafından indüklenen karaciğer hasarını azaltmadaki mekanizmasını aydınlatmak için Karaciğer spesifik transgenik zebra balığı larvaları, döllenmeden üç gün sonra (3 dpf), farklı PCP konsantrasyonları (100, 50 ve 25 µg/mL) ile 48 saat boyunca tedavi etmiş, 32 saat boyunca 350 mM etanol içinde bekletilmişlerdir. PCP, zebra balığı karaciğer fonksiyonunu restore etmiştir. Ayrıca, doza bağlı olarak PCP, sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) ifadesini engellemiş, hücre içi reaktif üretimini azaltmış ve karaciğer yağ birikimini ve oksidatif hasarı hafifletmiştir. PCP, kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) ifadesini azaltarak, nükleus faktör-E2-related factor 2 (Nrf2) ifadesini (nükleusa taşınarak) artırarak ve sistemik oksidatif stresi azaltarak hepatoprotektif işlevini yerine getirmiştir. Ayrıca, PCP, sequestosome 1 (p62/SQSTM1, p62), Atg13 ve Beclin 1 ifadelerini azaltarak, otomfaji sinyal yolunu yukarı regüle etmiştir.

Moraes vd. (2023), zebra balıklarında hafif, ağır, esnek olmayan ve negatif takviye olarak tanımlanan dört etanol tercih fenotipini karakterize etmişlerdir. Bu amaçla, beyinde telomer uzunluğunu, mtDNA kopya sayısını gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR) kullanarak değerlendirdik ve antioksidan enzimler olan CAT-SOD-GPx- aktivitelerini incelemişler ve bu biyobelirteçler arasındaki etkileşimleri değerlendirmişlerdir. Bu parametrelerde gözlenen değişiklikler etanol tüketimi ve alkol kötüye kullanımı ile ilişkilendirmişlerdir. Ağır, esnek olmayan ve negatif takviye telomer kısalması gösterdiği gibi yüksek SOD/CAT ve/veya GPx aktiviteleri göstermiştir. Ancak, etanol tercihi olmayan hafif fenotip, ilaçla temas ettikten sonra bile analiz edilen parametrelerde herhangi bir değişiklik göstermemiştir. Ayrıca, telomer uzunluğu ile SOD ve CAT aktivitesi arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur.

Üstündağ vd. (2023), çalışmalarında zebra balıkları embriyolarında morfinin PTZ ile indüklenen epilepsi modelindeki etkilerini değerlendirmeyi, lokomotor aktiviteyi ve oksidan-antioksidan durumu, inflamasyonu ve kolinerjik sistem ile nöronal aktivite işaretleyicileri c-

fos, bdnf ve opioid reseptörlerini içeren parametreleri belirlemeyi amaçlamışlardır. Zebra balığı embriyoları 72 saat sonrasında PTZ (20 mM), VPA (1 mM) ve morfine (MOR) (100 µM) maruz bırakılmıştır. MOR ve VPA ön işlem gören gruplar, PTZ maruziyetinden 20 dakika önce MOR (MOR + PTZ) veya VPA (VPA + PTZ) ile tedavi edilmiştir. Oksidan-antioksidan sistem parametreleri, asetilkolinesteraz aktivitesi ve sialik asit seviyeleri spektrofotometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. C-fos, BDNF, OPRM1 ve OPRD1 genlerinin ekspresyonları RT-PCR ile analiz edilmiştir.. MOR'un PTZ ile indüklenen epileptojenik süreç karşısındaki iyileştirici etkisinde, inflamatuvar ve oksidan-antioksidan sistem parametrelerinin, C-fos, BDNF ve opioid reseptörü OPRM1'in restorasyonu etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Paravani vd. (2024), Östrojen 17a-etinilestradiol (EE2) çevresel kirleticilerin üreme sistemine doğrudan veya dolaylı olarak etki ederek gelişimi ve doğurganlığı bozabileceğini göz önünde bulundurarak zebra balıklarında EE2'nin hücresel oksidatif durumu nasıl değiştirdiği hakkında bilgiler elde etmek için bir çalışma planlamışlar ve EE2'ye in vivo maruz kalan yetişkin zebra balığının solungaç hücrelerindeki etkisini değerlendirmişler ve oksidatif stres yollarında yer alan ana enzimleri analiz etmişlerdir. EE2'ye maruz kaldıktan sonra Mn-SOD ve CAT genlerinin mRNA düzeylerinde artış olduğunu göstermişlerdir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Serbest Radikaller ve Epilepsi

Epilepsi hastalarının yaklaşık üçte biri mevcut medikal tedavilere cevap vermemektedir (Schuele ve Luders, 2008). Farklı antiepileptojenik ilaçlar cevap yanıtlarına bağlı olarak seçim kriteri olmaksızın hastalarda denenmek zorunda kalınmakta ve cevap alınan vakalarda da ilaç tedavisi nöbetleri semptomatik olarak engelleyebilmektedir ve mevcut antiepileptojenik ilaçların epilepsiye neden olan beyin anormalliklerini düzeltebileceği ya da epilepsinin doğal gelişimini değiştirebileceğine dair yeterli bir kanıt yoktur. Dolayısıyla epileptogenezi engelleyen veya hücrel ve moleküler mekanizmaları tersine çeviren (antiepileptojenik aktiviteye sahip) yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Dichter 2006, Loscher ve Schmidt 2006, Stefan vd.2006). Bu tedavilerin geliştirilmesi ise epileptogenezi şekillendiren biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasıyla gerçekleşebilir (Zeng vd. 2009). Ayrıca epileptogeneze yatkınlık durumunda bireysel farklılıkların olması kişiye özgü tedavi yaklaşımlarına da gerek olduğunu göstermektedir.

Epilepsi genetik ve/veya çevresel etkenlere bağlı bir bozukluktur (Wayne 2009). Çok sayıda hastalık epilepsiye neden olabilir ancak epilepsi hastalarının %50 den fazlasında belirgin bir neden bulunamamaktadır ve bu vakalar idiyopatik epilepsi hastaları olarak adlandırılmaktadır. İdiyopatik epilepsilerin patogenezi halen bilinmemekle beraber bu vakaların %80' i ilaçla kontrol edilebilmekte geriye kalan %20' de ise ilaca-dirençli epilepsi gelişmektedir (Shorvon 1996). Epilepsinin tanısı temel olarak detaylı, güvenilir klinik bulgularla, hasta öyküsüyle ve elektroensefalogram (EEG) bulgularıyla konmaktadır. Ancak tipi yeterince açık olmayan klinik bulgular ve hasta öyküsü bazı vakalarda tanı konmasını güçleştirmektedir. Epilepsi tüm yaşam boyunca sürebilir, bu nedenle epilepsi hastaları yaşam boyu süren ilaç tedavisine ihtiyaç duyabilirler (Engel 1989).

Serbest radikaller sık sık biyolojik redoks reaksiyonlarını üretmektedirler. Ayrıca serbest radikaller fazla miktarda ilaç kullanımı, kirlilik, ağır metaller, ısı, ultraviyole ışınlar veya iyonize radyasyon formları gibi pek çok dış etkene bağlı olarakda vücutta üretilirler (Cheeseman ve Slater, 1993; Halliwell ve Gutteridge, 1999). Reaktif türlerin kontrolsüz bir şekilde üretiminin artması, vücutta geniş bir biyolojik molekül yelpazesinde geri dönüşümü zor veya imkansız hücrel hasar yâda hastalıklarla sonuçlanan bir dizi zincir reaksiyona neden olurlar (Ekmekcioglu, 2006). Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu zararlara ve kanser de dahil olmak üzere bir çok hastalığın fizyolojisinde ve patolojisinde bu ürünlerin etkilerinin araştırıldığı çalışmalara büyük ilgi vardır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Epilepsi nöbetlerinden kaynaklanan beyin hasarı, nöral hücre ölümüne katkıda bulunan çok sayıda faktörü içeren dinamik bir süreçtir. Bu süreçler genetik faktörleri, hücre içi elektrolit metabolizmasında bozulmalara yol açan glutamate araçlı toksisite durumunu, oksidatif stress, mitokondriyal bozukluk ve aşırı artmış sitokin konsantrasyon durumunu içermektedir (Ferriero, 2005). Epileptik nöbet aktivitesinde hücresel düzeyde N-metil-D-aspartat (NMDA) bağımlı iyon kanallarının aracılığıyla büyük oranda kalsiyum akışı başlatılmaktadır. Hücre içi kalsiyum miktarının fazlalığı, epileptik nöbet sonrası akut nöral hücre ölümünü tetikleyen biyokimyasal bozukluklara neden olur. Ayrıca hücre içi yüksek kalsiyum miktarı reaktif oksijen türlerinin oluşmasına, mitokondriyanın ayrışmasına ve hücrenin fonksiyonlarına müdahale edebilen katabolic enzimlerin aktivasyonunu tetiklemektedir (Patel, 2004). Mitokondriyal membranın sürekli olarak sitozolik kalsiyum (Ca^{2+}) iyonlarına maruz kalması sonrasında oluşan depolarizasyon ve artan reaktif oksijen türlerinin üretimi nedeniyle NADPH ve ATP üretimi bozulabilmektedir (Schuchmann vd.1999). Uzun süreli epileptik durum sonrasında ATP üretiminde bir bozulmanın olduğu ileri sürülmüştür (Gupta vd. 2001). Serbest radikallerin epilepside hem sebep ve hem de sonuç ürünü olduğu kanıtlanmıştır (Patel, 2004).

Oksidatif stress ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu, nöbet bozuklukları da dahil olmak üzere pek çok nörolojik bozukluklarda önemli bir rol oynamaktadır (Ashrafi vd. 2007a, b). Ratlarda deneysel olarak oluşturulan epilepsi modelinde serebral korteksde artan bir oksidatif stress olduğu tespit edilmiştir (Lores Arnaiz vd.1998). Mitokondriyumda oluşan oksidatif reaksiyonlar vücut dokularında ve sinir sistemi hücrelerinde oksijen radikali üretimini artırmaktadır. Eğer hücrede güçlü bir antioksidan savunma sistemi varsa, antioksidanlar tarafından reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerinden korunabilirler. Sistem, normal durumun ötesinde aşırı kullanıldığında veya kronik olarak etkinleştirildiğinde yan ürünlerdeki anormal artışlar nöral hücre hasarına neden olabilir (Ashrafi vd. 2007a, b).

Epilepsinin mekanizması üzerine yapılan çalışmalar daha çok rodent kullanılarak yapılmıştır. Diğer memeli türleri nadir olarak incelenmektedir. Daha basit yapıdaki organizmalar da epileptik nöbet modellemelerinde kullanılmıştır. Bu organizmalarla yapılan modellemelerin; basit bir sinir sistemine sahip olmaları nedeniyle insanlardaki epileptik nöbetler ile ilişkisinin olamayacağı üzerine pek çok tartışma vardır. Fakat, omurgalılar arasında pek çok nöral fonksiyonun balık ve diğer basit yapılı omurgalılarda bulunması, bunların çeşitli nörolojik bozukluklar için uygun modeller oluşturabileceğini düşündürmektedir. Gerçekten de zebra balığı gibi basit omurgalılar ile yapılan çalışmalar, memelilerdeki beyin gelişim mekanizmasının açıklanmasında büyük rol oynamıştır. Zebra balığı gelişimsel ve genetik çalışmalar için kolaylıkla temin edilebilen ve birçok insan hastalığına karşı modellenmesi oldukça kolay olan bir tatlısu balığıdır. Zebra balığının özellikle genom sekansının tamamlanmasından sonra insan hastalıklarının çalışılması için iyi

bir model organizma olduğu görülmüştür. Gelişiminin ilk devresi yüksek yapılı omurgalılara olan benzerliği ve çok sayıda geninde özellikle insan gen yapısına uygunluk görülmesi bu balığın model organizma olarak kullanımını kaçınılmaz hale getirmiştir. Zebra balığının embriyo ve larvalarının şeffaf özellikte olması mutasyonların hızlı ve etkili bir şekilde tanınmasına neden olmaktadır. (Sun vd. 2004; Lieschke ve Currie, 2007). Zebra balığı kullanılarak insanlarda hemen hemen bütün organlarda modelleme çalışması yapılabilir. Çevresel toksik maddelerin etkilerinin araştırılması zebra balıklarında rutin çalışmalar haline gelmiştir (Zhang vd. 2003). Zebra balığında deneysel olarak oluşturulan neoplasm'ların insanlardaki kanser vakalarına benzediği histolojik olarak ortaya konulmuştur (Stern vd. 2003). Yine ilaç uygulamalarında apoptoz ve anjiyogenezis çalışmalarında iyi bir model organizma olduğu bildirilmiştir (Habeck vd. 2002). Zebra balığının bakımı oldukça kolaydır. Küçük bir balık olması yer bakımından avantaj sağlamaktadır. Kısa bir olgunlaşma devresine sahiptir. Haftada 200-300 yumurta alınabilir. Buda bir defada bir çok denek üzerinde çalışma imkanı sağlamaktadır. Embriyo ve larvaları şeffaftır. Buda kanser veya diğer patolojik bozuklukların izlenmesine fırsat vermektedir. Zebrabalığı insana benzer bir genetik yapı göstermektedir. Bu balığın genomik yapısı tamamen aydınlatılmıştır. 1.505.581.940 baz çiftine sahip olup 26.247 proteinden oluşmaktadır. Genlerinin %72'si insanlar ile uyushmaktadır. İnsan hastalıklarıyla bağlantılı olduğu bilinen genlerin %84'ü zebra balıklarında mevcuttur (Ensembl, 2013). Bu özelliklerden dolayı zebra balığının model organizma olarak kullanımı gün geçtikçe artmaktadır.

Alkol dolaylı olarak membran akışkanlığında, kanal ve pompalarda ve iyonik geçişlerde değişikliklere neden olur. Son zamanlarda, çeşitli çalışmalar, muhtemelen ROS oluşumu yoluyla, alkol aracılı kan ve doku toksisitesinin gelişiminde oksidatif stresin rolünü incelemiştir (Shipoor vd. 2008; Çalışkan vd. 2010). Alkol, mitokondriyal ve sitoplazmik membranın oksidasyonunu, lipidleri başlatır, membranlara zarar verir ve ROS oluşumuna yol açar (Siler-Marsiglio vd. 2004). Bazı bilim adamları, alkolün lipid peroksidasyonunu indüklediği ve alkolik insanlarda ve deney hayvanlarında ROS oluşumuna bağlı olarak glutatyon ve C vitamini gibi antioksidanları azalttığı gösterilmiştir (Fernández-Solà vd.1998; Çalışkan vd. 2010).

2.2 Alkol Metabolizması ve Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu

Alkol tüketimi, alınan alkol miktarına bağlı olarak iki aşamalı bir kardiyovasküler etkiye sahiptir. Düşük ila orta dozlarda, alkolün kardiyovasküler sisteme olumlu etkisi vardır. Ancak, kronik yüksek doz alkol alımı doğrudan kan basıncını yükseltme, konjestif kalp yetmezliği, karaciğer hastalığı ve diğer etanol kaynaklı hastalıkların gelişme olasılığını

artırma ile ilişkilidir. Alkol ayrıca renin-angiotensin aldosteron eksenini, adrenajik sinir sistemi atımı, kortizol salgısı ve insülin duyarlılığını azaltma, kalp atış hızını ve periferik kas tonusunu düşürme ve endotel disfonksiyonuna neden olma gibi etkileri kötüleştirir (Estruch vd. 2004).

Etanol kötüye kullanımı tarafından tetiklenen ciddi klinik sorunlar arasında karaciğer hastalıkları öne çıkar, çünkü karaciğer etanol metabolizmasının başlıca yeri ve özellikle asetaldehit olmak üzere kendi reaktif metabolitlerinin hedefidir (Henzel vd. 2004). Alkol alındığında, karaciğerde enzimatik aktivite tarafından sitozol, mikrozomlar ve peroksizomlarda geniş ölçüde metabolize edilir, bu da asetaldehitin oluşturulmasına yol açar. Asetaldehit, mitokondrilerde asetaldehid dehidrogenaz tarafından asetata daha da oksitlenen, serbest radikaller/reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olan toksik bir maddedir (Husain vd. 2005). Alkol metabolizma enzimi sitokrom P450 veya mikrozomal etanol oksidasyon sistemi (MEOS) (Lieber vd. 1994), alkol aracılı etkileşimlerde merkezi bir rol oynar.

Sitokrom P450, biri sitokrom P450 redüktaz (EC 1.6.2.4) diğeri Sitokrom P450 2E1 (CYP2E1 olan iki enzimden oluşur, her ikisi de endoplazmik retikulumun membranına gömülüdür. Alkole ek olarak, CYP2E1 birçok bileşiği, asetaldehit dahil olmak üzere metabolize edebilir. Etanol bağımlı oksidatif stres, hepatositlerin endoplazmik retikulum (ER) membranında etanolü metabolize ederken bol miktarda hidrojen peroksit ve süperoksit anyon radikal gibi ROS (reaktif oksijen türleri) üreten sitokrom P450-2E1'in (CYP2E1) indüksiyonuna neden olur (Lu ve Cederbaum, 2008). Hem akut hem de kronik alkol tüketimi aşırı reaktif oksijen türleri (ROS)/serbest radikal üretir. Bu nedenle, ROS birçok alkolle ilişkili hastalıkta rol oynamaktadır (Conde de la Rosa vd. 2008).

2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif Oksijen Türleri Serbest radikaller, eşlenmemiş elektronlara sahip moleküller veya atomlardır. Radikaller, normal oksidasyonun yan ürünleri olarak hücrelerde üretilir. Çoğu radikal, normal hücre aerobik solunum sırasında oluşur (Gutteridge ve Halliwell, 2000). Serbest radikaller, kimyasal reaksiyonların seyrinde kısa bir süre bağımsız olarak var olabilirler (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Eşlenmemiş elektron, serbest radikallere önemli bir reaktivite derecesi verir. Oksijenden türeyen radikaller, yaşayan sistemlerde oluşan radikal türlerinin en önemli sınıfını temsil eder. Serbest radikaller ve ROS birkaç biyomolekülle reaksiyona girer ve bir zincir reaksiyonunu başlatır. Bu reaksiyonlar, serbest radikallerin yok edilmesiyle durur. Oluşan serbest radikal, başka bir serbest radikal veya bir zincir kırma veya birincil antioksidan ile reaksiyona girer. Serbest radikaller, diğeri hücresel

yapılarla etkileşime giren yüksek reaktif moleküllerdir. Eşlenmemiş elektron içerdikleri için kararlı bir çift üretilene kadar diğer elektronları almak için çabalarlar. Örneğin, oksijenin iki eşlenmemiş elektronu vardır. Oksijen, oksijen kullanan organizmalar için hücrel metabolizmada nihai elektron alıcı olarak dört elektron alabilir (yani, dört elektronla indirgenebilir) (Miller vd. 1990).

2.4.Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Etkileri

Biyolojik sistemlerde ROS'un birçok yararlı etkisi bulunmaktadır. Bunlar, hücrel sinyalleşme ve redoks düzenlemesinde faydalıdır. Nitrik oksit (NO), bir sinyal molekülü olarak bulunmuş ve transkripsiyon faktörü aktiviteleri ve gen ekspresyonunun diğer belirleyicilerini düzenlemektedir (Furchgott, 1995). Hidrojen peroksit ve süperoksit, benzer hücrel fonksiyonlar gösterirler (Patel vd. 2000). Birçok sitokin, büyüme faktörü, hormon ve nörotransmitter, hücrel sinyal iletiminde ROS'u ikincil haberciler olarak kullanır (Thannickal ve Fanburg, 2000). Radikallerin başka önemli bir işlevi ise enfeksiyona karşı savunma mekanizması olarak hareket etmektir. Aktive edilmiş fagositler, hücrelere giren bakterileri öldüren ROS üretirler (Thomas vd. 1988).

Paradoksal bir şekilde, radikallerin birçok zararlı etkisi vardır. Hücrelerin önemli bileşenlerini kalıcı olarak okside ederek onlara zarar verirler. Lipitleri, proteinleri, DNA'yı ve diğer doymamış yağ asitlerini oksitlerler (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Hidroksil radikal, vücutta oluşan tüm radikaller arasında en reaktif olanıdır. Canlı hücredeki herhangi bir molekülle reaksiyona girebilme kapasitesine sahiptir (Halliwell, 1989).

ROS'un mutajenik olduğu bulunmuştur. Özellikle •OH radikalleri ile reaksiyona girerek DNA'yı hasarlarlar ve DNA'nın kırılmasıyla modifiye ederler, bu da yapısal değişikliklere neden olur (Marnett, 2000). DNA'daki yapısal değişiklikler mutasyonlara ve sitotoksik etkilere yol açar (Diplock, 1991), bu da sırasıyla kanser ve diğer hastalıklara neden olabilir. ROS tarafından amino asit kalıntıları oksitlenir ve ya modifiye edilmiş ve daha az aktif enzimlere ya da denatüre olmuş ve işlevsiz enzimlere neden olur (Butterfield vd. 1998). Kükürt veya selenyum kalıntıları içeren amino asitler, radikaller tarafından oksidasyona daha yatkındır (Jonas ve Elias, 2001).

ROS, lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipidler, hücrenin önemli bir parçasını oluşturur. Lipidler, oksijenle reaksiyona girerek parçalanır, bu sürece oto-oksidasyon denir. Poli doymamış yağ asitlerinin doymamış bölgeleri serbest radikaller tarafından kolayca saldırıya uğrar. Bu süreç, başlangıç, çoğaltma ve sonlandırma reaksiyonları olmak üzere üç aşamayı içerir. Bu, serbest radikaller tarafından başlatılan bir zincir reaksiyonudur ve

doymamış yağ asitlerinden oluşan diğer serbest radikallerin sürekli bir kaynağını sağlar ve daha fazla peroksidasyonu başlatır (Powers vd. 1999).

Serbest radikaller, içsel kaynaklar, dışsal kaynaklar ve fizyolojik faktörler tarafından üretilir. İçsel kaynaklar, enzimatik reaksiyonlar yoluyla serbest radikalleri üretir. Bunlar arasında mitokondriyal solunum zinciri, fagositoz ve prostaglandin sentezi, sitokrom P450 sistemi, ksantin oksidazı içeren reaksiyonlar, fagositoz, demir ve diğer geçiş metalleri, peroksizomlar, arakidonat yolları, egzersiz, iskemi, reperfüzyon ve inflamasyon bulunmaktadır. Dışsal kaynaklar, iyonlaştırıcı radyasyonlar tarafından başlatılan organik bileşiklerin enzimatik olmayan reaksiyonlarıyla serbest radikalleri üretir. Serbest radikallerin diğer dışsal kaynakları, sigara dumanı, çevresel kirleticiler, radyasyonlar, ultraviyole ışık, ozon, belirli ilaçlar, pestisitler ve anesteziklerdir. Fizyolojik faktörler arasında stres, duygu ve hastalık koşulları serbest radikallerin oluşumundan sorumludur (Knight, 1998).

Serbest radikaller, milisaniye, mikrosaniye veya nanosaniye yarı ömürlere sahip çok kısa ömürlüdür ve birçok insan hastalığının yanı sıra yaşlanmanın etiolojisinde de rol oynamıştır (Harman, 1956). Serbest radikaller, Düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) oksitler ve aterosklerotik plakların oluşmasına neden olarak kardiyovasküler hastalığın gelişiminden sorumludur (Halliwell, 1993).

2.5.Oksidatif stres

Oksidatif stres, pro-oksidanlar ile antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizlik anlamına gelir ve bu aşırı oksidatif metabolizmaya yol açar. Oksidatif stres, serbest radikal olarak adlandırılan reaktif moleküllerin fazlalığı veya serbest radikalleri ortadan kaldırabilen moleküllerin eksikliği durumunda meydana gelir. Bu stres, çevresel faktörlerin birkaçı tarafından kaynaklanabilir, örneğin kirleticilere maruz kalma, alkol, ilaçlar, enfeksiyon, kötü beslenme, toksinler ve radyasyon vb. Antioksidasyon ile oksidasyon arasındaki denge, sağlıklı bir biyolojik sistem sürdürmek için kritik bir kavram olarak kabul edilmektedir (Tiwari, 2001).

Oksidatif stresle ilişkili birçok hastalık, vücutta serbest radikallerin birikimi sonucunda ortaya çıkar. ROS, biyomembranda bulunan poli doymamış yağ asitlerine saldırabilir ve lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını başlatarak, biyomembranın işlev bozukluğuna ve membran enzimlerinin hasarına neden olabilir (Powers vd. 1999). Etanol metabolizmasında NADH'nin aşırı üretimi, etanol metabolizan enzim sitokrom P450E1'in (CYP2E1) aktivasyonu ve Kupffer hücrelerindeki NADPH oksidazı, ROS'un aşırı üretimine katkıda bulunabilir (Wu ve Cederbaum, 2003).

Kimyasal olarak, oksidatif stres, oksitleyici türlerin artmış üretimi veya antioksidan savunmaların, örneğin glutatyonun, önemli ölçüde azalması ile ilişkilidir. Oksidatif stresin etkileri, bu değişikliklerin büyüklüğüne bağlıdır; küçük pertürbasyonları hücre aşabilir ve orijinal durumuna geri dönebilir. Ancak, daha ciddi oksidatif stres hücre ölümüne neden olabilir ve hatta orta düzeyde oksidasyon bile apoptozu tetikleyebilir, daha yoğun stresler ise nekroza yol açabilir (Lieber, 1997).

2.6.Oksidatif stresin organlara etkisi

Oksidatif stres, epilepsi patogenezinde kilit bir rol oynar. Alkol alımı, etanolü aetaldehide dönüştüren sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) enziminin ifadesini ve aktivitesini indükler. CYP2E1 enziminin bu katalitik aktivitesi oksijen aktivasyonunu gerektirir ve bu da reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine yol açar, örneğin hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit anyon radikalı (O₂⁻) ve hidroksil radikal (OH⁻) (Leung ve Nieto, 2013).

Böbrek, ROS tarafından neden olunan hasara son derece duyarlı bir organdır, bunun nedeni renal lipidlerin bileşiminde uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin bol miktarda bulunmasıdır. Etanol ve metabolitleri idrara atılır, ve idrardaki içeriği kan ve karaciğere göre daha yüksektir. Kronik alkol uygulaması böbrek tübüler reabsorpsiyonunu azaltır ve böbrek fonksiyonunu düşürür. Böbrek tübüllerinin fonksiyonel anormallikleri, etanolün membran kompozisyonundaki değişiklikler ve lipid peroksidasyonu ile ilişkili olabilir. Uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin yüksek içeriği nedeniyle, böbrek oksidatif stres hasarına son derece duyarlıdır (Rodrigo vd. 2002).

Büyük miktarlarda alkol tüketimi, kronik karaciğer hastalıklarından bağımsız olarak böbrek üzerinde çeşitli zararlı etkilere sahiptir. Hepatorenal sendrom ve diğer böbrek fonksiyonlarının anormallikleri ileri düzeyde karaciğer hastalığı ile ilişkilidir (Vamvakas vd. 1998). Etanol ile ilişkili kardiyovasküler hastalık riski kadınlarda erkeklere göre daha yüksektir. Kronik alkol tüketimi, vasküler disfonksiyon ve hipertansiyonla ilişkilidir (Leonardo vd. 2006).

2.7. Antioksidanların etkileri

Bu nedenle, antioksidanlar, reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan hasara karşı insan vücudunu korumada önemli bir rol oynarlar (Harold vd. 2007). Bilindiği gibi, süperoksit, endotel kaynaklı nitrik oksit (NO) - en önemli endojen vazodilatatör'ü hızla etkisiz hale getirir ve böylece vazokonstriksiyonu teşvik eder. Ayrıca, arteriyel

hipertansiyonda, koroner damarların endotel bağımlı nitrik oksit ile genişlemesi bastırılmıştır, çünkü mekanik stres tarafından oksidatif stres artırılır ve bu da koroner dolaşımın miyokardiyal oksijen talebindeki değişikliklere uyumunu bozar. Oksidatif stresin LDL kolesterolün oksidasyonunda da önemli bir rol oynaması nedeniyle, arteriyel hipertansiyonun sonuçları entegratif bir patofizyolojik desende toplanabilir (Zicha vd. 2001)

Antioksidanlar, ROS tarafından kaynaklanan hasara karşı canlı organizmaları koruyan serbest radikal avcılarıdır. Neredeyse tüm organizmalar antioksidan savunma ve onarım sistemlerine sahip olsalar da, bu sistemler tamamen hasarla başa çıkmak için yetersizdir. Bu nedenle, beslenme yoluyla antioksidan takviyesi, antioksidan savunma ve onarım sistemlerini güçlendirmek için umut verici bir yöntemdir. Antioksidanlar, doğal veya sentetik antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılabilir. Doğal antioksidanlar bitki ve hayvan kaynaklarından çıkarılır. Sentetik antioksidanlar laboratuvarla sentetik olarak hazırlanır. Ancak, doğal kaynaklı antioksidanlar, en yaygın kullanılan sentetik antioksidanların (örneğin, butilhidroksianisol, butilhidroksitoluen ve propil galat gibi) karaciğer hasarı ve kanserojen gibi sağlık tehlikeleri yan etkilere sahip olması nedeniyle büyük değere sahiptir.

2.8.Epilepsi

Epilepsi, dünya nüfusunun 50 milyondan fazlasını etkileyen ve en sık gözlenen ikinci nörolojik hastalıktır. 2040'lı yıllarda bu sayının 100 milyona ulaşması beklenmektedir (Fiest vd. 2017). Hastalığın ana belirtisi tekrarlayan nöbetlerdir. Epilepsinin nedenleri üzerine birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, kesin moleküler mekanizmalar kısmen aydınlatılabilmektedir. Hücre içine giren Ca^{+2} iyonları, voltaja duyarlı ve kimyasal kapılar gibi kanallar aracılığıyla girer (Armijo vd. 2003). Epileptik bireylerin hipokampus nöronları, hücre içine aşırı miktarda sodyum ve Ca^{+2} iyonu alarak epileptik nöbetlere yol açabilir. Aşırı oksidatif stresin epilepsi etiyolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Nazıroğlu, 2009).

2.9.Pentilentetrazol

Pentilentetrazol (PTZ) veya metrazol, antiepileptik ilaçların geliştirilmesinde sıkça kullanılan bir kimyasal maddedir. PTZ, tetrazol türevidir ve kedi, fare, tavşan, primat ve sıçanlarda konvülsan etki gösterir. PTZ, öncelikle myoklonik kasılmalar ardından da jeneralize tonik-klonik nöbetlere yol açar. Sistemik olarak enjekte edilen PTZ, önce mezensefalondaki retiküler formasyon çekirdeklerini ve daha sonra korteksteki nöronları

etkiler (Marangoz, 2009). PTZ, merkezi sinir sisteminde genel olarak uyarıcı bir etki göstererek hücrel disinhibisyon oluşturur. Bu etkisi, GABAA reseptörlerini bloke ederek gerçekleşir. PTZ, voltaj bağımlı mekanizmalar aracılığıyla hücre membranının geçirgenliğinde değişiklikler yaparak prokonvulsif etki gösterir. Doğrudan GABA reseptörlerini etkilemez, ancak GABA aracılı klor akışını engelleyen bir antagonisttir (Akman, 2004). Ayrıca, NMDA reseptörleri ile ilişkili iletişim, PTZ tarafından tetiklenen jeneralize tonik-klonik nöbetlerin oluşumunda önemli bir rol oynar. PTZ-kindling modeli, insanlarda gözlemlenen belirtilere benzer davranışsal, nöropatolojik ve bilişsel bozuklukları değerlendirmek için yararlı bir model olarak kullanılmıştır, çünkü nöbetlerin ardından oluşabilecek sonuçları incelemek için uygun bir platform sunar (Mortazavi vd. 2005).

2.10.Zebrabalığı

Zebrabalıkları, tatlı su balığı Cyprinidae ailesine ait bir canlıdır (Nelson, 1994). *Danio* adı, Bengalce'deki "dhani" kelimesinden türetilmiştir ve bu kelime "pirinç tarlasına ait" anlamına gelir (Talwar ve Jhingran, 1991). *D. rerio*'nun doğal dağılımı, Kuzeydoğu Hindistan, Bangladeş ve Nepal'deki Ganj ve Brahmaputra nehir havzalarıdır (Spence ve ark. 2006). Dağılım detayları net olmamakla birlikte, *D. rerio* 'nun Hindistan alt kıtasında geniş bir şekilde yayılmış olabileceği düşünülmektedir. *D. rerio*, 30 cm'lik sığ su kütlelerinde yaşamaktadır. En sık olarak göletler ve sabit su kütlelerinde, genellikle pirinç tarımı ile bağlantılı yerlerde karşılaşırlar.

Zebrabalığı, vücudunun yan tarafında bulunan beş düzenli, pigmente edilmiş, yatay mavi şeritler nedeniyle bu adı almıştır. Bu şeritler bir zebra'nın şeritlerini andırır ve kuyruk yüzeyine kadar uzanır (Şekil 1.8.1). Boyutları nadiren 40 mm'yi geçer ve şekilleri fusiform ve yanlardan sıkışmış olup, ağızları yukarıya dönüktür. Gözleri merkeze yerleşmiş olup, ince ve uzun alt çeneleri vardır; alt çenenin çıkıntılı yapısı ağızlarını yukarıya doğru yönlendirir. Diğer Cyprinidlerde olduğu gibi, zebrabalığı midesiz ve dişsizdir. Bu nedenle, yiyecekleri parçalamak için solungaç tırmıkları görev yapar. Zebrabalıkları'nın birkaç belirgin özelliği vardır: tamamlanmamış bir yan çizgi, iki çift bıyık ve operkulumun arkasından kuyruk yüzeyine kadar uzanan 5 ila 7 koyu mavi uzunlamasına şeritler (Barman, 1991). Zebra balıkları'ndaki cinsel dimorfizm minimal düzeydedir; erkekler genellikle daha fazla sarı renge sahip olup, dişilerden daha büyük anal yüzgeçlere sahip olma eğilimindedir. Balığın vücudu orta derecede uzunlamasına uzamış olup, klasik balık şeklindedir. Baş üstten basık olup, ağız hafifçe yukarıya dönüktür. Anal yüzgeç 10-12 dallanmış ışınla çizgili olup, sırt yüzgecinde 31-32 dallanmış yumuşak ışın vardır. Zebrafish'in ana vücut rengi gümüşü beyaz olup, yan tarafında vücudu boyunca ve kuyruk yüzgeçlerine kadar uzanan belirgin derin

mavi 4-5 yatay çizgi ile işaretlenmiştir. Vücudun üst kısmı kahverengi, karın bölgesi ise soluk sarıdır. Renk deseni, üç tür pigment hücresinden oluşur: koyu mavi melanoforlar, altın ksantoforlar ve parlak iridoforlar (Parichy, 2006). Birçok teleost balığı gibi, melanoforlar uyarıcılara yanıt olarak yoğunlaşabilir veya dağılabilir; bu, hem kamuflaj işlevi görür hem de ışık yoğunluğuna yanıt olarak melanoforların toplanması ve dağılması ile gerçekleşir (Guo, 2004).



Şekil 1.1. Erkek ve dişi zebra balığı

Zebra balıkları'nın deneysel manipülasyon için uygun olmasını sağlayan birçok özellik vardır. Küçük ve dayanıklı bir balık olması nedeniyle, büyük miktarlarda kolayca ve ucuz bir şekilde laboratuvar ortamında tutulabilir ve yıl boyunca üreyebilir. Dişiler her 2-3 günde bir yumurtlayabilir ve tek bir kuluçkada birkaç yüz yumurta bulunabilir. Nesil süresi kısa olup, genellikle 3 ila 4 ay sürer; bu da zebra balığı'nı seçim deneyleri için uygun kılar. *D. rerio* yumurtaları diğer balıklara göre büyük olup (döllenme sırasında çapı 0.7 mm) ve optik olarak şeffaftır; yumurta sarısı ayrı bir hücreye yerleştirilmiştir. Ayrıca, döllenme dışarıda gerçekleşir, bu nedenle canlı embriyolar manipüle edilebilir ve gelişim aşamalarının tümü boyunca bir diseksiyon mikroskobu altında izlenebilir. Gelişim hızlıdır; tüm ana organların öncülleri 36 saat içinde gelişir ve larvalar, döllenmeden beş gün sonra yani yumurtadan çıktıktan 2-3 gün sonra besin arama ve aktif kaçınma davranışları sergiler. Zebra balıkları genellikle pul yiyecek, fitoplankton ve özellikle de silialar ve protozoa gibi zooplanktonlarla beslenir. Ayrıca solucanlar, böcek larvaları ve küçük kabuklularla da beslenir. Bu nedenle, zebra balıkları genellikle omnivor balık olarak adlandırılır (Talwar ve Jhingran, 1991).

Zebra balığı, genetik, gelişim biyolojisi, toksikoloji, çevresel toksikoloji, nörofizyoloji, biyomedikal ve insan hastalıkları gibi kanser, Alzheimer hastalığı, biyomedikal çalışmalarda, serebrovasküler hastalıklar, motor nöron hastalığı ve davranışsal genetik alanlarında en önemli omurgalı model organizmalardan biridir (Rubinstein, 2003; Amsterdam ve Hopkins, 2006; Norton ve Bally-Cuif, 2010; Newman ve ark. 2014).

Bu tez çalışması ile; alkol ve pentilentetrazol (PTZ) maruziyetinin bireysel ve kombinasyon etkilerini, zebrabalıklarında beyin ve kas dokularında biyokimyasal değişiklikler açısından etkilerinin araştırması amaçlandı. Bu sayede epilepsiden sıkıntı çeken bireylerde alkol tüketiminin vücutta meydana getirdiği fizyolojik olayların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmak hedeflendi.



3. MATERYAL VE METOT

3.1.Balık

Yaklaşık olarak 7-8 aylık erişkin zebra balığı (*Danio rerio*) ticari bir işletmeden temin edildi. Balıklar su sıcaklığı 28 ± 1 °C ve pH 7 olan 10-12 L'lik sürekli havalandırılan akvaryumlara bırakıldı ve periyodik olarak su değişimi yapıldı. Ortamın sıcaklık, pH ve oksijen düzeyleri izlenerek kontrol altında tutuldu. Akvaryumun bulunduğu ortamın fotoperiyodunu sağlamak için 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ışıklandırıldı. Balıklar, ticari bir akvaryum balığı yemi ve *Artemia salina* ile günde 2-3 defa beslenerek 2 hafta boyunca ortama adaptasyonları sağlandı.

3.2.Deneme Düzeni

Deneme; etil alkolün 3 farklı dozunun günlük 1 saat boyunca banyo şeklinde uygulandığı ve PTZ ile epileptik nöbet oluşturulan balıklar üzerinde yürütüldü. Alkol uygulaması için Aksakal vd. (2006)'ın; PTZ dozu ise Abbas vd. (2012) ve Alishahi vd. (2018)'nin çalışmaları göz önünde bulundurularak belirlendi. Buna göre Etil alkol uygulaması %1, %1,5 ve %3 günlük olarak 1 saat boyunca banyo yaptırıldı. PTZ için ise 15 mM olacak şekilde uygulama yapıldı. Aşağıda, bu işlemlerin gruplara göre dağılımı verilmiştir.

Denemede her grupta 30 adet olacak şekilde tekerrürlerde dahil olmak üzere toplam 720 adet balık kullanıldı. Balıklar aşağıdaki gibi 8 gruba ayrıldı. Tüm deneyler farklı zamanlarda olacak şekilde 3 defa tekrar edildi. Bu sayede elde edilecek verilerin güvenilirliği artırılma yoluna gidilmiş olundu.

Grup 1: Kontrol grubu (herhangi bir işlem uygulanmadı),

Grup II. 15 mM PTZ ile 60 dakika immerse edilen grup,

Grup III: 28 gün boyunca %1 (günlük 1 saat) olacak şekilde Etil alkol uygulanan grup,

Grup IV: 28 gün boyunca %1,5 (günlük 1 saat) olacak şekilde Etil alkol uygulanan grup,

Grup V: 28 gün boyunca %3 (günlük 1 saat) olacak şekilde Etil alkol uygulanan grup,

Grup VI: %1 olacak şekilde Etil alkol ile 28 gün boyunca (günlük 1 saat) banyo ve 15 mM PTZ ile 60 dakika immerse edilen grup,

Grup VII: %1,5 olacak şekilde Etil alkol ile 28 gün boyunca (günlük 1 saat) banyo ve 15 mM PTZ ile 60 dakika immerse edilen grup,

Grup VIII: %3 olacak şekilde Etil alkol ile 28 gün boyunca (günlük 1 saat) banyo ve 15 mM PTZ ile 60 dakika immerse edilen grup,

Deneyisel uygulamalar 28 gün boyunca sürdürüldü. Hayvanların deneyisel uygulamanın başlangıcında ve bitişindeki canlı ağırlık değişimleri kaydedildi. Deneyisel uygulamanın bittiği gün, hayvanlar anestezi altında dekapite edilerek beyin ve kas dokusu örnekleri alındı. Doku örnekleri analiz edilinceye kadar -20° C'deki bir derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.3. Biyokimyasal parametreler

Denemede kullanılacak olan zebra balıklarının beyinlerinin küçük boyutlu olması nedeniyle biyokimyasal analizlerde ayrı ayrı balıkların kullanılması doğru olmayacaktır. Bu nedenle aynı gruptaki 3 balığın beyin dokusu bu analizlerin yapımına geçmeden birleştirilerek havuz yapıp birlikte işlendi.

Balıklar MS222'de bayıldıktan sonra deneylerin yapımına kadar -20 °C'de saklandı. Daha sonra buz üzerinde olacak şekilde diseksiyon işlemine tabi tutuldu ve beyin ve kas dokusu alındı. Dokular soğuk hipotonik tampon içinde bir metal çubuk kullanılarak homojenize edildi ve kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklandı. Yeterli hacimde homojenat elde etmek için 3 veya daha fazla balığın organları birleştirildi.

3.3.1. MDA Aktivitesinin Ölçülmesi

MDA düzeyi Ohkawa vd. (1979)'nın bildirdiği şekilde yapıldı. Kısaca; 25 µL doku homojenatı, 19 µL %10 sodyum dodesilsülfat çözeltisi ve 81 µL saf su ile bir tüpe eklendi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 0,125 mL %20 asetik asit çözeltisi (pH 3.5) eklendi ve 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Ardından 0,125 mL %0.8 TBA çözeltisi eklendi ve karışım >95°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından karışım soğumaya bırakıldı. Reaksiyon karışımı, 0,625 mL n-butanol: metanol (85:15) karışımı ile ekstrakte edildi, organik faz santrifüjleme ile ayrıldı ve 532 nm'de okundu.

3.3.2. SOD Aktivitesinin Ölçülmesi

SOD düzeyi Kakkar vd. (1984)'nin bildirdiği şekilde yapıldı. Kısaca, doku homojenatı (20 µL) 90 µL tetrasodyum pirofosfat tamponu (0.052 M, pH 8.3), 30 µL nitro mavi tetrazolyum tuzu çözeltisi (300 µM), 10 µL fenazin metosülfat çözeltisi (180 µM) ve 30 µL saf su ile karıştırıldı. Reaksiyon, 20 µL β-nikotinamid adenin dinükleotid çözeltisi (780 µM) eklenmesiyle başlatıldı ve oda sıcaklığında 90 saniye inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon 50 µL asetik asit eklenerek durduruldu. Her doku homojenatının referans

reaksiyonu, β -nikotinamid adenin dinükleotid çözeltisi kullanılmadan da gerçekleştirildi. Absorban 550 nm'de ölçüldü ve referansın optik yoğunluğu ilgili örneğin optik yoğunluğundan çıkarılarak SOD aktivitesinin hesaplanması yapıldı.

3.3.3. CAT Aktivitesinin Ölçülmesi

CAT düzeyi Sinha (1972)'nin bildirdiği şekilde yapıldı. Kısaca, 25 μ L doku homojenatına 250 μ L fosfat tamponu (0.01 M) ve 100 μ L saf su eklendi. Reaksiyon, 37°C'de su banyosunda 1 dakika inkübe edilirken 125 μ L H₂O₂

(0.2 M) eklenerek başlatıldı. Reaksiyonu durdurmak için hemen 0,5 mL dikromat-asetik asit çözeltisi (5% potasyum dikromat: buz asidi (1:3)) eklendi ve >95°C'de 15 dakika inkübe edildi. Soğuduktan sonra, örnekler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar 550 nm'de okundu.

3.3.4. GSH Aktivitesinin Ölçülmesi

GSH düzeyi Ellman (1959)'nin bildirdiği şekilde yapıldı. Glutasyon içeriği, renk gelişimi için 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) kullanılarak belirlendi. Kalibrasyon için indirgenmiş glutasyon kullanılarak bir standart eğri oluşturuldu (Ellman, 1959). Test için, 50 μ L %10 triklorasetik asit, bir tüpe 50 μ L doku homojenatı eklenerek karıştırıldı. Santrifüjleme (2000 rpm, 10 dakika) sonrası, 25 μ L süpernatant alındı ve 100 μ L Tris EDTA tamponu (0.4 M Tris, 0.02 M EDTA, pH 8.7), 5 μ L DTNB (0.01 M) ve 25 μ L saf su ile karıştırıldı, iyice çalkalandı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Reaksiyon karışımının sarı rengi okunmuş ve optik yoğunluk (O.D.) 412 nm'de ölçüldü.

3.4. İstatistiksel Analizler

Bütün değerler ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. Elde edilecek veriler varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's testi ile analiz edilerek gruplar arasındaki farklılıklar tespit edildi. Tüm analizlerde istatistiksel farklılıklar %95 güven aralığında belirlenmiştir. İstatistiksel analizler ticari bir istatistik program paketi kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Deney düzeneği



Şekil 3.2. Zebra balığa anestezik madde uygulaması



Şekil 3.3. Anestezi altındaki zebra balıkları

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. MDA Düzeyi

Alkol uygulanan tüm gruplarda MDA düzeylerinde anlamlı bir artışın olduğu tespit edildi ($P<0.05$). En fazla artışın % 3 alkol ve PTZ'nin uygulandığı grupta olduğu gözlemlendi. Alkol grubuplarında en yüksek MDA aktivitesi $4,88 \pm 0,42$ nmol/mg protein ile % 3 alkol uygulanan grupta olduğu tespit edildi. Bu durumun alkol ve PTZ'nin uygulandığı gruplarda da olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda beyin MDA düzeyi $1,73 \pm 0,18$ nmol/mg protein bulunduğu halde PTZ uygulanan grupta $3,49 \pm 0,51$ nmol/mg protein olduğu bulundu. Alkol ve PTZ+alkol uygulanan gruplardaki MDA düzeyi sırasıyla $5,08 \pm 0,37$; $5,43 \pm 0,71$ ve $7,93 \pm 1,03$ nmol/mg protein şeklinde oldu (Çizelge 4. 1). Aynı şekilde kas dokusunda MDA düzeyi $3,92 \pm 0,41$ nmol/mg protein bulunduğu halde PTZ, alkol ve PTZ+alkol uygulanan gruplardaki MDA düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede yükseldiği tespit edildi (Çizelge 4. 1).

Çizelge 4.1. Alkol, PTZ ve kombinasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında MDA aktivitesi (nmol/mg protein). Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. Farklı harfler ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel ayrım bulunmaktadır ($P<0,05$).

MDA düzeyi (nmol/mg protein)		
Doku		
Gruplar	Beyin	Kas
Kontrol	$1,73 \pm 0,18$	$3,92 \pm 0,41$
PTZ	$3,49 \pm 0,51^a$	$4,84 \pm 0,11$
% 1 Alkol	$3,55 \pm 0,55^a$	$5,63 \pm 0,28^{a,b}$
% 1,5 Alkol	$3,90 \pm 0,29^{a,b}$	$6,92 \pm 0,73^{a,b,c}$
% 3 Alkol	$4,88 \pm 0,42^{a,b,c,d}$	$6,28 \pm 0,73^{a,b}$
% 1 Alkol + PTZ	$5,08 \pm 0,37^{a,b,c,d}$	$6,41 \pm 0,41^{a,b}$
% 1,5 Alkol + PTZ	$5,43 \pm 0,71^{a,b,c,d,e}$	$7,83 \pm 0,93^{a,b,c,e,f}$
% 3 Alkol + PTZ	$7,93 \pm 1,03^{a,b,c,d,e,f,g}$	$9,49 \pm 1,00^{a,b,c,d,e,f,g}$

a: Kontrol, b: PTZ; c: % 1 Alkol; d: % 1,5 Alkol; e: % 3 Alkol; f: % 1 Alkol + PTZ; g: % 1,5 Alkol + PTZ; h: % 3 Alkol + PTZ

4.1.2. SOD Aktivitesi

Alkol uygulanan tüm gruplarda SOD düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edildi ($P<0.05$). En fazla azalma hem beyin ve hem kas dokusunda %3 alkol ve PTZ'nin uygulandığı grupta olduğu gözlemlendi. Alkol grublarında en düşük SOD aktivitesi $5,93 \pm 1,00$ beyin dokusunda % 78,97 ve $17,59 \pm 2,51$ U/mg protein ile kas dokusunda % 86,72 oranında azalmanın olduğu tespit edildi. Bu durumun alkol ve PTZ'nin uygulandığı gruplarda da olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda beyin SOD düzeyi $28,21 \pm 3,11$ U/mg protein bulunduğu halde PTZ uygulanan grupta $21,15 \pm 0,48$ U/mg protein olduğu bulundu. Alkol ve PTZ+alkol uygulanan gruplardaki SOD düzeyi kontrol grubuna göre istatistiki olarak bir azalmanın olduğu görüldü (Çizelge 4. 2). Aynı şekilde kas dokusunda SOD düzeyi $132,49 \pm 9,18$ U/mg protein bulunduğu halde PTZ, alkol ve PTZ+alkol uygulanan gruplardaki SOD düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (Çizelge 4. 2).

Çizelge 4.2. Alkol, PTZ ve kombinasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında SOD aktivitesi (U/mg protein). Veriler aritmetik ortalama±standart sapma şeklinde sunulmuştur. Farklı harfler ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($P<0,05$).

SOD düzeyi (U/mg protein)		
Doku		
Gruplar	Beyin	Kas
Kontrol	$28,21 \pm 3,11$	$132,49 \pm 9,18$
PTZ	$21,15 \pm 0,48^a$	$67,56 \pm 3,28^a$
% 1 Alkol	$22,85 \pm 1,12^a$	$81,4 \pm 4,21^{a,b}$
% 1,5 Alkol	$18,90 \pm 1,27^a$	$69,00 \pm 4,70^{a,c}$
% 3 Alkol	$11,56 \pm 0,98^{a,b,c,d}$	$51,75 \pm 5,21^{a,b,c,d}$
% 1 Alkol + PTZ	$10,84 \pm 2,41^{a,b,c,d}$	$53,41 \pm 6,43^{a,b,c,d}$
% 1,5 Alkol + PTZ	$11,24 \pm 1,09^{a,b,c,d,e}$	$35,19 \pm 2,78^{a,b,c,d,e,f}$
% 3 Alkol + PTZ	$5,93 \pm 1,00^{a,b,c,d,e,f,g}$	$17,59 \pm 2,51^{a,b,c,d,e,f,g}$

a: Kontrol, b: PTZ; c: % 1 Alkol; d: % 1,5 Alkol; e: % 3 Alkol; f: % 1 Alkol + PTZ; g: % 1,5 Alkol + PTZ; h: % 3 Alkol + PTZ

4.1.3. CAT Aktivitesi

Alkol, alkol ve PTZ uygulanan tüm gruplarda CAT düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edildi ($P<0.05$). En fazla azalma hem beyin ve hem kas dokusunda % 3 alkol ve PTZ'nin uygulandığı grupta olduğu gözlemlendi. Alkol ve PTZ grubuplarında en düşük CAT aktivitesi $0,14 \pm 0,00$ U/mg protein beyin dokusunda % 90,41 ve $0,40 \pm 0,03$ U/mg protein ile kas dokusunda % 66,10 azalmanın olduğu tespit edildi. Bu durumun alkol ve PTZ'nin uygulandığı gruplarda da olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda beyin CAT düzeyi $1,46 \pm 0,21$ U/mg protein bulunduğu halde PTZ uygulanan grupta $0,83 \pm 0,13$ U/mg protein olduğu bulundu (Çizelge 4. 3). Aynı şekilde kas dokusunda CAT düzeyi $1,18 \pm 0,08$ U/mg protein ile PTZ grubu ile aynı düzeyde bulunduğu halde alkol ve PTZ+alkol uygulanan gruplardaki CAT düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (Çizelge 4. 3).

Çizelge 4.3. Alkol, PTZ ve kombinasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında CAT aktivitesi (U/mg protein). Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. Farklı harfler ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel ayrım bulunmaktadır ($P<0,05$).

CAT düzeyi (U/mg protein)		
Doku		
Gruplar	Beyin	Kas
Kontrol	$1,46 \pm 0,21$	$1,18 \pm 0,08$
PTZ	$0,83 \pm 0,13^{a,c}$	$1,18 \pm 0,05$
% 1 Alkol	$0,69 \pm 0,09^a$	$1,03 \pm 0,04$
% 1,5 Alkol	$0,70 \pm 0,10^a$	$0,82 \pm 0,05^{a,b,c}$
% 3 Alkol	$0,43 \pm 0,11^{a,b,c,d}$	$0,71 \pm 0,05^{a,b,c,d}$
% 1 Alkol + PTZ	$0,43 \pm 0,09^{a,b,c,d}$	$0,69 \pm 0,07^{a,b,c,d}$
% 1,5 Alkol + PTZ	$0,28 \pm 0,09^{a,b,c,d,e,f}$	$0,63 \pm 0,06^{a,b,c,d,e}$
% 3 Alkol + PTZ	$0,14 \pm 0,00^{a,b,c,d,e,f,g}$	$0,40 \pm 0,03^{a,b,c,d,e,f,g}$

a: Kontrol; b: PTZ; c: % 1 Alkol; d: % 1,5 Alkol; e: % 3 Alkol; f: % 1 Alkol + PTZ; g: % 1,5 Alkol + PTZ; h: % 3 Alkol + PTZ

4.1.4. Glutasyon (GSH) Düzeyi

Alkol uygulanan tüm gruplarda GSH düzeylerinde anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edildi ($P<0.05$). En fazla azalışın %3 alkol ve PTZ'nin uygulandığı grupta olduğu olduğu gözlemlendi. Alkol grublarında en düşük GSH aktivitesi $0,42 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/g}$ protein ile % 3 alkol uygulanan grupta olduğu tespit edildi. Bu durumun alkol ve PTZ'nin uygulandığı gruplarda da olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda beyin GSH düzeyi $1,53 \pm 0,21$ $\mu\text{mol/g}$ protein bulunduğu halde PTZ uygulanan grupta $1,02 \pm 0,18$ $\mu\text{mol/g}$ protein olduğu bulundu. Alkol ve PTZ+alkol uygulanan gruplardaki GSH düzeyi sırasıyla $0,83 \pm 0,05$; $0,29 \pm 0,03$ ve $0,13 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/g}$ protein şeklinde oldu (Çizelge 4. 4). Aynı şekilde kas dokusunda GSH düzeyi $4,72 \pm 1,00$ $\mu\text{mol/g}$ protein bulunduğu halde PTZ, alkol ve PTZ+alkol uygulanan gruplardaki GSH düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (Çizelge 4. 4).

Çizelge 4.4. Alkol, PTZ ve kombinasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında GSH aktivitesi ($\mu\text{mol/g}$ protein). Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. Farklı harfler ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel ayrım bulunmaktadır ($P<0,05$).

GSH düzeyi ($\mu\text{mol/g}$ protein)		
Doku		
Gruplar	Beyin	Kas
Kontrol	$1,53 \pm 0,21$	$4,72 \pm 1,00$
PTZ	$1,02 \pm 0,18^a$	$4,13 \pm 1,21^a$
% 1 Alkol	$1,02 \pm 0,21^a$	$3,19 \pm 0,93^{a,b}$
% 1,5 Alkol	$0,89 \pm 0,11^a$	$2,44 \pm 0,23^{a,b,c}$
% 3 Alkol	$0,42 \pm 0,09^{a,b,c,d,f}$	$2,12 \pm 0,40^{a,b,c,d}$
% 1 Alkol + PTZ	$0,83 \pm 0,05^a$	$2,21 \pm 0,18^{a,b,c,d}$
% 1,5 Alkol + PTZ	$0,29 \pm 0,03^{a,b,c,d,e,f}$	$2,13 \pm 0,09^{a,b,c,d}$
% 3 Alkol + PTZ	$0,13 \pm 0,03^{a,b,c,d,e,f,g}$	$1,18 \pm 0,05^{a,b,c,d,e,f,g}$

a: Kontrol, b: PTZ; c: % 1 Alkol; d: % 1,5 Alkol; e: % 3 Alkol; f: % 1 Alkol + PTZ; g: % 1,5 Alkol + PTZ; h: % 3 Alkol + PTZ

4.2. Tartışma

Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonun epileptik vakalar ile güçlü bir ilişki içinde olduğu bilinmektedir. Pek çok zararlı madde, biyolojik sistemlerde oksidatif zararı artırarak çeşitli fizyolojik bozukluklara yol açmaktadır. Bu kimyasal maddeler, hücrenin antioksidan savunma sisteminde hızlı ve kalıcı bir azalmasına neden olur. Serbest radikaller, epilepsinin her aşamasında etkili olmasına rağmen, bu etkinin ilerleme döneminde daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir.

ROS ürünleri ve serbest radikaller, vücuttaki fizyolojik süreçler ve hücresel olaylarının bir sonucu olarak ortaya çıkar. Oluşan serbest radikaller, vücudun antioksidan savunma sistemleri tarafından temizlenir. Organizmadaki serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasında bir ilişki vardır. Eğer serbest radikal üretimi artarsa veya antioksidan savunma mekanizmaları tam olarak işlevini yerine getiremezse, bu denge serbest radikallerin faydasına doğru yönelir. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar ve bu da biyolojik sistemlerde çeşitli hasarlara neden olur (Mercan, 2004). Oksidatif stres genellikle proteinlerin değişime uğraması, mitokondriyal fonksiyonlarda bozukluklar ve lipid peroksidasyonun artışı şeklinde ortaya çıkar. Alkol, önemli bir serbest radikal kaynağı olarak bilinir.

Bu çalışmada oksidatif stresi tetiklemek için etil alkol tercih edilmiştir. Etil alkol; kolayca vücuda geçebilmesi ve deneysel olarak fizyolojik hasarı ile oksidatif stres oluşturmak için yaygın olarak kullanılan bir peroksidant madde olmasından dolayı seçilmiştir (Aykaç vd.1985). Aşırı miktarda alkolün dokularda zarara yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada zebra balıklarında alkolün oksidatif stres etkisi PTZ ile oluşturulmuş epileptik nöbet sırasında vücutta oluşturduğu fizyolojik bozuklukları ortaya konulmuştur.

Hücresel bileşenlere yönelik oksidatif hasarı en aza indirmek için organizmalar antioksidan savunmalar geliştirmiştir. Önemli antioksidan enzimler, süperoksit dismutaz (SOD; O_2^- radikalini H_2O_2 'ye dönüştürür), katalaz (CAT, H_2O_2 'yi suya indirger) ve glutatyon peroksidaz (GPX, lipid peroksidasyonu ile oluşan H_2O_2 veya organik hidroperoksitleri detoksifiye eder (Di Giulio vd. 1995; Halliwell ve Gutteridge, 1999). Glutatyon (GSH) çeşitli elektrofilik maddelerle birleştirerek lipid peroksidasyonunun parçalanma ürünlerini GSH ile birleştirerek oksidatif hasarı önlemede rol oynar (Ketterer vd. 1983).

Lipid peroksidasyon, çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) radikallerinin karmaşık bir dizi reaksiyona girdiği genel bir aşamadır. Bu, serbest radikal aracılı bir süreçtir ve hücre zarlarına ve alt hücresel organellere zarar verir. Dokuların bir tür hasarını temsil eder ve çeşitli dejeneratif hastalıkların patogenezeine ilişkilidir. Bu çalışmada gözlemlenen yüksek MDA oluşumu, artmış lipid peroksidasyonunun ve aynı zamanda oksidatif stresin bir

göstergesidir. Bu bulgu, bazı önceki çalışmalarla uyumludur (Ishii vd. 2003; Das vd. 2007). Lipid peroksidasyonu, her adımda serbest radikallerin sürekli bir şekilde sağlanmasını sağlayarak daha fazla peroksidasyonu başlatan bir zincirleme reaksiyon sürecidir (Porter vd. 1997) ve bu süreç, geniş bir faktör yelpazesi tarafından etkilenebilen başlatma, yayılma ve sonlanma aşamalarını içerir (Aust, 1985). Biyolojik sistemlerde lipidlerin peroksidasyonu son yıllarda büyük ilgi görmüştür, çünkü *in vivo* doku hasarına yol açabilir ve ateroskleroz ve alkolizmle ilişkili çeşitli komplikasyonların nedeni olabilir (Gupta vd. 2005). Hayvanlardan izole edilen dokuların düşük konsantrasyonlarda lipid peroksiditler içerdiği ve patolojik durumlar sonucunda hücre hasar sırasında daha fazla peroksidit ürettiği gösterilmiştir (Dey ve Cederbaum, (2006). Peroksidasyon, hücre zarlarının yapısal organizasyonunda ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere yol açar ve zararlı geçirmeye hale gelmesine neden olur (Lindi vd. 1998). Lipid peroksidasyonunun serbest radikal aktivitesinin bir sonucu olarak mı yoksa tam tersi mi olduğu henüz doğrulanmamıştır. Bu çalışmada alkolik zehirlenmelerinin beyin ve kas dokusunda gözlenen artmış lipid peroksidasyonu, önceki çalışmalarla uyumludur (Gupta vd. 2005).

Daha önce yapılan çalışmalar, lipid peroksidasyonunun kapsamını doğrudan ölçmenin yağ asidi peroksiditleri ve hidroksil yağ asitleri ile mümkün olmadığını göstermiştir; ancak, lipid peroksiditlerinin parçalanmasından türeyen bir ürün olan MDA'nın belirlenmesi tekrarlanabilir bir şekilde yapılabilmektedir. Bu aldehit geçmişte, peroksidatif bozulmanın kapsamını değerlendirmek için uygun ve pratik bir gösterge olarak kabul edilmiştir. Mevcut çalışma, alkol verilen grupların ve bunların üç farklı dozu ile kontrol gruplarının beyin ve kas dokusundaki MDA-düzeyinin PTZ uygulaması ile daha fazla artış gösterdiği görülmüştür. Bu artış her iki madeninde vücutta oksidatif strese neden olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca sonuçlar, alkol ve PTZ'nin uygulandığı gruplarda MDA içeriklerinde kontrol gruplarına kıyasla anlamlı yükselmelere işaret etmektedir. Bu sonuçlar, epilepsi hastalarında alkol tüketiminin oksidatif stresi çok daha fazla artırdığının bir göstergesidir.

El-Sokkary vd. (1999) alkol ile muamele edilen sıçanların beyin, kalp, akciğer ve testislerinde MDA seviyelerinin kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde arttığını bildirmiştir. Aynı zamanda, (Schlorff vd. 1999) sıçanlarda etanol uygulamasından sonra zamanla plazma MDA-seviyelerinin önemli derecede yükseldiğini ve bunun lipid peroksidasyonunun zamanla arttığını gösterdiğini bulmuştur. Ayrıca, (Atamer vd. 2000), karaciğer, kalp, böbrek ve beyindeki MDA seviyelerinin kısa ve uzun süreli etanol tedavisi gören sıçanlarda normal kontrol gruplarına kıyasla arttığı belirtilmiştir. (Husai vd. 2001), kronik etanol alımının sıçan karaciğerinde MDA içeriğini anlamlı derecede artırdığı rapor edilmiştir.

BalaSubramaniyan vd. (2003) tarafından belirlenen raporda, alkole maruz kalan farelerin karaciğer, beyin ve böbreklerinde MDA seviyelerinin normal kontrol grubuna

kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu belirtilmiştir. Balkan vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, etanol tedavisinin plazma MDA seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artışa neden olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, Rajagopalan vd. (2004) etanol tedavisi gören sıçanların böbrek, karaciğer ve kalp bölgelerinde MDA seviyelerinde anlamlı bir artış bulmuştur. Bu nedenle, alkolik bireylerde beyin ve kas MDA seviyelerindeki artışa dair mevcut veriler (Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir) yukarıda belirtilen çeşitli araştırmacıların raporlarıyla paralellik göstermektedir. Elektroşoklarla benzer şekilde, akut pentylenetetrazol (PTZ) enjeksiyonu sonrasında hayvanların beyinlerinde LPO (lipid peroksidasyonu) artışı gözlemlenmiştir. Bu artış, hem bütün beyinlerde hem de ayrı ayrı ölçülen beyin yapılarında, yani hipokampus, korteks ve striatumda gözlemlenmiştir (Kumar ve Gandhimathi, 2010; Cavalcante vd., 2019). Bu çalışmada da hem beyin ve hemde kas dokusunda PTZ ve PTZ+Alkol uygulanan zebra balıklarında MDA seviyesinde anlamlı bir artışın olduğu gözlemlenmiştir.

Glutasyon, hemen hemen tüm hücrelerde bulunan ve serbest radikaller ile reaktif oksijen ara ürünlerine karşı metabolizma, taşıma ve hücrel koruma süreçlerinde önemli bir rol oynayan bir tripeptiddir. Bu reaktif oksijen türlerinin seviyeleri, antioksidan enzimler tarafından kontrol edilir (Das, 1997). Bu çalışmada, üç farklı alkol dozunda ve PTZ uygulanan gruplarda beyin ve kas dokusunda glutasyon içeriğinin kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde azaldığını görüldü. Bu durum, glutasyonun sızabileceğini işaret etmektedir.

Glutasyon konsantrasyonunun ölçülmesi, beyin ve kaslarda lipid peroksidasyonu ve oksidan stresin derecesini doğrudan belirlemenin bir yolunu sağlar, bu da alkol maruziyetinde oksidatif strese neden olduğunu öne sürmektedir. Çalışmamızın deneysel bulguları bu sonuçlarla tutarlı bir şekilde örtüşmektedir; çalışmada GSH seviyelerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Birçok sonuç, glutasyon konsantrasyonunun alkolik bireylerde anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir. Altomare vd. (1988) çalışmalarında, alkolik hastaların karaciğer glutasyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gösterdiğini rapor etmiştir. Cardin vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada, serum GSH seviyelerinin kronik alkolik karaciğer hasarı olan hastalarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, hayvan denemeleri, kronik etanol tüketiminin beyin GSH seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir (Montoliu vd.1994). Chen vd. (1995) etanol ile beslenen farelerde karaciğer GSH seviyelerinin anlamlı derecede azaldığını bildirmiştir. Wieland vd. (1995) etanol uygulamasının karaciğer GSH konsantrasyonunda, özellikle de mitochondrial GSH'da belirgin bir azalmaya yol açtığını bulmuştur. Husain vd. (1997) kronik etanol alımının sıçanların karaciğer, akciğer, testis ve kalplerinde GSH içeriğinde anlamlı bir tükenmeye neden olduğunu rapor etmiştir. Colell vd. (1997) ise uzun süre etanolle beslenen sıçanlardan taze izole edilen hepatositlerin mitokondri GSH konsantrasyonunda bir azalma gösterdiğini

bulmuştur. Atamer vd. (2000) etanol uygulamasının sıçanların karaciğerindeki GSH seviyelerini kontrol grubuna kıyasla azalttığını belirtmiştir. Ayrıca, Brown vd. (2001) alkolle beslenen sıçanlarda mitochondrial GSH'nın kontrol sıçanlarına kıyasla tükenmiş olduğunu göstermiştir. Zhao vd. (2002) tarafından rapor edilen çalışmada, kronik etanol uygulamasının 6 haftalık tedavi süresinde karaciğer mitochondrial GSH seviyelerini seçici olarak azalttığı, ancak sitozolik GSH'yi etkilemediği bulunmuştur. Bu çalışmada PTZ uygulanan ve alkol ile PTZ uygulana gruplarda GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede azalmalar gözlenmiştir. Rishitha vd. (2018) ve Hacke vd. (2021), PTZ uygulanan zebra balıklarında GSH düzeyinde önemli azalmaların olduğunu bildirmişlerdir.

Glutasyon (GSH) ve beyin ve kas lipid peroksidasyonunun belirteci MDA aktivitesindeki değişimler gibi bulgular, alkol maruziyetinin uygulandığı gruplarda beyin ve kas Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesinin değerlendirilmesiyle desteklenmiştir. SOD, biyolojik sistemlerde O₂ radikalini zararlı etkilerini azaltmakla görevli bir enzimdir; çünkü iki O₂ radikalini içeren dismutasyon reaksiyonunu katalize ederek H₂O₂'nin oluşumunu sağlar. Bu çalışma, diğer araştırmalardaki SOD aktivitesine ilişkin benzer bulguları ortaya koymuştur. SOD tarafından katalize edilen iki O₂ radikalini içeren dismutasyon reaksiyonu, H₂O₂'nin oluşumuyla sonuçlanır.

Bu çalışmada, alkole ve PTZ'ye maruz kalan zebra balıklarında beyin ve kas SOD aktiviteleri, kontrol gruplarına kıyasla düşük ve istatistiksel olarak anlamlı derecede önemli bulunmuştur. Hayvan deneylerine dayalı olarak elde edilen deneysel kanıtlar, Husain vd. (1997) tarafından bildirildiği gibi, kronik etanol tüketiminin sıçanların kalp SOD aktivitesini önemli ölçüde azalttığını belirtmiştir. Schlorff vd. (1999) tarafından yapılan araştırmada, etanol alımının doz ve zaman bağımlı etkileri incelenmiş ve plazma SOD aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. Velvizhi vd. (2002) etanol uygulamasının erkek Wistar sıçanların eritrosit SOD aktivitelerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, Ozaras vd. (2003) etanol ile intragastrik olarak beslenen sıçanların serum ve karaciğer dokularındaki SOD aktivitesini incelemiş ve hem serumda hem de dokuda SOD aktivitesinin etanol ile tedavi edilen sıçanlarda kontrol grubundan daha düşük olduğunu bulmuştur. Benzer şekilde, Joharapurkar vd. (2003) de benzer bir gözlem raporlamış ve sıçanlara kronik etanol verilmesinden sonra SOD aktivitesindeki azalmayı belirtmiştir. Bu nedenle, bizim SOD aktivitesindeki azalma bulgularımız, bu çalışmaların bulgularıyla benzerlik göstermemektedir.

Farklı konsantrasyonlardaki alkol uygulanan gruplarda gözlemlenen düşük ve istatistiksel olarak anlamlı SOD değeri; bu enzimin alkol gruplarındaki serbest radikal kaynaklı oksidatif stresin azaltılmasında rol oynayabileceğini gösteriyor olabilir. Ayrıca, serbest radikallerin bu enzimin inaktivasyonuna neden olabileceğine dair olası bir ipucu sunmaktadır. Bu veriler, alkollü bireylerde lipid peroksidasyonunun artmış seviyeleriyle

desteklenmektedir. Dolayısıyla, alkol gruplarındaki balıklardaki SOD aktivitesindeki ani düşüş, bu balıkların dokularının süperoksit radikallerini detoksifiye etme ve hücreyi oksidatif hasardan koruma yeteneklerinde belirgin bir azalma olabileceğini göstermektedir.

Çeşitli stres faktörleri, canlıların farklı gruplarında oksidatif stresi ve özel antioksidan tepkilerini uyarmaktadır. CAT gibi antioksidanların başlıca rolü, doğrudan parçalanma yoluyla ROS üretimini inhibe etmektir (Girotti, 1998). CAT'ın enzimatik parçalanma süreci, çoğunlukla ilk antioksidan mekanizma aşamasının bir parçası olarak tanımlanır (Costa vd. 2021). CAT, hücreleri toksik hidrojen peroksit (H_2O_2) haline gelen ROS'ların, önceden süperoksit dismutaz enzimatik reaksiyonu ile üretilmiş su ve oksijene parçalanarak korur.

Önceki çalışmalarda CAT aktivitesi açısından PTZ uygulamasının etkileri hakkında farklı bulgular bulunmaktadır. Dang vd. (2021), 15 mM PTZ'nin immersiyon şeklinde uygulandığı 7 günlük zebra balıklarında CAT aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Fontana vd. (2019), yetişkin zebra balıklarında 10 mM PTZ'nin SOD düzeyinde bir değişime neden olmamasına rağmen MDA ve CAT aktivitesinde bir artışın olduğunu ifade etmişlerdir. Fakat 7,5 mM PTZ uygulamasının zebra balıklarında CAT aktivitesinde önemli derecede azalmalara neden olduğu bildirilmiştir (Hacke vd. 2021). Ayrıca, Jin ve vd. (2018) çalışmasında, 15 mM konsantrasyonunda 20 dakika süren maruziyette reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimindeki artış ve SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivite ve gen ekspresyonundaki azalma gibi oksidatif stres değişiklikleri gözlemlenmiştir; bu değişiklikler nöronal ölüme yol açabilir. Bu çalışmada da bu aktivitelerdeki azalmaların gözlenmesi elde edilen bulguların diğer çalışmalar ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Birçok çalışma, PTZ tarafından indüklenen nöbetler nedeniyle sıçan veya fare beyinlerinde antioksidan enzimlerin, SOD, GPx, glutatyon redüktazı (GR) ve CAT gibi aktivitelerinin azaldığını ortaya koymuştur. Akut PTZ uygulaması, bölgesel biyokimyasal değişikliklere yol açar ve enzim aktivitelerinde önemli değişiklikler korteks ve hipokampusta gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, PTZ uygulanan hayvanların korteksindeki değişmemiş SOD aktivitesini, hem SOD'nin hem de oksidatif stres nedeniyle enzim yıkımının aynı anda gerçekleşmesi ile açıklamışlardır (Kumar ve Gandhimathi, 2010). Patsoukis vd. (2004), PTZ kaynaklı nöbetler sonrası farelerin serebral korteks ve hipokampusunda tiol redoks durumu (TRS) bileşenlerini (glutatyon (GSH), glutatyon disülfid (GSSG), sistein (CSH), protein (P) tioller (PSH), ve protein ve non-protein (NP) karışık/simetrik disülfidleri (PSSR, NPSSR, NPSSC, PSSP)) incelediler. Serebral kortekste GSH, GSSG, CSH, NPSSC, PSSR ve PSSC'de önemli bir azalma, ayrıca protein karbonilinde bir artış ve PSSP seviyelerinde yüksek bir artış bulunmuştur, bu da artmış oksidatif stresi göstermektedir. Hipokampusta ise PTZ konvülsiyonları PSH, CSH ve NPSSC'de bir azalmaya, PSSP, NPSSR, LPO ve protein oksidasyon seviyelerinde bir artışa neden olmuştur, bu da bu yapıda artmış oksidatif hasarı

göstermektedir. Bir diğer çalışma, fare hipokampusunda GSH ve antioksidan enzim seviyelerinde bir azalma bildirilmiştir (Nader vd. 2018).

Bu çalışmada alkol, reaktif oksijen türlerinin üretimini etkili bir şekilde azalttı, bu da alkolün PTZ-indüklenmiş nöbetler sonrasında oksidatif stresin oluşmasında önemli rol oynadığını gösterdi. Alkolün, PTZ uygulanan zebra balıklarında antioksidan enzim aktivitelerini ve oksidatif stresle ilişkili enzimlerin azalttığı tespit edildi. Balıklarda oksidatif strese karşı koymak için önemli olan SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler, süperoksit anyon radikalini H_2O_2 'ye dönüştüren SOD ve ardından H_2O_2 'nin parçalanmasını sağlayan CAT ve GPx, organizmaları oksidatif hasardan kormaktadır (Du vd. 2016; Qu ve., 2016). Çalışmalarımız, Alkol uygulanmış ve PTZ uygulanan balıklarda hem SOD hem de CAT aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı görüldü; bu da bu enzimlerin PTZ-indüklenmiş nöbetlerde oluşan oksidatif strese karşı savaşmada ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu gözlemler, oksidatif strese karşı korumanın potansiyel olarak balıkları ileri epilepsiden koruyabileceğini destekleyen önceki bulguları teyit etmektedir (Keskin vd. 2016). Ayrıca, alkol gruplarında SOD ve CAT aktiviteleri kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldı; bu da alkolün antioksidatif yolları inhibe etme yeteneğine sahip olduğunu gösteren önceki bulgularla uyumludur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Epilepsi nörolojik hastalıklar arasında en fazla görülen bir hastalıktır. Epilepside alkol kullanımının etkilerini ortaya koymak bu hastalığın patobiyolojisinde önemli açıklamaların kazanılmasına neden olabilir. Alkolün tüm dünyada çok yaygın olarak kullanıldığı da göz önünde bulundurulursa bu konunun önemi dahada artmaktadır. Literatürde uzun süreli alkol maruziyetinin epileptik benzeri oluşumlarda ki etkisi üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Bu çalışmada PTZ ile oluşturulan akut epilepsi modelinde uzun süreli ve sürekli olarak kullanılan farklı alkol dozlarının beyin ve kas antioksidan enzimlerinde düşüşe neden olduğu ve PTZ ile oluşturulan epilepsi de ise bu değerlerde istatistiki olarak önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca MDA düzeyinde artış gözlenmiştir. Bununda alkol ve PTZ uygulamasının vücutta oksidatif strese neden olduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Mevcut literatür incelendiğinde PTZ ile oluşturulan epilepsi çeşitli maddelerin etkilerinin oksidatif mekanizmadaki etkisinin araştırıldığı çalışmaların olduğu görülmüştür. Sonraki çalışmalarda epileptik zebra balığı kullanarak alkolün zararlı etkilerinin azaltılmasında bu maddelerin kullanılabilirliği ve etkilerinin moleküle mekanizmaları araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, P. Wilfred, G. Ramakrishna B. (2002). Oxidative damage to the heptocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. *Clin. Chim. Acta.* **325**, (1-2), 117-125.
- Agostini, J. F., Toé, H. C. Z. D., Vieira, K. M., Baldin, S. L., Costa, N. L. F., Cruz, C. U., Rico, E. P. (2018). Cholinergic system and oxidative stress changes in the brain of a zebrafish model chronically exposed to ethanol. *Neurotox. Res.* **33**, 749-758.
- Akman, O. Geçirilmi, G. (2004). Febril konvulsiyonların generalize tonik-klonik ve absans epilepsiler üzerine etkisi. Bilim Uzmanlığı Tezi, Kocaeli.
- Aksakal, E., Ekinci, D., Supuran, C. T. (2021). Dietary inclusion of royal jelly modulates gene expression and activity of oxidative stress enzymes in zebrafish. *J. Enzyme Inhib. Med. Che.*, **36** (1), 885-894.
- Albano, E. P. (2002). Free radicals and alcohol-induced liver injuiy. In: Sherman. C. D. I. N., Preddy, V. R., Walson, R. R. (Eds). *Ethanol and Liver*. Taylor and Francis, London. 153-190.
- Amsterdam, A. Hopkins, N. (2006). Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *TiG.* **22**, 473-478.
- Armijo J. A, Shushtarian, M. Valdizan, EM. Cuadrado, A. de las Cuevas, I. Adín, J. Ion. (2005). Channels and epilepsy. *Curr. Pharm. Des.* **11** (15), 1975-2003.
- Ashrafi, M. R., Shabanian, R. Abbaskhanian, A. Nasirian, A. Ghofrani, M. Mohammadi, M. Zamani, G.R., Kayhanidoost, Z. Ebrahimi, S. Pourpak, Z. (2007). Selenium and intractable epilepsy: is there any correlation. *Pediatr. Neurol.* **36**, 25–9.
- Ashrafi, M. R., Shams, S. Nouri, M. Mohseni, M. Shabanian, R. Yekaninejad, M.S., Chegini, N., Khodadad, A., Safaralizadeh, R. (2007). A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia.* **48**, 1750–55.
- Aust. S.D. (1985). Lipid peroxidation. In: Greenlvald, RA. (ed). *Handbook of the methods for oxygen research*, Boca Ratton Florida, CRC press, 203.
- Aykaç, G., Uysal, M., Süha Yalçın, A., Koçak-Toker, N., Sivas, A., Öz, H. (1985). The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology.* **36** (1), 71-76
- Bailey, S.M. (2003). A review of the role of reactive oxygen and nitrogen species in alcohol-induced mitochondrial dysfunction. *Free Radic. Res.* **37** (6), 585-596.
- Bailey, S.M., Patel, VB. Young, TA, Asayama, K. and Cunningham, C.C. (2001). Chronic ethanol consumption alters the glutathione glutathione peroxidase-I system and protein oxidation status in rat liver. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **25** (5), 726-733.
- Baldin, S. L., de Pieri Pickler, K., de Farias, A. C. S., Bernardo, H. T., Scussel, R., da Costa Pereira, B., Rico, E. P. (2022). Gallic acid modulates purine metabolism and oxidative stress induced by ethanol exposure in zebrafish brain. *Purinergic Signal.* **18** (3), 307-315.
- Banote, R. K., Koutarapu, S., Chennubhotla, K. S., Chatti, K., Kulkarni, P. (2013). Oral gabapentin suppresses pentylenetetrazole-induced seizure-like behavior and cephalic field potential in adult zebrafish. *Epilepsy Behavior.* **27** (1), 212-219.
- Baraona, E. Lieber C,S. (1970). Effect of chronic ethanol feeding on serum lipoprotein metabolism in the rat. *J. Clin. Investig.* **5**, 769-778.
- Barbalho, P. G., Lopes-Cendes, I., Maurer-Morelli, C. V. (2016). Indomethacin treatment prior to pentylenetetrazole-induced seizures downregulates the expression of ilb and cox and decreases seizure-like behavior in zebrafish larvae. *BMC*, **17**. 1-9.
- Barman, R.P. (1991). A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. *Rec. Zool. Surv. India*, Occ. Paper. **137**, 1-91.

- Braida, D., Donzelli, A., Martucci, R., Ponzoni, L., Pauletti, A., Sala, M. (2012). Neurohypophyseal hormones protect against pentylentetrazole-induced seizures in zebrafish: role of oxytocin-like and V1a-like receptor. *Peptides*. **37** (2), 327-333.
- Brind, AM, Hurlstone, A, Edrington, D, Gilmore 1, Fisher N, Pirmohamed M, and Fryer AA. (2004). The role of polymorphisms of glutathione S- transferase GSTM 1.M3.P1.TI and AI in susceptibility to alcoholic liver disease. *Alcohol and Alcoholism*. **39** (6), 478-483.
- Butterfield, D. A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R. Hall N., Hensley, K., Yatin, S., Allen, K. Aksenov, M., Aksenova, M. and Carney, J. (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and Vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **854**, 448-462.
- Canzian, J., Fontana, B. D., Quadros, V. A., Müller, T. E., Duarte, T., Rosemberg, D. B. (2019). Single pentylentetrazole exposure increases aggression in adult zebrafish at different time intervals. *Neurosci. Lett.* **692**, 27-32.
- Cavalcante, T. M. B., De Melo, J. M. A., Jr., Lopes, L. B., Bessa, M. C., Santos, J.G., Vasconcelos, L.C., Vieira Neto, A.E., Borges, L.T.N., Fonteles, M.M.F. (2019). . Ivabradine possesses anticonvulsant and neuroprotective action in mice. *Biomed. Pharmacother.* **109**, 2499–2512
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* **49**, 481–93
- Conde de la Rosa L, Moshage H, Nieto N. (2008). Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease. *Rev. Esp. Enferm Dig.* **100**, 156–163
- Cong, B., Liu, C., Wang, L., Chai, Y. (2020). The impact on antioxidant enzyme activity and related gene expression following adult zebrafish (*Danio rerio*) exposure to dimethyl phthalate. *Animals*. **10** (4), 717.
- Costa, A. P. L., Silva, D.A.M., Rodrigues, A. C. M., Marques, C.R., Soares, A.M.V.M., Rocha, R. J. M. (2021). Species-specific oxidative stress responses and cellular energy allocation after coral shipping. *Aquac. Rep.* **19**, 623.
- Çalışkan, A. M., Nazıroğlu, M. Uğuz, A. C. Övey, İS. Sütçü, R. Bal, R. Çalışkan, S. Özçankaya, R. (2010). Acamprosate modulates alcohol-induced hippocampal NMDA receptors and brain microsomal Ca²⁺-ATPase but induces oxidative stress in brain cortex of rat. *J. Memb. Biol.* **237**, 51-58
- Dang, J., Paudel, Y. N., Yang, X. Ren, Q. Zhang, S. Ji, X. (2021). Schaftoside Suppresses Pentylentetrazol-Induced Seizures in Zebrafish via Suppressing Apoptosis, Modulating Inflammation, and Oxidative Stress. *ACS Chem. Neurosci.* **12**, 42–52.
- Das, M. (1997). Glutathione status of some homeothermic vertebrate species and its relation with diabetogenesis. *IJEB*. **35**, 661-662.
- Das, SK., Vasudevan, DM. (2007). Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* **81**, 177-187.
- Denake, SM., Fanburg, BL. (1989). Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **257**, 1163-1 173.
- Dey, A. Cederbaum, A. I. (2006). Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology*. **43**, S63-S74.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A. (1995). Biochemical mechanisms, metabolism, adaptation, and toxicity. In, Rand, G. (Ed), Fundamentals of Aquatic Toxicology, Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Taylor Francis, London, pp. 523– 561
- Dichter, M.A. (2006). Models of epileptogenesis in adult animals available for antiepileptogenesis drug screening. *Epilepsy. Research*. **68** (1), 31-5.
- Diplock, A. T. (1991). Antioxidant nutrients and disease prevention, an overview. *AJCN*. **53** (1 S), 189S-193S.
- Dong, M., Zhu, L., Zhu, S., Wang, J., Wang, J., Xie, H., Du, Z. (2013). Toxic effects of 1-decyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Chemosphere*. **91** (8), 1107-1112.

- Du, F., Wang, X. Shang, B. Fang, J. Xi, Y. Li, A., Diao, Y. (2016). Gastrodin ameliorates spinal cord injury via antioxidant and antiinflammatory effects. *ABP*. **63** (3), 589–593.
- Du, Z., Zhu, L., Dong, M., Wang, J., Wang, J., Xie, H., Zhu, S. (2012). Effects of the ionic liquid [Omim] PF6 on antioxidant enzyme systems, ROS and DNA damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*. **124**, 91-93.
- Duy, P. Q., Berberoglu, M. A., Beattie, C. E., Hall, C. W. (2017). Cellular responses to recurrent pentylene-tetrazole-induced seizures in the adult zebrafish brain. *Neurosci*. **349**, 118-127.
- Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed. Pharmacother*. **60**, 97–108.
- Engel, J. Jr. (1989). Seizures and epilepsy. Philadelphia, PA. Davis
- Ensembl. (2013). Ensembl genome browser 74, *Danio rerio* - whole genome. [Online]. Available, http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Location/Genome.
- Estruch, R., Coca, A. (2004). High blood pressure, Alcohol and Cardiovascular risk. *ESH Sci. News*. **5**, 22.
- Fataccioli, V., Andraud, E., Gentik, M., French, S. W., and Rouach, F. I. (1999). Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities, relationship with oxidative stress. *Hepatology*. **29** (1), 14-20.
- Fernandez-Sola, J. Villegas, E. Nicolas, J. M., Deulofeu, R., Antunez, E., Sacanella, E. Estruch, R. Urbano-Marquez A. (1998). Serum and muscle levels of alpha-tocopherol, ascorbic acid, and retinol are normal in chronic alcoholic myopathy. *Alcohol Clin. Exp. Res*. **22**, 422-427.
- Ferriero, D. M. (2005). Protecting neurons. *Epilepsia*. **46** (Suppl 7), 45–51.
- Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., Patten, S. B., Kwon, C. S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, DL., Jetté N. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy, A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*. **88** (3), 296-303.
- Fisher, R.S., Boas, W.E., Blume, W., Elger, C, Genton, P., Lee, P., Engel, J.J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy, definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Apr*. **46** (4), 470-2.
- Fontana, B. D., Ziani, PR., Canzian, J., Mezzomo, N. J., Müller, T. E., Dos Santos, M. M., (2019). Taurine Protects from Pentylene-tetrazole-Induced Behavioral and Neurochemical Changes in Zebrafish. *Mol Neurobiol*. **56**, 583–94.
- Fontana, B. D., Ziani, P. R., Canzian, J., Mezzomo, N. J., Müller, T. E., Dos Santos, M. M., Rosemberg, D. B. (2019). Taurine protects from pentylene-tetrazole-induced behavioral and neurochemical changes in zebrafish. *Mol. Neurobiol*. **56**, 583-594.
- Forsgren, L., Hauser, W.A., Olafsson, E., Sander, J.W., Sillanpää, M., Tomson, T. (2005). Mortality of epilepsy in developed countries, a review. *Epilepsia*. **46** (Suppl 11), 18-27.
- Frohlich, JJ. (1996). Effect of alcohol on plasma lipoprotein metabolism. *C. Unica. Chimica. Acta*. **246** (1-2), 39-49.
- Furchgott, R. F., A. (1995). Research trail over half a century. *Ann. Rev. Pharma. Tox*. **35**, 1-27.
- Gawel, K., Kukula-Koch, W., Banono, N. S., Nieoczym, D., Targowska-Duda, K. M., Czernicka, L., Esguerra, C. V. (2021). 6-Gingerol, a major constituent of *Zingiber officinale* rhizoma, exerts anticonvulsant activity in the pentylene-tetrazole-induced seizure model in Larval Zebrafish. *Int. J. Mol. Sci*. **22** (14), 7745.
- Gawel, K., Kukula-Koch, W., Nieoczym, D., Stepnik, K., van der Ent, W., Banono, N. S., Esguerra, C. V. (2020). The influence of palmatine isolated from *Berberis sibirica* radix on pentylene-tetrazole-induced seizures in zebrafish. *Cells*. **9**, 1233.
- Girotti, A.W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res*. **39**, 1529–1542

- Guo, S. (2004). Linking genes to brain, behaviour and neurological diseases, what can we learn from zebrafish. *Genes. Brain. Behav.* **3**, 63–74.
- Gupta, S., Pandey, R., Katval, R., Aggarwal, H. K., Aggarwal, R. P., Aggarwal, SK. (2005). Lipid peroxide levels and antioxidant status in alcoholic liver disease. *IJCBBR*. **20** (1). 67-71.
- Gupta, R. C., Milatovic, D., Dettbarn, W. D. (2001). Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus, protection by antioxidant. *Neurotox.* **22**, 271–82.
- Gutteridge, J. M. C., Halliwell B., (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends. Biochem. Sci.* **15**, 129-135.
- Habeck, H., Odenthal, J., Walderich, B., Maischein H. M. (2002). Analysis of a Zebrafish VEGF Receptor Mutant Reveals Specific Disruption of Angiogenesis. *Curr. Biol.* **12**, 1405-12,
- Hacke, A. C. M., Miyoshi, E., Marques, JA., Pereira, R. P. (2021). *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, citral and geraniol exhibit anticonvulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. *J. Ethnopharmacol.* **275**, 114-142.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free. Radic. Biol. Med.* Oxford University Press, Oxford.
- Haorah, J. S. H., Ramirez, N., Floreani, S., Gorantla, B., Morsey, Y. Persidsky. (2008). Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free. Radic. Biol. Med.* vol. 45, no. 11, pp. 1542–1550.
- Harold, E.S., Darrell, E.A., Evan, I.F., John, A.M. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *JNB*.**18**, 567-579.
- Henzel, K., Thorborg, C., Hofmann, M., Zimmer, G. and Leuschner, U. (2004). Toxicity of ethanol and acetaldehyde in hepatocytes treated with urso deoxycholic or tauroursodeoxycholic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **1644**, 37–45.
- Hiller-Sturmhofel, S., Spear, L.P. (2018). Binge drinking's effects on the developing brain-animal models. *Alcohol. Res. Health* **39**, 77.
- Houslay, MD. and Stanley, KK. (1982). Dynamics of biological membranes. John Wiley and Sons. New York.
- Hsiao, T. H., Lin, C. J., Chung, Y. S., Lee, G. H., Kao, T. T., Chang, W. N. T. (2014). Ethanol-induced upregulation of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase helps relieve ethanol-induced oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.*
- Huang, S., Zhou, C., Zeng, T., Li, Y., Lai, Y., Mo, C., Gao, L. (2020). P-hydroxyacetophenone ameliorates alcohol-induced steatosis and oxidative stress via the NF-κB signaling pathway in zebrafish and hepatocytes. *Front. Pharmacol.* **10**, 1594.
- Husain, K., Mejia, J., Lalla, J., Kasim, S., Dose response of alcohol induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. *Pharmacological Research.* (2005). 51, 337-343. Jonas N and Elias S.J.A. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad. Biol. Med.* **31** (11), 1287- 1312.
- Ishii, H., Adachi, M., Fernandez-checa, JC., Cederbaum, AI., Deaciuc IV and Nanji AA. (2003). Role of apoptosis in alcoholic liver injury. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **27** (7), 1207-1212.
- Ishii, H., Kurose, I. and Rato, S. (1997). Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *JGH.* **12** (9-10), S272- S282.
- Issac, P. K., Guru, A., Velayutham, M., Pachaiappan, R., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Arockiaraj, J. (2021). Oxidative stress induced antioxidant and neurotoxicity demonstrated in vivo zebrafish embryo or larval model and their normalization due to morin showing therapeutic implications. *Life Sci.* **283**, 119-864.
- Jacob, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.* **15**, 755-766.
- Jin, M., He, Q., Zhang, S., Cui, Y., Han, L., Liu, K. (2018) Gastrodin Suppresses Pentylenetetrazole-Induced Seizures Progression by Modulating Oxidative Stress in Zebrafish. *Neurochem. Res.* **43**, 904–17.

- Jin, M., He, Q., Zhang, S., Cui, Y., Han, L., Liu, K. (2018). Gastrodin suppresses pentylenetetrazole-induced seizures progression by modulating oxidative stress in zebrafish. *Neurochem. Res.* **43**, 904-917.
- Jin, M., Zhang, B., Sun, Y., Zhang, S., Li, X., Sik, A., Liu, K. (2020). Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor γ in anticonvulsant activity of α -asaronol against pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. *Neuropharmacol.* **162**, 107-760.
- Kalishwaralal, K., Jeyabharathi, S., Sundar, K., Muthukumaran, A., (2015). Sodium selenite/selenium nanoparticles (SeNPs) protect cardiomyoblasts and zebrafish embryos against ethanol induced oxidative stress. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **32**, 135-144.
- Karahanian, E., M. E. Quintanilla, L. Tampier, Ethanol as prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* vol. 35, no. 4, pp. 606–612, **35** (4), 606-612.
- Keskin Guler, S., Aytac, B., Durak, Z. E., Gokce, Cokal, B., Gunes, N., Durak, I., Yoldas, T. (2016). Antioxidative-oxidative balance in epilepsy patients on antiepileptic therapy, a prospective case-control study. *Neurol. Sci.* **37** (5), 763–767.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D. J. (1983). The role of glutathione in detoxification. *Environ. Health Perspect.* **49**, 59–69.
- Kim, S. S., Kan, H., Hwang, K. S., Yang, J. Y., Son, Y., Shin, D. S., Bae, M. A. (2021). Neurochemical effects of 4-(2Chloro-4-fluorobenzyl)-3-(2-thienyl)-1, 2, 4-oxadiazol-5 (4H) one in the pentylenetetrazole (PTZ) induced epileptic seizure zebrafish model. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (3), 1285.
- Koch, O. R., Pani, G., Borrello, S., Palombini, G. Galeotti, T. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med.* **25** (1-2), 191-198.
- Kumar, A., Gandhimathi, R. (2010). Effect of *Guettarda speciosa* extracts on antioxidant enzymes levels in rat brain after induction of seizures by MES and PTZ. *J. Nat. Prod* **3**, 80–85.
- Lai, Y., Zhou, C., Huang, P., Dong, Z., Mo, C., Xie, L., Lv, Z. (2018). Polydatin alleviated alcoholic liver injury in zebrafish larvae through ameliorating lipid metabolism and oxidative stress. *J. Pharmacol. Sci.* **138** (1), 46-53.
- Leonardo, B. M. R., Carlos, R.T., Vera, L. L., Sergio, A., Uyemura Ana, M.O., Fernando M. A. C. (2006). Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. *Life Sciences.* **78**, 2179-2187.
- Leung, T.M., Nieto, N. (2013). CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **58**, 395–398.
- Li, H., Isaac, N., He, S., Ou, X., Xiang, J., Tian, X., Chu, W. (2022). Dietary supplementation with protein hydrolysates from the shell of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) affects growth, muscle antioxidant capacity and circadian clock genes expression of zebrafish (*Danio rerio*). *Aqua. Rep.* **27**, 101-390.
- Lieber, C. S., Wu, Y. S. and Salmela, K. S. (1994). Microsomal acetaldehyde oxidation is negligible in the presence of ethanol. *Alcohol.* **8**, 409-423.
- Lieber, C.S. (1997). Gastric ethanol metabolism and gastritis, Interactions with other drugs, Helicobacter pylori and antibiotic therapy. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **21**, 1360–1366.
- Lieschke, G. J., Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* **8**, 353–67.
- Lindi, C., Montorfano, G. Marliani, P. (1998). Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake. *Alcohol.* **16** (4), 311-316.
- Liu, X., Wen, F., Yang, J., Chen, L., Wei, Y. Q. (2010). A review of current applications of mass spectrometry for neuroproteomics in epilepsy. *Mass Spectrom. Rev.* **29** (2), 197-246.

- Lores Arnaiz, S., Travacio, M., Llesuy, S., Rodriguez, de Lores Arnaiz, G. (1998). Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. *Neurochem. Res.* **23**, 1477–83.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem* **193**, 265-275.
- Löscher, W., Schmidt, D. (2006). New Horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. *Neurochem. Res.* **69** (3), 183-272.
- Lu, Y., Cederbaum, A. (2008). CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol; Free Radicals. *Biological Medicine*. **44**, 723–738.
- Marangoz, C. (2009). Deneysel Epilepsi Modelleri. *JECM* **14** (3), 147-186.
- Marnett, L. J., (2009). Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. **21**, 361-370
- Mas, M. M. E., Zhang, J. Abdel-Rahman, A. A. (2006). Upregulation of vascular inducible nitric oxide synthase mediates the hypotensive effect of ethanol in conscious female rats. *J. Appl. Physiol.* **100**, 1011-1018.
- Mazumder, A. G., Kumari, S., Singh, D. (2019). Anticonvulsant action of a selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor LY294002 in pentylenetetrazole-mediated convulsions in zebrafish. *Epilepsy research*, **157**, 106-207.
- Menezes, F. P., Da Silva, R. S. (2017). The influence of temperature on adult zebrafish sensitivity to pentylenetetrazole. *Epilepsy Research*, **135**, 14-18.
- Mercan, U., (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Van. Vet. J.* **15** (1-2), 91-96.
- Miller, D.M., Buettner, G.R and Aust, S.D., (1990). Transition metals's catalysts of autoxidation reactions. *Free Radic Biol Med* . **8**, 95-108.
- Moraes, I. B., Paiva, I. M., Moreira-Júnior, R. E., Sartori, B. M., Franco, R. R., Espindola, F. S., Brunialti-Godard, A. L. (2023). Ethanol Preference Leads to Alterations in Telomere Length, Mitochondria Copy Number, and Antioxidant Enzyme Activity in Zebrafish Brains. *FBL*. **28** (4), 73.
- Mortazavi, F., Ericson, M., Story, D., Hulce, V.D., Dunbar, G.L. (2005). Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats. *Epilepsy Behav* **7** (4), 629-638.
- Mussulini, B. H. M., Leite, C. E., Zenki, K. C., Moro, L., Baggio, S., Rico, E. P., de Oliveira D. L. (2013). Seizures induced by pentylenetetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PloS one*. **8** (1), e54515.
- Müller, T. E., Nunes, S. Z., Silveira, A., Loro, V. L., Rosemberg, D. B. (2017). Repeated ethanol exposure alters social behavior and oxidative stress parameters of zebrafish. *Prog. Neuro.Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. **79**, 105-111.
- Nader, M. A., Ateyya, H., El-Shafey, M., El-Sherbeeney, N. A. (2018). Sitagliptin enhances the neuroprotective effect of pregabalin against pentylenetetrazole-induced acute epileptogenesis in mice. Implication of oxidative, inflammatory, apoptotic and autophagy pathways. *Neurochem. Int.* **115**, 11–23.
- Naver, K. P., Baraona, E. Lieber, C. S. (1997). Polyenoic phosphatidylcholine decrease alcohol hyperlipemia without affecting the alcohol-induced rise of HDL-Cholesterol. *Life Sci.* **61** (19), 1907-1914.
- Nazıroğlu, M. (2009). Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem. Res.* **34**, 2181–219.
- Nelson, J.S. (1994). Fishes of the world. 3rd edn. Wiley, New York.
- Newman, M., Giuseppe Verdile., Martins R.N., Lardelli M. (2011). Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. *Bioch. Biophys. Acta*. **1812**, 346-352.
- Norton, W., Bally-Cuif, L. (2010). Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neurosci.* **11**, 90.
- Paravani, E. V., Bianchi, M., Querubín Pereyra, P. L., Acosta, M. G., Odetti, L., Simoniello, M. F., Poletta, G. (2024). DNA damage, alterations in the expression of antioxidant enzyme genes and in the histoarchitecture of gill cells of zebrafish exposed to 17- α -ethinylestradiol. *Drug. Chem. Toxicol.* **47** (1), 60-66.

- Parichy, D.M. (2006). Evolution of Danio pigment pattern development. *Heredity*. **97**, 200-210.
- Patel, M. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1951–62.
- Peng, X., Lin, J., Zhu, Y., Liu, X., Zhang, Y., Ji, Y., Li, Q. (2016). Anxiety-related behavioral responses of pentylentetrazole-treated zebrafish larvae to light-dark transitions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **145**, 55-65.
- Perumal, S., Gopal Samy, M. V., Subramanian, D. (2021). Developmental toxicity, antioxidant, and marker enzyme assessment of swertiamarin in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **35** (9), e22843.
- Pineda, R., Beattie, C. E., Hall, C.W. (2013). Closed-loop neural stimulation for pentylentetrazole-induced seizures in zebrafish. *DMM*. **6** (1), 64-71.
- Porter, N. A., Caldwell, S. E., Mills, K. A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*. **30**, 277-290.
- Powers, S. K., Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: Focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.* **58**, 1025–1033.
- Qu, L. L., Yu, B., Li, Z., Jiang, W. X., Jiang, J. D., Kong, W. J. (2016). Gastrodin ameliorates oxidative stress and proinflammatory response in nonalcoholic fatty liver disease through the AMPK/Nrf2 pathway. *Phytother Res* **30** (3), 402–411.
- Raju, S. V., Mukherjee, A., Sarkar, P., Issac, P. K., Lite, C., Paray, B. A., Arockiaraj, J. (2021). RM12 similar to substance P from tachykinin of freshwater murrel *Channa striatus* influence intracellular ROS in vitro fish erythrocytes and developmental toxicity and antioxidant enzymes in vivo zebrafish embryo. *Fish Physiol. Biochem.* **47** (4), 1073-1085.
- Rishitha, N., Muthuraman, A. (2018). Therapeutic evaluation of solid lipid nanoparticle of quercetin in pentylentetrazole induced cognitive impairment of zebrafish. *Life SCI.* **199**, 80-87.
- Rodrigo, R. Rivera, G. (2002). Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic. Biol. Med.* **3** (33), 409 – 422.
- Rosemberg, D. B., da Rocha, R. F., Rico, E. P., Zanotto-Filho, A. L. F. E. U., Dias, R. D., Bogo, M. R., Souza, D. O. (2010). Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience*. **171** (3), 683-692.
- Rubinstein, A. L. (2003). Zebrafish: from disease modelling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **6**, 218-223.
- Schuchmann, S., Buchheim, K., Meierkord, H., Heinemann, U. (1999). A relative energy failure is associated with low-Mg² but not with 4-aminopyridine induced seizure-like events in entorhinal cortex. *J. Neurophysiol*, **81**, 399–403.
- Schuele, S.U., Luders, H.O. (2008). Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives. *Lancet Neurol.* **7** (6), 514-24.
- Sehonova, P., Zikova, A., Blahova, J., Svobodova, Z., Chloupek, P., Kloas, W. (2019). mRNA expression of antioxidant and biotransformation enzymes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to the tricyclic antidepressant amitriptyline. *Chemosphere*. **217**, 516-521.
- Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P. and Cillard, J. (2001). Alcohol and oxidative stress. *Pathologic Biologic.* **49** (9), 689-695.
- Sharma, P., Kumari, S., Sharma, J., Purohit, R., Singh, D. (2021). Hesperidin interacts with CREB-BDNF signaling Pathway to suppress pentylentetrazole-induced convulsions in zebrafish. *Front. Pharmacol.* **11**, 607-797.
- Shim, S.Y. and H.S. Kim. (2013). Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain. **56** (3). 107-111.
- Shirpoor, A., Minassian, S., Salami, S., Khadem-Ansari, MH., Yeghiazaryan, M. (2008). Alpha-lipoic acid decreases DNA damage and oxidative stress induced by alcohol in

- the developing hippocampus and cerebellum of rat. *Cell. Physiol. Biochem.* **22**, 769-776.
- Shorvon, S.D. (1996). The epidemiology and treatment of chronic and refractory epilepsy. *Epilepsia*. **37**, 1-3.
- Siebel, A. M., Menezes, F. P., Capiotti, K. M., Kist, L. W., Schaefer, I. D. C., Frantz, J. Z., Bonan, C. D. (2015). Role of adenosine signaling on pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. *Zebrafish*. **12** (2), 127-136.
- Siler-Marsiglio, K. I., Shaw, G., Heaton, M. B. (2004). Pycnogenol and vitamin E inhibit ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Neurobiol.* **59**, 261-271.
- Slotte, J. P. (1999). Sphingomyelin-Cholesterol interactions in biological and model membranes. *Chem. Phys. Lipids*. **102**, 13-27.
- Song, L., Li, M., Feng, C., Sa, R., Hu, X., Wang, J., Yang, J. (2022). Protective effect of curcumin on zebrafish liver under ethanol-induced oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicol Pharmacol*, **258**, 109-360.
- Spence, R., Fatema, M.K., Reichard, M., Huq, K.A., Wahab, M.A., Ahmed, Z.F., Smith, C., (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *J Fish Biol.* **69**, 1435-1448.
- Stancova, V., Zikova, A., Svobodova, Z., Kloas, W. (2015). Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) naproxen on gene expression of antioxidant enzymes in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol*, **40** (2), 343-348.
- Stefan, H., Lopes, da Silva, F.H., Löscher, W., Schmidt, D., Perucca, E., Brodie, M.J., Boon, P.A., Theodore, W.H., Moshe, S.L. (2006). Epileptogenesis and rational therapeutic strategies. *Acta Neurol. Scand.* **113** (3), 139-55.
- Stern, H. M., Zon, L. I. (2003). Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish *Nature Rev. Cancer*. **3** (7), 533- 39.
- Sun, Z., Amsterdam, A., Pazour, G.J., Cole, D.G., Miller, M.S., Hopkins, N. (2004). A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Dev.* **131**, 4085–93.
- Sutha, J., Anila, P. A., Gayathri, M., Ramesh, M. (2022). Long term exposure to tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) causes alterations in reproductive hormones, vitellogenin, antioxidant enzymes, and histology of gonads in zebrafish (*Danio rerio*): In vivo and computational analysis. *CBPC*. **254**, 109-263.
- Talwar, P.K., Jhingran, A.G. (1991). Inland fishes of India and adjacent countries. Oxford I. B. H. Publishing, Calcutta.
- Thannickal, V.J. Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling: American. *Am J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **279**, L1005-L1028.
- Thomas, E.L., Lehrer, R.I. Rest, R.F. (1988). Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev. Infect. Dis.* **10**, S450-S456.
- Tiedeken, J. A., Ramsdell, J. S. (2007). Embryonic exposure to domoic acid increases the susceptibility of zebrafish larvae to the chemical convulsant pentylenetetrazole. *EHP*. **115** (11), 1547-1552.
- Torres, C. A., Mendes, N. V., Baldin, S. L., Bernardo, H. T., Vieira, K. M., Scussel, R., Rico, E. P. (2021). Cotreatment of small gold nanoparticles protects against the increase in cerebral acetylcholinesterase activity and oxidative stress induced by acute ethanol exposure in the zebrafish. *Neurosci.* **457**, 41-50.
- Torres-Hernandez, B. A., Colon, L. R., Rosa-Falero, C., Torrado, A., Miscalichi, N., Ortiz, J. G., Behra, M. (2016). Reversal of pentylenetetrazole-altered swimming and neural activity-regulated gene expression in zebrafish larvae by valproic acid and valerian extract. *Psychopharmacol.* **233**, 2533-2547.
- Torres-Hernandez, B. A., Del Valle-Mojica, L. M., Ortiz, J. G. (2015). Valerenic acid and Valeriana officinalis extracts delay onset of Pentylenetetrazole (PTZ)-Induced seizures in adult *Danio rerio*. *BMC Complement. Altern. Med.* **15**, 1-10.
- Ungerer, M., Knezovich J., Ramsay M (2013). In utero alcohol exposure, epigenetic changes, and their consequences. *ARCR*. **35** (1), 37.

- Üstündağ, F. D., Ünal İ., Üstündağ Ü. V., Cansız D., Beler M., Alturfan A. A., Emekli-Alturfan, E. (2023). Morphine ameliorates pentylenetetrazole-induced locomotor pattern in zebrafish embryos; mechanism involving regulation of opioid receptors, suppression of oxidative stress, and inflammation in epileptogenesis. *Toxicol. Mech. Methods*. **33** (2), 151-160.
- Vamvakas, S., Teschner M., Bahner U., Heidland A. (1998). Alcohol abuse: potential role in electrolyte disturbances and kidney diseases. *Clin. Nephrol.* **49** (4), 205-213.
- Velayutham, M., Ojha, B., Issac, P. K., Lite, C., Guru, A., Pasupuleti, M., Arockiaraj, J. (2021). NV14 from serine O-acetyltransferase of cyanobacteria influences the antioxidant enzymes in vitro cells, gene expression against H₂O₂ and other responses in vivo zebrafish larval model. *Cell Biol. Int.* **45** (11), 2331-2346.
- Velisek, L., Kusa, R., Kulovana, M., Mares, P. (1990). Excitatory amino acid antagonists and pentylenetetrazol-induced seizures during ontogenesis. I. The effects of 2-amino-7-phosphonoheptanoate. *Life Sci.* **46** (19), 1349-1357.
- Vore, A. S., Deak, T. (2021). Alcohol, inflammation, and blood-brain barrier function in health and disease across development. *Int. Rev. Neurobiol.* **161**, 209-249.
- Wayne, N. F. (2009). Genetics of complex neurological disease: challenges and opportunities for modeling epilepsy in mice and rats. *TiG.* **25** (8), 361–67.
- Wu, D. Cederbaum, A. (2003). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Res Health.* **27** (4), 277-284.
- Xu, W. Abdel-Rahman, A. A. (2005). Effect of chronic ethanol administration on hepatic eNOS activity and its association with caveolin-1 and calmodulin in female rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, G579-G585.
- Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J. (2015). Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **122**, 54-60.
- Zeng, L. H., Rensing, N. R., Wong, M. (2009). The mammalian target of rapamycin signaling pathway mediates epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy *J. Neurosci.* **29** (21), 69-72.
- Zhang, B., Wang, L., Ji, X., Zhang, S., Sik, A., Liu, K., Jin, M. (2020). Anti-inflammation associated protective mechanism of berberine and its derivatives on attenuating pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. *J. Neuroimmune. Pharmacol.* **15**, 309-325.
- Zhang, C. J., Willett, C., Fremgen, T. (2003). Zebrafish: an animal model for toxicological studies. *Curr.Prot.Tox.* **17**, 1–18.
- Zhao, X., Zhou, M., Deng, Y., Guo, C., Liao, L., He, L., Li, Y. (2022). Functional teas from *Penthorum chinense* Pursh alleviates Ethanol-Induced hepatic oxidative stress and autophagy impairment in zebrafish via modulating the AMPK p62/Nrf2/mTOR Signaling Axis. *Plant Foods. Hum. Nutr.* **77** (4), 514-520.
- Zheng, Y. M., Chen, B., Jiang, J. D., Zhang, J. P. (2018). Syntaxin 1B mediates berberine's roles in epilepsy-like behavior in a pentylenetetrazole-induced seizure zebrafish model. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 378.
- Zicha, J., Dobesova, Z., Kunes, J. (2001). Relative deficiency of nitric oxide dependent vasodilatation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J. Hypertens.* **19**, 247–254.
- Zimatkin, S. M. A. I. Buben. (2007). Ethanol oxidation in the living brain, *Alcohol and Alcoholism.* **42**, 529–532.