

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DİYETLE ALINAN SÜLFİTİN HİPOKAMPUSTAKİ PGE2
DÜZEYİ VE PGE2 RESEPTÖRLERİNE ETKİLERİ

Tuğberk DENİZALTI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYO FİZİK ANABİLİM DALI

DİYETLE ALINAN SÜLFİTİN HİPOKAMPUSTAKİ PGE2
DÜZEYİ VE PGE2 RESEPTÖRLERİNE ETKİLERİ

Tuğberk DENİZALTI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Narin DERİN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TYL-2018-4053 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim boyunca, gerek kişisel gelişimim, gerekse eğitimime yaptığı büyük katkılarından dolayı çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Narin DERİN'e,

Tezime olan katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalında görevli kıymetli hocalarım Prof. Dr. Mutay ASLAN ve Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN'a,

Tezimle ilgili yolculukta benden desteğini ve bilgisini sakınmayan çok kıymetli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Betül DANIŞMAN, Arş. Gör. Mustafa Munzuroğlu ve Arş. Gör. Güven Akçay'a,

Yüksek Lisans programına kayıt sürecimden başlamak üzere eğitimimin her aşamasında bana yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitüsünün değerli çalışanlarına,

Ve sevgili anneme ve babama bugüne kadar hiçbir şekilde benden desteklerini esirgemedikleri ve her daim yanımda oldukları için,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda gıda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum metabisülfitin, öğrenme ve uzaysal hafıza üzerindeki etkilerinin ve olası etkilerde araşidonik asit, COX-2, PGE₂ sinyal yolağı ile PGE₂'nin reseptör subtipinin katkısının olup olmadığının araştırılması planlanmıştır.

Yöntem: 3 aylık erkek Wistar sıçanlar kontrol (K), S100 ve S260 olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna musluk suyu, S100 ve S260 grubuna ise sırasıyla 100 ve 260 mg/kg/gün dozunda sodyum metabisülfid içeren su 35 gün boyunca gavaj yoluyla verilmiştir. Sıçanlara öğrenme, uzaysal hafıza ve lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için sırasıyla Morris su tankı (Morris Water Maze=MWM) ve açık alan (Open Field=OF) testi yapılmıştır. Sonrasında plazma S-sülfonat tayini için kan örnekleri alınmış, kandan arındırılan beyin dokuları çıkarılmış ve hipokampusları ayrılmıştır. Hipokampus dokularında AA ve PGE₂ düzeyleriyle COX-2 aktivitesi tayin edilmiş, RT-PCR ile PGE₂ reseptör subtiplerinin mesajcı RNA (mRNA) ekspresyonları analiz edilmiştir.

Bulgular: Morris su tankı testinde 6. günde toplam alınan yol ve ortalama hız değerleri sülfid verilen gruplarda anlamlı derecede yüksek, ancak sülfid gruplarında hedef kadrana giriş sıklığı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşüktür. Sülfid gruplarında açık alan testinde elde edilen toplam yol, ortalama hız değerleri ve plazma S-sülfonat ve AA düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksektir. COX-2 aktivitesiyle PGE₂ düzeyinin sadece S260 grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, hipokampustaki PGE₂'nin dört reseptör subtipinin mRNA ekspresyonları S100 grubunda anlamlı düzeyde artmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda sülfid alımına bağılı olarak uzaysal hafıza ve öğrenmenin bozulduğu, bu sürece AA, COX-2 ve PGE₂ sinyal yolağının katkı sunduğu, sülfitin etkilerinde PGE₂ reseptörlerinin katkısının maruz kalınan sülfitin dozuna bağılı olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sülfid, uzaysal hafıza, araşidonik asit, COX-2, PGE₂

ABSTRACT

Objective: In our study, it has been planned to investigate the effects of sodium metabisulfite, which is used as a food additive, on learning and spatial memory, and the possible contribution of arachidonic acid, COX-2, PGE₂ signal pathway and PGE₂ receptor subtype to these effects.

Method: 3-month-old male Wistar rats were divided into 3 groups as control (K), S100 and S260. Tap water was given to the control group, water containing 100 and 260mg/kg/day sodium metabisulphite dose were given to S100 and S260 group respectively via gavage for 35 days. Morris water maze (MWM) and open field (OF) test were performed to evaluate learning and spatial memory and locomotor activity respectively in rats. Afterwards, blood samples were taken to determine plasma S-sulfonate levels and brain tissues purified from blood were removed and hippocampus tissues were separated. AA, PGE₂ levels and COX-2 activity were determined in hippocampus and mRNA expressions of RT-PCR and PGE₂ receptor subtypes were analyzed.

Results: Total distance and average velocity performed on the 6th day in the sulfite groups were significantly higher, yet target quadrant entrance frequency in the sulphite groups was significantly lower compared to control group in the MWM test. Total distance and average velocity obtained using OF test, plasma S-sulfonate and AA levels in sulphite groups were significantly higher compared to control group. PGE₂ level and COX-2 activity was found to be significantly higher only in S260 group. However, mRNA expressions of the four receptor subtypes of PGE₂ in the hippocampus increased significantly in the S100 group.

Conclusion: In our study, it was determined that spatial memory and learning were impaired due to sulfite intake, and AA, COX-2 and PGE₂ signal pathways contributed to this process and the contribution of PGE₂ receptors to the effects of sulfide depends on exposed sulfite dose.

Key words: Sulfite, spatial memory, arachidonic acid, COX-2, PGE₂

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sülfıt	3
2.1.1. Sülfıtın endojen üretımı	3
2.1.2. Sülfıtın Eksojen Alımı	4
2.1.3. Sülfıt Metabolizması	6
2.1.4. Sülfıt Toksisitesi	8
2.1.5. Sülfıt radikallerinin oluşumu	10
2.2. Araşidonik asit ve Prostaglandin Yolağı	11
2.2.1. Fosfolipaz A2 Enziminin Subtipleri	12
2.2.2. Siklooksijenaz-1 ve Siklooksijenaz-2	13
2.2.3. Prostaglandin E2	14
2.2.4. PGE2 reseptör subtipleri	14
2.3. Öğrenme ve Hafıza	24
2.3.1. Kalıcılık Süresine Göre Sınıflandırma	25
2.3.2. İçeriğine Göre Hafıza Tipleri	26
2.3.3. Uzun Süreli Güçlenme	29
2.4. Öğrenmenin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Deneysel Modeller	29
2.4.1. Klasik Labirent Testi	29
2.4.2. T-Labirent Testi	30
2.4.3. Y-Labirent Testi	30
	iii

2.4.4. Radial Kollu Labirent	30
2.4.5. Morris Su Tankı Testi	30
2.4.6. Açık Alan Testi	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Gruplandırma	32
3.2. Deney Protokolü	32
3.3. Davranış Deneyleri	32
3.3.1. Morris Su Tankı Testi	32
3.3.2. Açık Alan Testi	33
3.4. Biyokimyasal Analizler	33
3.4.1. Plazma-S-Sülfonat Tayini	33
3.4.2. Araşidonik Asit Düzeyi Tayini	34
3.4.3. COX-2 aktivitesinin tayini	34
3.4.4. PGE ₂ düzeyinin tayini	34
3.4.5. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ile PGE ₂ reseptörlerinin (E1, E2, E3, E4) tayini	35
3.5. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. Morris Su Tankı Testi Bulguları	37
4.2. Açık Alan Testi Bulguları	39
4.3. Plazma-S-Sülfonat Bulguları	40
4.4. Araşidonik Asit Bulguları	41
4.5. COX-2 Bulguları	41
4.6. PGE ₂ Bulguları	41
4.7. PGE ₂ Reseptör Subtipi Ekspresyon Analizi	41
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Genel Olarak Besinlerdeki Maksimum SO ₂ Düzeyleri	5
Tablo 2.2. Yüksek Sülfid İçeriğine Sahip Bir Lokanta Öğününün Sülfid İçeriği	6
Tablo 2.3. Reseptör Subtipleri Genel Özellikleri	21
Tablo 3.1. Real-time PCR için kullanılan primerlerin sekansları	36
Tablo 4.1. Açık alan testinde deney gruplarının girilen kare sayısı, kat ettikleri toplam yol ve ortalama hızları	40
Tablo 4.2. Deney gruplarının hipokampus dokularında ölçülen arasıdonik asit düzeyi, COX-2 aktivitesi ve PGE ₂ seviyesi	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Vücutta endojen sülfite oluşumu	4
Şekil 2.2. Sülfite oksidazın sülfite sülfata oksitlemesi	7
Şekil 2.4. Siklooksijenaz yolu ve prostanoidler	17
Şekil 4.1. MWM testinde testin ilk beş gününde grupların platformu bulma süresi	37
Şekil 4.2. Probe trial için toplam alınan yol	38
Şekil 4.3. Probe trial ortalama hız verileri	38
Şekil 4.4. Probe trial için hedef kadrana giriş sıklıkları	39
Şekil 4.5. Grupların Plazma-s-sülfonat seviyeleri	40
Şekil 4.6. Hipokampusda PGE ₂ -EP1 reseptörünün mRNA ekspresyon düzeyleri	42
Şekil 4.7. Hipokampusda PGE ₂ -EP2 reseptörünün mRNA ekspresyon düzeyleri	42
Şekil 4.8. Hipokampusda PGE ₂ -EP3 reseptörünün mRNA ekspresyon düzeyleri	43
Şekil 4.9. Hipokampusda PGE ₂ -EP4 reseptörünün mRNA ekspresyon düzeyleri	43

SİMGELER ve KISALTMALAR

4-HNE	: 4-Hidroksi-2-Nonenal
AA	: Araşidonik Asit
ATP	: Adenozin Trifosfat
BDNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (Brain-Derived Neurotrophic Factor)
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
COX-1/COX-2	: Siklooksijenaz 1 ve Siklooksijenaz 2
cPLA2	: Sitozolik Fosfolipaz A2
DHA	: Dokosaheksaenoik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FDA	: Food and Drug Administration
iPLA2	: Ca^{+2} -Bağımsız Fosfolipaz A2
LTP	: Uzun Süreli Güçlenme (Long Term Potentiation)
Mo	: Molibdenyum
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MWM	: Morris Su Tankı
NMDA	: N-Metil-D Aspartik Asit
-O₃SOO	: Peroksimonosülfat Anyon Radikali
PGE₂	: Prostaglandin E2
PGG₂	: Prostaglandin G2
PGH₂	: Prostaglandin H2
PKC	: Protein Kinaz-C

PLA2	: Fosfolipaz A2
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi (Polyunsaturated Fatty Acid)
RNA	: Ribonükleik asit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
RT-PCR	: Reverse transcription polymerase chain reaction
SO₄⁻²	: Sülfat
SO₂	: Sülfür Dioksit
SO₃⁻	: Sülfür Trioksit
SO₃²⁻	: Sülfite İyonu
SOX	: Sülfite Oksidaz
sPLA2	: Sekretuar Fosfolipaz A2
TBARS	: Tiobarbitürik asit reaktif ürünleri

1. GİRİŞ

İnsanların sülfite maruziyeti, özellikle raf ömürleri uzun ürünlerin tüketilmesiyle veya inhalasyon yoluyla olabileceği gibi vücutta endojen olarak üretilmesiyle de mümkün olmaktadır (Cooper, 1983). Ne var ki sülfitle ilgili literatür çalışmalarına bakıldığında, yüksek dozda sülfite maruziyetinin bir çok olumsuz etkiye sebep olduğu görülmektedir (Gunnison ve ark. 1987; Lester, 1995). Vücuttaki bu olumsuz etkilerin azaltılması, mitokondriyal bir enzim olan sülfite oksidaz enziminin, sülfite okside ederek zararsız bir ürün olan inorganik sülfata (SO_4^{2-}) dönüştürmesine bağlıdır (Johnson ve Rajagopalan, 1976b). Ancak maruz kalınan sülfite miktarının, dünya sağlık örgütü tarafından belirlenen güvenli dozun üzerinde olması veya sülfite oksidaz enzim aktivitesinin yetersiz olması durumlarında sülfite radikalleri açığa çıkabilmekte ve bu serbest radikaller nükleik asit, protein veya lipid yapılarıyla reaksiyona girerek moleküler hasara, akabinde de hücresel hasarlara neden olabilmektedirler (Reist ve ark. 1998a; Meng ve ark. 2005). Daha önce ekibimiz tarafından yapılan sülfite çalışmalarında, 100 mg/kg/gün sülfite maruziyetinin beyin dokusunda lipid peroksidasyona, nöronal apoptoza ve nörodejenerasyona yol açtığı ve sülfite aracılı nörodejenerasyona sekretuar fosfolipaz A2 (sPLA2), sitozolik fosfolipaz A2 (cPLA2) artışının katkı sunduğu gösterilmiştir (Kencebay ve ark. 2013; Basaranlar ve ark. 2019). Bir diğer çalışmamızda ise 260 mg/kg/gün dozunda uygulanan sülfitin beyin dokusunda siklooksijenaz 2 (COX-2) ekspresyonunu ve prostaglandin E2 (PGE_2) düzeyini arttırdığını ve arakidonik asit (AA) sinyal yolağının sülfite toksisitesine bağlı nörodejenerasyona aracılık ettiğini bildirmiştik (Derin ve ark. 2017). Sülfitin beyin dokusunda neden olduğu bu nörotoksik etkilerin hipokampal nöronlarda da olabileceği düşünülerek yapılan öğrenme ve hafıza çalışmalarında, sülfite maruziyetinin öğrenme ve hafızayı bozduğu ve hipokampal piramidal nöronlarda hasara neden olduğu rapor edilmiştir (Akdogan ve ark. 2011; Ozsoy ve ark. 2012; Noorafshan ve ark. 2013). Episodik ve uzaysal hafıza gibi bazı spesifik hafıza ve öğrenme tiplerinde hipokampus asıl rolü oynamaktadır (Deng ve ark. 2010). Sıçanlarla yapılan çalışmalarda hipokampusta oluşan lezyonların uzaysal hafızada bozulmalara neden olduğu saptanmıştır (Broadbent ve ark. 2004).

Fosfolipaz A2 (PLA2), membran fosfolipitlerini sn-2 pozisyonundan keserek hücre içine serbest AA asit salınımına neden olmakta ve AA siklooksijenazlar (COX)

tarafından prostaglandinlere dönüştürülmektedir. Siklooksijenazlar, siklooksijenaz 1 (COX-1) ve COX-2 olmak üzere 2 farklı izoformda bulunmakta (Smith ve ark. 2000); COX-1 genellikle hücre pasif durumdayken işlev görürken, COX-2, hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve makaslama stresi (shear stress) gibi çeşitli uyarıların etkisiyle uyarılmakta (Hla ve ark. 1999) ve patolojik süreçlerde rol almaktadır (Herschman, 1996; Smith ve Langenbach, 2001). Siklooksijenazlar tarafından oluşturulan PGG₂, peroksidaz aktivitesi ile prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüştürülmekte ve PGH₂ ise prostaglandin sentazlar tarafından PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , PGI₂ ve tromboksan A₂ (TxA₂) gibi biyomoleküllere dönüştürmektedirler. PGE₂, vücutta en yaygın üretilen prostaglandin olup, reproduktif, nöronal, metabolik ve immün fonksiyonlarda çeşitli görevler üstlenmektedir (Harris ve ark. 2002; Legler ve ark. 2010). PGE₂ hem proinflatuar hem de antiinflatuar etkileri nedeniyle nöronal dokularda oldukça önemli fonksiyonlara sahiptir (Takadera ve ark. 2004; Kang ve ark. 2009). PGE₂ fonksiyonlarına, PGE₂'ye karşı afinitelerine, doku ve hücrel lokalizasyonlarına göre EP1, EP2, EP3 ve EP4 olmak üzere 4 farklı spesifik reseptör subtipi üzerinden etki göstermektedir (Rogers ve ark. 2014; Dennis ve Norris, 2015; O'callaghan ve Houston, 2015). Yang ve arkadaşları (Yang ve ark. 2009) tarafından yapılan çalışmada EP2 reseptörleri knockout farelerde hipokampal uzun-süreli sinaptik plastisite ve kognitif fonksiyonların bozulduğu gösterilmiştir. EP3'ün genetik delesyonunun, nöronları N-Metil-D Aspartik Asit (NMDA) aracılı toksisiteye karşı koruduğu ve PGE₂'nin COX aracılı nörotoksisiteye EP3 üzerinden katkı sağladığı düşünülmektedir. (Wang ve ark. 2015).

Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda farklı dozlarda maruz kaldığımız sülfitin hipokampus üzerindeki olası nörodejeneratif etkilerini, öğrenme ve uzaysal hafızanın değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan Morris su tankı testi ile değerlendirdik. Hafıza ve öğrenme süreçlerinde etkin rol oynadığı bilinen araşidonik asit yolağının hipokampusta sülfitin etkilerine aracılık edip etmediğini araştırmayı planladık. Bunun yanı sıra, sahip oldukları reseptör subtipleri nedeniyle hem nöroprotektif hem de nörotoksik etkileri olduğu bilinen PGE₂ düzeyinin ve reseptör subtiplerinin ekspresyon seviyelerinin, sülfitin neden olduğu nörotoksik etkilere aracılık edip etmediğini açığa çıkartmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

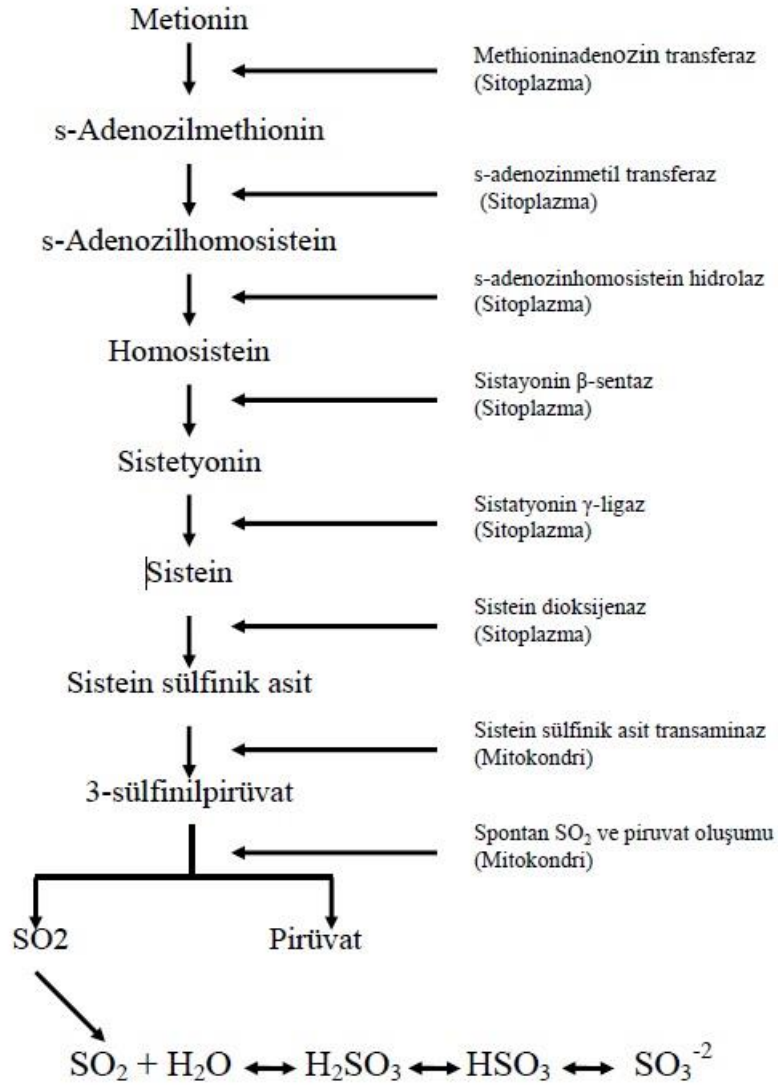
2.1. Sülfıt

Sülfıtlar, sülfıt iyonu (SO_3^{2-}) içeren bileşiklere verilen genel bir isimdir. Sülfıt dendiği zaman bu terim genel olarak sülfür dioksit (SO_2) gazı, bisülfıtları (hidrojen sülfıtın kalsiyum, potasyum ve sodyum tuzları), sülfıt iyonlarını ve disülfıtları (metabisülfıt) içermektedir. Bu bileşikler farklı pH koşullarında veya farklı besinlerle reaksiyona girme gibi çevresel koşullarda aynı türlere dönüşebilmektedirler ve bu durum kimyasal yapılarının birbirlerine benzediğini ortaya koymaktadır (Güneş, 2014a). İnsanlık tarihi boyunca dezenfeksiyon ve sanitasyon gibi farklı amaçlar için kullanılan sülfıtlar, 1664 yılında koruyucu gıda katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır (Güneş, 2014b). Koruyucu katkı maddesi olarak ilk kullanımları, şarap yapım süreçlerinde, elma şaraplarının depo edildiği fıçı ve kaplara ilave edilmeleriyle başlamıştır (Güneş, 2014b). Sülfıtlar, çeşitli gıdalarla, ilaçlarla, hava yoluyla vücuda alınabilir veya sistein ve metionin gibi sülfür içeren aminoasitlerin katabolizması sırasında endojen olarak da üretilebilirler (Cooper, 1983).

2.1.1. Sülfıtın Endojen Üretimi

Sülfıt metabolik olarak, sülfür içeren bileşiklerin ve yine sülfür içeren aminoasitlerin katabolik tepkimeleriyle oluşabilir (Gunnison ve ark. 1987; Reist ve ark. 1998b; Güneş, 2014a). Özellikle metionin ve sistein aminoasitlerinin katabolik tepkimeleri, endojen sülfıt üretimi için önemli bir kaynaktır (Gunnison ve ark. 1987). Metionin katabolizması sitoplazmik s-adenozin transferaz ile gerçekleşir (Gunnison ve ark. 1987). S-adenozin transferaz, metionini s-adenozin metionine dönüştürür ve sonrasında metil transferaz aracılığıyla s-adenozin homosistein oluşur (Gunnison ve ark. 1987; Blom ve ark. 1989). S-adenozin homosisteinden spesifik hidrolaz aracılığıyla homosistein oluşur (Şekil 2.1.). Oluşan homosistein, sistionin β -sentaz ile sistatyonine, sistatyonin ise sistatyonin γ -ligaz aracılığıyla sisteine dönüştürülür (Gunnison ve ark. 1987; Blom ve ark. 1989). Açığa çıkan sistein ise, sistein deoksijenaz ile tepkimeye girerek sülfınik asit meydana getirir (Gunnison ve ark. 1987). Sürecin geri kalanı mitokondride devam eder ve sistein sülfınik asit aspartat taşıyıcıları ile mitokondriye taşınır (Gunnison ve ark. 1987). Mitokondriye taşınan sistein sülfınik asit, transaminaz enzimiyle 2-ketoglutarat veya oksaloasetat ile transaminasyon reaksiyonu gerçekleştirir ve 3-sülfınil piruvat açığa çıkar (Gunnison

ve ark. 1987). Bu molekülün desülfantasyonu sonucu piruvat ile SO_2 oluşur, SO_2 'den 2 proton ayrılarak SO_3^{-2} meydana gelir (Gunnison ve ark. 1987).



Şekil 2.1. Vücutta endojen sülfite oluşumu

2.1.2. Sülfite Eksojen Alımı

Sülfite, gıdaların üretimi veya saklanması sürecinde, gıdaların tat ve kokularında değişiklik olmasının önlenmesi ve dayanıklılıklarını artırması amacıyla koruyucu katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Dalton-Bunnow, 1985). Örneğin, sülfite şarapta antimikrobiyal olarak, dondurulmuş turta ve pizza hamurlarında hamurun mevcut durumunun korunması amacıyla veya maraschino kirazlarındaki ağartma etkileri gibi özellikleri için kullanılabilir (Simon, 1998). Yapılan bir

çalışmada alkol tüketmeyen bireylerin sülfite alımının ortalama 20 mg/gün, alkol tüketenlerin ise 31.5 mg/gün olduğu belirlenmiştir (Güneş, 2014a).

Gıdalarda bulunan sülfite seviyelerinin, dondurulmuş hamurlar, mısır şurubu ve jölelerde 10 ppm'nin altında, taze karides, turşu ve taze mantarlarda 60 ppm dolaylarında olduğu, kurutulmuş patates, şarap sirkesi ve kiraz liköründe ise 100 ppm'ye kadar değişkenlik gösterdiği görülmektedir. (Simon, 1998). En yüksek sülfite seviyeleri ise (1000 ppm'ye kadar) limon, ıhlamur, üzüm, tuzlanmış lahana gibi kurutulmuş meyvelerde ve mağazadan satın alınan taze soslarda bulunmaktadır (Simon, 1998). Sülfite zararlı etkilerinin önlenmesi için Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration = FDA) tarafından, başta restoran yemeklerine olmak üzere bazı sınırlandırmalar getirilmiştir (Gunnison ve ark. 1987). Bununla birlikte, FDA ürünlerdeki sülfite miktarlarının 10 ppm'yi geçmesi durumunda, sülfite miktarının etiketlerde belirtilmesi gerektiğini vurgulamıştır (Güneş, 2014a). Bazı besinlerin içerdiği azami SO₂ miktarları Tablo 2.1.'de, yüksek sülfite içeriğine sahip bir lokanta öğününün SO₂ değerleri ise Tablo 2.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Genel Olarak Besinlerdeki Maksimum SO₂ Düzeyleri (Taylor ve ark. 1985)

Besin	Manier-Williams yolu ile tespit edilen maximum SO ₂ düzeyleri (ppm)
Tahıl ürünleri	200
Unlu gıdalar	30
Bira	25
Şarap	275
Çay	90
Baharat ve çeşniler	30
Sirke	75
Süt ürünleri	200
Kurutulmuş balık	200
Karides (donmuş veya taze)	100
Jelatin	40
Et suyu ve salça	75
Reçeller ve jeller	30
Kurutulmuş meyve	2000
Meyve suları	300 -1000 (konsantre)
Maraschino kirazı	150
Kurutulmuş sebze	200
Kurutulmuş patates	500
Donmuş patates	50
Sebze suyu	100
Melaslar	300

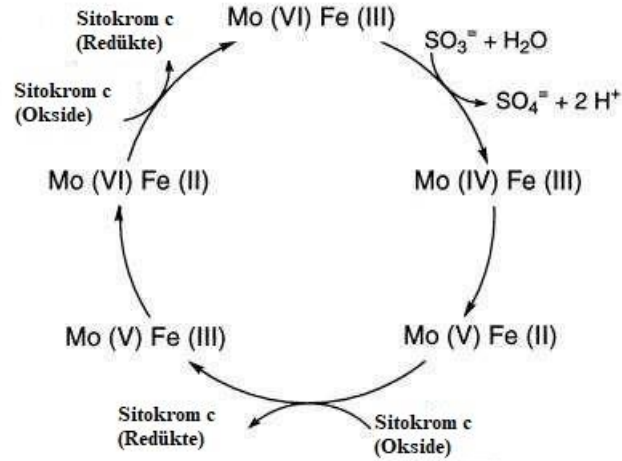
Tablo 2.2. Yüksek Sülfid İçeriğine Sahip Bir Lokanta Öğününün Sülfid İçeriği (Taylor ve ark. 1985)

Yemek	Servis Miktarı (g)	Total SO₂ (ppm)	Tüketildiği Zaman Total SO₂ (mg)
Sülfitlemiş yeşil salata	100	500	50
Kurutulmuş patates	150	75	11
Karides	50	40	2
Şarap	250	120	3
Total alım			93

Sülfid gıda sektörünün yanında ilaç sektöründe de sıklıkla kullanılan bir ajandır (Güneş, 2014a). Ayrıca, gıda ve ilaçlar ile kıyaslandığında çok daha az miktarda olsa da sülfid kirli havanın solunması ile de alınmakta olup metabolik etkiler gösterebilir (Gunnison ve ark. 1987).

2.1.3. Sülfid Metabolizması

Sülfid bileşikler pH koşullarına bağlı olarak farklı türevlerine dönüşebilmektedirler (Güneş, 2014a). Örneğin, vücuda girdikten sonra, pH değeri ortalama 2-3 olan mide gibi asidik ortamlarda, üretilen SO₂ miktarı artarken, pH değeri daha yüksek olan ortamlarda sülfid ve bisülfid oluşmaktadır (Gunnison ve ark. 1987). Oluşan bileşikler ise bu aşamadan sonra dokulara dağılmakta ve inorganik sülfata dönüştürülerek detoksifiye edilmekte ve bu detoksifikasyon süreci sülfid oksidaz (SOX) ile gerçekleştirilmektedir (Yang ve Purchase, 1985). Sülfid oksidaz enzimi mitokondride bulunmakta ve molibdenyum (Mo) kofaktör olarak kullanılmaktadır (Johnson ve ark. 1980).



Şekil 2.2. Sülfıt oksidazın sülfıti sülfata oksitlemesi.

Sülfıt oksidaz enzimi başta karaciğer ve böbrek olmak üzere kalp, dalak, beyin, iskelet kası gibi pek çok dokuda bulunmaktadır (Woo ve ark. 2003; Güneş, 2014a). İnsan karaciğerindeki sülfıt oksidaz aktivitesinin sıçan karaciğerinin sadece %10'u kadar olduğu bildirilmiştir (Johnson ve Rajagopalan, 1976b). Sülfıt oksidaz enzimi homodimer yapıda olup, Mo kofaktörü içeren bir C-terminali ve hem grubu içeren bir N-terminalinden oluşmaktadır (Morikawa ve ark. 1997). İki ayrı redoks merkezi olarak bilinen Mo ve hem grubu, SOX enziminin fonksiyonu açısından önemli role sahiptir. Oksidasyon esnasında SOX enziminin Mo merkezine bağlanan SO_3^{2-} , 2 elektron ile indirgenmekte ve bu indirgenme reaksiyonu sonunda Mo (VI)/Fe(III), Mo(IV)/Fe(III)'e dönüşmektedir. Söz konusu indirgenme reaksiyonu sonucunda sülfıt, idrarla atılan ve toksik olmayan SO_4^{2-} 'ye okside olmaktadır (Bailey ve ark. 2009). Sülfata çevrilme süreci çok hızlı gerçekleştiğinden, endojen sülfıtın dokularda ve kanda tespitinin imkansız olduğu kabul edilmektedir (Güneş, 2014a). İki elektron ile indirgenen Mo (IV)'deki elektronlardan biri intramoleküler elektron transferiyle redoks merkezine aktarılmakta ve Mo(V)/Fe(II) kompleksi açığa çıkmaktadır. Bu bileşikteki kararlı olmayan elektronların solunum zincirinde rol alan sitokrom c (sito-c)'yi indirgemesiyle Mo(V)/Fe(III), devamında ikinci intramoleküler elektron tranferi ile Mo(VI)/Fe(II) kompleksi oluşmaktadır. Mo(VI)/Fe(II) kararlı değildir ve sito-c tarafından indirgenerek Mo(VI)/Fe(III)'e dönüşmektedir. Böylece SOX enziminin yapısında bulunan redoks merkezlerinin katalitik aktifliği yeniden kazanılmış olmaktadır (Şekil 2.2.) (Bailey ve ark. 2009). Bu süreçte oksidasyona uğrayan bir mol sülfıt için 1 mol adenosin trifosfat (ATP) üretilmesi sağlanmaktadır. Sülfıtın, SOX ile metabolizmasının hızlı olduğu ve bu nedenle, kronik

maruziyetlerde serumda 15 µM konsantrasyona kadar sülfite gözlemlenebilirken, tamamen metabolize edildiği için dokularda birikmediği rapor edilmiştir (Pundir ve Rawal, 2013). Sülfite oksidaz yokluğunda sülfite, sistein katabolik reaksiyonlarının merkezi olan karaciğerde birikir (Stipanuk ve ark. 2006).

2.1.4. Sülfite Toksisitesi

Özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılan sülfite türevlerine maruz kalmanın, hassas bireylerde dermatit, ürtiker, kızarma, hipotansiyon, rinokonjonktivit, karın ağrısı ve ishal yanı sıra hayatı tehdit eden anafilaktik reaksiyon ve astım gibi çeşitli olumsuz klinik etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Simon, 1986; Oliphant ve ark. 2012). Özellikle astım hastalarının, sağlıklı bireylere göre sülfite negatif etkilerine karşı daha duyarlı olduğu ve bu hassasiyetin ağırlıklı olarak kadınlarda görüldüğü ileri sürülmüştür (Lester, 1995). Sülfite maruziyetine yanıt oluşması için gereken miktarların da değişkenlik gösterdiği görülmektedir; 1 ile 5 mg potasyum metabisülfite'in sindirilmesi, sülfite duyarlı bir kişide reaksiyona neden olabilirken, duyarlı bireylerin çoğunun 20 mg ile 50 mg arasında değişen değerlerde tepki oluşturduğu belirlenmiştir (Lester, 1995). Sülfite duyarlılığıyla ilgili farklı görüşler olmasına karşın en kabul gören teori, reaksiyonların sülfite içeren yiyeceklerin veya içeceklerin tüketilmesiyle midede üretilen SO₂ gazının solunması sonucu meydana gelmesidir (Lester, 1995). Sülfitler çözeltiye konduğunda SO₂ üretilmekte ve bu üretim yüksek sıcaklıkta ve düşük pH'da artmaktadır (Lester, 1995). Ağız ve midenin ılık, asidik ortamı ise SO₂ üretimi için primer koşullardır (Lester, 1995). Dolayısıyla astımlıların, özellikle steroide bağımlı astımlıların, hiperreaktif hava yollarıyla, bu duruma diğer bireylerden daha duyarlı oldukları öne sürülmüştür (Lester, 1995). Sülfite alerjik duyarlılığının yanı sıra, Meisel ve Welford'un (Meisel ve Welford, 1992) yaptığı bir çalışmada, hastalara koruyucu olarak sodyum bisülfite içeren yüksek doz intravenöz morfin verilmesinin, miyoklonik ve tonik-klonik nöbetlerin gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir.

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda ise SO₂ ve türevlerinin mikro çekirdek oluşumu, kardeş kromatid değiş tokuşu ve lenfosit kromozomlarında aberasyonlara neden olduğu belirlenmiştir (Rencüzoğulları ve ark. 2001). Farelerle yapılan bir çalışmada sülfite toksisitesinin böbrek, beyin, dalak, akciğer, kalp ve kemik iliği gibi birçok doku ve organda deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına neden olduğu belirlenmiştir (Meng ve ark. 2002; Meng ve ark. 2003; Meng ve ark. 2005) Sülfite,

ribonükleik asitte (RNA) urasil ile, DNA'da ise sitozin ile reaksiyona girerek DNA ve RNA zincir yapılarına zarar verebilmekte ve sülfür içeren proteinlerdeki disülfid bağlarını yıkarak protein yapılarının bozulmasına neden olmaktadır (Meng ve ark. 2005).

Sülfid nörolojik olarak da toksik etkilere sahip bir moleküldür. Kalıtsal olarak sülfid oksidaz enzim eksikliği olan hastalarla yapılan çalışmalar göstermiştir ki tiyosülfat ($S_2O_3^{2-}$) maruziyeti, şiddetli zekâ geriliği (Irreverre ve ark. 1967), nöbetler (Rupar ve ark. 1996), spastik kuadriparezi (Brown ve ark. 1989), çıkık lensler ve erken ölüm (Shih ve ark. 1977) gibi ciddi nörolojik disfonksiyonlara neden olabilmektedir (Johnson ve Rajagopalan, 1976a; Reist ve ark. 1998b). Özellikle erken çocukluk dönemlerinde hızla ilerleyen nörodejenerasyona ve sonunda ölüme neden olabilmektedir (Tan ve ark. 2005). Enzim eksikliği durumlarında idrarla atılan tiyosülfat, sistein-S-sülfonat ve sülfid miktarı artmaktadır (Güneş, 2014a). Doğuştan var olan bu eksikliğin apoenzim ya da molibden kofaktör metabolizma yetersizliğiyle ilgili olduğu düşünülmektedir (Güneş, 2014a). 2004 yılında sıçanlarda yapılan bir çalışmada, SO_2 ve metabisülfid'in, CA1 nöronları ve dorsal kök gangliyonları üzerindeki sodyum ve potasyum akımlarını değiştirdiği gözlemlenmiştir (Du ve Meng, 2004). Küçükataay ve ark. (Küçükataay ve ark. 2005) tarafından yapılan ve sıçanlarda SOX eksikliğine bağlı aktif kaçınma davranışlarında bozulma olup olmadığını gözlemleyen çalışmada, SOX eksikliği olan sıçanlarda aktif kaçınma yanıtları üzerine sülfidin belirgin bir zararlı etkisinin olduğunu ancak normal sıçanlarda olumsuz bir etkiye neden olmadığını göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, sıçanlarda sülfid maruziyetine bağlı olarak hem görsel hem de somatosensoriyel uyarılmış potansiyellerinde dalga formlarının latanslarının arttığı rapor edilmiştir (Ağar ve ark. 2000; Küçükataay ve ark. 2003; Kencebay ve ark. 2013). Diğer bir çalışmada ise wistar sıçanlarına sülfid uygulanmasına bağlı olarak hipokampusun CA1, CA2, CA3 bölgelerinde piramidal hücre kayıpları gözlemlendiği rapor edilmiştir (Akdogan ve ark. 2011). Baud ve ark. (Baud ve ark. 2001) ise deksametazon preperasyonlarındaki sülfid mevcudiyetinin, eksitotoksik ajanların nörotoksik etkilerini ve nöronal ölümleri arttırdığını tespit etmişlerdir.

Sülfür içeren aminoasitlerin metabolizması, beyin de dahil olmak üzere çoğu dokuda meydana gelmekte ve bozulmuş bir endojen sülfür aminoasit metabolizması bazı

nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir (Heafield ve ark. 1990). Nöronlardaki sülfid toksisitesinin mekanizması hakkında çok az bilgi bulunmasına karşın, sülfidin zararlı etkilerinin sülfür trioksit (SO_3) ve SO_2 gibi sülfür ve oksijen merkezli serbest radikallerin etkisi ile olabileceği düşünülmektedir (Shi, 1994; Reist ve ark. 1998).

Sülfidin bu etkilerine ilişkin yapılan moleküler düzeydeki çalışmalarda ise sülfid radikallerinin nükleik asitlerle reaksiyona girdiği, DNA'da zincir kırıklarına ve baz parçalanmalarına neden olduğu, proteinlerle çapraz bağ yaparak DNA delesyonlarına ve mutasyonlara, böylelikle hücrel disfonksiyonlara veya hücre ölümlerine sebep olduğu gösterilmiştir. Dahası sülfid radikalleri proteinlerle ve lipidlerle de reaksiyona girebilmektedirler (Cecil, 1963).

2.1.5. Sülfid Radikallerinin Oluşumu

Organizmada SO_3^{2-} konsantrasyonu arttığında ve SOX enzim aktivitesinde düşüş olduğunda, peroksidazlar devreye girerek SO_3^{2-} oksidasyonunu katalizlemektedir. Peroksidaz katalizasyonuna bağlı oksidasyon reaksiyonları sonucu, sülfür trioksit anyon (SO_3^-) adı verilen sülfür merkezli bir radikal meydana gelmektedir (Mottley ve Mason, 1988).

Sülfür trioksit oluşum tepkimelerinden sonraki zincir tepkimeler otokatalitik bir şekilde iki basamakta gerçekleşmektedir;

- 1- Sülfür trioksit anyonu oksijenle tepkir ve süperoksit radikali (O_2^-) veya peroksimonosülfat anyon radikali ($^-\text{O}_3\text{SOO}$) meydana gelir (Mottley ve Mason, 1988).
- 2- Oluşan $^-\text{O}_3\text{SOO}$ ile SO_3^{2-} tepkimeye girerek sülfat radikali (SO_4^-) oluşmaktadır (Mottley ve Mason, 1988).

Aynı zamanda sülfat, sülfidi okside ederek SO_3^- oluşmasına neden olmaktadır (Mottley ve Mason, 1988). Bunun dışında, sülfidin iki önemli reaksiyonu daha bulunmaktadır (Mottley ve Mason, 1988). Bunlardan ilki peroksil reaksiyonudur ve sonucunda sülfid trioksit (SO_3) ve hidroksil iyonu açığa çıkmaktadır (Mottley ve Mason, 1988). Benzer şekilde sülfat ve suyun tepkimesi sonucunda da hidroksil iyonu oluşmaktadır (Mottley ve Mason, 1988).

Vücudumuzda oksidatif hasarın ortadan kaldırılması için vitaminler (E, A, C), mitokondriyal SOX, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz (GSSG-R), glutatyon-S-transferaz (GST), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan ajanlar görev almaktadır (Pinnell, 2003). Sülfite maruziyeti sonucu, bu antioksidan kapasitenin azaldığı ve oksidatif hasarın arttığı rapor edilmiştir (Derin ve ark. 2006). Kencebay ve ark. (Kencebay ve ark. 2013) tarafından yapılan bir çalışmada sülfite uygulanmasıyla toksisiteye maruz bırakılan sıçanların beyin dokularında, tiobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS), kaspaz-3 ve TUNEL pozitif hücre sayısını arttırdığı ve bu şekilde meydana gelen nörodejenerasyonda sekretuar PLA2 artışı ile aktive olan AA yolağının etkili olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, 2017 yılında yapılan bir çalışmada ise sıçanlara 260 mg/kg/gün dozunda sülfite uygulanmasının, COX-2 ekspresyonunu arttırdığı bulunmuş olup, bu etki sülfite toksisitesine bağlı nörodejenerasyon ile ilişkilendirilmiştir (Derin ve ark. 2017). Aynı zamanda başka bir çalışmada da sülfitin lokomotor aktiviteyi arttırdığı ve cPLA2'nin, uygulanan sülfite bağlı olarak oksidatif stres ve hipokampusta apoptotik hücre ölümlerine yol açtığı gösterilmiştir (Basaranlar ve ark. 2019).

2.2. Araşidonik Asit ve Prostaglandin Yolağı

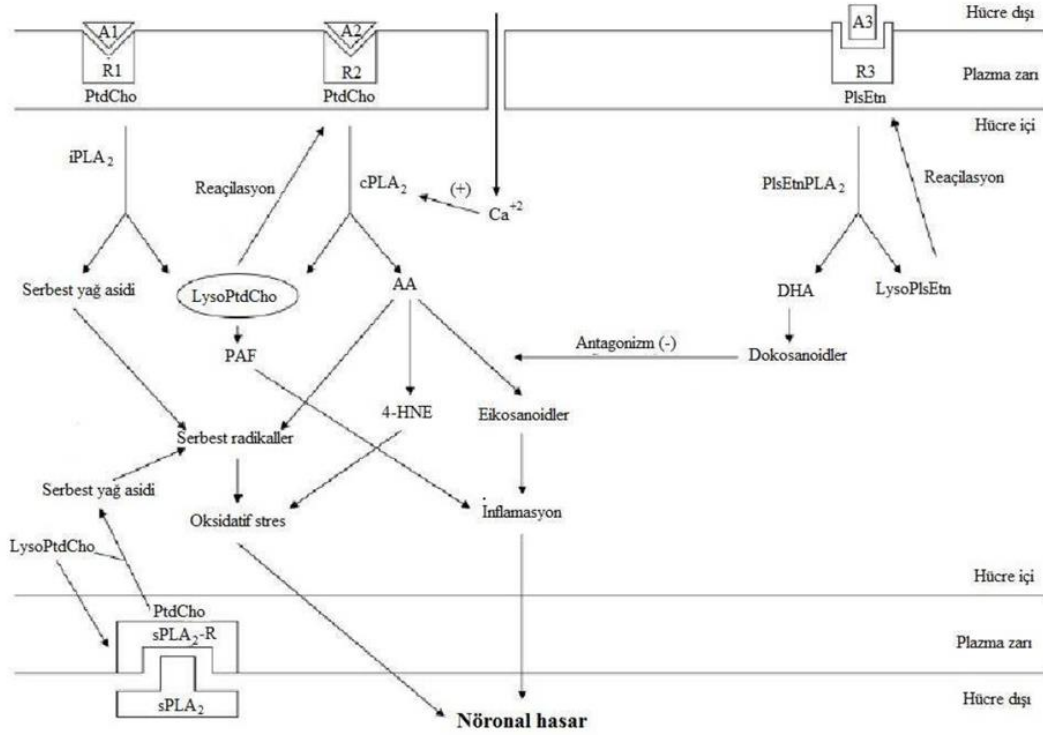
Bergström ve meslektaşları (Bergström ve ark. 1964), 1950 ve 60'lı yıllarda, ilk prostaglandin izomerlerini bulmuşlardır. Daha sonra ise Van Dorp ve Bergström (Van Dorp ve ark. 1964), birbirinden bağımsız olarak 1964 yılında, prostaglandinlerin öncüsü olan 20 karbonlu tetraenoik yağ asidi (C₂₀:4ω₆) olan arşidonik asidi tanımlamışlardır. Araşidonik asit terimi, yirmi karbon zincirli bir omega-6 çoklu doymamış yağ asidi (polyunsaturated fatty acid=PUFA) olan eikosatetraenoik aside karşılık gelmektedir (Sonnweber ve ark. 2018). PUFA'lar, insan hücre zarlarının fosfolipitlerinde ve bağışıklık hücrelerindeki lipid damlacıklarında bol miktarda bulunmaktadır (Sonnweber ve ark. 2018). Araşidonik asit ve türevlerinin yanı sıra çeşitli omega-3 PUFA'lar da eikosanoidler olarak adlandırılmaktadır (Sonnweber ve ark. 2018). En yüksek AA konsantrasyonları beyin, kas, karaciğer, dalak ve retinada bulunurken, dolaşımdaki serbest AA konsantrasyonları tipik olarak albümine bağlı olması nedeniyle düşüktür (Sonnweber ve ark. 2018). Fosfolipaz A2, bir esteraz olup, membran gliserofosfolipidlerindeki gliserolün sn-2 pozisyonundaki açıl ester bağına yıkararak, lizofosfolipid ve arşidonik asit gibi serbest yağ asitlerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır (Moreira ve ark.

2019). Beyin PLA2 aktivitesi 1970'lerde birkaç araştırmacı tarafından tanımlanıp karakterize edilmiştir (Gullis ve Rowe, 1973), ancak bu aktivitelerin spesifik PLA2 gruplarına atfedilmesi 1990'lara kadar başlamamıştır (Balboa ve ark. 2002). Fosfolipaz A2, nörogelişimsel süreçlerde ve sinir sistemi gelişiminin erken evrelerinde rol oynamaktadır (Forlenza ve ark. 2007). Fosfolipaz A2 aktivitesinin aşırı uyarılması, serbest yağ asitleri, eikosanoidler ve lipit peroksidlerin üretilmesine ve birikmesine neden olabilmektedir (Farooqui ve ark. 2000). Bu süreç, iskemi, omurilik travması ve kafa travması gibi nörolojik durumlarda nöronal hasar ve nörodejenerasyon ile sonuçlanmaktadır (Farooqui ve ark. 2000). Buna karşılık, lizofosfolipitlerin asil-CoA: lizofosfolipid asiltransferaz ile yeniden reaksiyonu, nöral hücre membranının restorasyonu ve dolayısıyla nöronun korunması ve hayatta kalması ile sonuçlanmaktadır (Farooqui ve ark. 2000). Fosfolipaz A2 yapısı, işlevi, hücreyel yerleşimi ve enzimatik özellikleri gibi farklılıklarına göre 15 farklı alt grupta sınıflandırılmıştır (Burke ve Dennis, 2009). Bunlardan en yaygın olanları; sPLA2, cPLA2, Ca^{+2} -bağımsız fosfolipaz A2 (iPLA2), plazmalojen-selektif fosfolipaz A2 (Pls-Etn PLA2) olarak bilinen fosfolipaz A2 türleridir (Heinrikson ve ark. 1977; Kudo ve ark. 1993; Dennis, 1994; Murakami ve ark. 2017).

2.2.1. Fosfolipaz A2 Enziminin Subtipleri

Sekretuar PLA2

Sekretuar PLA2 keşfedilen ilk PLA2 tipi olarak bilinmektedir (Burke ve Dennis, 2009). Bu enzim memelilerde, beynin tüm bölgelerinde bulunabilmekle birlikte, aktiviteleri bölgeden bölgeye değişebilmektedir. Olfaktör bulbus ve serebellumda, diğer beyin bölgelerine (cerebrum, medulla oblongata, pons, talamus, hipokampus, ve hipotalamus) göre daha düşük bir aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (Thwin ve ark. 2003).



Şekil 2.3. Fosfolipaz A2 mekanizması. Sekretuar fosfolipaz A2 (sPLA2), sitozolik fosfolipaz A2 (cPLA2), Ca^{+2} -bağımsız fosfolipaz A2 (iPLA2) ve plazmalojen selektif fosfolipaz A2 (Pls-EtnPLA2), A1, A2, A3 farklı agonistler; R1, R2, R3 farklı reseptörler; sPLA2-R, sekretuar PLA2 reseptörü; PtdCho, fosfatidilkolin; PlsEtn, etanolamin plazmalojen; Lyso-PtdCho, lizofosfatidilkolin; AA, arasidonik asit; DHA, dokoheksaenoik asit; PAF, platelet aktive edici faktör; 4-HNE; 4-hidroksi-2-nonenal

Hücre içi kalsiyumun yükselmesi, hücreleri PLA2'ye duyarlı halde getirebilmektedir (Smith ve ark. 2001). Dolayısıyla Ca^{+2} yükselmesi sPLA2 aktivitesini indükleyerek apoptozise neden olmaktadır (Kim ve ark. 1995) (Şekil 2.3.). Beyinde glutamat seviyesinin artmasıyla birlikte voltaj duyarlı Ca^{+2} kanalları açılmakta ve hücre içi artan Ca^{+2} konsantrasyonuna bağlı olarak sPLA2 aktivitesinde artış meydana gelmektedir. Sekretuar fosfolipaz A2'nin kendisi de glutamat bağımlı sinaptik aktiviteyi regüle ederek glutamat artışına bağlı toksisitede görev almaktadır (DeCoster ve ark. 2002). Sekretuar PLA2, ekstraselüler matrikse salındıktan sonra presinaptik membrana bağlanarak, sinaptik veziküllerin geri alınımı sırasında vezikül lümenine girerek, sinaptik vezikülün içindeki gliserofosfolipidleri hidroliz eder ve böylelikle vezikül yapısını bozarak sinaptik transmisyonunda görev alan veziküllerin reagregasyonunu engellemiş olur (Wei ve ark. 2003).

Sitozolik Fosfolipaz A2

Bu enzim hücre içindeki Ca^{+2} miktarının artmasına bağlı olarak aktive olmaktadır (Hirabayashi ve ark. 2004). Sitozolik PLA2 97 kDa'lık bir protein olup (Sun ve ark.

2014), mRNA ekspresyonları insanda ağırlıklı olarak kalp, dalak, akciğer ve böbrekte bulunmasıyla birlikte hipokampus ve eozinofillerde de bulunmakta, aynı zamanda sıçanların beyin, karaciğer ve testislerinde de var olduğu bilinmektedir (Clark ve ark. 1995). Sitozolik PLA2'nin önemli bir özelliği de, protein kinazların aktivasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile ilişkili sinyal yollarını uyaran hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasıdır (Sun ve ark. 2014). Merkezi sinir sisteminde (MSS), cPLA2 aktivasyonu, bir dizi nörodejeneratif hastalığın patogenezinin altyapısını oluşturduğu düşünülen nöronal uyarılma, sinaptik sekresyon, apoptozis, hücre-hücre etkileşimi, bilişsel ve davranışsal işlev, oksidatif-nitrozatif stres ve inflamatuvar yanıt gibi mekanizmalarda rol oynamaktadır (Sun ve ark. 2014).

Ca⁺² Bağımsız Fosfolipaz A2

Ca⁺²-bağımsız fosfolipaz A2 her yerde eksprese edilebilmekte ve diğer PLA2'lerin aksine, translokasyon veya aktivitesi için Ca⁺² gerekmemektedir (Ramanadham ve ark. 2015). Ca⁺² bağımsız fosfolipaz A2'ler, 1980'lerde, 40 kDa'lık bir ağırlıkla, köpek miyokard sitozolünde, daha sonra da insülinoma hücrelerinde, renal proksimal tübüllerde ve makrofaj hücrelerinde tanımlanmıştır (Ramanadham ve ark. 2015). Ca⁺²-bağımsız fosfolipaz A2'ler tüm beyin bölgelerinde bulunmasına karşın en yüksek aktivitesini hipotalamus, striatum ve hipokampus bölgelerinde göstermektedir (Molloy ve ark. 1998).

Plazmalojen- Selektif Fosfolipaz A2

Plazmalojen- selektif PLA2 enzimi ilk olarak sığır ve domuz beyni sitozolünden elde edilerek tanımlanmış olup, 39 kDa'lık molekül ağırlığa sahiptir (Ong ve ark. 2010). Plazmalojenden dokosaheksaenoik asitin (DHA) salınım hızı, araşidonik asitten 3-5 kat daha hızlıdır (Ong ve ark. 2010). Plazmalojen-selektif PLA2'nin, DHA üretiminde rol oynayan ana PLA2 izoformu olduğu düşünülmektedir (Ong ve ark. 2010). Dokosaheksaenoik asit daha sonra 15-lipoksijenaz ile dokosanoidlere (resolvinler ve nöroprotektinler) metabolize edilir ve bu metabolitler anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, anti-aritmik ve vazodilatör özelliklere sahiptir (Ong ve ark. 2010). Plazmalojen-selektif PLA2, esas olarak glial hücrelerde lokalize olmasına karşın bazı immunoreaktif durumlarda nöronlarda da bulunmaktadır (Ong ve ark. 2010). Bununla birlikte, iskemi ve Alzheimer hastalığı gibi patolojik koşullar altında,

bu enzimin artan aktivitesinin nörodejenerasyonda rol oynayabileceği düşünülmektedir (Ong ve ark. 2010).

Van Dorp ve Bergström'un araşidonik asidi tanımlamasından sonra, Samuelsson ve arkadaşları (Samuelsson ve Ark.,2007) tarafından AA'nın enzimatik olarak siklize edildiği ve endoperoksit içeren prostaglandin G2 (PGG₂) verecek şekilde oksijenlendiği siklooksijenaz reaksiyonu tanımlanmıştır. Diğer bir yolak ise 5-Lipoksijenaz enzimi, araşidonik asidi hidroperoksieikosatetraenoik aside (5-HPETE) ve daha sonra hidroksieikosatetraenoik aside (5-HETE) metabolize eder ve bu reaksiyonların sonucunda lökotrienler oluşur (Powell ve Rokach, 2015). Araşidonik asit, epoksijenazlar ile epoksieikosatrienoik asitlere (EET) dönüştürülebilmektedir (Cantley 2012). Bu derivatiflerin üretilmesine ve vücuttaki hareketlerine genel olarak "araşidonik asit kaskadı" denmektedir.

2.2.2. Siklooksijenaz-1 ve Siklooksijenaz-2

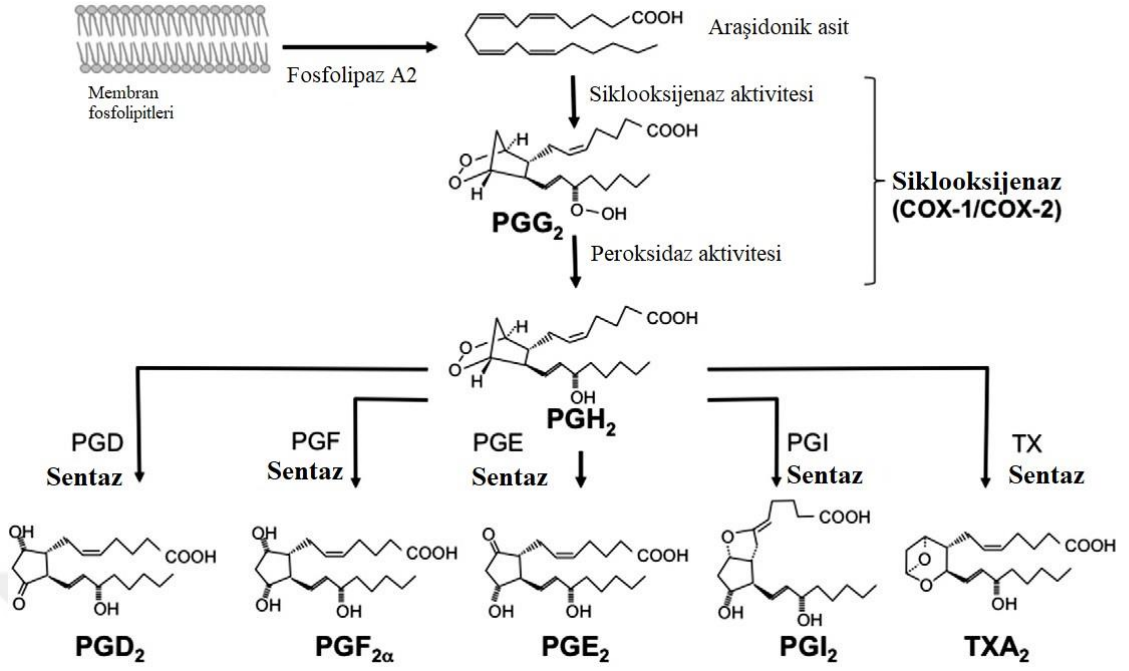
Prostaglandin H sentaz (PGHS) veya prostaglandin endoperoksit sentaz olarak da bilinen COX enzimi, AA'nın PGG₂ ve PGH₂'ye oksidatif dönüşümünde ana enzim olarak tanımlanmıştır (Simmons ve ark. 2004). 67 kDa'lık ağırlığa sahip PGHS enziminin saflaştırılması önce koyun ve sığır seminal veziküllerinden sağlanmıştır (Simmons ve ark. 2004). Dolayısıyla sığırların ve koyunların seminal vezikülleri, uzunca bir süre enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (Simmons ve ark. 2004).

Farklı gen ürünleri ile kodlanan iki farklı COX izoenzimi tanımlanmıştır: Konstitütif enzim COX-1 ve indüklenabilir enzim COX-2 (Hla ve ark. 1999). COX-1 genellikle hücre pasif durumdayken işlev görürken, COX-2, hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve makaslama stresi (shear stress) gibi çeşitli uyarıların etkisiyle indüklenmektedir (Hla ve ark. 1999). COX-1 ve COX-2 genleri karşılaştırıldığında, bunların oldukça benzer oldukları ve bir istisna dışında aynı intron-ekson yerleşimine sahip oldukları görülmüştür (Simmons, 2003). Bu istisna, COX-1 genlerinin, gendeki ilk intronu oluşturan ekstra bir intron bölgesi içermesidir (Simmons, 2003). COX-2 genlerinde ilk ekson proteini, N-terminal hidrofobik sinyal peptidini kodlarken, COX-1 geninde hidrofobik sinyal peptidini, genin intron-1 (ekstra intron) bölgesi ile birbirinden ayrılan iki ekson bölgesi kodlamaktadır (Simmons, 2003).

Hücrede temel fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesinden sorumlu olan COX-1'in prostanoit üretimi için temel referans olduğu bilinmektedir (Smith, 1992; Smith ve

Langenbach, 2001; Hao ve Breyer, 2007). Hücreler dinlenim halindeyken COX-1 eksprese olurken, patofizyolojik uyaranların bulunduğu koşullarda COX-2 indüklenmektedir (Hla ve ark. 1999). Ancak bazı durumlarda, COX-1'in de patolojik koşullarda indüklenbildiği rapor edilmiştir (Crofford ve ark. 1994; Sano ve ark. 1995; Hwang ve ark. 1998). Ayrıca, bazı çalışmalarda nörodejenerasyona bağlı olarak hipokampal COX-2 ekspresyonunda artış olduğu da gösterilmiştir (Manev ve ark. 2000). Serebral korteks, hipokampus ve striatumda yüksek miktarda eksprese edilen COX-2'nin stres ve inflamasyonda kritik rol oynadığı belirlenmiştir (Feldman ve McMahon, 2000; Rocha ve ark. 2003; Andreasson, 2010; Bortolanza ve ark. 2015; Blaker ve Yamamoto, 2018). COX-2, travmatik beyin hasarı, serebral iskemi, glutamat eksitotoksitesi, Alzheimer ve ALS gibi hastalıklarda önemli görevler üstlenmektedir (McGeer ve McGeer, 2004; Minghetti, 2004; Cimino ve ark. 2008; Liang ve ark. 2008; Andreasson, 2010).

COX proteini AA'nın PGG₂'ye dönüştürüldüğü bir siklooksijenaz bölgesi ve PGG₂'nin PGH₂'ye indirgenmesinden sorumlu bir peroksidaz bölgesi olmak üzere iki aktif bölge içerir: (Smith ve ark. 2000; Smith ve Murphy, 2002). Siklooksijenazlar tarafından oluşturulan PGG₂, peroksidaz aktivitesi ile PGH₂'ye dönüştürülmektedir. Açığa çıkan PGH₂, prostaglandin sentazlar tarafından PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ ve TxA₂ gibi biyomoleküllere dönüştürülmektedir (Hla ve ark. 1999; Park ve ark. 2006). Prostaglandinler, siklopentan halkası ve iki karbon zincirinden oluşan ve siklopentan halkasının yapısına göre A'dan J'ye sınıflandırılan temel prostanoik asit yapısına sahip moleküllerdir (Şekil 2.4.) (Kawahara ve ark. 2015).



Şekil 2.4. Siklooksijenaz yolu ve prostanoidler (Kawahara ve ark. 2015)

2.2.3. Prostaglandin E2

PGE₂, vücutta en yaygın üretilen prostaglandin olup (Serhan ve Levy, 2003), reproduktif, nöronal, metabolik ve immün fonksiyonlarda görevler üstlenmektedir (Harris ve ark. 2002; Legler ve ark. 2010). Dolaşım sisteminde PGE₂'nin yarı ömrü yaklaşık 30 saniyedir ve normal plazma düzeyi 3-12 pg/ml'dir (Dray ve ark. 1975; Fitzpatrick ve ark. 1980; Kimball ve ark. 1980). PGE₂ hem proinflatuar hem de antiinflatuar etkileri nedeniyle çeşitli nöronal dokularda oldukça önem teşkil etmektedir (Takadera ve ark. 2004; Kang ve ark. 2009). İlk olarak 1970'te yapılan ve 1977'de Amerika Birleşik Devletleri'nde tıbbi kullanım için onaylanan (Beard Jr, 2001) PGE₂'nin kusma, ateş, ishal ve aşırı uterus kasılması gibi yaygın yan etkileri de gözlenebilmektedir (Simmons ve ark. 2004). Aynı zamanda, PGE₂, vazodilatasyon, nosisepsiyon, artmış damar geçirgenliği gibi durumlarla temsil edilen proinflatuar süreçlere dahil olan birincil lipid mediatörüdür (Moreira ve ark. 2019). Aynı zamanda bu inflamatuvar mediatörlere dönüşümün sonucunda, hücrede membran polarizasyonu, membran viskozitesinin değişimi, protein kinaz-C (PKC) aktivasyonu, Ca⁺² salınımının tetiklenmesi, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi ve gen transkripsiyonu gibi hücresel süreçlerle nöronal fonksiyonları modüle etmektedir (Molloy ve ark. 1998).

PGE₂, reseptörüne bağlandığında G-proteini üzerinden etki göstermekte olup, PGE₂ reseptörleri fonksiyonlarına, PGE₂'ye olan afinitelerine, doku ve hücrel lokalizasyonlarına göre EP1, EP2, EP3 ve EP4 olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (Sugimoto ve Narumiya, 2007; Rogers ve ark. 2014; Dennis ve Norris, 2015; O'callaghan ve Houston, 2015).

2.2.4. PGE2 Reseptör Subtipleri

EP1

EP1 insan vücudunda miyometriyum, pulmoner damarlar, kolon, deri ve mast hücrelerinde, beyinde korteks, hipokampus ve serebellar Purkinje hücrelerinde eksprese edilmektedir (Andreasson, 2010; Markovič ve ark. 2017).

EP1 reseptörü, Gq proteinine bağlanarak etki gösteren bir 'kontraktil' reseptör grubu üyesidir (Markovič ve ark. 2017). PGE₂'nin EP1 reseptörüne bağlanması, PKC'nin aktivasyonuna aracılık eden fosfolipaz C'yi (PLC) aktive eder, bu da artan fosfatidilinositol hidrolizine ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun yükselmesine neden olur (Tablo 2.3.) (Markovič ve ark. 2017; Moreno, 2017).

Merkezi sinir sisteminde EP1 rolüyle ilgili olarak, PGE₂'nin fizyolojik konsantrasyonlarda kortikal ve hipokampal primer nöronal kültürlerle uygulanmasının, nöronları NMDA veya glutamat toksisitesinden koruduğu ileri sürülmektedir (Andreasson, 2010). Ancak, COX-2 inhibitörünün varlığında, eksitotoksisite kaynaklı nöronal ölüm, EP1 reseptör agonisti uygulanarak da ortaya çıkarılabilmektedir (Andreasson, 2010). T-labirent spontan değişimi ve yeni nesne tanıma testleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, Huntington hastalığına bağlı olarak ortaya çıkan uzun süreli bellek ve motor koordinasyon bozulmalarının, EP1 reseptör antagonizmiyle düzeltilebileceği de ileri sürülmüştür (Anglada-Huguet ve ark. 2014).

EP1 aynı zamanda ACTH sekresyonu ve stres davranışı benzeri stres tepkilerine aracılık eder, kimyasal karsinogenezi teşvik eder ve inflamatuvar termal hiperaljeziye yol açar (Mutoh ve ark. 2002; Matsuoka ve ark. 2003; Matsuoka ve ark. 2005; Moriyama ve ark. 2005). EP1 reseptörünün aktivasyonu nörotoksik süreçlere katkıda bulunurken, antagonistler kullanılarak inhibe edilmesi hasar oluşumunu önlemektedir (Ahmad ve ark. 2006).

EP2

EP2, EP reseptörleri arasında en az bulunanıdır (Sugimoto ve Narumiya, 2007). İnsan vücudunda lökositler, düz kas, MSS’de serebral korteks, hipokampus ve ön beyin yapılarının yanı sıra talamus, hipotalamus, beyin sapı ve omurilikte, ayrıca üreme sistemi ve kemiklerde de bulunmaktadır (Liu ve ark. 2005; Andreasson, 2010; Markovič ve ark. 2017).

Nöroprotektif etki gösteren EP2 reseptörleri Gs proteine bağlı olarak hücrel cevap oluşturmaktadır (Tablo 2.3.). PGE₂’nin bu reseptörlere bağlanmasıyla aktive olan Gs, adenilat siklaz (AC) enzimini aktive etmekte ve hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) konsantrasyonu artmaktadır (Sugimoto ve Narumiya, 2007) (Tablo 2.3.).

EP2’nin aktivasyonu, yumurtlamayı ve döllenmeyi kolaylaştırma, farelerde bağırsak polip oluşumuna aracılık etme, glisinerjik inhibisyonu ortadan kaldırarak ağrı iletimini kolaylaştırma, kollajen kaynaklı artritte eklem iltihabına aracılık etme, dendritik hücre farklılaşmasını baskılama, G-CSF üretimi ile nötrofil alımını kolaylaştırma, Alzheimer hastalığında amiloid- β oluşumunu teşvik etme ve son olarak da COX-2 ile indüklenen meme hiperplazisine aracılık etme gibi süreçlere katkı sağlamaktadır (Hizaki ve ark. 1999; Sonoshita ve ark. 2001; Yang ve ark. 2003; Chang ve ark. 2005; Liang ve ark. 2005; Reinold ve ark. 2005; Sugimoto ve ark. 2005; Honda ve ark. 2006).

EP2 reseptörünün sinir sistemindeki fonksiyonlarını incelemek için yapılan bir çalışmada omurilikte, glisinerjik nöronlarda EP2 üzerinde etkili olan PGE₂, dorsal boynuzda glisin kaynaklı tonik ağrı nöronunun inhibisyonunu ortadan kaldırır ve noziseptif sinyallerin omurilikten MSS’nin daha yüksek bölgelerine yayılmasını kolaylaştırır (Reinold ve ark. 2005). Ayrıca, EP2 aktivasyonunun, hipokampusta oluşturulan NMDA toksisitesine karşı nöroprotektif etkilere sebep olduğu ve EP2’nin genetik olarak silindiği, kalıcı orta serebral arter oklüzyon modelinde, inme hacminde belirgin bir artış saptandığı ileri sürülmüştür (Liu ve ark. 2005). Uzun süreli bellek ve motor fonksiyon bozukluklarına neden olan Huntington hastalığı modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada ise EP2 agonisti uygulanmasının, nöronlarda beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) etkisiyle oluşan dendritik dallanmayı arttırdığı ve T-labirent spontan değişim testi ve yeni nesne tanıma testi ile analiz edildiğinde uzun süreli bellek eksikliklerini iyileştirdiği gözlemlenmiştir

(Anglada-Huguet ve ark. 2016). Yang ve ark. (Yang ve ark. 2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada da EP2 knockout farelerde hipokampal uzun-süreli sinaptik plastisite ve kognitif fonksiyonların bozulduğu gösterilmiştir (Chen ve ark. 2002; Yang ve ark. 2009; Shi ve ark. 2010).

EP3

EP3 mRNA ekspresyonu farelerin neredeyse tüm dokularında görülmektedir (Sugimoto ve Narumiya, 2007). İnsan vücudunda ise MSS, kardiyovasküler sistem, üreme sistemi, böbrek ve idrar kesesinde bulunmaktadır (Markovič ve ark. 2017). EP3 reseptörü ön beyin yapılarında sınırlı ekspresyon gösterirken, talamik, hipotalamik ve beyin sapı yapılarında daha yüksek ekspresyon göstermektedir (Andreasson, 2010). Dört PGE₂ reseptörü arasında en yaygın eksprese edilenler EP3 ve EP4 reseptörleridir (Markovič ve ark. 2017).

EP3 reseptörünün aktivasyonu, Gi proteini ile cAMP seviyelerini düşüren adenilat siklazin inhibisyonuna neden olmaktadır (Markovič ve ark. 2017). Bu etkisiyle EP3 reseptörü, EP2 ve EP4 aracılı PGE₂ etkisine antagonist bir etki oluşturmaktadır (Saleem ve ark. 2009). Bu nedenle EP3 PGE₂'nin inhibitör reseptörü olarak kabul edilmektedir (Markovič ve ark. 2017).

EP3 reseptör subtipi, ateş oluşumuna aracılık eder, tümör ve kronik inflamasyon ile ilişkili anjiyogeneze rol oynar, duodenum sekresyonunu düzenler, endotoksin kaynaklı gelişmiş ağrı algısına neden olur, virüs enfeksiyonu ile ilişkili ağrıya yol açar ve tip I allerjiyi baskılar. (Ushikubi ve ark. 1998; Takeuchi ve ark. 1999; Ueno ve ark. 2001; Amano ve ark. 2003; Minami ve ark. 2003; Kunikata ve ark. 2005; Takasaki ve ark. 2005). Aynı zamanda EP3'ün genetik delesyonunun, nöronları NMDA aracılı toksisiteye karşı koruduğu ve PGE₂'nin COX aracılı nörotoksisiteye EP3 üzerinden katkı sağladığı düşünülmektedir (Wang ve ark. 2015). Yapılan bir çalışmada EP3'ün farmakolojik blokajının veya genetik olarak baskılanmasının, cerrahiye bağlı hipokampal hafıza eksikliklerini hafifletebildiği ve hipokampusta cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB), aktiviteye bağlı sitoskeletal ilişkili protein (Arc) ve BDNF de dahil olmak üzere, plastisite ile ilgili proteinlerin ekspresyonlarının sürdürülmesini sağlayabileceği gösterilmiştir (Xiao ve ark. 2018).

EP4

İnsan vücudunda EP4 lökositler, düz kas, kardiyovasküler sistem, böbrekler, kemikler beyin korteksi ve hipokampusta bulunmaktadır (Ahmad ve ark. 2005; Sugimoto ve Narumiya, 2007; Markovič ve ark. 2017; Xiao ve ark. 2018). Siklik adenosin monofosfat artışı ile etki gösteren diğer bir reseptör olan EP4 ise Gs proteine bağlı olarak hücresel cevap oluşturmaktadır. PGE₂'nin bu reseptörlere bağlanmasıyla aktive olan Gs, adenilat siklaz (AC) enzimini aktive etmekte ve hücre içi cAMP konsantrasyonunu arttırmaktadır (Tablo 2.3.). PGE₂ EP4 reseptörüne bağlanarak beyinde nöroprotektif etki gösterir, duktus arteriozusun kapanmasını kolaylaştırır, kemik oluşumunu indükler, inflamatuvar bağırsak hastalığına karşı korur, Langerhans hücre göçünü ve olgunlaşmasını kolaylaştırır ve kollajen kaynaklı artritte eklem iltihabına aracılık eder (Segi ve ark. 1998; Kabashima ve ark. 2002; Yoshida ve ark. 2002; Kabashima ve ark. 2003; Ahmad ve ark. 2005; Honda ve ark. 2006; Yokoyama, 2006). EP4 reseptörünün hipokampustaki etkileriyle ilgili bir çalışmada, hipokampal bölgede oluşan hasarın, EP4 antagonizmi uygulandığında, bölgede mezenşimal ekstraselüler veziküllerin açığa çıktığını ve bunun sonucunda da hipokampal hasara bağlı oluşan bilişsel ve öğrenme eksikliklerinin kurtarılabileceği ileri sürülmüştür (Chen ve ark. 2019).

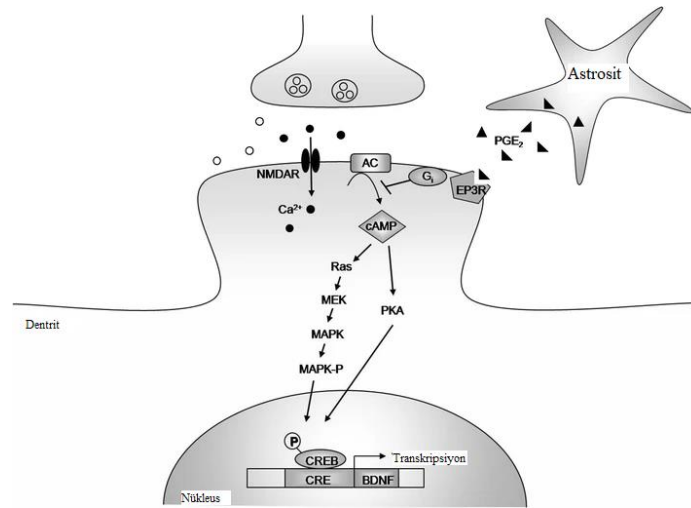
Tablo 2.3. Reseptör Subtipleri Genel Özellikleri (Sugimoto ve Narumiya, 2007)

Subtip	İzoform	Amino asit	G protein	Sinyal yolağı
EP2		362	G _s	cAMP↑
EP4		513	G _s (G _i)	cAMP↑, PI3K
EP1		405	Gq/G11	PLC, IP3, Ca ⁺² ↑, PKC, cAMP↓
EP3	EP3 _α	366	G _i , G ₁₂	cAMP↓, IP3/Ca ⁺² ↑, Rho
	EP3 _β	362	G _i , G ₁₂	cAMP↓, IP3/Ca ⁺² ↑, Rho
	EP3 _γ	365	G _i , G _s	cAMP↓, cAMP↑, IP3/Ca ⁺² ↑

EP2 ve EP4'ün her ikisi de, cAMP artışına neden olan yollarla ilgili olmasına rağmen, birçok süreçte farklı roller oynamaktadırlar (Sugimoto ve Narumiya, 2007). Örneğin; fare dendritik hücrelerinde hem EP2 hem de EP4 ifade edilmesine rağmen,

sadece EP4 hücre migrasyonunu düzenlemektedir (Kabashima ve ark. 2003). Bu durumun adenilat siklaz etkilerine ek olarak, EP2'nin değil EP4'ün Gi yolağı üzerinden, fosfatidilinositol 3-kinaz ile eşleşmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (Fujino ve ark. 2003; Fujino ve Regan, 2006; Sugimoto ve Narumiya, 2007).

Hipokampus, beyinde öğrenme ve hafıza ile ilgili kritik bir beyin bölgesidir ve prostaglandin düzeyi, travmatik beyin hasarı, yaşlanma ve Alzheimer hastalığı gibi bir çok inflamatuvar koşul altında artabilmektedir (Hein ve O'Banion, 2009). Sıçanlarla yapılan çalışmalarda, COX-2'nin aşırı ekspresyonunun veya PGE₂ enjeksiyonunun hafızayı bozabildiği, ayrıca non-steroid antiinflamatuvar uygulamaları ile siklooksijenaz enzimlerinin bloke edilmesinin, nöroinflamasyon süreçlerinde hafızayı geliştirecek etkilere neden olduğu gösterilmiştir (Hein ve O'Banion, 2009). Hipokampustaki nöroinflamasyon süreçlerine açıklık getirmek için yapılan çalışmalarda, postsinaptik bölgelerdeki EP3 reseptörlerinin arttığı gözlemlenmiştir (Hein ve O'Banion, 2009). EP3, PGE₂'ye karşı en yüksek afiniteye sahip reseptör olduğundan, PGE₂'nin hafıza üzerindeki bu olumsuz etkilerini, EP3 sinyal yolağı üzerinden, hipokampal bellek için gerekli bir molekül olan BDNF'yi azaltarak gösterdiği düşünülmektedir (Şekil 2.5.)(Hein ve O'Banion, 2009).



Şekil 2.5. Uzun süreli güçlenme (LTP) için PGE₂ EP3 reseptörü-BDNF bağlantısı ve yüksek PGE₂'nin hafıza bozukluğu etkisi (Hein ve O'Banion, 2009).

Chen ve ark. (Chen ve Bazan, 2005) tarafından yapılan bir çalışmada endojen PGE₂'nin hipokampustaki temel membran ve sinaptik özellikleri seçici olarak düzenlediği gösterilmiştir. Somatik ve dendritik membran uyarılabilirliğinin, selektif bir COX-2 inhibitörü kullanılarak endojen PGE₂'nin üretiminin önlenmesiyle,

hipokampal CA1 nöronlarında önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Chen ve Bazan, 2005).

Bir başka çalışmada ise atmosferdeki SO₂ kirliliğine bağlı oluşan nörotoksik etkinin COX-2 üretiminin uyarılmasıyla ilgili olduğunu, yani artan COX-2 üretimi sonucunda arasıdonik asit türevi prostaglandinlerin, özellikle PGE₂ üretiminin artmasıyla ilgili olduğu ileri sürülmüştür (Sang ve ark. 2011). Ayrıca bu çalışmada, moleküler modülasyon sürecinin, in vivo SO₂ metabolizması sonucu oluşan serbest radikal atakları sonrası cAMP/PKA yolağının aktivasyonu ile glutamat salınım ihtimalinin ve NMDA reseptör ekspresyonunun artışı tarafından tetiklenebileceği ve nöronal apoptoza neden olabileceği de ileri sürülmüştür (Sang ve ark. 2011).

Hipokampal nöronlarla ilgili bir başka çalışmada ise selektif COX-2 inhibitörlerinin, postsinaptik membran uyarılabilirliğini ve hipokampal dentat granül nöronlarında uzun süreli potentiasyon (LTP) indüksiyonunu önemli ölçüde azalttığını ve bu etkilerin eksojen PGE₂ uygulamasıyla etkili bir şekilde tersine çevrilebildiği gösterilmiştir (Chen ve ark. 2002). Diğer bir deyişle COX-2 ile üretilen PGE₂'nin hipokampal perforant yol dentat girus sinapslarında membran uyarılabilirliğini ve uzun süreli sinaptik plastisiteyi düzenlediği ileri sürülmüştür (Chen ve ark. 2002).

PGE₂ eylemlerine aracılık eden EP subtiplerinin anlaşılması için yapılan çalışmalarda, her bir EP subtipi için knock-out fareler ve EP spesifik agonistler / antagonistler kullanılmaktadır (Sugimoto ve Narumiya, 2007). EP subtipleri, non-steroid antiinflatuar ilaçlar tarafından inhibe edildiği bilinen birçok süreç/işlev/fonksiyon aracılık etmektedir. Örneğin, EP3 reseptörü, pirojeni (Ushikubi ve ark. 1998) oluşumuna aracılık ederken, EP1 ve EP3 sinyalleri hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinde birleşir ve kortikotropin salgılatıcı hormonun salınımını kolaylaştırarak nöroendokrin stres tepkisine aracılık eder (Matsuoka ve ark. 2003). Farklı çalışmalar diğer EP subtiplerinin yanı sıra IP (PGI reseptörü) reseptörünün de hem periferde hem de MSS'de hiperaljezide işlev gördüğünü ortaya koymuştur (Murata ve ark. 1997; Ueno ve ark. 2001).

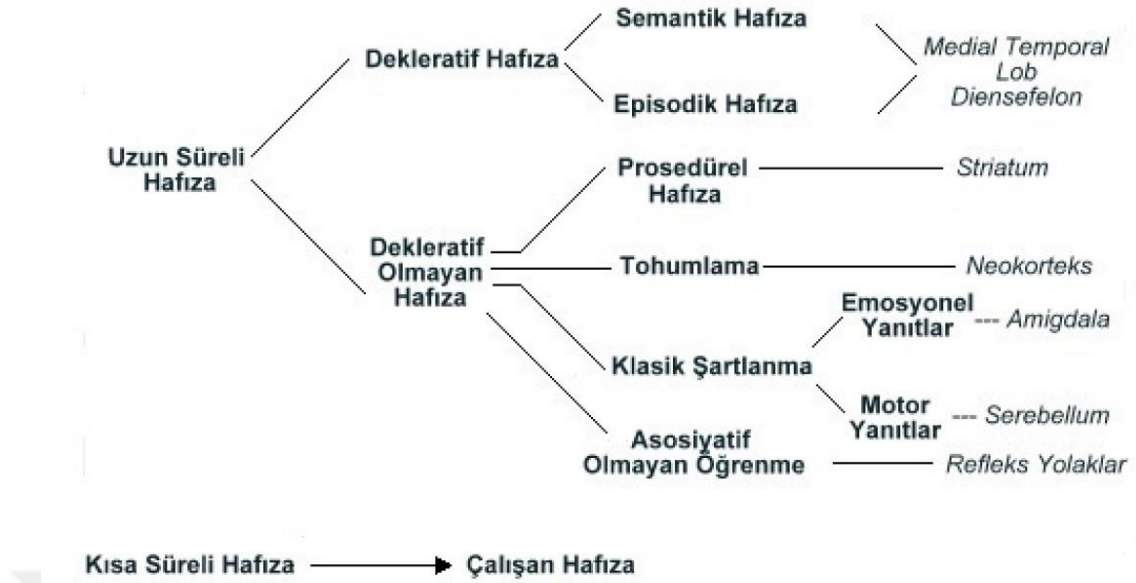
Prostanoidlerin, özellikle PGE₂'nin, periferik dolaşıma etki ederek akut inflamasyonda önemli bir rol oynadığı ve hiperemiyi indüklediği düşünülmektedir (Sugimoto ve Narumiya, 2007). Bununla birlikte knock-out çalışmaları, PGE₂'nin de

dahil olduğu prostanoidlerin, hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar yanıtlar verdiğini ve bu eylemlerin genellikle ilgili dokulardaki gen ekspresyonunun regölasyonuyla sağlandığını göstermiştir (Sugimoto ve Narumiya, 2007). Bazı prostanoidlerin antiinflamatuar etkileri tipik olarak alerjik veya immün inflamasyonda görölmekte ve genellikle diğer prostanoidlerin pro-inflamatuar etkileri ile dengelenmektedir (Sugimoto ve Narumiya, 2007). Bu durum, antiinflamatuar ilaçların neden alerji ve bağışıklık tepkileri üzerinde etkisi olmadığını açıklayabilmektedir (Sugimoto ve Narumiya, 2007). Alerjik astımın ortaya çıkmasında PGD2-DP (Prostaglandin D reseptörü) ve PGE₂-EP3 yolları arasındaki antagonizm bu duruma örnek olarak gösterilebilir (Sugimoto ve Narumiya, 2007). DP ve EP3'ün her ikisi de hava yolu epitelinde bulunan reseptörlerdir ve ikincisinin aktivasyonu, bir dizi alerjiyle ilişkili genin ekspresyonunu ve alerjik inflamasyonun ilerlemesini bastırmaktadır (Sugimoto ve Narumiya, 2007). Derideki Langerhans hücrelerinin mobilizasyonunu, migrasyonunu ve olgunlaşmasını, PGD2-DP yolağı baskımlarken, PGE₂-EP4 yolağı kolaylaştırmaktadır (Sugimoto ve Narumiya, 2007). Özetle PGE₂, diğer prostanoidlerle birlikte çeşitli inflamasyon süreçlerini modüle edebilmekte ve bu süreçleri hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar yönde koordine edebilmektedir (Sugimoto ve Narumiya, 2007).

Sonuç olarak PGE₂, kendine özgü 4 farklı reseptör subtipi (EP1, EP2, EP3, EP4) doğrultusunda, nörotoksik ya da nöroprotektif etkiler gösterebilmektedir (Andreasson, 2010). Bu bilgiler ışığında, PGE₂'nin hipokampusta farklı reseptör subtiplerinin olması ve sülfite bağlı olarak bu reseptör tiplerinin ekspresyonlarında değişiklik olup olmadığı sorusuna yanıt bulmak amacıyla PGE₂ düzeyi ile PGE₂ reseptör subtiplerinin analizi yapılmıştır.

2.3. Öğrenme ve Hafıza

Canlılarda, çevresel etmenleri algılamak ve daha sonra bu verileri kullanmak üzere saklamak, hayatta kalmayı sağlamak için oldukça önemli bir mekanizmadır. Öğrenme, bu çevresel koşullarla ilgili verilerin alınması, hafıza ise alınan bu verilerin daha sonra kullanılacak bir şekilde saklanması olarak tanımlanabilmektedir (Dronkers ve ark. 2013). Hafıza tiplerini sınıflandırırken “içeriğine” ve “kalıcılık süresine” göre olmak üzere iki ana sınıflandırma yöntemi kullanılmaktadır.



Şekil 2.6. Uzun ve Kısa Süreli Hafıza Türleri

2.3.1. Kalıcılık Süresine Göre Sınıflandırma

Bir bilginin, alındıktan sonra ne kadar süreyle saklandığına bağlı olarak tanımlanan sınıflandırma sistemi olup, “kısa” ve “uzun” süreli hafıza olarak iki başlığa ayrılmaktadır.

1. Uzun süreli hafıza (long term memory = LTM) çevreyle ilgili verinin alındıktan sonra uzun süre (yıllarca veya ömür boyu) saklandığı hafıza türüdür.
2. Kısa süreli hafıza (short term memory = STM) veya çalışan bellek, çevreyle ilgili verinin alındıktan sonra kısa süre (en fazla birkaç saat) saklandığı hafıza tipidir.

Kısa süreli hafıza (working memory) çevresel verilerin algılandıktan sonra, alınan bilgiyi kısa süreliğine saklama ve bilgiye ihtiyaç duyulduğunda bilinçli olarak kullanılmasını sağlayan bilişsel bir yeti olarak kabul edilmektedir (Türkoğlu ve ark. 2019). Kısa süreli bellek, alınan bilginin kodlanarak uzun süreli belleğe aktarılması ve gerektiğinde mevcut bilginin kullanılmak üzere geri çağırılması sürecini de gerçekleştirmektedir (Türkoğlu ve ark. 2019). Diğer bir deyişle çalışan hafıza ya da kısa süreli bellek bilgiyi geçici olarak saklama ve zamanda işleme sistemi olarak tanımlanabilmektedir (Alloway ve Alloway, 2010). Bilgiyi işleme koyma ve hatırlama yeteneği olan olan çalışma belleğinin, mantıksal akıl yürütme süreçlerinden sözel anlamaya kadar birçok bilişsel faaliyetle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Alloway ve Alloway, 2010). Buna karşın uzun süreli bellek ise

bilginin uzun yıllar boyunca kalıcı olarak saklanabildiği ve ihtiyaç duyulduğunda çağırılabilirdiği pasif bir sistem olarak açıklanmaktadır (Dehn, 2010; Türkoğlu ve ark. 2019). Diğer bir deyişle uzun süreli bellek, çevresel verileri saklayan geniş bir bilgi deposu olup, canlının geçmişte yaşamış olduğu olayları kaydetmektedir (Cowan, 2008). Bu iki bellek tipi arasındaki farkı belirleyen parametreler süre ve kapasitedir (Cowan, 2008). Süre farkı, kısa süreli hafızada depolanan verilerin, zamanın bir fonksiyonu olarak kısa süreli hafıza deposunda bozulmaları olarak tanımlanmaktadır (Cowan, 2008). Kapasite farkı ise kısa süreli hafızanın depolama potansiyelinin bir sınırı olduğu anlamına gelmektedir (Cowan, 2008). Dolayısıyla, kapasite sınırının olması, kısa süreli hafıza deposundaki, depo kapasitesini doldurmayan küçük verilerin, yerlerine yeni veriler gelene kadar kısa süreli hafızada depolanabileceği anlamına gelmektedir (Cowan, 2008). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar, kısa süreli hafızadaki verilerin ilaç veya travma gibi çevresel faktörlere bağlı olarak bozulabileceğini ancak uzun süreli hafızanın ise bu tip bozulmalara çok daha dirençli olduğunu göstermiştir (Ganong, 1995; Dronkers ve ark. 2013).

2.3.2. İçeriğine Göre Hafıza Tipleri

Hafıza tipleri, içeriğine göre implisit (deklaratif olmayan) ve eksplisit (deklaratif) hafıza olarak iki ana başlık altında incelenmektedir.

İmplicit hafıza tipinde öğrenilmiş davranışlar, alışkanlık ya da beceriler otomatik olarak açığa çıkar (Kandel ve ark, 2013; Ganong, 2016). Yani geçmiş deneyimlerin bilinçli veya kasıtlı olarak hatırlanmasını gerektirmeyen işlemlerin yapılmasını sağlayan hafıza türüdür (Schacter, 1987). Asosiyatif, asosiyatif olmayan, prosedürel ve tohumlama ismi verilen dört alt tür ile incelenmektedir (Schacter, 1987). Asosiyatif hafıza alt türünde canlı, aldığı uyarıların birbiriyle olan ilişkisini öğrenmektedir (Schacter, 1987). Bu hafıza tipi de kendi içinde klasik ve operan şartlanma olarak ikiye ayrılmaktadır (Schacter, 1987). Klasik şartlanma bir refleks yanıttır; klasik şartlanma, yanıtı neden olmayan ya da hafif bir yanıtı neden olan uyaran (koşullu uyaran) ve aynı yanıtı doğal olarak tetikleyen ayrı bir uyarının (koşulsuz uyaran) birbiriyle eşleştirilmesiyle oluşmaktadır (Schacter, 1987). Operan şartlanma asosiyatif hafıza tipinde ise canlı, ödüle ulaşma ya da zarardan (cezadan) kaçınma davranışlarını gerçekleştirmek için belli bir görevi yerine getirmesi gerektiğini öğrenmektedir (Kandel ve ark, 2013; Ganong, 2016). Bu hafıza tipinde koşulsuz şartlanma olumlu (organizmanın yararına) ya da olumsuz (organizmanın

kaçınmak istediği) olayı temsil etmekte ve koşullu şartlanma ise bu olumlu ya da olumsuz koşulların gerçekleşmesini ya da kaçınılmasını sağlayacak görevleri yerine getirmek olarak tanımlanmaktadır (Kandel ve ark, 2013; Ganong, 2016). Bu duruma örnek olarak aktif/pasif sakınma deneylerinde kullanılan ve deney hayvanının ayağına elektrik veren aparatın, çubuğa basarak durdurulabileceğini öğrenmesi verilebilmektedir (Ganong, 1995; Dronkers ve ark. 2013).

Alışkanlık, öğrenmenin en basit biçimlerinden biridir ve tekrarlanan bir uyarıcıya verilen yanıtın azalması ile sonuçlanmaktadır (Best ve ark. 2008). Yanıttaki azalma, uyarının türüne ve yapılan çalışmaya bağlı olarak dakikalar veya saatler boyunca sürebilmektedir (Best ve ark. 2008). Bu tür bir yanıt, asosiyatif olmayan öğrenme olarak adlandırılmaktadır (Best ve ark. 2008). Diğer bir asosiyatif olmayan öğrenme tipi ise duyarlanma olarak adlandırılmaktadır ve canlı açısından olumsuz (zararlı) uyarıya verilen yanıtın her seferinde daha şiddetli olarak açığa çıkması ile karakterize edilmektedir (Nishiyama ve ark. 2000). Prosedürel hafıza tipi ise öğrenilen bilginin tekrarlı ve uzun süreler boyunca kullanılmasının sonucunda, mevcut bilginin beceri veya alışkanlık haline gelmesi olarak tanımlanmaktadır (Kandel ve ark, 2013; Ganong, 2016). Tohumlama hafıza ise bir sözcüğün ilk birkaç harfi bilindikten sonra hatırlanması gibi, bir sözcükle veya çevresel herhangi başka bir faktörle karşılaşıldığında bu bilgilerin tanınmasını kolaylaştıran hafıza tipidir (Kandel ve ark, 2013; Ganong, 2016).

Hatırlama kavramı, belirli deneyimlerle ilgili bilginin bilinçli veya açık bir şekilde geri çağırılması olarak tanımlandığı varsayılmaktadır (Graf ve Schacter, 1985). Bu varsayım büyük ölçüde serbest çağrışım, ipucu ile hatırlama ve tanıma gibi geleneksel bellek testlerinden kaynaklanmaktadır (Graf ve Schacter, 1985). Bu testlerin en belirgin ortak özellikleri ise mevcut bilginin geri çağırımı için açık talimatlar sağlamasıdır (Graf ve Schacter, 1985). Diğer bir deyişle deklaratif hafıza olarak da adlandırılan eksplisit hafıza tipi, implisit sistemin aksine değişmeye açık, esnek ve bilinç eşlenik olarak açıklanabilmektedir (Kandel ve ark, 2013; Andersen, 2007). Bireyler, çevre veya tarihler gibi bilgiler bu hafıza sistemi ile depolanmaktadır (Kandel ve ark, 2013; Andersen, 2007).

Hafıza ile ilgili işlemlerde beynin birçok bölgesi görev almaktadır ancak episodik ve uzaysal hafıza gibi bazı spesifik hafıza ve öğrenme tiplerinde hipokampus denilen

beyin bölgesi asıl rolü oynamaktadır (Deng ve ark. 2010). Bu bölge entorhinal korteks, parasubikulum, presubikulum, subikulum, dentat girus, ve entorhinal korteksten oluşan bir yapıya sahiptir (Amaral ve ark. 2007). Hipokampus, CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak adlandırılan alt bölgelerden oluşmaktadır (Amaral ve ark. 2007). Bu alt bölgelerin her birinin giriş ve çıkış alanları farklı olmakla birlikte yapısal olarak da farklılıklar göstermektedirler (Andersen, 2007). Hipokampus, Perforant yol, Mossy fiberleri ve Schaffer kollateralleri olmak üzere üç ana yolak üzerinden işlem görmektedir (Andersen, 2007). Örneğin CA3 bölgesindeki piramidal hücrelerin eksitator kollateralleri, Schaffer kollateralleri ile CA1'deki piramidal hücrelere ulaşabilmektedir (Andersen, 2007). Benzer şekilde hipokampusteki granül hücrelerinin aksonlarından başlayan Mossy fiberleri ise CA3 bölgesine uzanmaktadır (Andersen, 2007). Perforant yolak ise entorhinal korteks üzerinden dentat girusa ulaşmaktadır (Andersen, 2007). Sıçanlarla yapılan çalışmalarda hipokampusta oluşan lezyonların uzaysal hafızada bozulmalara neden olduğu saptanmıştır (Broadbent ve ark. 2004).

Hayvanlarda keşif davranışı içgüdüsel bir sistemdir ve uzaysal bellek de bu içgüdüsel davranış ile kazanılan bir özellik olarak bilinmektedir ve merak davranışının doğal bir ekspresyonu olarak ifade edilmektedir (Paul ve ark. 2009). Diğer bir deyişle uzaysal hafıza, hedefe giden yolun haritası veya objelerin uzaysal konumu hakkındaki bilgileri kodlama, pekiştirme, depolama ve geri çağırma sürecinde görev alan zihinsel süreç olarak açıklanmaktadır (Paul ve ark. 2009).

1973 yılında yapılan bir araştırmada, hipokampal yollarda önceden gerçekleşmiş aktivitelere karşı oluşan yanıtın duyarlılığının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Bliss ve Lomo, 1973). Bu çalışmada anestezi verilen tavşanlar kullanılmış ve perforant yolakta uyarımı başlatmak için yüksek frekanslı uyaranlar verilmiştir (Bliss ve Lomo, 1973). Daha sonra dentat girus üzerinden eksitator postsinaptik potansiyel kaydı alınmıştır (Bliss ve Lomo, 1973). Sonuçta artan ekstraselüler eksitator postsinaptik potansiyel sayısının ve eşik değerdeki düşüşün yaklaşık bir saat boyunca sürdüğünü ileri sürmüşlerdir (Bliss ve Lomo, 1973). Başka bir çalışmada ise anestezi kullanılmayan deney hayvanlarında da stimulusa bağlı olarak sinaptik aktivitedeki artışın haftalar ve aylar boyunca sürebildiği tespit edilmiş, bu uzun süreli değişime

ise “uzun süreli güçlenme” adı verilmiştir. (Bliss ve Lomo, 1973; Bliss ve Collingridge, 1993; Haines, 2012).

2.3.3. Uzun Süreli Güçlenme

Uzun süreli güçlenme, nöronal ve sinaptik plastisite süreçlerinin işlemesindeki en önemli olgulardan bir tanesi olarak bilinmektedir (Bliss ve Collingridge, 1993). Bu güçlenme tipi hipokampüste çok belirgin olmasına karşın subkortikal bölgeler, neokortikal bölgeler ve serebellum gibi farklı beyin bölgelerinde de gözlenebilmektedir (Haines, 2012).

Uzun süreli güçlenme mekanizmasının işleme süreci (oluşma ve korunma), sinapslar arasında farklılık gösterebilmektedir (Cooke ve Bliss, 2006). Örnek olarak mossy fiberlerinde NMDA blokajı uzun süreli güçlenmeyi engellemez. Çünkü CA3 piramidal nöronlarında ve dentat girustaki sinaptik plastisitede NMDA reseptörlerinin rolü çok azdır (Kandel ve ark., 2013). Postsinaptik aktivasyonun oluşması için hipokampal sinaps tek başına yeterli gelmemekte ve dolayısıyla birden fazla aksonun aynı anda ateşlenmesi ile bu aktivite sağlanabilmektedir (Kandel ve ark, 2013). Uzun süreli güçlenmeyi sağlayacak uyarı yeterli olmadığında başka bir uyarı ile daha güçlü hale gelerek LTP indüklenebilmektedir (Connors BW, 2012). Dolayısıyla LTP aktif nöronların sinaps yapmasıyla gerçekleşen bir süreç olarak değerlendirilmektedir (Connors BW, 2012).

2.4. Öğrenmenin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Deneysel Modeller

Öğrenme ve hafıza sistemlerinin araştırılmasında hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Deney hayvanlarında uzaysal hafızanın değerlendirilmesi için kullanılan çeşitli testler bulunmaktadır.

2.4.1. Klasik Labirent Testi

Deney hayvanları (sıçan veya fare) ile yapılan deneylerde çoğu zaman klasik labirentler kullanılmaktadır. Dikdörtgen veya kare olabilen bu düzenek aynı zamanda çok sayıda dikey ve yatay duvar içermektedir. Deney hayvanının görevi labirentin belirli bir yerine gizlenen ödülü bulmaktır. Sıçan, başlangıç noktası ile ödül noktası arasındaki yolda ne kadar süre geçirdiği, deneme sayısına bağlı olarak sürede ne gibi değişiklikler olduğu ve yanlış kola ne kadar girdiği gibi parametreler kaydedilip analiz edilmektedir (Gasmi, 2018).

2.4.2. T-Labirent Testi

T-Labirent Testi sıklıkla uzaysal hafıza ve spontan alternasyon analizleri için kullanılmaktadır. T şeklinde ve deney hayvanının hareket edebileceği büyüklükte bir labirent kullanılmaktadır. Bir başlangıç kolu ve bir de ödül bulunan kol belirlendikten sonra sıçan başlangıç kolundan bırakılmakta ve kaç deneme sonunda ödül olan kola girdiği kaydedilmektedir. Daha sonra ödül, koldan alınır ve deneme tekrarlanarak ödül bulunan kola giriş frekansı kaydedilir (Viana ve ark., 1994).

2.4.3. Y-Labirent Testi

Y-Labirent Testi de T-Labirent Testi gibi uzaysal hafıza ve spontan alternasyon analizleri için kullanılan bir testtir. T labirentten farkı ise kol birleşim noktalarındaki açıların T labirentinden daha geniş olması ve dolayısıyla T labirent testinden daha kolay olduğu düşünülmektedir. Labirentin birbirine eşit üç kolu bulunmakta ve bir tanesi kapatılmaktadır (yeni kol). Sıçanın diğer kollarda (başlangıç ve diğer kol) on beş dakika dolaşmasına izin verilmektedir. Deneme bittikten dört saat sonra kapalı kol açılır (yeni kol) ve aynı deneme beş dakikalık süreyle tekrarlanır. Bu testte ise kat edilen mesafe ile yeni kola giriş frekansı ve yeni kolda geçirilen süre parametreleri esas alınmaktadır (Ghafouri ve ark., 2016).

2.4.4. Radial Kollu Labirent

Bu test Y ve T testlerinden farklı olarak kısa süreli hafızanın ölçülmesi için kullanılmakta olan çok sayıda kola sahip (dairesel sekiz, on iki veya 16 kol) bir labirent düzeneğidir. Kolların her birine bir ödül (yem) konmaktadır. Deney hayvanı merkeze bırakılır ve kısa süreli bellekte kaydedilmiş bilgilerden ve distal ipuçlarından faydalanarak girdiği kolları hatırlaması beklenir. Yem yediği kola tekrar girmesi hata olarak kabul edilmektedir (Olton ve ark., 1977).

2.4.5. Morris Su Tankı Testi

Morris Su Tankı Testi uzaysal hafızanın ölçümü için en sık kullanılan testlerden bir tanesidir. Uzaysal hafıza ölçümünün daha doğru yapılabilmesi açısından diğer uzaysal hafıza ölçüm testlerine göre daha çok tercih edilmektedir. Çünkü kokuya dayalı ipuçları bulunmamaktadır ve deney hayvanı için daha geniş bir kaçış bölgesi sağlamaktadır. Test daire şeklinde metal ya da plastik, ortalama 40 cm derinliğe sahip içi su dolu bir düzenekten ve kaçış platformundan oluşmaktadır. Çok sayıda protokolü olmasına karşın en çok kullanılan protokole deney hayvanının kaçış için kullanacağı platform suyun 1-2 cm altına (ayaklarının yetiştirebileceği ve üzerinde

yüzmeden durabileceği mesafe) yerleştirilmekte ve platformun görünmesini engellemek için su yüzeyine zehirli olmayan boyalar dökülebilmektedir. Daha sonra deney hayvanı suya bırakılmakta ve distal uzaysal ipuçlarını kullanarak platformu bulana kadar tankta geçirdiği süre, ket ettiği yok ve yüzme hızları gibi faktörler değerlendirilmektedir (Morris ve ark. 1982).

2.4.6. Açık Alan Testi

Kare ve yaklaşık 30 cm derinlikteki yine plastik veya ahşap bir düzenden oluşan bu testte ise deney hayvanının lokomotor aktivitesi, anksiyetik hareketleri ve araştırma davranışları değerlendirilmektedir. Açık alan testinin protokolleri, değerlendirilmek istenen parametrelere göre değişkenlik göstermektedir (Navarro ve ark., 2014).

Sülfitin öğrenme ve hafıza üzerine olumsuz etkileri pek çok araştırma ile rapor edilmiştir (Küçükataay ve ark. 2005; Noorafshan ve ark. 2013). Ekibimiz tarafından yapılan bir çalışmada 100 mg/kg/gün dozda uygulanan sülfitin total beyinde AA, COX2 ve PGE₂ düzeylerinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Derin ve ark., 2017). Mevcut çalışmamızda sülfitin öğrenme ve hafıza üzerindeki etkilerini araştırmayı ve bu sürece AA yolağının ve PGE₂ düzeyi ile nörotoksik veya nöroprotektif etkileri bilinen PGE₂ reseptör subtiplerinin katkılarının olup olmadığını ortaya koymayı planladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gruplandırma

Çalışmamızda 45 adet 3 aylık erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Her grupta 15 hayvan bulunmak üzere 3 grup oluşturulmuştur.

- 1) Kontrol grubu (K)
- 2) 100 mg/kg/gün dozunda sülfite verilen grup (S100)
- 3) 260 mg/kg/gün dozunda sülfite verilen grup (S260)

3.2. Deney Protokolü

Çalışmaya alınan sıçanlara, 35 gün süreyle kontrol grubuna musluk suyu, S100 ve S260 gruplarına ise sırasıyla 100 ve 260 mg/kg/gün dozlarında sodyummetabisülfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) gavaj yoluyla verilmiştir. Deney süresince hayvanlar ticari sıçan yemi ve musluk suyuyla beslenmiştir. Gavajın 35. gününde öğrenme deneyleri tamamlanmış ve sıçanların anestezi altında abdominal aortlarından heparinize kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örnekleri 1400 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrılmış ve alikvatlanarak plazma-S-sülfonat seviyelerine bakılmak üzere -80°C 'de saklanmıştır. Daha sonra transkardiyak perfüzyonla serum fizyolojik verilerek kandan arındırılan beyin dokuları çıkarılmış ve hipokampusları ayrılarak biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80°C 'de saklanmıştır.

3.3. Davranış Deneyleri

Davranış deneyleri Noldus Ethovision-XT sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.3.1. Morris Su Tankı Testi

MWM testi çapı 150 cm, yüksekliği 60 cm olan daire şeklindeki su dolu tankta yapılmıştır. Tank 4 kadrana bölünmüş ve hedef kadrana platform konulmuştur. Hayvanların deneyi yapan araştırmacıya alışmaları için 25. günden itibaren 5 gün boyunca, günde 5 dk “ele alıştırma” (handling) prosedürü uygulanmış ve takip eden günde (30. Gün) MWM testine başlanmıştır. 30. günden itibaren, öğrenme aşamasındaki sıçanların her gün 120 saniye tankta yüzmelerine izin verilmiştir. Bu süre içinde platformu bulan hayvanların 15 sn süreyle platform üzerinde kalarak

uzaysal ipuçlarını keşfetmeleri beklenmiştir. 120 sn içinde platformu bulamayan sıçanlar yavaşça elle platforma yönlendirilerek 15 sn platformun üzerinde durmaları sağlanmıştır. 5 gün süreyle, 5 dakika aralıklarla, günde 4 trial uygulanmıştır. 5 gün boyunca sıçanların platformu bulma süreleri kaydedilmiştir. Deneyin 6. günü platform kaldırılmış ve deney süresince öğrenmenin gerçekleşip gerçekleşmediği platformsuz su tankında yapılan 30 saniyelik yüzdürme triali (probe trial) ile değerlendirilmiştir. Bu trialde sıçanların daha önce platform bulunan kadrana (hedef kadrana) giriş frekansları, katettikleri yol ve ortalama yüzme hızları Noldus Ethovision XT kayıt sistemi ile kaydedilmiştir (Wang ve ark. 2017; Zhang ve ark.,2013).

3.3.2. Açık Alan Testi

Açık alan testleri duvar yüksekliği 40 cm olan, tabanı 80x80 cm² ebatlarında kare şeklinde siyah mat tabanlı düzenekte yapılmıştır. Alan birbirine eşit 16 küçük kareye bölünmüştür. Deneyin başlangıcında sıçanlar tek tek bu alanın merkezine bırakılmış ve 5 dakika boyunca hareketleri Noldus Ethovision XT kayıt sistemi ile kaydedilmiştir. Her sıçan için girdiği kare sayısı, kat ettiği toplam mesafe ve ortalama hız değerlendirilmiştir (Navarro ve ark., 2014).

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Plazma-S-Sülfonat Tayini

Plazma-S-Sülfonat düzeyleri Gunnison ve Palmes'in yöntemiyle ölçülmüştür (Gunnison ve Palmes, 1973). Alınan kan örnekleri 1400xg'de 6 dakika santrifüj yapılarak elde edilen ve saklanan plazmadan 1 ml alınarak, 200 µl KCN ile karıştırılmış ve 36°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda karışımın 1ml'si diyalizat torbasına aktarılmış ve 5 ml glisin-NaOH tamponu içerisinde 4 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra diyalizat torbasının dışındaki solüsyondan 1.4 ml bir tüpe aktararak üzerine sırası ile HCl, sodyum tetrakloromerkürat solüsyonu, distile su, formaldehit ve parorasanil reaktifi ilave edilmiştir. 20 dakika inkübasyon süresinin ardından karışımın absorbansı spektrofotometrede 560 nm'de okunmuştur. Plazma-S-Sülfonat miktarları µmol sülfid/ml olarak verilmiştir.

3.4.2. Araşidonik Asit Düzeyi Tayini

Araşidonik asit düzeyi tayini için hipokampus dokusuna, fosfat tamponu (PBS) 5 ml/gram doku olacak şekilde eklendikten sonra homojenize edilmiştir. 100 µl standart solüsyonuna eklenen, 100 µl hipokampus dokusu 90°C'de 2 saat hidrolize olması için inkübe edilmiştir. Ardından örnekler oda sıcaklığına gelene kadar soğutulduktan sonra serbest AA, 2 ml heksan eklenerek ayrıştırılmış ve 3000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatantlar alınmıştır. Ayrıştırılan yağ asidi 100 µl kloroform, methanol ve su karışımına eklenerek kullanılmıştır. Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi yöntemi, LCMS (long chain mass spectroscopy) 8040 triple quadrupole MS cihazı kullanılarak yapılmıştır. 80°C'ye sahip kaynak sıcaklığında 3 kV kapiller voltajı seçilerek 5 ml örnek cihaz enjektöründen (20 µl/dk' dan başlayan akış hızından 50 µl/dk akış hızına 2 dk içinde çıkarılarak) püskürtülerek damlacıkların iyonlaşması sağlanmış ve iyonlaşan damlacıklar Mass Lynx NT Software yazılımı ile sayılarak değerlendirilmiştir.

3.4.3. COX-2 aktivitesinin tayini

Siklooksijenaz aktivitesinin ölçülmesi piyasada bulunan aktivite assay kitiyle yapılmıştır. Hipokampus dokuları, gram doku başına, pH düzeyi 7.8 olan 5-10 ml 1 mM EDTA ve 0.1 M Tris-HCl içeren tampon ile homojenize edilmiştir. Daha sonra 10000xg'de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiş ve süpernatantları çıkarılarak kitte kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. COX-2 aktivitesi bakılan bu örnekler N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) ile okside edilip 590nm'de okunmuştur. Sonuçlar nmol/ml/dk olarak verilmiştir.

3.4.4. PGE₂ düzeyinin tayini

İn vivo PGE₂ 15-dihydrogenaz yoluyla hızlıca inaktif metabolitine (13,14-dihydro-15-keto PGE₂) dönüşür. Ekstrakte edilen dokular sıvı azot ile dondurularak -80°C'de saklanmıştır. 1 g dokuya 5 ml homojenizasyon tamponu (1 mM EDTA ve 10 uM indometasin içeren 0.1 M fosfat, pH 7.4) eklenmiştir. Numuneler, bir homojenizatör ile homojenize edildikten sonra, proteinleri çöktürmek için 10 dakika boyunca 3000xg'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar temiz bir test tüpüne aktarılmıştır. Maksimum absorbans vermesi beklenen kuyucuklara 50 µl ELISA tamponu eklendikten sonra üzerine 50 µl doku örnekleri ve aşağıdan yukarıya doğru aliquat sırasına göre standart eklenmiştir. Daha sonra plate spektrofotometrede 415 nm dalga boyunda okutulmuştur.

3.4.5. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ile PGE₂ Reseptörlerinin (E1, E2, E3, E4) Tayini

Total RNA izolasyonu:

Kontrol ve deney grubuna ait doku örneklerinden total RNA izolasyonu, Trizol (Invitrogen) reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi. MagNa Lyser Gren Beads tüplerine alınan dokuların üzerine 1 ml Trizol reaktifi eklendi ve homojenizasyon işlemi MagNa Lyser cihazında 3000 rpm 30 saniyede gerçekleştirildi. Homojenizasyon işleminden sonra Invitrogen'in protokolüne göre RNA izolasyonu tamamlandı. Protokol sonunda elde edilen RNA pelletleri üzerine RNaz-içermeyen su konuldu. Toplanan RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ölçüldü. Daha sonra tüpler -80°C 'ye kaldırıldı.

DNaz-muamelesi:

RNA (3 µg) 1U DNaz I (Invitrogen) ile muamele edildi ve komplementer DNA (cDNA) sentezi için kullanıldı.

cDNA sentezi:

cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi. DNaz ile muamele edilmiş olan 3 µg RNA örneğine, 10xRT tamponu, 25xNTPmix, 10xRT random primerler, RNase inhibitör ve Multiscribe reverse transcriptase (50 U/µl)'den oluşan toplam 10 µl'lik cDNA sentez karışımı ilave edilip yavaşça karıştırıldı. Bu karışım, 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 85°C'de 5 dakika inkübe edilerek sonlandırıldı. Elde edilen cDNA'lar PCR için kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Real-time PCR reaksiyonu:

Sıçan PGE₂-EP1, PGE₂-EP2, PGE₂-EP3, PGE₂-EP4 ve GAPDH için spesifik primerler (Tablo 3.1.) QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazında, Power SYBR® Green Master Mix protokolüne göre Real-time PCR çalışıldı. Reaksiyon karışımı; 10 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X), 10 µM forward ve 10 µM reverse primer, 2 µl cDNA ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde nükleaz-içermeyen su'dan oluşacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları; 95 °C'de 10 dakika, 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 30 saniye olacak şekilde oluşturuldu. QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazına ait software programı yardımıyla CT (siklus eşik değeri)

değerleri belirlendi. Elde edilen CT değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülünde kullanılarak her genin kontrol grubuna kıyasla göreceli değişim düzeyleri hesaplandı. Amplifikasyon, 35 siklusta gerçekleştirildi. Ayrıca, Melting Curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm değerleri karşılaştırılarak PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirildi.

Tablo 3.1. Real-time PCR için kullanılan primerlerin sekansları

Hedef gen büyüklüğü (bp)	Sekans	Fragment
PGE ₂ -EP1	forward 5'-CCCTGCTGGTATTGGTGGTG-3' reverse 5'-GCGTACAGCCAGAAAGAGCG-3'	80
PGE ₂ -EP2	forward 5'-AGGACTTCTATGGCGGAGGA-3' reverse 5'-AGCAAAGATTGTGAAAGGCAGG-3'	96
PGE ₂ -EP3	forward 5'-CTGCCAGATGATGAACAACCTGA-3' reverse 5'-GAGGCCGAAAGAAGATACAATCC-3'	123
PGE ₂ -EP4	forward 5'-GCAGCGCCTCAGTGACTTTC-3' reverse 5'-AGCGGAATGGAGCAGATGAG-3'	120
GAPDH	forward 5'-GTGCCAGCCTCGTCTCATAG-3' reverse 5'-AGAGAAGGCAGCCCTGGTAA-3'	91

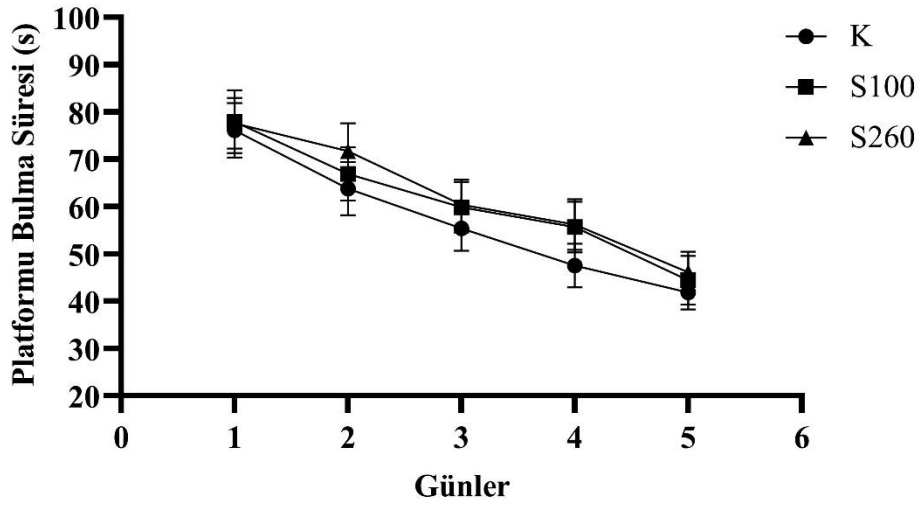
3.5. İstatistiksel Analiz

Projeden elde edilen sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel analizde normal dağılıma uyan parametrik veriler one-way varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış, çoklu karşılaştırmada Tukey post-hoc testi kullanılmış olup, normal dağılıma uymayan non-parametrik veriler Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiş, grupların ikili karşılaştırmasında Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

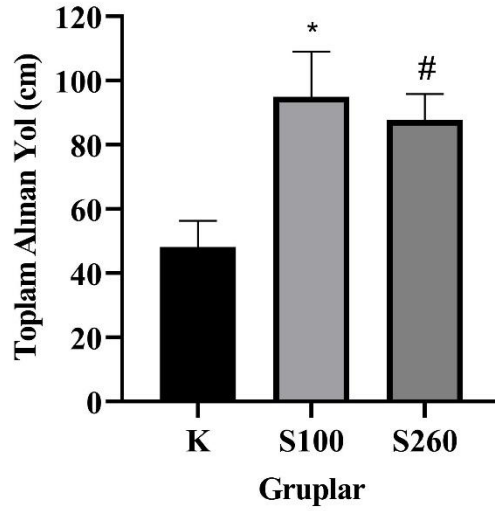
4.1. Morris Su Tankı Testi Bulguları

Morris su tankı testinde sodyum metabisülfite almiş S100 ve S260 grubundaki sıçanlarının MWM düzeneğinde platformu bulma süreleri değerlendirildiğinde K grubu sıçanların platformu bulma sürelerinin, sülfite alan gruplardan daha kısa olduğu gözlemlense de gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Grupların MWM testinde 5 gün boyunca elde edilen platformu bulma süreleri Şekil 4.1.'de verilmiştir.



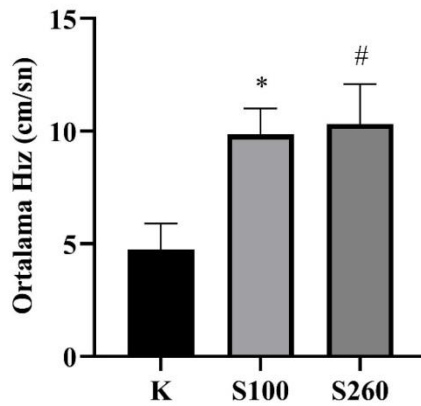
Şekil 4.1. MWM testinde testin ilk beş gününde grupların platformu bulma süresi

Şekil 4.2.'de verileri gösterilen MWM testi probe tiralinde (6. gün), toplam alınan yol değerlendirildiğinde, sülfite verilen S100 ($94,94 \pm 14,16$ cm) ve S260 ($87,75 \pm 7,14$ cm) gruplarının K ($87,75 \pm 8,14$ cm) grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir.



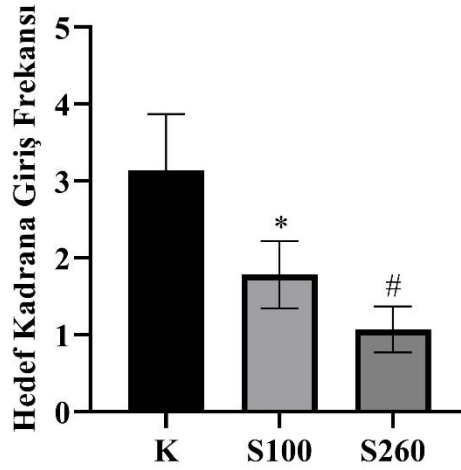
Şekil 4.2. Probe trial için toplam alınan yol * $p < 0.05$ K ile S100 karşılaştırması, # $p < 0.05$ K ile S260 karşılaştırması

Şekil 4.3.'da gösterildiği gibi MWM testinin 6. gününde, sülfite verilen S100 ($9,86 \pm 1,14$ cm/sn) ve S260 ($10,32 \pm 1,77$ cm/sn) gruplarının ortalama hız değerlerinin, sülfite almayan K ($4,76 \pm 1,14$ cm/sn) grubuna göre anlamlı seviyede arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Probe trial ortalama hız verileri * $p < 0.05$ K ile S100 karşılaştırması, # $p < 0.05$ K ile S260 karşılaştırması

Çalışmamızda, sıçanların MWM testinin 6. Gününde, yani kaçış platformunun kaldırıldığı deney gününde, önceden platform bulunan kadrana (hedef kadrana) giriş sıklıkları (frekans) değerlendirilmiştir. Mevcut verilerle yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, K grubunun ($3,17 \pm 0,87$) hedef kadrana giriş frekansının, sülfite alan S100 ($1,42 \pm 0,33$) ve S260 ($1,31 \pm 0,32$) gruplarından anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Probe trial için hedef kadrana giriş sıklıkları * $p < 0,05$ K ile S100 karşılaştırması
$p < 0,05$ K ile S260 karşılaştırması

4.2. Açık Alan Testi Bulguları

Açık alan testinde sıçanların girdiği kare sayısı, toplam yol ve ortalama hız verileri değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.1.'de sunulmuştur. S100 ve S260 grubu sıçanların girdikleri kare sayısı K grubu ile karşılaştırıldığında, S260 grubunun K grubuna göre anlamlı seviyede arttığı, diğer sülfite grubu olan S100 grubunda ise K grubuna göre artış gözlenirse de istatistiksel analizlerde gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. Açık alana bırakılan sıçanların aldıkları toplam yol ve ortalama hızları değerlendirildiğinde sülfite alan grupların K grubuna göre anlamlı derecede daha fazla yol katettikleri ve hızlarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

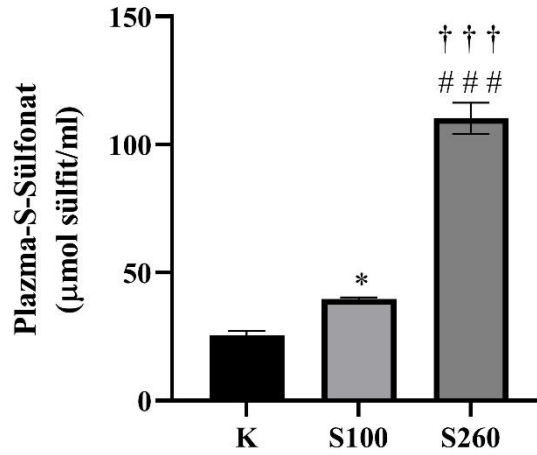
Tablo 4.1. Açık alan testinde deney gruplarının girilen kare sayısı, kat ettikleri toplam yol ve ortalama hızları

Grup	Girilen Kare Sayısı	Toplam Yol (cm)	Ortalama Hız (cm/dk)
K	39 ± 5,24	878,73 ± 26,80	197,8 ± 11,22
S100	49 ± 5,97	1049,95 ± 53,56 *	260,2 ± 14,72 *
S260	62 ± 7,60 #	1061,43 ± 43,48 #	305,5 ± 18,28 ##

*p<0.05 K ile S100 karşılaştırması, #p<0.05 K ile S260 karşılaştırması ##p<0.01 K ile S260 karşılaştırması

4.3. Plazma-S-Sülfonat Bulguları

Deney gruplarının plazma S-sülfonat düzeyleri değerlendirildiğinde S100 (39,68±0,70 µmol/ml) ve S260 gruplarına (110,28±6,05 µmol/ml) sülfite verildiği için beklendiği şekilde, sülfitin metabolizması sonucu açığa çıkan S-sülfonat düzeyinin hem S100 hem de S260 gruplarında K grubuna göre (25,45±1,71 µmol/ml) anlamlı seviyede arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, 260 mg/kg verilen S260 grubunun S-sülfonat düzeyi daha düşük dozda sülfite uygulanan S100 grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Grupların Plazma-s-sülfonat seviyeleri *p<0,05 K-S100 karşılaştırması, ###p<0,001 K-S260 karşılaştırılması, †††p<0,001 S100-S260 karşılaştırılması.

4.4. Araşidonik Asit Bulguları

Grupların araşidonik asit düzeyleri değerlendirildiğinde sülfite verilen S100 ve S260 gruplarının K grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu (*p<0,05) saptanmıştır (Tablo 4.2.).

4.5. COX-2 Bulguları

Tablo 4.2.'de gösterilen hipokampus dokusundaki COX-2 enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde K grubu ile S100 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, S260 grubunun COX-2 enzim aktivitesinin hem S100 hem de K grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.6. PGE₂ Bulguları

Hipokampus dokularında PGE₂ düzeyleri değerlendirildiğinde, S260 grubunun PGE₂ düzeyinin hem S100 hem de K grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiş olup, S100 grubunun PGE₂ düzeyinde K grubuna göre bir miktar artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2.).

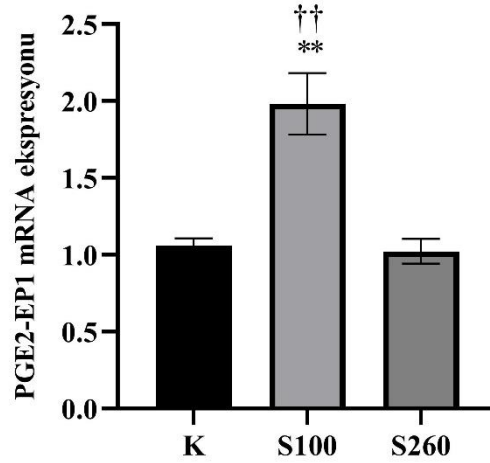
Tablo 4.2. Deney gruplarının hipokampus dokularında ölçülen araşidonik asit düzeyi, COX-2 aktivitesi ve PGE₂ seviyesi.

Grup	Araşidonik Asit (µg/ml)	COX-2 (nmol/ml/dk)	PGE ₂ (µg/g protein)
K	176,74±11,61	2,36±0,70	114,1±12,50
S100	217,82±10,62*	3,57±0,92	129,1±7,43
S260	241,34±8,51#	7,43±0,69 #†	182,6±15,19 #†

*p<0.05 K ile S100 karşılaştırması, #p<0.05 K ile S260 karşılaştırması †p<0,05 S100 ile S260 karşılaştırması.

4.7. PGE₂ Reseptör Subtipi Ekspresyon Analizi

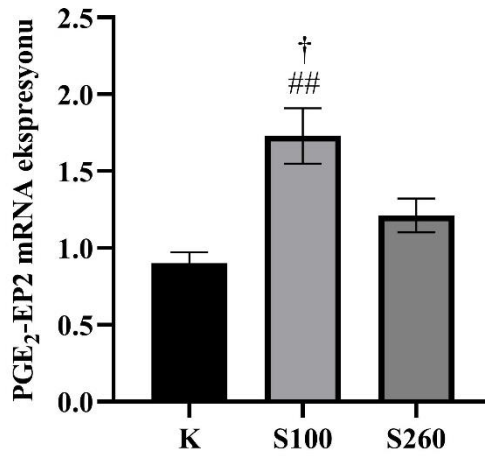
Grupların hipokampus dokusunda RT-PCR yöntemiyle yapılan analizde PGE₂'nin EP1 reseptör ekspresyonunun S100 (1,98±0,21) grubunda kontrole göre arttığı ancak S260 (1,02±0,08) grubunda kontrol (1,06±0,05) grubuyla aynı düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Sülfite grupları kendi içinde karşılaştırıldığında S260 grubunda S100 grubuna göre EP1 ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır. EP1 mRNA ekspresyon düzeyleri şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Hipokampus dokusunda PGE₂-EP1 reseptörünün mRNA ekspresyon düzeyleri

** p<0,01 K ile S100 karşılaştırılması. ††p<0,01 S100 ile S260 karşılaştırılması.

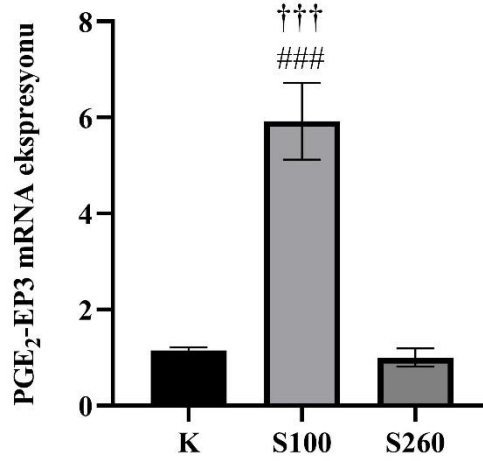
Hipokampus dokusunda EP2 mRNA ekspresyon düzeyleri şekil 4.7.'de verilmiştir. PGE₂'nin EP2-mRNA ekspresyonunun S100 (1,7±0,18) grubunda kontrole göre (0,9±0,07) arttığı ancak S260 (1,2±0,11) grubu kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Sülfid grupları kendi içinde karşılaştırıldığında S260 grubunda S100 grubuna göre EP2 ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır.



Şekil 4.7. Hipokampus dokusunda PGE₂-EP2 reseptörünün mRNA ekspresyon düzeyleri

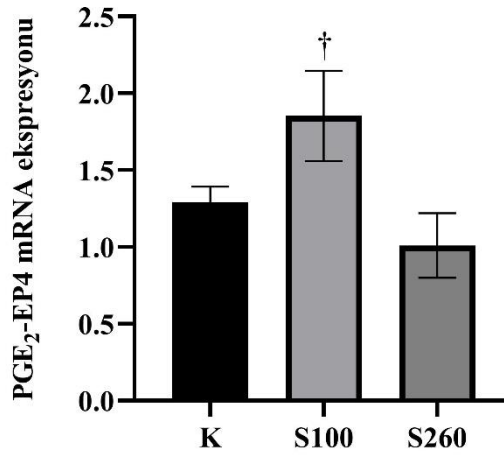
†p<0,05 S100 ile S260 karşılaştırılması, ##p<0,01 K ile S100 karşılaştırılması.

Hipokampus dokusunda EP3 mRNA ekspresyon düzeyleri şekil 4.8.'de verilmiştir. PGE₂'nin EP3-mRNA ekspresyonunun S100 (5,92±0,81) grubunda, kontrol (1,15±0,06) ve S260 (0,99±1,19) grubuna göre arttığı ancak S260 ve kontrol grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. Hipokampus dokusunda PGE₂-EP3 reseptörünün mRNA ekspresyon düzeyleri
###p<0.001 K ile S100 karşılaştırılması, †††p<0,001 S100 ile S260 karşılaştırılması.

Hipokampus dokusunda PGE₂'nin reseptörü olan EP4 mRNA ekspresyon düzeyleri şekil 4.9.'da verilmiştir. K (1,29±0,99) grubunun EP4-mRNA ekspresyon düzeyi hem S100 (1,85±0,29) hem de S260 (1,00±0,21) grupları ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür. Bunun yanı sıra sülfid verilen gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise S260 grubunun EP4 mRNA ekspresyon düzeyinin S100 grubuna göre azaldığı saptanmıştır.



Şekil 4.9. Hipokampus dokusunda PGE₂-EP4 reseptörünün mRNA ekspresyon düzeyleri
†p<0.05 S100 ile S260 karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Sülfite, bir gıda katkı maddesi olarak kullanılmaya başlandıktan sonra, olası yan etkileriyle ilgili tartışmalara neden olmuş ve literatürde sülfite etkilerini araştırmak üzere farklı dozlardaki sülfite değerleriyle yapılan çalışmalar rapor edilmeye başlanmıştır (Simon, 1986; Atkinson ve ark. 1993). Til ve ark. (Til ve ark. 1972) 72 mg/kg/gün dozunda sülfite maruziyetinin olumsuz yan etkileri olmadığını ileri sürmüşlerdir. Bunun üzerinde WHO, bu değerin üzerine 100 katlık bir güvenlik faktörü ekleyerek günlük 0,7 mg/kg sülfite alımının güvenli olduğunu açıklamıştır (JEFCA, 2000). Daha sonra yapılan doz bağımlı sülfite çalışmalarında ise sülfite içerikli ürünlerin tüketilmesiyle, bu güvenli dozun üzerine çıkılabileceği ve yüksek düzeyde sülfite alımının toksik etkilere neden olabileceği ileri sürülmüştür (Gunnison ve ark. 1987; Lester, 1995). Örneğin, yüksek sülfite içeriğine sahip bir lokanta öğünü tüketildiği zaman ortalama 93 mg sülfite alınmış olmaktadır (Taylor ve ark. 1985). Gıdalarla tüketilen sülfite miktarı toplumların yeme alışkanlıklarına göre farklılıklar göstermekte olup, Avustralya’da 25-63 yaş arasında günlük sülfite tüketiminin güvenli sınırın 14 katı, İngiltere’de 16-64 yaş aralığında alınan günlük sülfite düzeyinin güvenli dozun 24 katı, 1.5-4.5 yaş aralığında ise 110 katı olduğu rapor edilmiştir (Vandevijvere ve ark. 2010). Yeme alışkanlığına bağlı bu farklılıklar göz önünde bulundurularak 10, 25, 75, 100 ve 260 mg/kg/gün sülfite maruziyetlerinin nörotoksik etkilerini araştıran çokça çalışma yapılmıştır (Derin ve ark. 2009; Ozturk ve ark. 2011; Kencebay ve ark. 2013; Noorafshan ve ark. 2013). Literatürde yer alan bilgilerin ışığında, çalışmamızda nörotoksik etkileri rapor edilen 100 ve 260 mg/kg/gün dozundaki sülfite maruziyetlerinin etkilerini araştırdık.

Plazma S-sülfonat, plazma proteini ile kompleks oluşturan S-sülfonattan (R-S-SO₃⁻), SO₃⁻²’nin çeşitli kimyasal reaksiyonlarla koparılması ve farklı reaktiflerle ölçülebilir hale gelmesiyle düzeyi saptanan ve sülfite alımının göstergesi olarak değerlendirilen bir parametredir (Gunnison ve Palmes, 1978). Gunnison ve Palmes (Gunnison ve Palmes, 1973) yaptıkları çalışmada sülfite içeren içme suyu ile beslenen tavşanların kanında S-sülfonatin maruz kalma süresi boyunca arttığını, sülfite uygulanmasının bırakılmasıyla plazma S-sülfonat değerlerinin düştüğünü rapor etmişlerdir. Ekibimiz tarafından yapılan araştırmalarda sıçanlara gavaj yoluyla 35 gün boyunca 100 mg/kg ve 260 mg/kg sülfite verilmiş ve sıçanların plazma-S-sülfonat

değerlerinde artış olduğu tespit edilmiştir (Ozturk ve ark. 2011; Kencebay ve ark. 2013). Çalışmamızda da bu literatür bilgilerini destekler nitelikte sülfite verilen grupların, plazma S-sülfonat düzeylerinin sülfite verilen her iki grupta da (S100 ve S260), kontrol grubundan yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda 260 mg/kg sodyummetabisülfite uygulanan grubun plazma S-sülfonat düzeyinin S100 grubundan anlamlı oranda yüksek olduğu tespit edilmiş olup, bu veri bize maruz kalınan sülfite dozu arttıkça sülfitin kandaki göstergesi olan plazma S-sülfonatın da arttığını göstermiştir.

Ekimiz tarafından yapılan çalışmalarda 100 ve 260 mg/kg/gün dozunda gavajla verilen sülfite, lipid peroksidasyon için gösterge olan TBARS ve 4-HNE seviyelerinde artışa neden olduğu (Ozturk ve ark. 2011), 100 mg/kg/gün sülfite maruziyetinin beyin dokusunda nöronal apoptozis sürecinde rol alan kaspaz-3 düzeylerini ve DNA fragmentasyonlarını gösteren TUNEL pozitif hücre sayılarını artırarak nörodejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir (Kencebay ve ark. 2013). Sülfite bilinen bu nörodegeneratif etkilerine bağlı öğrenme ve hafıza değişiklikleri olup olmadığı merak konusu olmuştur. Nitekim, Küçükata ve ark. (Küçükata ve ark. 2005) 25 mg/kg/gün sülfite alımının, aktif sakınma testlerinde uzun süreli bellek bozulmalarına neden olmadığını ancak SOX eksikliği olan sıçanlara aynı dozda uygulanan sülfite bağlı aktif sakınma öğrenmesinde bozulmanın olduğunu ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde Ozsoy ve ark.'da erişkin sıçanlarla (Ozsoy ve ark. 2012) ve yaşlı sıçanlarla (Ozsoy ve ark. 2017), güvenli kabul edilen 25 mg/kg/gün sülfite dozuyla yaptıkları çalışmalarda aktif sakınma testiyle sıçanların öğrenmelerini değerlendirdiklerinde, herhangi bir öğrenme bozukluğuna yol açmadığını ifade etmişlerdir. Buna karşın 2013 yılında Noorafshan ve ark. (Noorafshan ve ark. 2013) 25 mg/kg/gün dozundaki sülfite alımının öğrenme üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, sülfite radyal kollu labirent testinde uzaysal öğrenme ve hafıza bozukluklarına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Biz literatürde mevcut olan farklı verileri dikkate alarak uzaysal öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için MWM testini kullandık. Uzaysal ipuçlarına bağlı yer araştırma yöntemi için tipik bir deneysel paradigma olan MWM testiyle hipokampus bağımlı uzaysal öğrenme ve hafıza ölçülmekte olup (Morris ve ark. 1982), bu test hipokampus lezyonlarına duyarlıdır (Jessberger ve ark. 2009). Wang ve ark. (Wang ve ark. 2017) nörotoksik etkileri bilinen karbon disülfite uygulanan sıçanları MWM testine almışlar ve 4

günlük eğitim süresi boyunca kaçış platformunun olduğu kadrana ulaşma süresini değerlendirdiklerinde karbon disülfid uygulanan sıçanlarda sürenin uzadığını rapor etmişlerdir. Bizim projemizde ise MWM testinde grupların 5 günlük eğitim süreci boyunca navigasyon test performansları değerlendirildiğinde, kaçış platformunu bulma süresinin nörotoksik etkileri bilinen sülfid verilen gruplarda yüksek olduğu fakat bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiş ve bu durum sülfite bağlı olarak uzaysal öğrenmenin kısmen bozulduğu şeklinde değerlendirilmiştir. MWM testinde son gün probe trial olarak tanımlanmakta ve sıçanların uzaysal hafızası değerlendirilmektedir (Wang ve ark. 2017). Wang ve ark. (Wang ve ark. 2017) yapmış oldukları çalışmada nörotoksik etkileri bilinen karbon disülfid verdikleri sıçanlarda hedef kadranda geçirilen sürenin ve hedef kadrandan geçme sayısının azaldığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde MWM testinin 6. gününde uzaysal hafızanın değerlendirilmesinde önemli olan hedef kadrana giriş frekansının sülfid uygulanan gruplarda belirgin olarak azalması, sülfidin neden olduğu nörotoksisiteye bağlı öğrenme ve hafızanın bozulduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Nitekim Akdoğan ve ark. (Akdoğan ve ark. 2011) yaptıkları araştırmada 8 hafta boyunca, 25 mg/kg/gün dozunda sülfid uygulamışlar ve sıçanların hipokampuslarının histolojik incelemesinde CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde piramidal nöron kaybının olduğunu rapor etmişlerdir. Probe trialde ortalama hız ve alınan yol değerlendirildiğinde ise sülfid verilen gruplarda kontrole göre artış olduğu saptanmış olup, sıçanların bu süreçte hedef kadrandan geçme sayıları azalmışken hız ve yolun artışı hayvanların uzaysal ipuçlarına dikkat etmeksizin platformu aramaları olarak değerlendirilmiş olup, bu durum sülfid verilen sıçanların lokomotor aktivitelerinin artışı ile de ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Locomotor hiperaktivite nörotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılan serebral disfonksiyon ve nörolojik bozukluklarla ilgili bilgi veren önemli bir parametredir (Artigas, 2013; Quines ve ark. 2014). Quines ve ark. gıda katkı maddesi olarak kullanılan monosodyum glutamat maruziyetinin sıçanlarda lokomotor aktivite artışına neden olduğunu ve bu artışa serebral kortekste serotoninin alımında yükselme ile Na^{+}/K^{+} -ATP-az aktivitesindeki azalmanın eşlik ettiğini göstermiştir (Quines ve ark. 2016). Nitekim daha önce tamamladığımız tez çalışmasında sülfite bağlı olarak hiperaktivite artışının olduğu saptanmıştır (Topak, 2017). Bir diğer çalışmamızda ise 100 mg/kg sülfite 35 gün maruz kalan sıçanlarda açık alan testinde hem alınan yolun hem de hızın arttığı tespit edilmiştir (Basaranlar ve ark. 2019). Mevcut çalışmamızda da bu

çalışmalarımızı destekler nitelikte, açık alan testinde sülfite verilen sıçanların almış oldukları yol ve ortalama hız değerlerinin kontrole göre yüksek olduğu saptanmıştır. Yee (Yee, 1999) yapmış olduğu araştırmada, medial prefrontal korteksin sitotoksik ajanlarla haraplanmasının hiperaktiviteye yol açtığını göstermiştir. Sülfite bağlı lokomotor aktivite artışı Yee tarafından belirtilen medial prefrontal korteks haraplanması ile ilişki olabilir. Bu nedenle lokomotor aktivite artışına yol açan mekanizmalar sülfite ile ilgili süreçlerde de etkin olabileceğinden lokomotor aktivite ile ilişkili prefrontal korteksin sülfite verilen sıçanlarda da araştırılması planlanmaktadır.

Santral sinir sistemi doymamış yağ asitleri özellikle AA ve dokosaheksaenoik asit düzeyleri açısından zengin olup, bu doymamış yağ asitleri serbest oksijen radikalleri tarafından peroksidasyona duyarlıdır ve bu süreç AA'dan 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) ve DHA'dan 4-hidroksiheksanal oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Yang ve ark. 2019). Ekibimiz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda 100 ve 260 mg/kg/gün sodyummetabisülfite verilen sıçanlarda total beyin dokusunda hem 4-HNE düzeyinin ve hem de TBARS düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Ozturk ve ark. 2011; Kencebay ve ark. 2013). 100mg/kg sülfite maruziyetinin rat karaciğer dokusunda AA ve dokosaheksaenoik asit düzeylerini arttırdığı rapor edilmiştir (Ercan ve ark. 2015). Mevcut çalışmamızda da bu veriler ışığında hipokampus dokusunda AA düzeyinin arttığı tespit edilmiş olup, bu durum daha önceki çalışmalarımızda arttığını tespit etmiş olduğumuz 4-HNE artışı ile ilişkili olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Öte yandan, Beck-Speier ve ark. (Beck-Speier ve ark. 2003) pH 7'de sülfitin cPLA2 aktivitesini iki kat artırdığını göstermişlerdir. Bizim önceki çalışmamızda da Beck-Speier ve ark. çalışmasını destekler nitelikte cPLA2 aktivitesinin 100 mg/kg sodyum metabisülfite uygulaması sonrasında arttığını tespit etmiştik (Basaranlar ve ark. 2019). Bir diğer yayıнымızda ise 100mg/kg sülfite verilen sıçanların beyin dokusunun Western Blot analizinde sPLA2 enzim düzeyinin arttığını rapor etmiştik (Kencebay ve ark. 2013). Bilindiği üzere santral sinir sisteminde membran fosfolipidlerinden PLA2 enzimleri aracılığıyla AA ortaya çıkmakta (Yang ve ark. 2019) ve cPLA2 enzimi ROS üretimine ve oksidatif stres gelişimine katılmaktadır (Shelat ve ark. 2008). Mevcut çalışmamızda sülfite verilen gruplarda AA düzeyinin artması, geçmiş literatür bilgileri ışığında hem oksidatif stres artışı hem de sPLA2 ve cPLA2 aktivitelerindeki artış ile ilişkilendirilmiştir.

Serbest AA siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri için substrat olup, COX-1/COX-2 enzimleri tarafından PGH₂'ye dönüştürülür (Yang ve ark. 2019). Vücudun pek çok organında COX-2 enzimi ya yoktur ya da az bulunmakla birlikte memeli beyinde önemli düzeyde COX-2 mRNA ekspresyonunun olduğu rapor edilmiştir (Feng ve ark. 1993). Bu nedenle çalışmamızda hipokampus dokusunda AA düzeyinde meydana gelen artışa bağlı olarak COX-2 enzim aktivitesinin sülfid verilen gruplarda arttığı özellikle 260 mg/kg sülfid dozunda meydana gelen aktivite artışının anlamlı olduğunu tespit ettik. Ekibimiz tarafından yapılan bir başka çalışmada ise günlük 260 mg/kg sülfid alımının, inflamasyon durumlarında arttığı bilinen beyinde COX-2 ekspresyon seviyelerinin yükselmesine neden olduğunu ve bu etkinin sülfid toksisitesine bağlı nörodejenerasyon ile ilgili olabileceğini rapor etmiştik (Derin ve ark. 2017). COX-2 aktivitesinin artması sitokinler, büyüme faktörleri, tümör nekrozis faktör, bakteriyel endotoksin ve diğer toksik ajanlarla ilişkili olabilir (Milatovic ve ark. 2011). Öte yandan 100mg/kg dozda COX-2 enzim aktivitesinde anlamlı değişikliğin olmaması AA artmış olsa dahi mevcut AA lipooksijenaz ve sitokrom P450 epoksijenaz yoluyla eikosanoidlere dönüştürülmüş olabileceği veya 4-HNE'ye perokside olduğu şeklinde değerlendirilmiştir (Strauss, 2008). Bu nedenle gelecekte yapılacak çalışmalarda, sülfidin farklı dozlarında AA'yı substrat olarak kullanan diğer enzimlerin hipokampus ve beyin dokusundaki aktivitelerinin ve düzeylerinin analiz edilmesi planlanmıştır.

COX-2 aracılı prostaglandin ürünleri ölüm sonrası insan beyinde orta seviye konsantrasyonlarda bulunmuştur (Ogorochi ve ark. 1984). COX-2 aracılı prostaglandinler vücut sıcaklığının regülasyonu (Saper ve Breder, 1992) ve hipokampal uzun süreli güçlenme (Nishizaki ve ark. 1999) gibi birçok beyin fonksiyonuna aracılık etmektedir. Birçok nörodejeneratif hastalığın yanı sıra özellikle nörotoksositeye bağlı nöronal hasarda da COX-2 aracılı üretilen PGE₂ sentezinin arttığı gösterilmiştir (Xu ve ark. 2003; Choi ve ark. 2009). Bizim çalışmamızda da COX-2 aktivite düzeylerine benzer şekilde sülfid verilen gruplarda hipokampus PGE₂ düzeylerinde artış olduğu fakat sadece 260 mg/kg sülfid dozunda istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir. Çalışmalarımızda ifade ettiğimiz gibi sülfid nörotoksik bir ajandır, bizim hipokampusta saptamış olduğumuz PGE₂ artışı, nörotoksik ajan maruziyetine bağlı PGE₂ artışını rapor eden çalışmaları destekler niteliktedir.

PGE₂ reseptörleri endotel hücrelerinde, mikroglialarda, astrositlerde ve nöronlarda saptanmış, (Cimino ve ark. 2008; Carlson ve ark. 2009) hipokampusta ise PGE₂ reseptörlerinin dört subtipi de ekspere edilmiştir (Zhu ve ark. 2005). Serebral iskemi modellerinde ve eksitotoksisitede gözlenen EP2'nin koruyucu etkisinin aksine, EP1 reseptörünün geninin inaktivasyonu veya farmakolojik inhibisyonunun orta serebral arter (MCA) oklüzyonu, oksijen glukoz yoksunluğu ve eksitotoksitenin neden olduğu beyin hasarını iyileştirdiği rapor edilmiştir (Kawano ve ark. 2006; Carlson ve ark. 2009; Andreasson, 2010). Yapılan başka bir araştırmada ise PGE₂'nin EP2 aracılığıyla, serebral iskemi sonrasında bağışıklık tepkisine katıldığı ve EP2 reseptör ekspresyonunun iskemik hemisferdeki nöronlarda yüksek oranda arttığı tespit edilmiştir (Liu ve ark. 2019). Ahmad ve ark. (Ahmad ve ark. 2007) orta serebral arter oklüzyonu iskemi modelinde ise EP3 reseptörünün farmakolojik stimülasyonu ile infarkt alanının arttığını rapor etmişlerdir. Diğer taraftan EP4 reseptörünün EP2 reseptörüne benzer şekilde Gs proteini üzerinden cAMP, PKA yolağını kullanarak etki gösterdiği ve beyin hastalıkları ve nörotoksisitede EP4 reseptör aktivitesindeki artışın tedavi edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Shi ve ark. 2010). Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda sülfitin toksik etkilerinin hangi PGE₂ reseptör subtipleri üzerinden oluştuğu sorusuna cevap aranmıştır. Veriler değerlendirildiğinde 100 mg/kg/gün dozunda sülfite verilen gruplarda nörotoksik etkiye katkıları olduğu bilinen EP1 ve EP3 reseptörlerinin mRNA ekspresyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı seviyede artış olması, PGE₂ EP1 ve EP3 reseptörlerine toksik süreçlere aracılık ettiklerini gösteren ilgili literatür çalışmalarıyla uyumlu görünmektedir. Aynı sülfite dozunda EP2 ve EP4 reseptörlerinin mRNA ekspresyonlarının da EP1 ve EP3 kadar yüksek olmasa da artmış olduğu saptanmış olup, EP2 ve EP4 reseptörlerinin nörotoksisiteye ve iskemiyeye karşı koruyucu etkisinin olduğunu gösteren çalışmaları destekler niteliktedir. Dolayısıyla sülfite maruziyetine bağlı olarak tüm reseptör subtiplerinde ekspresyon artışı sülfitin nörotoksik etkilerine PGE₂'nin EP1 ve EP3 reseptörlerinin katkısı olduğu ancak hipokampal EP2 ve EP4 ekspresyon artışının ise mevcut toksik etkiye karşı koruyucu etki ortaya çıkarmak olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda 100 mg/kg sülfite maruziyetinde reseptör ekspresyonları artarken PGE₂ düzeyinde artış olmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. McCullough ve ark. (McCullough ve ark. 2004) yapmış oldukları çalışmada bizim mevcut verimizi destekler nitelikte veri sunmuşlar ve in vitro hipokampal nöronlarda ve organotipik hipokampal kesitlerinde oluşturulan NMDA toksisitesi ve oral glukoz

yoksunluğu paradigmalarında EP2 reseptör aktivasyonunun nöroprotektif olduğunu ancak EP1'in toksik ve EP2'nin protektif aktivitelerinde PGE₂ stimülasyonunun katkısının olmadığını rapor etmişlerdir. Akut glutamat toksisite modellerinde, EP2'nin protektif etkisi PKA inhibisyonu ile tersine çevrildiğini ve nöronal EP2 aracılı korumanın cAMP sinyal yolağına bağlı olduğunu göstermişlerdir (McCullough ve ark. 2004). Dolayısıyla 100 mg/kg sülfid dozunda PGE₂ düzeyinde önemli bir artış görülmezken PGE₂ reseptör düzeylerindeki artış McCullough ve ark. rapor ettiği gibi bu reseptörlerin aktivasyonuna PGE₂'nin katkı sunmaması ile açıklanabilir. Öte yandan Deng ve ark. (Deng ve ark. 2020) rat retinasında iskemi reperfüzyon modeli uygulamışlar ve iskemi reperfüzyonun birinci gününde COX-2 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığını fakat PGE₂ reseptör düzeylerinde anlamlı bir artış olmadığını tespit etmişlerdir. Bu veri, bizim çalışmamızda da sülfid 260 mg/kg uygulandığı grupta COX-2 aktivitesi belirgin olarak artmış ancak PGE₂ EP1, EP2, EP3, EP4 reseptörlerinin mRNA ekspresyonlarının artmadığı sonucu ile benzerdir. Mevcut verimiz COX-2 ve PGE₂ artışının reseptör ekspresyonlarına katkı sunmadığını rapor eden McCullough'un verisini de desteklemektedir. COX-2 ve PGE₂ artışının nöronal hücre ölümü, apoptozis, protein denatürasyonu gibi pek çok patolojik sürece katkı sunduğu göz önünde bulundurulduğunda COX-2 aktivitesinde ve PGE₂ düzeyinde artışa bağlı olarak PGE₂ reseptörlerinin ve bu reseptörleri üzerinde bulunduran nöronlarda bu sülfid dozunda nöronal ölümün gerçekleşmesi ile ilişkili olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda 100 ve 260 mg/kg sülfid maruziyetinin öğrenme ve hafıza bozukluklarına neden olduğu, hipokampal COX-2, PGE₂ sinyal yolağının özellikle yüksek dozda bu sürece katkı sunduğu ortaya konmuştur. PGE₂ reseptörlerinin ise sülfidin etkilerine karşı hem nöroprotektif hem de nörotoksik süreçlere katkı sunabileceği ancak bu sürecin tam anlamıyla değerlendirilebilmesi için PGE₂ reseptör tipleri ile ilişkili hücre içi sinyal yolağının gelecek çalışmalarda ayrıntılı olarak çalışılması planlanmıştır.



KAYNAKLAR

- Ağar A, Küçükataş V, Yargıçoğlu P, Aktekin B, Kipmen-Korgun S, Gümüşlü D, Apaydin C. The effect of sulfur dioxide inhalation on visual evoked potentials, antioxidant status, and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic rats. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2000;39(2): 257-264.
- Ahmad AS, Ahmad M, de Brum-Fernandes AJ, Doré S. Prostaglandin EP4 receptor agonist protects against acute neurotoxicity. *Brain Res*. 2005;1066(1-2): 71-77.
- Ahmad AS, Saleem S, Ahmad M, Doré S. Prostaglandin EP1 receptor contributes to excitotoxicity and focal ischemic brain damage. *Toxicol Sci*. 2006;89(1): 265-270.
- Ahmad M, Ahmad AS, Zhuang H, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. Stimulation of prostaglandin E2-EP3 receptors exacerbates stroke and excitotoxic injury. *J Neuroimmunol*. 2007;184(1-2): 172-179.
- Akdogan I, Kocamaz E, Kucukatay V, Yonguc NG, Ozdemir MB, Murk W. Hippocampal neuron number loss in rats exposed to ingested sulfite. *Toxicol Ind Health*. 2011;27(9): 771-778.
- Alloway TP, Alloway RG. Investigating the predictive roles of working memory and iq in academic attainment. *J Exp Child Psychol*. 2010;106(1): 20-29.
- Amano H, Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Maruyama T, Sugimoto Y. Host prostaglandin E2-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med*. 2003;197(2): 221-232.
- Andersen P, Amaral D, O'Keefe J, Morris R. *The hippocampus book*. Oxford University Press. 1st ed. USA; 2007.
- Andreasson K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2010;91(3-4): 104-112.
- Anglada-Huguet M, Vidal-Sancho L, Giralt A, Barriga GG-D, Xifro X, Alberch J. Prostaglandin E2 EP2 activation reduces memory decline in R6/1 mouse model of huntington's disease by the induction of bdnf-dependent synaptic plasticity. *Neurobiol Dis*. 2016;95: 22-34.
- Anglada-Huguet M, Xifró X, Giralt A, Zamora-Moratalla A, Martín ED, Alberch J. Prostaglandin E2 EP1 receptor antagonist improves motor deficits and rescues memory decline in R6/1 mouse model of huntington's disease. *Mol Neurobiol*. 2014;49(2): 784-795.
- Artigas F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther*. 2013;137(1): 119-131.
- Atkinson DA, Sim TC, Grant JA. Sodium metabisulfite and SO2 release: An under-recognized hazard among shrimp fishermen. *Ann Allergy*. 1993;71(6): 563-566.

Bailey S, Rapson T, Johnson-Winters K, Astashkin AV, Enemark JH, Kappler U. Molecular basis for enzymatic sulfite oxidation how three conserved active site residues shape enzyme activity. *J Biol.* 2009;284(4): 2053-2063.

Balboa MA, Varela-Nieto I, Killermann Lucas K, Dennis EA. Expression and function of phospholipase A(2) in brain. *FEBS Lett.* 2002;531(1): 12-17.

Basaranlar G, Derin N, Kencebay Manas C, Tanriover G, Aslan M. The effects of sulfite on cPLA2, caspase-3, oxidative stress and locomotor activity in rats. *Food Chem Toxicol.* 2019;123: 453-458.

Baud O, Laudénbach V, Evrard P, Gressens P. Neurotoxic effects of fluorinated glucocorticoid preparations on the developing mouse brain: role of preservatives. *Pediatr Res.* 2001;50(6): 706-711.

Beard Jr EL. The american society of health system pharmacists. JONA'S healthcare law, ethics and regulation. 2001;3(3): 78-79.

Beck-Speier I, Dayal N, Denzlinger C, Haberl C, Maier K. L, Ziesenis A, Heyder J. Sulfur-related air pollutants induce the generation of platelet-activating factor, 5-lipoxygenase-and cyclooxygenase-products in canine Lipid M. 2003;71(3-4): 217-234.

Bergström S, Danielsson H, Samuelsson B. The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32. *Biochim Biophys Acta.* 1964;90: 207-210.

Best JD, Berghmans S, Hunt JJ, Clarke SC, Fleming A, Goldsmith P, Roach AG. Non-associative learning in larval zebrafish. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(5): 1206-1215.

Blaker AL, Yamamoto BK. Methamphetamine-Induced Brain Injury and Alcohol Drinking. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2018;13(1): 53-63.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993;361(6407): 31-39.

Bliss TV, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physical.* 1973;232(2): 331-356.

Blom HJ, Boers G, Van Den Elzen J, Gahl WA, Tangerman A. Transamination of methionine in humans. *Clin Sci.* 1989;76(1): 43-49.

Bortolanza M, Padovan-Neto FE, Cavalcanti-Kiwiatkoski R, Dos Santos-Pereira M, Mitkovski M, Raisman-Vozari R, Del-Bel E. Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1672): 20140190.

Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(40): 14515-14520.

Brown GK, Scholem RD, Croll HB, Wraith JE, McGill JJ. Sulfite oxidase deficiency: clinical, neuroradiologic, and biochemical features in two new patients. *Neurology*. 1989;39(1): 252-257.

Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*. 2009;50: 237-242.

Cantley L. Signal Transduction. In: Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology a cellular and molecular approach*. 3th. Philadelphia: Elsevier; 2012, p:47-72.

Carlson NG, Rojas MA, Black JD, Redd JW, Hille J, Hill KE, Rose JW. Microglial inhibition of neuroprotection by antagonists of the EP1 prostaglandin E2 receptor. *J Neuroinflammation*. 2009;6(1): 5.

Cecil R. Intramolecular bonds in proteins. I. The role of sulfur in proteins. In *The proteins, composition, structure, and function v1*. 2nd ed. Academic Press, New York; 1963, p: 379-476.

Chang SH, Ai Y, Breyer RM, Lane TF, Hla T. The prostaglandin E2 receptor EP2 is required for cyclooxygenase 2-mediated mammary hyperplasia. *Cancer Res*. 2005;65(11): 4496-4499.

Chen C, Bazan NG. Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2005;93(2): 929-941.

Chen C, Magee JC, Bazan NG. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol*. 2002;87(6):2851-2857.

Chen SY, Lin MC, Tsai JS, He PL, Luo WT, Herschman H, Li HJ. EP4 Antagonist-Elicited Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells Rescue Cognition/Learning Deficiencies by Restoring Brain Cellular Functions. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(7): 707-723.

Choi SH, Aid S, Bosetti F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(4):174-181.

Cimino PJ, Keene CD, Breyer RM, Montine KS, Montine TJ. Therapeutic targets in prostaglandin E2 signaling for neurologic disease. *Curr Med Chem*. 2008;15(19):1863-1869.

Clark JD, Schievella AR, Nalefski EA, Lin LL. Cytosolic phospholipase A2. *Journal of lipid mediators and cell signalling*. 1995;12(2-3): 83-117.

Connors BW. Synaptic transmission in the nervous system. In: Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology a cellular and molecular approach*. 3th. Philadelphia: Elsevier; 2012, p:307-333.

Cooke S, Bliss T. Plasticity in the human central nervous system. *Brain*. 2006;129(7): 1659-1673.

Cooper AJ. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:187-222.

Cowan N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res.* 2008;169: 323-338.

Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest.* 1994;93(3): 1095-1101.

Dalton-Bunnnow M. F. Review of sulfite sensitivity. *Am J Hosp Pharm.* 1985;42(10): 2220-2226.

DeCoster MA, Lambeau G, Lazdunski M, Bazan NG. Secreted phospholipase A2 potentiates glutamate-induced calcium increase and cell death in primary neuronal cultures. *J Neurosci Res.* 2002;67(5): 634-645.

Dehn MJ. Long-term memory problems in children and adolescents: Assessment, intervention, and effective instruction. John Wiley & Sons; 2010.

Deng C, Chen S, Li X, Luo H, Zhang Q, Hu P, Wang F, Xiong C, Sun T, Zhang X. Role of the PGE2 receptor in ischemia-reperfusion injury of the rat retina. *Mol Vis.* 2020;26: 36-47.

Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(5): 339-350.

Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Chem.* 1994;269(18): 13057-13060.

Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev.* 2015;15(8): 511-523.

Derin N, Akpınar D, Yargıoğlu P, Agar A, Aslan M. Effect of alpha-lipoic acid on visual evoked potentials in rats exposed to sulfite. *Neurotoxicol Teratol.* 2009;31(1): 34-39.

Derin N, Topak G, Korgun DK, Aslan M. The effects of different doses of ingested sulfite on the arachidonic acid pathway in the brain tissue. Meeting Abstract at the Acta Physiologica. 2017;221: 34-34.

Derin N, Yargıoğlu P, Aslan M, Elmas O, Agar A, Aicigüzel Y. The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health.* 2006;22(6): 233-240.

Dray F, Charbonnel B, Maclouf J. Radioimmunoassay of prostaglandins F α , E1 and E2 in human plasma. *Eur J Clin Invest.* 1975;5(4):311-318.

Dronkers N, Pinker S, Damasio A, Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. Health Professions Division. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2013

Du Z, Meng Z. Modulation of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by sulfur dioxide derivatives. *Brain Res*. 2004;1010(1-2):127-133.

Ercan S, Kencebay C, Basaranlar G, Ozcan F, Derin N, Aslan M. Induction of omega 6 inflammatory pathway by sodium metabisulfite in rat liver and its attenuation by ghrelin. *Lipids Health Dis*. 2015;14(1): 7.

Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. *J Mol Neurosci*. 2000;14(3): 123-135.

Feldman M, McMahon AT. Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity? *Ann Intern Med*. 2000;132(2): 134-143.

Feng L, Sun W, Xia Y, Tang W, Chanmugam P, Soyoola E, Hwang D. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: Differential regulation of their expression. *Arch Biochem*. 1993;307(2): 361-368.

Fitzpatrick F, Aguirre R, Pike J, Lincoln F. The stability of 13, 14-dihydro-15 keto-pge2. *Prostaglandins*. 1980;19(6): 917-931.

Forlenza OV, Mendes CT, Marie SK, Gattaz WF. Inhibition of phospholipase A2 reduces neurite outgrowth and neuronal viability. *Prostag Leukotr Ess*. 2007;76(1): 47-55.

Fujino H, Regan J. W. EP4 prostanoid receptor coupling to a pertussis toxin-sensitive inhibitory g protein. *Mol Pharmacol*. 2006;69(1): 5-10.

Fujino H, Xu W, Regan JW. Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. *J Chem*. 2003;278(14): 12151-12156.

Ganong WF. Review of medical physiology. Mcgraw-hill Education. 25th ed. Norwalk: Conn; 2016.

Gasmi S. Classic labyrinth test for neurobehavioral evaluation in wistar rats. *Bio-protocol*. 2018;8(18): 3007.

Ghafouri S, Fathollahi Y, Javan M, Shojaei A, Asgari A, Mirnajafi-Zadeh J. Effect of low frequency stimulation on impaired spontaneous alternation behavior of kindled rats in y-maze test. *Epilepsy research*. 2016;126: 37-44.

Graf P, Schacter DL. Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn*. 1985;11(3):501-518..

Gullis R, Rowe C. Stimulation of phospholipase A2 of synaptosomes of guinea-pig brain by noradrenaline and other amines. *Biochem Soc Trans*. 1973;1(4):849.

Gunnison AF, Jacobsen DW, Schwartz HJ. Sulfite hypersensitivity. A critical review. *Crit Rev Toxicol.* 1987;17(3): 185-214.

Gunnison AF, Palmes E. Persistence of plasma S-sulfonates following exposure of rabbits to sulfite and sulfur dioxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1973;24(2): 266-278.

Gunnison AF, Palmes E. Species variability in plasma S-sulfonate levels during and following sulfite administration. *Chem Biol Interact.* 1978;21(2-3): 315-329.

Güneş FE. Sülfidler ve aşırı duyarlılık reaksiyonları. *Clin Exp Health Sci.* 2014a; 4 (3): 173-181.

Güneş FE. Sülfidler ve gıda katkı maddesi olarak kullanılması. *Academic Food Journal.* 2014b; 12 (2): 114-119.

Haines DE. Fundamental neuroscience for basic and clinical applications e-book: With student consult online access: Elsevier Health Sciences. 5t ed. Philadelphia: PA Saunders, 2012.

Hao CM, Breyer M. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney Int.* 2007;71(11): 1105-1115.

Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 2002;23(3): 144-150.

Heafield MT, Fearn S, Steventon GB, Waring RH, Williams AC, Sturman SG. Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, parkinson's and alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1990;110(1-2): 216-220.

Hein AM, O'Banion MK. Neuroinflammation and memory: The role of prostaglandins. *Mol Neurobiol.* 2009;40(1): 15-32.

Heinrikson RL, Krueger ET, Keim PS. Amino acid sequence of phospholipase A2-alpha from the venom of crotalus adamanteus. A new classification of phospholipases A2 based upon structural determinants. *J Chem.* 1977;252(14): 4913-4921.

Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1299(1): 125-140.

Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(8): 1168-1173.

Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Yoshida N. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. *PNAS.* 1999;96(18): 10501-10506.

Hla T, Bishop-Bailey D, Liu C, Schaeffers H, Trifan O. Cyclooxygenase-1 and-2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(5): 551-557.

Honda T, Segi-Nishida E, Miyachi Y, Narumiya S. Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis *J Exp Med*. 2006;203(2): 325-335.

Hwang D, Byrne J, Scollard D, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *JNCI*. 1998;90(6): 455-460.

Irreverre F, Mudd SH, Heizer WD, Laster L. Sulfite oxidase deficiency: Studies of a patient with mental retardation, dislocated ocular lenses, and abnormal urinary excretion of S-sulfo-L-cysteine, sulfite, and thiosulfate. *Biochem Med*. 1967;1(2): 187-217.

JEFCA. Evaluation of certain food additives: Fifty-first report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. In Evaluation of certain food additives: Fifty-first report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives 2000; (pp. 168-168): World Health Organization.

Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, Clemenson GD, Consiglio A, Lie DC, Gage FH. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn Mem*. 2009;16(2): 147-154.

Johnson JL, Rajagopalan K. Human sulfite oxidase deficiency. Characterization of the molecular defect in a multicomponent system. *J Clin Invest*. 1976a;58(3): 551-556.

Johnson JL, Rajagopalan K. Purification and properties of sulfite oxidase from human liver. *J Clin Invest*. 1976b;58(3): 543-550.

Johnson JL, Waud WR, Rajagopalan K, Duran M, Beemer FA, Wadman SK. Inborn errors of molybdenum metabolism: Combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthine dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor. *PNAS*. 1980;77(6): 3715-3719.

Kabashima K, Saji T, Murata T, Nagamachi M, Matsuoka T, Segi E, Miyachi Y. The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin invest*. 2002;109(7): 883-893.

Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of langerhans cells. *Nat Med*. 2003;9(6): 744-749.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. Health Professions Division. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2013.

Kang KD, Rittenhouse KD, Osborne NN. The localization of PGE2 receptor subtypes in rat retinal cultures and the neuroprotective effect of the EP2 agonist butaprost. *Neurochem Int*. 2009;55(4): 199-207.

Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *BBA-Mol Cell Biol L*. 2015;1851(4): 414-421.

Kawano T, Anrather J, Zhou P, Park L, Wang G, Frys KA, Iadecola C. Prostaglandin E2 EP1 receptors: Downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med.* 2006;12(2): 225-229.

Kencebay C, Derin N, Ozsoy O, Kipmen-Korgun D, Tanrioer G, Ozturk N, Agar A. Merit of quinacrine in the decrease of ingested sulfite-induced toxic action in rat brain. *Food Chem Toxicol.* 2013;52: 129-136.

Kim D, Rordorf G, Nemenoff R, Koroshetz W, Bonventre J. Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A2 in brain cortical cultures. *Biochem J.* 1995;310(1): 83-90.

Kimball FA, Cornette JC, Bundy GL, Kirton KT. Plasma concentrations of 9-deoxy-16, 16-dimethyl-9-methylene-PGE2 in rhesus monkeys after administration by various routes. *Prostaglandins.* 1980;20(3): 559-569.

Kudo I, Murakami M, Hara S, Inoue K. Mammalian non-pancreatic phospholipases A2. *BBA- Lipid Met.* 1993;1170(3): 217-231.

Kunikata T, Yamane H, Segi E, Matsuoka T, Sugimoto Y, Tanaka S, Narumiya S. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol.* 2005;6(5): 524-531.

Küçükataç V, Ağar A, Yargıçoğlu P, Gümüşlü S, Aktekin B. Changes in somatosensory evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in experimental diabetes: Effect of sulfur dioxide. *Arch Environ Health Inter J* 2003;58(1): 14-22.

Küçükataç V, Savcıoğlu F, Hacıoğlu G, Yargıçoğlu P, Ağar A. Effect of sulfite on cognitive function in normal and sulfite oxidase deficient rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2005;27(1): 47-54.

Legler DF, Bruckner M, Uetz-von Allmen E, Krause P. Prostaglandin E2 at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(2): 198-201.

Lester MR. Sulfite sensitivity: Significance in human health. *J Am Coll Nutr.* 1995;14(3): 229-232.

Liang X, Wang Q, Hand T, Wu L, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K. Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2005;25(44): 10180-10187.

Liang X, Wang Q, Shi J, Lokteva L, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K. The prostaglandin E2 EP2 receptor accelerates disease progression and inflammation in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Anna Neurol.* 2008;64(3): 304-314.

Liu D, Wu L, Breyer R, Mattson MP, Andreasson K. Neuroprotection by the PGE2 EP2 receptor in permanent focal cerebral ischemia. *Anna Neurol.* 2005;57(5): 758-761.

Liu Q, Liang X, Wang Q, Wilson EN, Lam R, Wang J, Larkin PB. PGE2 signaling via the neuronal EP2 receptor increases injury in a model of cerebral ischemia. *PNAS*. 2019;116(20): 10019-10024.

Manev H, Uz T, Qu T. 5-lipoxygenase and cyclooxygenase mRNA expression in rat hippocampus: Early response to glutamate receptor activation by kainate. *Exp Gerontol*. 2000;35(9-10): 1201-1209.

Markovič T, Jakopin Ž, Dolenc MS, Mlinarič-Raščan I. Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discov Today*. 2017;22(1): 57-71.

Matsuoka Y, Furuyashiki T, Bito H, Ushikubi F, Tanaka Y, Kobayashi T, Higashi M. Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial endotoxin in mice deficient in prostaglandin E receptor EP1 and EP3 subtypes. *PNAS*. 2003;100(7): 4132-4137.

Matsuoka Y, Furuyashiki T, Yamada K, Nagai T, Bito H, Tanaka Y, Kitaoka S, Ushikubi F, Nabeshima T, Narumiya S. Prostaglandin E receptor EP1 controls impulsive behavior under stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(44): 16066-16071.

McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, Andreasson K. Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2004;24(1): 257-268.

McGeer PL, McGeer EG. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2004;10(1): 3-7.

Meisel SB, Welford PK. Seizures associated with high-dose intravenous morphine containing sodium bisulfite preservative. *Ann Pharmacother*. 1992;26(12): 1515-1517.

Meng Z, Qin G, Zhang B. DNA damage in mice treated with sulfur dioxide by inhalation. *Environ Mol Mutagen*. 2005;46(3): 150-155.

Meng Z, Qin G, Zhang B, Geng H, Bai Q, Bai W, Liu C. Oxidative damage of sulfur dioxide inhalation on lungs and hearts of mice. *Environmen Res*. 2003;93(3): 285-292.

Meng Z, Qin G, Zhang B, Zhang J. Inhalation of sulfur dioxide on the DNA damage of brain cells in mice. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi Chin J Prev Med*. 2002;36(6): 370-373.

Milatovic D, Montine TJ, Aschner M. Prostanoid signaling: Dual role for prostaglandin E2 in neurotoxicity. *Neurotoxicol*. 2011;32(3): 312-319.

Minami T, Matsumura S, Mabuchi T, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ito S. Functional evidence for interaction between prostaglandin EP3 and κ -opioid receptor pathways in tactile pain induced by human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) glycoprotein gp120. *Neuropharmacol*. 2003;45(1): 96-105.

Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63(9): 901-910.

Molloy GY, Rattray M, Williams RJ. Genes encoding multiple forms of phospholipase A2 are expressed in rat brain. *Neurosci Lett*. 1998;258(3): 139-142.

Moreira V, Gutiérrez JM, Lomonte B, Vinolo MAR, Curi R, Lambeau G, Teixeira C. 12-HETE is a regulator of PGE2 production via COX-2 expression induced by a snake venom group IIA phospholipase A2 in isolated peritoneal macrophages. *Chem Biol Int*. 2019;317: 108903.

Moreno JJ. Eicosanoid receptors: Targets for the treatment of disrupted intestinal epithelial homeostasis. *Eur J Pharmacol*. 2017;796: 7-19.

Morikawa Y, Yamamoto T, Higashino K. Distribution and pathophysiologic role of molybdenum-containing enzymes. *Histol Histopathol*. 1997;12(2): 513-524.

Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP Reveals Peripheral Nociceptive Mechanism of Prostaglandins. *Mol Pain*. 2005;1:3.

Morris RG, Garrud P, Rawlins J. a, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982;297(5868): 681-683.

Mottley C, Mason RP. Sulfate anion free radical formation by the peroxidation of (bi) sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers. *Arc biochem*. 1988;267(2): 681-689.

Murakami M, Nakatani Y, Atsumi GI, Inoue K, Kudo I. Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol*. 2017;37(2-6): 121-179.

Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh-ishi S, Narumiya S. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*. 1997;388(6643): 678-682.

Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M, Kawamori T, Tani K, Kobayashi M, Maruyama T, Kobayashi K, Ohuchida S, Sugimoto Y, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2002;62(1): 28-32.

Liso Navarro AA, Sikoglu EM, Heinze CR, Rogan RC, Russell VA, King JA, Moore CM. Effect of diet on brain metabolites and behavior in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res*. 2014;270: 240-247.

Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo MM, Kato K. Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature*. 2000;408(6812): 584-588.

Nishizaki T, Nomura T, Matsuoka T, Tsujishita Y. Arachidonic acid as a messenger for the expression of long-term potentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;254(2): 446-449.

Noorafshan A, Asadi-Golshan R, Karbalay-Doust S, Abdollahifar MA, Rashidiani-Rashidabadi A. Curcumin, the main part of turmeric, prevents learning and memory changes induced by sodium metabisulfite, a preservative agent, in rats. *Exp Neurobiol.* 2013;22(1): 23-30.

O'Callaghan G, Houston A. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets? *Br J Pharmacol.* 2015;172(22): 5239-5250.

Ogorochi T, Narumiya S, Mizuno N, Yamashita K, Miyazaki H, Hayaishi O. Regional distribution of prostaglandins D2, E2, and F2 alpha and related enzymes in postmortem human brain. *J Neurochem.* 1984;43(1): 71-82.

Oliphant T, Mitra A, Wilkinson M. Contact allergy to sodium sulfite and its relationship to sodium metabisulfite. *Contact Derm.* 2012;66(3):128-130.

Olton DS, Collison C, Werz MA. Spatial memory and radial arm maze performance of rats. *Learning and motivation.* 1977;8(3): 289-314.

Ong WY, Farooqui T, Farooqui AA. Involvement of cytosolic phospholipase A(2), calcium independent phospholipase A(2) and plasmalogen selective phospholipase A(2) in neurodegenerative and neuropsychiatric conditions. *Curr Med Chem.* 2010;17(25): 2746-2763.

Ozsoy O, Aras S, Ozkan A, Parlak H, Gemici B, Uysal N, Aslan M, Yargicoglu P, Agar A. The effect of ingested sulfite on active avoidance in normal and sulfite oxidase-deficient aged rats. *Toxicol Mech Methods.* 2017 Feb;27(2): 81-87.

Ozsoy O, Hacioglu G, Savcioglu F, Kucukatay V, Yargicoglu P, Agar A. The effect of sodium metabisulphite on active avoidance performance in hypercholesterolemic rats. *Environ Toxicol.* 2012;27(8): 453-460.

Ozturk N, Yargicoglu P, Derin N, Akpinar D, Agar A, Aslan M. Dose-dependent effect of nutritional sulfite intake on visual evoked potentials and lipid peroxidation. *Neurotoxicol Teratol.* 2011;33(2): 244-254.

Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol.* 2006;119(3): 229-240.

Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res.* 2009;203(2): 151-164.
Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(1): 1-22.

Powell WS, Rokach J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(4): 340-355.

Pundir CS, Rawal R. Determination of sulfite with emphasis on biosensing methods: a review. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(10): 3049-3062.

Quines CB, Rosa SG, Da Rocha JT, Gai BM, Bortolatto CF, Duarte MM, Nogueira CW. Monosodium glutamate, a food additive, induces depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young rats. *Life Sci.* 2014;107(1-2): 27-31.

Quines CB, Rosa SG, Velasquez D, Da Rocha JT, Neto JS, Nogueira CW. Diphenyl diselenide elicits antidepressant-like activity in rats exposed to monosodium glutamate: A contribution of serotonin uptake and Na(+), K(+)-ATPase activity. *Behav Brain Res.* 2016;301: 161-167.

Ramanadham S, Ali T, Ashley JW, Bone RN, Hancock WD, Lei X. Calcium-independent phospholipases A2 and their roles in biological processes and diseases. *J Lipid Res.* 2015;56(9): 1643-1668.

Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, Layh B, Heindl C, Hamza M, Pahl A, Brune K, Narumiya S, Müller U, Zeilhofer HU. Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *J Clin Invest.* 2005;115(3): 673-679.

Reist M, Jenner P, Halliwell B. Sulphite enhances peroxynitrite-dependent alpha1-antiproteinase inactivation. A mechanism of lung injury by sulphur dioxide?. *FEBS Lett.* 1998a;423(2): 231-234.

Reist M, Marshall KA, Jenner P, Halliwell B. Toxic effects of sulphite in combination with peroxynitrite on neuronal cells. *J Neurochem.* 1998b;71(6): 2431-2438.

Rencüzogullari E, İla HB, Kayraldiz A, Topaktaş M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutat Res.* 2001;490(2): 107-112.

Rocha PN, Plumb TJ, Coffman TM. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. *Springer Semin Immunopathol.* 2003;25(2): 215-227.

Rogers LM, Thelen T, Fordyce K, Bourdonnay E, Lewis C, Yu H, Zhang J, Xie J, Serezani CH, Peters-Golden M, Aronoff DM. EP4 and EP2 receptor activation of protein kinase A by prostaglandin E2 impairs macrophage phagocytosis of *Clostridium sordellii*. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(1): 34-43.

Rupar CA, Gillett J, Gordon BA, Ramsay DA, Johnson JL, Garrett RM, Rajagopalan KV, Jung JH, Bacheyie GS, Sellers AR. Isolated sulfite oxidase deficiency. *Neuropediatrics.* 1996 Dec;27(6):299-304.

Saleem S, Kim YT, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. Reduced acute brain injury in PGE2 EP3 receptor-deficient mice after cerebral ischemia. *J Neuroimmunol.* 2009;208(1-2): 87-93.

Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.* 2007;59(3): 207-224.

Sang N, Yun Y, Yao GY, Li HY, Guo L, Li GK. SO(2)-induced neurotoxicity is mediated by cyclooxygenases-2-derived prostaglandin E(2) and its downstream signaling pathway in rat hippocampal neurons. *Toxicol Sci.* 2011;124(2): 400-413.

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995;55(17): 3785-3789.

Saper CB, Breder CD. Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response. *Prog Brain Res.* 1992;93: 419-429.

Schacter DL. Implicit memory: History and current status. *J Exp Psychol Learn.* 1987;13(3): 501-518.

Segi E, Sugimoto Y, Yamasaki A, Aze Y, Oida H, Nishimura T, Murata T, Matsuoka T, Ushikubi F, Hirose M, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246(1): 7-12.

Serhan CN, Levy B. Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15): 8609-8611.

Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem.* 2008;106(1): 45-55.

Shi J, Johansson J, Woodling NS, Wang Q, Montine TJ, Andreasson K. The prostaglandin E2 E-prostanoid 4 receptor exerts anti-inflammatory effects in brain innate immunity. *J Immunol.* 2010;184(12): 7207-7218.

Shi, X. Shi X. Generation of SO₃⁻ and OH radicals in SO₃(2⁻) reactions with inorganic environmental pollutants and its implications to SO₃(2⁻) toxicity. *J Inorg Biochem.* 1994;56(3): 155-165.

Shih VE, Abroms IF, Johnson JL, Carney M, Mandell R, Robb RM, Cloherty JP, Rajagopalan KV. Sulfite oxidase deficiency. Biochemical and clinical investigations of a hereditary metabolic disorder in sulfur metabolism. *N Engl J Med.* 1977 Nov 10;297(19): 1022-8.

Simmons DL. Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. *Thromb Res.* 2003;110(5-6): 265-268.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56(3):387-437.

Simon RA. Update on sulfite sensitivity. *Allergy.* 1998;53(46): 78-79.

Simon RA. Sulfite sensitivity. *Ann Allergy.* 1986;56(4):281-288.

Smith SK, Farnbach AR, Harris FM, Hawes AC, Jackson LR, Judd AM, Vest RS, Sanchez S, Bell JD. Mechanisms by which intracellular calcium induces susceptibility to secretory phospholipase A2 in human erythrocytes. *J Biol Chem.* 2001;276(25): 22732-22741.

Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol.* 1992;263(2): 181-191.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:145-182.

Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest.* 2001;107(12): 1491-1495.

Smith WL, Murphy RC. Chapter 13 the eicosanoids: Cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxigenase pathways. In *New comprehensive biochemistry*. Elsevier. 4th ed. Boston; 2002;36, p:341-371.

Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, Weiss G, Tancevski I. Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11): 3285.

Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, Oshima M, Taketo MM. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat Med.* 2001;7(9):1048-1051.

Stipanuk MH, Dominy JE Jr, Lee JI, Coloso RM. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J Nutr.* 2006;136(6): 1652-1659.

Strauss KI. Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain. *Brain Behav Immun.* 2008;22(3): 285-298.

Sugimoto Y, Fukada Y, Mori D, Tanaka S, Yamane H, Okuno Y, Deai K, Tsuchiya S, Tsujimoto G, Ichikawa A. Prostaglandin E2 stimulates granulocyte colony-stimulating factor production via the prostanoid EP2 receptor in mouse peritoneal neutrophils. *J Immunol.* 2005;175(4): 2606-2612.

Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.* 2007;282(16):11613-11617.

Sun GY, Chuang DY, Zong Y, Jiang J, Lee JC, Gu Z, Simonyi A. Role of cytosolic phospholipase A2 in oxidative and inflammatory signaling pathways in different cell types in the central nervous system. *Mol Neurobiol.* 2014;50(1): 6-14.

Takadera T, Shiraishi Y, Ohyashiki T. Prostaglandin E2 induced caspase-dependent apoptosis possibly through activation of EP2 receptors in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 2004;45(5): 713-719.

Takasaki I, Nojima H, Shiraki K, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ushikubi F, Narumiya S, Kuraishi Y. Involvement of cyclooxygenase-2 and EP3 prostaglandin receptor in acute herpetic but not postherpetic pain in mice. *Neuropharmacology.* 2005;49(3): 283-292.

Takeuchi K, Ukawa H, Kato S, Furukawa O, Araki H, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ushikubi F, Narumiya S. Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP(3). *Gastroenterology.* 1999;117(5): 1128-1135.

Tan WH, Eichler FS, Hoda S, Lee MS, Baris H, Hanley CA, Grant PE, Krishnamoorthy KS, Shih VE. Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics*. 2005 Sep;116(3): 757-66.

Taylor S, Bush R, Busse W. The sulfite story. *Association of Food & Drug Officials Quarterly Bulletin*. 1985;49(4): 185-193.

Thwin MM, Ong WY, Fong CW, Sato K, Kodama K, Farooqui AA, Gopalakrishnakone P. Secretory phospholipase A2 activity in the normal and kainate injected rat brain, and inhibition by a peptide derived from python serum. *Exp Brain Res*. 2003;150(4): 427-433.

Til HP, Feron VJ, De Groot AP. The toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats. *Food Cosmet Toxicol*. 1972;10(3):291-310.

Topak G. Preadölesan sıçanlarda sülfidit alımına bağlı EEG ve lokomotor aktivite değişikliklerinin moleküler mekanizmalarla araştırılması. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2017, Antalya (Danışman: Prof. Dr. N Derin).

Türkoğlu S, Çetin FH, Tanır Y, Karatoprak S. Çalışma belleği ve nörogelişimsel hastalıklar. *Turk J Child Adolesc Ment Health*. 2019;26(2): 52-62.

Ueno A, Matsumoto H, Naraba H, Ikeda Y, Ushikubi F, Matsuoka T, Narumiya S, Sugimoto Y, Ichikawa A, Oh-ishi S. Major roles of prostanoid receptors IP and EP(3) in endotoxin-induced enhancement of pain perception. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(2): 157-160.

Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*. 1998;395(6699): 281-284..

Van Dorp DA, Beerthuis R, Nugteren D, Vonkeman H. Enzymatic conversion of all-cis-polyunsaturated fatty acids into prostaglandins. *Nature*. 1964;203(4947): 839-841.

Vandevijvere, S, Temme, E, Andjelkovic, M, De Wil, M, Vinkx, C, Goeyens, L, & Van Loco, J. Estimate of intake of sulfites in the belgian adult population. *Food Addit. Contam*. 2010; 27 (8): 1072-1083.

Viana MB, Tomaz C, Graeff FG. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994;49(3): 549-554.

Wang H, Ye M, Yu L, Wang J, Guo Y, Lei W, Yang J. Hippocampal neuronal cyclooxygenase-2 downstream signaling imbalance in a rat model of chronic aluminium gluconate administration. *Behav Brain Funct*. 2015;11:8: 1-12.

Wang S, Irving G, Jiang L, Wang H, Li M, Wang X, Han W, Xu Y, Yang Y, Zeng T, Song F, Zhao X, Xie K. Oxidative Stress Mediated Hippocampal Neuron Apoptosis Participated in Carbon Disulfide-Induced Rats Cognitive Dysfunction. *Neurochem Res*. 2017;42(2): 583-594.

Wei S, Ong W, Thwin M, Fong C, Farooqui A, Gopalakrishnakone P, Hong W. Differential activities of secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in rat brain and effects of sPLA₂ on neurotransmitter release. *Neuroscience*. 2003;121: 891-898.

Woo WH, Yang H, Wong KP, Halliwell B. Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(3): 619-623.

Xiao JY, Xiong BR, Zhang W, Zhou WC, Yang H, Gao F, Xiang HB, Manyande A, Tian XB, Tian YK. PGE₂-EP₃ signaling exacerbates hippocampus-dependent cognitive impairment after laparotomy by reducing expression levels of hippocampal synaptic plasticity-related proteins in aged mice. *CNS Neurosci Ther*. 2018;24(10): 917-929.

Xu J, Chalimoniuk M, Shu Y, Simonyi A, Sun AY, Gonzalez FA, Weisman GA, Wood WG, Sun GY. Prostaglandin E₂ production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;69(6): 437-448.

Yang B, Fritsche KL, Beversdorf DQ, Gu Z, Lee JC, Folk WR, Greenleaf CM, Sun GY. Yin-Yang Mechanisms Regulating Lipid Peroxidation of Docosahexaenoic Acid and Arachidonic Acid in the Central Nervous System. *Front Neurol*. 2019;10:642.

Yang H, Zhang J, Breyer RM, Chen C. Altered hippocampal long-term synaptic plasticity in mice deficient in the PGE₂ EP₂ receptor. *J Neurochem*. 2009;108(1): 295-304.

Yang L, Yamagata N, Yadav R, Brandon S, Courtney RL, Morrow JD, Shyr Y, Boothby M, Joyce S, Carbone DP, Breyer RM. Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP₂ receptor. *J Clin Invest*. 2003;111(5):727-735.

Yang WH, Purchase EC. Adverse reactions to sulfites. *CMAJ*. 1985;133(9):865-880.

Yee B. Cytotoxic lesion of the medial prefrontal cortex abolishes the partial reinforcement extinction effect, attenuates prepulse inhibition of the acoustic startle reflex and induces transient hyperlocomotion, while sparing spontaneous object recognition memory in the rat. *Neuroscience*. 1999;95(3): 675-689.

Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Ghatak S, Akaike T, Segi-Nishida E, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Toole BP, Sugimoto Y, Ishikawa Y. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP₄ promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest*. 2006;116(11): 3026-3034.

Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, Yamaguchi K, Segi E, Tsuboyama T, Matsushita M, Ito K, Ito Y, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohuchida S, Kondo K, Nakamura T, Narumiya S. Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP₄ receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4580-4585.

Zhang J, Li Y, Chen ZG, Dang H, Ding JH, Fan Y, Hu G. Glia protein aquaporin-4 regulates aversive motivation of spatial memory in Morris water maze. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19(12):937-944.

Zhu P, Genc A, Zhang X, Zhang J, Bazan NG, Chen C. Heterogeneous expression and regulation of hippocampal prostaglandin E2 receptors. *J Neurosci Res.* 2005;81(6):817-826.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuğberk	Uyruğu	T.C.
Soyadı	DENİZALTI	Tel no	05357225916
Doğum tarihi	25.04.1991	e-posta	berkdenizakd@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Yavuz Selim Lisesi	2010
Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2017
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	Devam Ediyor
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Prenatal, Postnatal Sülfid Maruziyetinin Davranış ve Öğrenme Üzerine Etkilerinin ve Moleküler Mekanizmalarının	TÜBİTAK 1001 projesi	2017-2019

Araştırılması		
Gebelik ve Laktasyon Dönemleri Boyunca Maternal Sirkadiyen Ritim Değişikliğinin, Erişkin Yavru Erkek Sıçanlardaki Davranış, Gonadal DNA Metilasyonu ve Transkriptomu Üzerindeki Transgenerasyonel Etkisi	TÜBİTAK 1001 projesi	2020-devam ediyor

Burslar-Ödüller:

Yayınlar Bildiriler:

1. Güven Akçay, Betül Danışman, Zeynep Kıymaz, Ceren Kencebay, Tuğberk Denizaltı, Narin Derin. Prenatal ve postnatal dönemde sülfite maruziyetinin öğrenme ve hafıza üzerine etkileri. 16. Ulusal sinirbilim kongresi, 20-23 Mayıs 2018, İstanbul.
2. Güven Akçay, Ceren Kencebay, Betül Danışman, Tuğberk Denizaltı, Çiğdem Gökçe Saraç, Mutay Aslan, Narin Derin. Sıçanlarda prenatal ve postnatal dönemde sülfite maruziyetine bağlı nörotoksitede glutamat'ın rolü. 17. Ulusal sinirbilim kongresi, 04-07 Nisan 2019, Trabzon.