

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DEĞİŞİK DOZLARDA ETANOL VE ASPİRİNİN BİRLİKTE  
KULLANIMININ RAT BEYİN SİNAPTOZOMLARI  
ÜZERİNE OLAN İN VİTRO ETKİSİ VE BETAİN'İN OLASI  
KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İBRAHİM SÖĞÜT

DANIŞMAN

Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK

Ağustos-2008

# PDF Eraser Free

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DEĞİŞİK DOZLARDA ETANOL VE ASPİRİNİN BİRLİKTE  
KULLANIMININ RAT BEYİN SİNAPTOZOMLARI  
ÜZERİNE OLAN İN VİTRO ETKİSİ VE BETAİN'İN OLASI  
KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İBRAHİM SÖĞÜT

DANIŞMAN

Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK

Ağustos-2008

# PDF Eraser Free

## ÖZET

Bu çalışmada, değişik dozlarda etanol ve aspirinin birlikte kullanımının rat beyin sinaptozomları üzerine olan *in vitro* etkisi ve betainin olası koruyucu yolu araştırıldı. Bu amaçla yirmi bir adet Spraque Dawley cinsi erkek albino rat dekapite edilerek öldürüldü. Frontal korteksleri (ön beyin) alındıktan sonra her ön beyin dört parçaya bölündü. Bu doku örneklerinden on dört grup oluşturuldu ve her bir grup altı adet ön beyin parçası içeriyordu (n=6). Sinaptozomal fraksiyonlar ön beyin parçalarının homojenizasyon ve santrifüj aşamaları sonrasında elde edildi. Etanol (50, 100, 200mM), aspirin (100µg/ml) ve betainin (0,5, 1mM) varlığında inkübe edilen sinaptozomal fraksiyonlarda siyalik asit (SA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ile adenozin deaminaz (ADA) aktiviteleri ölçüldü.

Farklı akut dozlarda *in vitro* olarak uygulanan etanol doza bağlı olarak rat beyin sinaptozomları üzerinde nörotoksik etki göstermektedir. 100mM ve 200mM dozlarda uygulanan etanol, SA parametresinde gösterildiği gibi sinaptozomal zarlarda hasar yaratabilmektedir. 200mM dozda uygulanan etanol, NO ve ADA parametrelerinin gösterdiği gibi fonksiyonel metabolik yollarda değişimlere sebep olmaktadır. Buna bağlı olarak zarda protein yapıdaki reseptör ve enzimlerin fonksiyonları bozulabilmektedir. 100µg/ml dozda aspirin, SA ve NO düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Etanol ile aspirin (100µg/ml) beraber uygulandığı zaman oluşan hasar etanol dozuna bağlı olarak SA ve NO düzeylerinde toksik etkiyi artırabilmektedir. Betainin ise doza bağlı olarak aspirin ile etanolün birlikte kullanımıyla artan sitotoksiteyi azaltabileceğini düşünüyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** Adenozin Deaminaz, Aspirin, Betain, Nitrik oksit, Sinaptozom, Siyalik Asit

## SUMMARY

This study deals with the *in vitro* effects of different doses of ethanol when it is used with aspirin on rat brain synaptosomes as well as the possible protective pathway of betaine. With this aim, twenty one male albino rats of Sprague Dawley type are killed by decapitation. After the frontal cortexes of the rats are taken out, each of them is divided into four pieces. Fourteen groups of which including 6 frontal cortex pieces each are generated from these tissue samples (n=6). The synaptosomal fractions are prepared by the homogenization of the frontal cortex pieces and centrifugation. Sialic acid (SA), nitric oxide(NO) levels and adenosine deaminase (ADA) activities of synaptosomal fractions incubated with ethanol (50, 100, 200mM), aspirin (100µg/ml) and betaine (0.5, 1mM) are recorded.

*In vitro* administration of different doses of ethanol have neurotoxic effect on rat brain synaptosomes. 100mM and 200mM ethanol, as it is shown in the SA parameter, might cause damage at synaptosomal membrane and also administration of 200mM ethanol may result in functional changes at metabolic pathways, which is shown by the NO and ADA parameters. Due to these changes, the structure and as a result of this, the function of the receptors and enzymes may be disrupted. The administration of 100µg/ml aspirin does not cause any change at SA and NO levels. When ethanol and aspirin (100µg/ml) are applied together, the toxicity at SA and NO levels might increase according to the doses of ethanol. On the other hand we think that betaine may decrease the cytotoxicity that is caused by the usage of ethanol and aspirin, together.

**Keywords:** Adenosine Deaminase, Aspirin, Betaine, Nitric Oxide, Sialic Acid, Synaptosome

## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	iv
ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	ix
TABLO DİZİNİ	xi
SİMGE ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hücre Zarı	4
2.2. Etanol Metabolizması	6
2.2.1. Oksidatif Etanol Metabolizması	7
2.2.2. Katalaz Metabolizması	8
2.2.3. Non-Oksidatif Etanol Metabolizması	8
2.2.3.1. Fosfatidiletanol yolu	9
2.2.3.2. Yağ Asidi Etil Ester (FAEE) yolu	9
2.3. Aspirin ve Etki Mekanizması	13
2.3.1. Aspirinin tarihçesi	13
2.3.2. Aspirinin etki mekanizması	14
2.3.2.1. Analjezik (Ağrı Kesici) etki	15
2.3.2.2. Anti-inflamatuvar etki	17
2.3.2.3. Antipiretik etki	17
2.3.2.4. Trombosit agregasyonunun inhibisyonu	18
2.3.2.5. Aspirinin yan etkileri	20
2.4. Betain ve Metabolizması	21
2.5. Siyalik Asit ve Metabolizması	25
2.5.1. Siyalik asitin metabolizması	26
2.5.2. Siyalik asitin biyolojik fonksiyonları	28
2.6. Nitrik Oksit ve Metabolizması	30
2.6.1. Nitrik oksit sentezi	31

2.6.2. Nitrik Oksit Sentaz izoformları	31
2.6.3. Nitrik oksidin etki mekanizması	32
2.6.4. Nitrik oksidin fonksiyonları	34
2.6.4.1. Kan dolaşımını düzenlemedeki rolü	34
2.6.4.2. NO ve trombosit aktivitesi	35
2.6.4.3. NO ve immün sistem	35
2.6.4.4. NO ve sinir sistemi	36
2.6.5. Nitrik oksitin sitotoksik etkileri	36
2.7. Adenozin Deaminaz ve Metabolizması	38
2.7.1. Adenozinin sentezi, salıverilmesi ve yıkılımı	39
3.GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Gereç	43
3.1.1. Deney hayvanları ve Sinaptozomların elde edilme protokolü	43
3.1.2. İstatistiksel Analiz	45
3.2. Yöntem	46
3.2.1. Sinaptozomda total siyalik asit düzeylerinin belirlenmesi	46
3.2.2. Sinaptozomda nitrik oksit düzeylerinin belirlenmesi	46
3.2.3. Sinaptozomda adenozin deaminaz düzeylerinin belirlenmesi	47
3.2.4. Kullanılan kimyasal maddeler	48
3.2.5. Kullanılan aygıt ve gereçler	49
4. BULGULAR	50
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	84
8. ÖZGEÇMİŞ	101



## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1: Zarın yapısı yapısı	5
Şekil 2.2: Sinapsın yapısı	5
Şekil 2.3: Etanolün oksidasyonu ve non-oksidatif metabolizması	6
Şekil 2.4: Etanol metabolizması	7
Şekil 2.5: Katalaz yoluyla etanolün asetaldehide dönüşümü	8
Şekil 2.6: Etanolün meydana getirdiği organ hasarı	12
Şekil 2.7: Trombogeneizde Aspirinin Etkisi	14
Şekil 2.8: Aspirinin Etkisi	16
Şekil 2.9: Trombosit Agregasyonu	19
Şekil 2.10: Betain (trimetilglisin), kimyasal formülü	21
Şekil 2.11: Betain Metabolizması	23
Şekil 2.12: Siyalik asitin yapısal formülü yapısı	25
Şekil 2.13: Hücre membranında siyalik asidin yapısı	26
Şekil 2.14: Siyalik asidin sentezi	27
Şekil 2.15: NO sentezi	31
Şekil 2.16: Yapısal NOS'ın uyarılması	33
Şekil 2.17: İndüklenebilir NOS'un uyarılması	34
Şekil 2.18: Adenozinin inozine dönüşümü	38
Şekil 2.19: Adenozin metabolizması	39
Şekil 2.20: Adenozin Biyosentezi	40
Şekil 3.1 : Sinaptozomun elde edilmesinde Hepes- sükröz gradienti	44
Şekil 4.1 : Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının SA değerleri	50
Şekil 4.2 : Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının NO değerleri	51
Şekil 4.3 : Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının ADA değerleri	52

- Şekil 4.4** : Kontrol grubu, 50mM etanol, aspirin, aspirin+ 50mM etanol, aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, aspirin+50mM etanol+ 1mM betain gruplarının SA değerleri 54
- Şekil 4.5** : Kontrol grubu,50mM etanol, aspirin, aspirin+ 50mM etanol, aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, aspirin+50mM etanol+ 1mM betain gruplarının NO değerleri 55
- Şekil 4.6** : Kontrol grubu,50mM etanol, aspirin, aspirin+50mM etanol, aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, aspirin+50mM etanol+ 1mM betain gruplarının ADA değerleri 57
- Şekil 4.7** : Kontrol grubu,100mM etanol, aspirin, aspirin+100mM etanol, aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, aspirin+100mM etanol+ 1mM betain gruplarının SA değerleri 58
- Şekil 4.8** : Kontrol grubu,100mM etanol, aspirin, aspirin+100mM etanol, aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, aspirin+100mM etanol+ 1mM betain gruplarının NO değerleri 59
- Şekil 4.9** : Kontrol grubu,100mM etanol, aspirin, aspirin+100mM etanol, aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, aspirin+100mM etanol+ 1mM betain gruplarının ADA değerleri 61
- Şekil 4.10** : Kontrol grubu, 200mM etanol, aspirin, aspirin+200mM etanol, aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, aspirin+200mM etanol+ 1mM betain gruplarının SA değerleri 63
- Şekil 4.11** : Kontrol grubu, 200mM etanol, aspirin, aspirin+200mM etanol, aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, aspirin+200mM etanol+ 1mM betain gruplarının NO değerleri 65
- Şekil 4.12** : Kontrol grubu, 200mM etanol, aspirin, aspirin+200mM etanol, aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, aspirin+200mM etanol+ 1mM betain gruplarının ADA değerleri 67

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 4.1:</b> Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının SA değerleri	50
<b>Tablo 4.2:</b> Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının NO değerleri	51
<b>Tablo 4.3:</b> Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının ADA değerleri	52
<b>Tablo 4.4:</b> Kontrol grubu, 50mM etanol, aspirin, aspirin+ 50mM etanol, aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, aspirin+50mM etanol+ 1mM betain gruplarının SA değerleri	53
<b>Tablo 4.5:</b> Kontrol grubu,50mM etanol, aspirin, aspirin+ 50mM etanol, aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, aspirin+50mM etanol+ 1mM betain gruplarının NO değerleri	55
<b>Tablo 4.6:</b> Kontrol grubu,50mM etanol, aspirin, aspirin+50mM etanol, aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, aspirin+50mM etanol+ 1mM betain gruplarının ADA değerleri	56
<b>Tablo 4.7:</b> Kontrol grubu,100mM etanol, aspirin, aspirin+100mM etanol, aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, aspirin+100mM etanol+ 1mM betain gruplarının SA değerleri	58
<b>Tablo 4.8:</b> Kontrol grubu,100mM etanol, aspirin, aspirin+100mM etanol, aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, aspirin+100mM etanol+ 1mM betain gruplarının NO değerleri	59
<b>Tablo 4.9:</b> Kontrol grubu,100mM etanol, aspirin, aspirin+100mM etanol, aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, aspirin+100mM etanol+ 1mM betain gruplarının ADA değerleri	60
<b>Tablo 4.10:</b> Kontrol grubu, 200mM etanol, aspirin, aspirin+200mM etanol, aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, aspirin+200mM etanol+ 1mM betain gruplarının SA değerleri	62

<b>Tablo 4.11:</b> Kontrol grubu, 200mM etanol, aspirin, aspirin+200mM etanol, aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, aspirin+200mM etanol+1mM betain gruplarının NO değerleri	64
<b>Tablo 4.12:</b> Kontrol grubu, 200mM etanol, aspirin, aspirin+200mM etanol, aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, aspirin+200mM etanol+1mM betain gruplarının ADA değerleri	66

## SİMGE ve KISALTMALAR

ADA	: Adenozin Deaminaz
ADH	: Alkol Dehidrogenaz
ADP	: Adenozin difosfat
ALDH	: Aldehid Dehidrogenaz
AMP	: Adenozin monofosfat
ASA	: Asetilsalisilik Asit
ATP	: Adenozin trifosfat
BHMT	: Betain Homosistein Metiltransferaz
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CDT	: Karbohidrattan Yoksun Transferin
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$	: Betain
CH <sub>3</sub> -THF	: 5- Metil Tetrahidrofolat
CMP	: Sitozin Monofosfat
COX	: Siklooksijenaz
CSA	: Lipide Bağlı Siyalik Asit
CYP2E1	: Sitokrom p450 Enzimi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDRF	: Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör
eNOS	: Endoteliyal Nitrik Oksit
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	: Flavin Mononükleotid
GSH	: Redükte Glutasyon
GTP	: Guanozin Trifosfat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
HepG2	: Hepatosellüler Karsinom Hücre Hattı
iNOS	: İndükte Edilebilir Nitrik Oksit
MDA	: Malondialdehid
MEOS	: Mikrozomal Etanol Oksidasyon Sistemi

# PDF Eraser Free

ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	: Redükte Nikotinomid Adenin Dinukleotid
NeuAc	: N- Asetilnöramik Asit
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
NSAIDs	: Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar
NO	: Nitrik Oksit
NO <sub>2</sub>	: Azot Dioksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit
(ONOO) <sup>-</sup>	: Peroksi Nitrit
PG	: Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	: Prostaglandin E2
PGI <sub>2</sub>	: Prostatiklin
PSA	: Proteine Bağlı Siyalik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SA	: Siyalik Asit
SAH	: S- Adenozinhomositin
SAM	: S- Adenozilmethionin
SOD	: Süperoksit Dizmutaz
TNF $\alpha$	: Tümör Nekrozis Faktör
TSA	: Total Siyalik Asit
TXA <sub>2</sub>	: Tromboksan
XO	: Ksantin Oksidaz
4-HNE	: 4-Hidroksinonenal
$\mu$ g	: Mikrogram

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Etanol günümüzde çok geniş ve sıklıkla kullanılan psikoaktif bir uyuşturucu maddedir. Sinir merkezleri üzerinde baskılayıcı etkileri vardır. Etanolün direkt olarak proteinlerine, reseptör ve iyon kanallarına etki edip biçimsel değişiklik yaptığı ve bu sayede bu proteinlerin fonksiyonlarını değiştirdiği görüşü öne sürülmüştür. Alınan alkol miktarına bağlı olarak etanolün zar akışkanlığını artırdığı, zara giren proteinlerin fonksiyonlarını ve nörokimyasal yolları negatif olarak değiştirdiği bilinmektedir. Etanolün lipid zarları çözüp akışkanlıklarını arttırarak zarlara gömülü reseptör ve iyon kanallarının fonksiyonlarını değiştirdiği kabul edilmiştir (1,8,10,37,56,57,70,85,86,101).

Sinaptozomlar nöronların sinapslarından, sinir dokusunun homojenizasyonu ve fraksiyonlanması (kısımlara ayrılma) sonucu elde edilir. Hücre zarının fosfolipid tabakasından ve sinaptik proteinler gibi reseptörlerden oluşmaktadır. Sinaptik iletimde görev alırlar. Sinaptozomlar, hücre zarlarında reseptör olarak sinaptik protein içeren mitokondrice zengin bir fosfolipid tabaka olarak da bilinir (57,70,85,86).

Aspirin (asetilsalisilik asit; ASA) geniş farmakolojik aktiviteye sahip ve birçok merkezi etkileyen anti-inflamatuvar bir ilaçtır. Prostoglandin ve tromboksan inhibitörüdür. Bunun yanısıra aspirinin uzun zaman kullanılmasının gastrik mukoza hasarına neden olduğu görülmüştür. Alkolle beraber alındığında aspirinin, alkolün etkisini artırdığı düşünülmektedir (54,93,94,99,128).

Betainin fizyolojik fonksiyonu, stres altındaki hücreleri koruyan bir organik ozmolit olması ve pek çok biyokimyasal yoldaki transmetilasyon reaksiyonları için bir metil kaynağı oluşturmasıdır. Betain, bitkileri ve mikroorganizmaları ozmotik inaktivasyona karşı korur. Yüksek tuzluluk, sıcaklık stresi gibi durumlarda betain sentezi artar. Bu gibi durumlarda rekabetçi bir ozmolit olan betain hücrelerin su alımını artırır, inorganik tuzların yerine geçer. Hücre içi enzimleri ozmotik ya da sıcaklık kaynaklı inaktivasyona karşı korur. Bir metil vericisi olarak, optimum beslenme

için gerekli olan metiyonin ve kolinin oluşması için gereken tek karbon birimlerini sağlar (34,70,74).

Siyalik asitler, nöraminik asidin asetile edilmiş türevlerini kapsar. Memelilerde yaygın dağılıma sahiptirler. Glikolipid ve glikoproteinlerin karbonhidrat zincirlerinin redükte edilmeyen uçlarında terminal komponent olarak bulunurlar. Daha çok enzimlerde, kan grubu ürünlerinde, hücre zarlarında ve ekstrasellüler alanda mevcuttur (47,61,69). İnsan serumundaki siyalik asit konsantrasyonları doku yıkımı, doku proliferasyonu, depolimerizasyon ve inflamasyonun olduğu patolojik durumlarda aşırı derecede yüksek bulunmuştur. Alkol alımı durumlarında da siyalik asit seviyelerinin yükseldiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (102). Klinik çalışmalar serum ve tükürük siyalik asit düzeylerinin alkolik erkek ve kadınlarda sosyal içicilerle karşılaştırıldığında önemli derecede yükseldiğini göstermiştir (79,81,109,125).

Nitrik oksit hücrel patofizyolojide önemli rol oynayan çözünebilir bir bileşiktir. Damar genişletici mesajı endotelden düz kasa taşıyan bir enerji aktarıcısı olarak, merkezi ve çevresel sinirsel sisteminde uyarı aktarımının yanı sıra bağışıklıkta da aktif rol alır. Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-Argininden sentezlenen, yarı ömrü kısa, serbest radikal yapısında bir moleküldür (35,78). Nitrik oksit, vasküler tonusun ve trombosit fonksiyonlarının düzenlenmesi, inflamasyona immünolojik cevap, otonomik kas tonusu ve duyu iletiminin ayarlanması gibi birçok fizyolojik olayda rol oynar. Aynı zamanda önemli bir nörotransmitter-nöromodülatördür. Nitrik oksit miktarının, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri ile ilişkisi vardır. Akut etanol tüketimi, nöronlardaki NO sentezini azaltırken; kronik tüketim nöronlardaki NO sentezini arttırmaktadır. Nitrik oksit sentezindeki değişimler beynin ayrı bölgelerinde önemli farklılıklar gösterir (15,25,35,90).

Adenozin deaminaz bütün omurgalıların dokularında yaygın olarak bulunan bir enzimdir. Pürin metabolizması içinde önemli bir yere sahiptir. ADA, Adenozin ile 2-deoksiadenozin nükleotidlerini sırasıyla inozin ve deoksiinozine dönüştürmekle görevlidir. Adenozin deaminaz zara bağlı bir enzim olarak kabul edilmektedir (21).



Hücre, adenzin sentezlemek için hücre içinde devamlı kullanılan adenzin trifosfat (ATP) ve döngüsel (siklik: c) adenzin monofosfatı (AMP) kullanır. Hücre içinde ve dışında üretilen adenzin, hücre zarında bulunan kendine özgü taşıyıcı moleküller aracılığı ile zarın içine ve dışına doğru iki yönlü olarak hareket edebilir. Adenzin bir nöromodülatör olarak işlev gördüğü için, diğer reseptör sistemleriyle çok fazla etkileşim içindedir. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonu ile de bağlantısı vardır (39). Etanol ekstraselüler adenzin aktivitelerinde artışa sebep olmaktadır. Etanol kaynaklı ekstraselüler adenzin artışı adenzin A2 reseptörlerinin aktivasyonuna, bu da hücre içi cAMP seviyesinin artmasına ve heterolog reseptör duyarsızlaşmasına sebep olmaktadır (41,91,92).

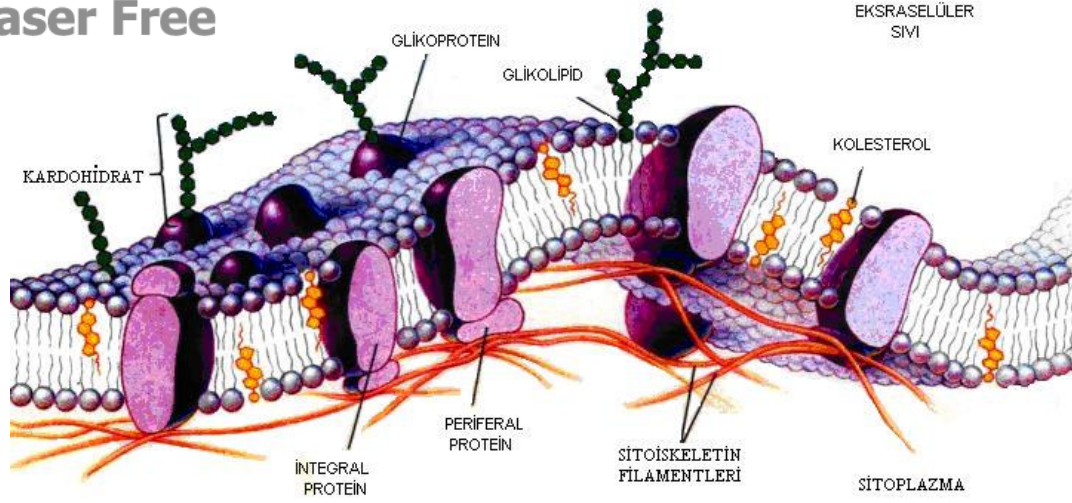
Son yıllarda yapılan çalışmalarda, etanolün rat beyni sinir hücrelerinden izole edilen sinaptozomca zengin fraksiyon üzerinde dejeneratif ve inflamatuvar etkisi olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, in vitro olarak elde ettiğimiz rat beyin sinaptozomları üzerinde farklı dozlarda etanolün (50, 100, 200mM), aspirinle (100µg/ml) birlikte uygulanması ve betainin (0,5, 1mM) sinaptozomlar üzerindeki dejeneratif hasarın önlenmesindeki etkinliğinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hücre Zarı

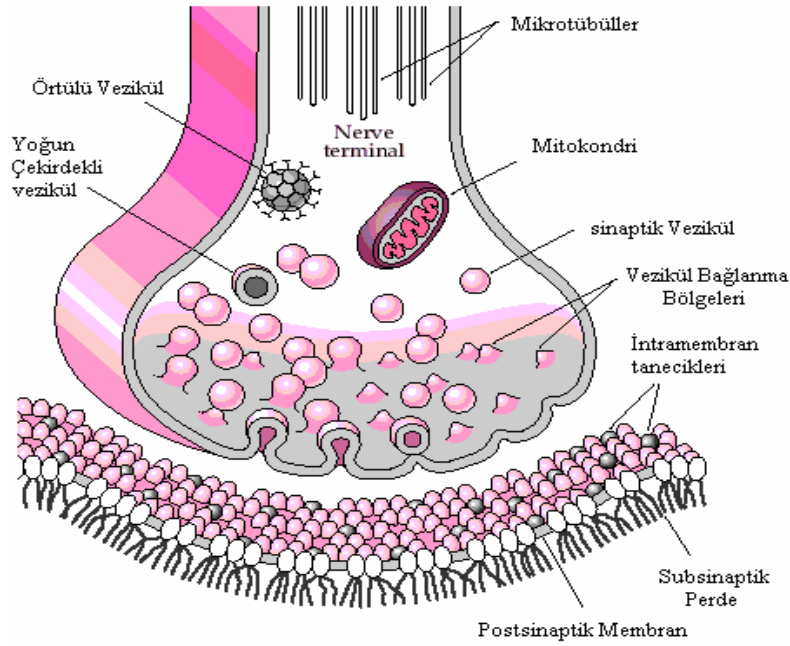
Hücre zarı protein, lipid ve karbonhidratlardan oluşur. Özellikle fosfolipid ve serbest kolesterolden oluşan lipidler zarın yaklaşık %50'sini oluşturur. Fosfolipidler, lipid katmanı içerisine asimetrik bir şekilde dağılmışlardır. Lipid katmanının dış kısmı sfingomyelin, glikolipid ve fosfatidilkolin içerirken; sitoplazmaya bakan iç kısmı ise fosfatidilinositol, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin gibi lipidlerden oluşmaktadır. Hücre içi ve hücre dışı sıvılarla temas edecek şekilde çift tabakalı olarak dizilmiş olan bu lipid yapısı sayesinde hücre içeriği dış ortamdan korunabilmektedir. Kolesterol, zarın esnekliğinin ve kararlılığının devam ettirilmesinde görev yapmaktadır. Proteinler, zarın dış yüzeyine gevşek olarak yapışmış halde (periferik proteinler) ve lipid tabakanın içinde boylu boyunca gömülü (integral proteinler) haldedir. İntegral proteinler, özellikle eriyik haldeki maddelerin hücre içi ile dışı arasındaki iletimini sağlar. Hücre zarı ayrıca içerden hücre iskeleti olarak adlandırılan ve proteinlerden oluşan ağ şeklinde bir yapıyla güçlendirilmiştir (Şekil 2.1). Bu hücre iskelet proteinleri, zarda bulunan proteinlerin tümünün % 50-60'lık kısmını oluşturmaktadır. Zar çatısında meydana gelen değişiklikler sonucunda su dengesi ve iyon akışı etkilenebilir. Bu etkilenmenin sonucunda hücre içindeki olaylar da etkilenecektir. Zar bileşenlerinin eksiklikleri veya değişimleri çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir (53,66).

Etanol, in vitro koşullarda biyolojik zarların fosfolipid zincirlerinin düzenini bozmaktadır. Bunun yanı sıra, kolesterol ve fosfatidilinositolün zara eklenmesini bozarak zar düzensizliğine sebep olur. Zardaki bu değişiklikler in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Etanolün zar akıcılığında değişiklikler meydana getirdiği, yük dağılımını etkilediği ve zarda oksidatif strese neden olduğu deneylerle kanıtlanmıştır (49). Ayrıca, beyin dokusunda hücre zarının fizikokimyasal yükü üzerinde değiştirici etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (66,68,119,134).



Şekil 2.1: Zarın yapısı

Beyin sinaptozomal fraksiyon zarı da etanole karşı hassastır. Sinaptozomlar; nöronların sinapslarından, sinir dokusunun homojenizasyonu ve fraksiyonlanması sonucu elde edilirler. Hücre zarının fosfolipid tabakasından ve sinaptik proteinler gibi reseptörlerden oluşmaktadırlar ve sinaptik iletimde görev alırlar (Şekil 2.2). Sinaptozomlar hücre zarlarında reseptör olarak sinaptik protein içeren bir fosfolipid tabaka olarak da bilinmektedirler (70,85,86,101).



Şekil 2.2: Sinapsın yapısı

## 2.2. Etanol Metabolizması

Etanol metabolizmasından sorumlu başlıca iki yol vardır. Bunlar Oksidatif ve Non-Oksidatif yoldur (80), (şekil 2.3).

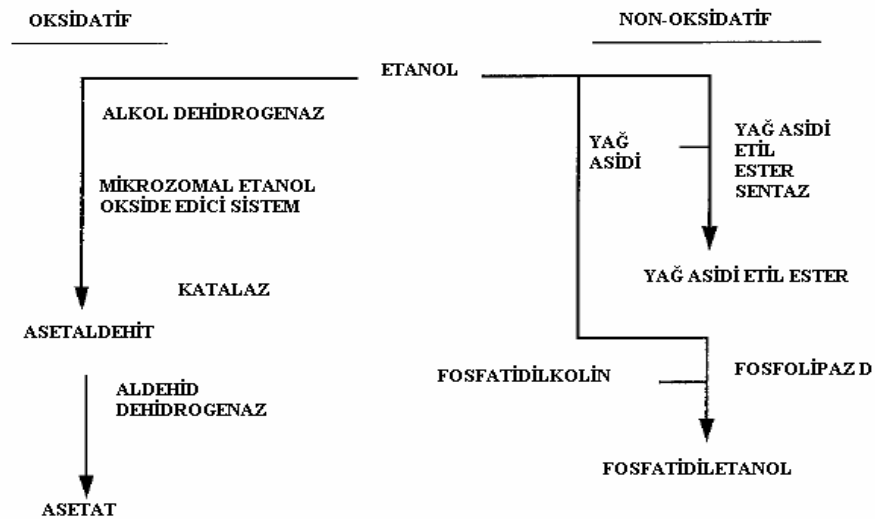
1-Oksidatif yol üç basamağa ayrılır (Şekil 2.4).

- Hücre sitozolünde bulunan alkol dehidrogenaz yolu (ADH)
- Hücre endoplazmik retikulumunda bulunan mikrozomal enzimler (MEOS)
- Hücre peroksizomlarında bulunan katalaz yolu

2-Non-oksidatif yol iki basamağa ayrılır (Şekil 2.4).

- Fosfatidiletanol yolu
- Etanolün yağ asitleriyle oluşturduğu etil ester yolu (FAEE)

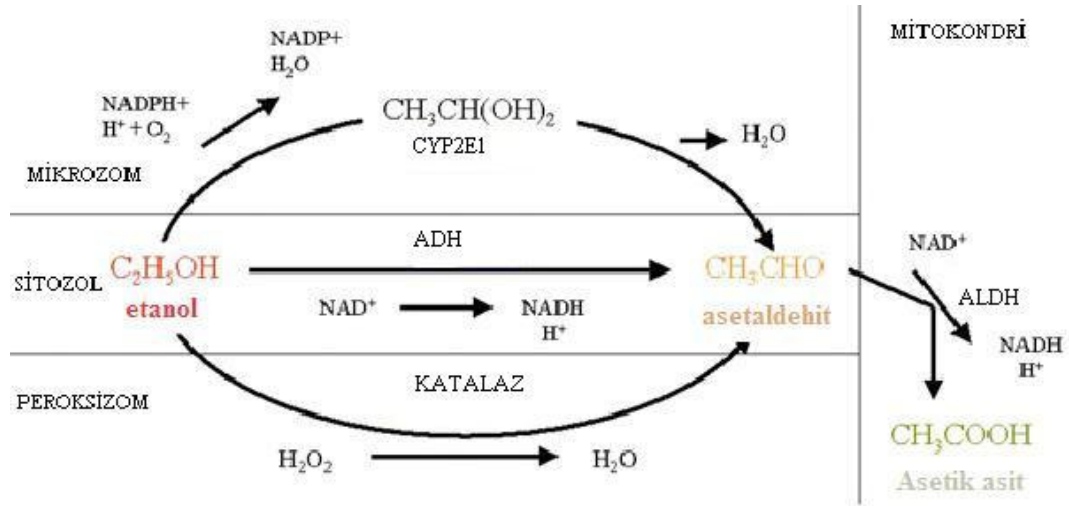
Rat beyin sinaptozomal fraksiyonlarındaki etanolün metabolize edilmesinde, oksidatif yolda peroksizomlarda bulunan katalaz enziminin (37,97,126) ve non-oksidatif yolda oluşan yağ asidi etil ester sentaz enziminin rol aldığı bilinmektedir (13,23,80). Bunun yanında etanolün zar üzerine direkt etkisi de bulunmaktadır (43,70).



Şekil 2.3: Etanolün oksidatif ve Non-oksidatif metabolizması

### 2.2.1. Oksidatif Etanol Metabolizması

Etanolün insan ve hayvanlardaki oksidatif metabolizması iki evrede olur. Birinci evrede etanol, alkol dehidrogenaz (ADH), mikrozomal etanol oksidasyon sistemi (MEOS) ve katalaz tarafından asetaldehite oksitlenmektedir. İkinci evrede ise asetaldehit, aldehit dehidrogenaz (ALDH) tarafından asetata dönüşür. Katalaz ve mikrozomal yolların Km değerleri ADH'tan yüksek olduğu için sadece çok yüksek etanol seviyelerinde veya ADH inhibe olduğunda devreye girerler (şekil 2.4), (126).

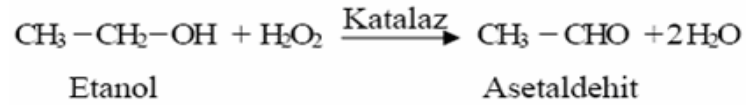


Şekil 2.4: Etanol metabolizması

Katalaz-peroksit sistemi, beyinde etanolü asetaldehite okside eden ana enzimatik yoldur. Bu yüzden birçok nöral doku preparasyonunda katalaz-peroksit sisteminin aktivitesi, farmakolojik veya genetik etkilerle bozulduğunda etanolden asetaldehit oluşumu önemli derecede azalır. Fakat aynı çalışmalarda ADH ya da P4502E1'in engellenmesi in vitro asetaldehit üretimini etkilememiştir. Aragon ve arkadaşları, direkt olmasa da etanol ve beyindeki katalaz-peroksit enzimatik sistemi arasındaki ilişkiyi in vivo kanıtlar sağlamışlardır (97).

## 2.2.2. Katalaz Metabolizması

Katalaz çoğu organizmada var olan genel bir enzimdir ve çok güçlü bir katalizördür, metabolizmanın zararlı bir yan ürünü olan hidrojen peroksiti suya ve oksijene çevirir. Aynı zamanda vücuttaki formaldehit, alkoller, fenoller ve formik asit gibi toksinleri okside eden katalaz bilinen bütün hayvanlarda vardır ve yaşam için vazgeçilmezdir (Şekil 2.5). Bir katalizör olmasının yanı sıra süttten hidrojen peroksit ayırarak peynir yapılmasında, kontak lenslerin dezenfekte edilmesinde ve ambalajlı yiyeceklerin okside olmasının engellenmesinde de kullanılır. Cohen ve arkadaşları, katalazın hidrojen peroksiti substrat olarak kullanarak beyindeki etanolü okside ettiğini göstermişlerdir (32). Aragon ve arkadaşları, rat beyinlerindeki bütün kan alınsa dahi etanolden asetaldehit oluşturulduğunu göstermişlerdir (8).



Şekil 2.5: Katalaz yoluyla etanolün asetaldehide dönüşümü

## 2.2.3. Non-Oksidatif Etanol Metabolizması

Etanolün non-oksidatif bir şekilde metabolize olması iki yolla olur;

- a. Fosfatidiletanol yolu
- b. Yağ asidi etil esterleri (FAEE) yolu.

## 2.2.3.1. Fosfatidiletanol yolu

Etanol, fosfolipite baş grup olarak eklenerek fosfatidiletanol oluşturabilir. Bu dönüşüm etanolün varlığında, fosfolipaz D'nin fosfatidilkoline etkisiyle olur. Çoğu hücre fosfatidiletanol sentezleme kapasitesine sahiptir. Etanol ve fosfolipaz D arasındaki etkileşim hücrenin işlevine zarar verebilir. Bu zarar, hücre içi sinyal kaskatlarındaki bozulma yüzünden fosfatidik asit sentezinin engellenmesi ve fosfatidiletanolün direkt etkileriyle olur. Fosfatidiletanol rat beyincik zarında, [<sup>3</sup>H]inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) molekülünün reseptörüne bağlanmasını engeller. Bu etki fosfatidik asit tarafından da taklit edilir ancak diğer fosfolipidler aynı etkiyi göstermezler. Fosfatidiletanol ve fosfatidilbutanol insan eritrositlerinin zarlarında bulunan Ca<sup>2+</sup> pompalarının aktivitesini artırır. Fosfatidiletanol ve fosfatidilbutanol tarafından yapılan uyarılma fosfatidilserininkinden farklıdır. Fosfatidiletanol kalmodulin tarafından uyarılan Ca<sup>2+</sup>-ATPaz'ın aktivitesini artırırken, fosfatidilserin arttırmaz. Fosfatidiletanol, diğer asidik fosfolipidler gibi, ATPaz'ın konformasyonunu Ca<sup>2+</sup> ve ATP'nin aktif bölgeye daha iyi ulaşabilmesini sağlayacak şekilde değiştirebilir (13,80).

## 2.2.3.2. Yağ asidi etil ester (FAEE) yolu

Fazla alkol alımının ciddi sağlık problemlerine yol açtığı bilinen bir gerçektir. Alınan etanolün çoğunluğu karaciğer tarafından metabolize edilir. Buna rağmen, etanol beyinde toksik etkilere sahiptir. Etanol metabolizmasının son ürünü olan asetaldehitin, karaciğerde alkole bağlı hastalık oluşmasında etken olduğu genel olarak kabul edilmiştir. Fakat asetaldehit; oksidatif metabolizmanın minimum olduğu ya da hiç olmadığı beyin, kalp ya da pankreas gibi organlardaki hasarlardan ve kronik alkoliklerde organ hasarlarının değişik şekillerde görülmesinden sorumlu tutulamaz. Bu yüzden, alkole bağlı organ hasarlarında diğer biyokimyasal araçlar önemlidir. Son dönemde, alkol metabolizması için yeni bir yol rapor edilmiştir. Bu yolun ürünleri olan yağ asidi etil esterler (FAEE), yağ asidi ve etanolden sentezlenirler (23).

Etanol ve diğ er kısa zincirli alkoller, potansiyel olarak sitotoksik ve kısmen hücre tipinden bağımsız birçok hücre sel tepki gösterirler. Kısa zincirli alkollere akut ya da kronik şekilde maruz kalınması fosfolipid ve yağ asidi metabolizmasında hatalara, hücrenin redoks durumunda de ğ iş ikliklere, enerji durumunun bozulmasına ve reaktif oksijen metabolitlerinin fazla üretilmesine sebep olur. Hücre iç i sinyal kaskatlarının fosfatidik asit senteziyle engellenmesi, fosforilasyon potansiyelinde düş me, yağ peroksidasyonu, ç özücü alkollerin hücre proliferasyon hızını etkilemesi hücre sayısının de ğ iş imine sebep olur. Kısa zincirli alkollerin non-oksidatif metabolizması (etanol fosfolipitlerinin fosfolipaz D aracılı ğ ıyla sentezini de iç erir) ve yağ asidi etil esterlerinin sentezi, alkollerin zar yapısını ve hücre işlevini etkileyen ek mekanizmadır (13).

Alkol tabanlı ç özücüler yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye sahiptir ve bu toksisite hücrenin çeşidinden bağımsızdır. %5 ve %50 (wt/vol)(yaklaşık 1.1 ve 11M) konsantrasyonlarda etanolün üç klonal hücre dizisi ve izole edilmiş hepatositler üzerinde eşit toksik etkisi oldu ğ u görülmüştür. Bu konsantrasyonlardaki hücre ölü mü, zar lipitlerinin ç özünlmesine ya da proteinlerin denature olmasına ba ğ lı olabilir. Sonuç lar alkollerin polaritesiyle yüksek derecede ilgilidir. Zar bütünlüğünün ölçüsü olarak laktat dehidrojenaz salınımı kullanılmıştır. Alkollerin lipid ç özünlükleri ve zar bütünlüğü arasındaki ilişkinin minimum ya da orta düzeyde hasarlarda geçerli oldu ğ u gösterilmiştir. Metanol, etanol ve propanolün hepatoblastoma hücreleri için akut toksisiteyi de hidrofobisiteyle pozitif şekilde alakalıdır. Birçok alkolün, beyin sinaptosomal zarlarını bozdu ğ unun belirlenmesi için kullanılan en iyi haberci alkolün yağ ç özünlüğüdür (13,23,38).

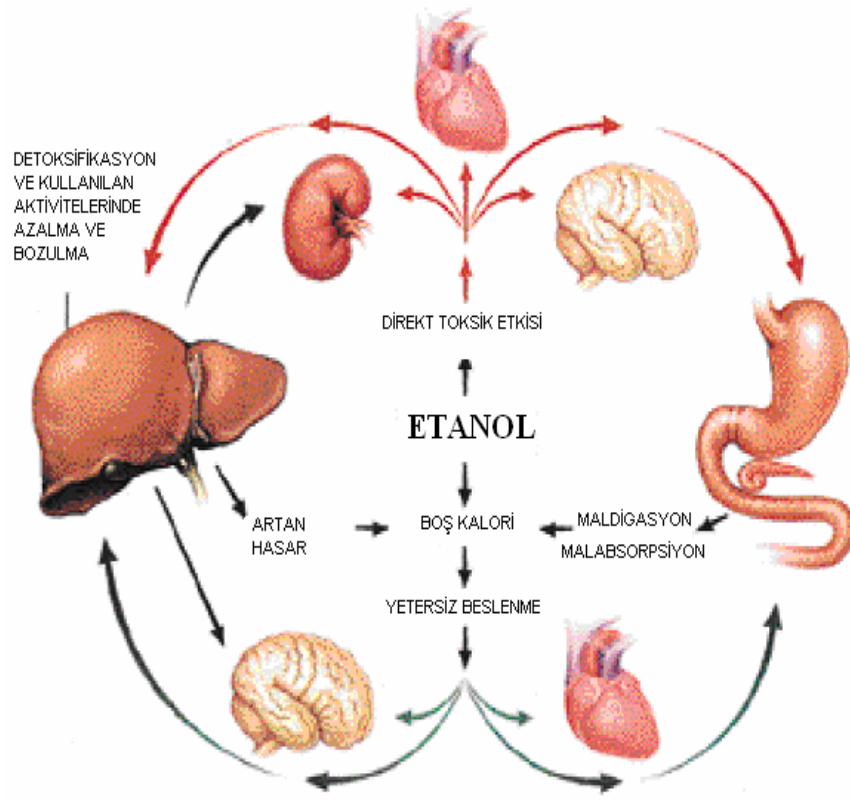
Akut etanol intoksikasyonundan sonra insan dokusunda belirlenen etil esterler; palmitik (16:0), palmitoleik (16:1), stearik (18:0), oleik (18:1), linoleik (18:2) ve araş idonik (20:4) asitdir. Diğ er alifatik (metanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-oktanol ve 3-metil-1-oktanol) ve halojen (2-kloroetanol, 2,2-dikloroetanol, 2,2,2-trikloroetanol ve 2-bromoetanol) alkoller in vivo ve in vitro koşullarda yağ asitleriyle birleşimlerinde substrattırlar (7,13).



Yağ asidi etil esterlerinin biyolojik önemi şu bulgulardan kaynaklanır;

- a. FAEE, karaciğer ve kalpten izole edilen mitokondrilerde ayrışmaya ve solunum hızının yavaşlamasına neden olur,
- b. FAEE oluştuğunda, FAEE'yi serbest yağ asitlerine parçalayan bir lipaz enziminin bulunduğu mitokondriyal zarla ilişki içindedir. FAEE bilinen bir oksidatif fosforilasyon bozucusudur,
- c. FAEE'nin zarlar üzerinde etanolden bir kat daha fazla düzen bozucu etkisi vardır,
- d. Düşük konsantrasyonlarda bile FAEE'nin hepatik protein sentezini ve triaçilgliserol lipaz enzimini engellediği gösterilmiştir (13).

Bunun yanısıra, aşırı etanol kullanımından sık sık hasar gören dokular, en yüksek düzeyde FAEE sentezi aktivitesine ve akut etanol alımından sonra en yüksek FAEE düzeyine sahiptirler. Pankreas, FAEE sentezini en yüksek düzeyde gösterir. Onu karaciğer, kalp, beyin, yağ dokusu ve çizgili kaslar takip eder (13), (şekil 2.6). Etanol; direkt olarak beynin sinaptik yapısını (örneğin lipid zar ve sinaptik zarın yapısını) aşırı derecede etkiler (43), iç zar partiküllerini artırırken sinaptik vezikül sayısını azaltır (101), mitokondriyal transmembran ve plazma membranını inhibe eder (70).



Şekil 2.6: Etanolün meydana getirdiği organ hasarı.

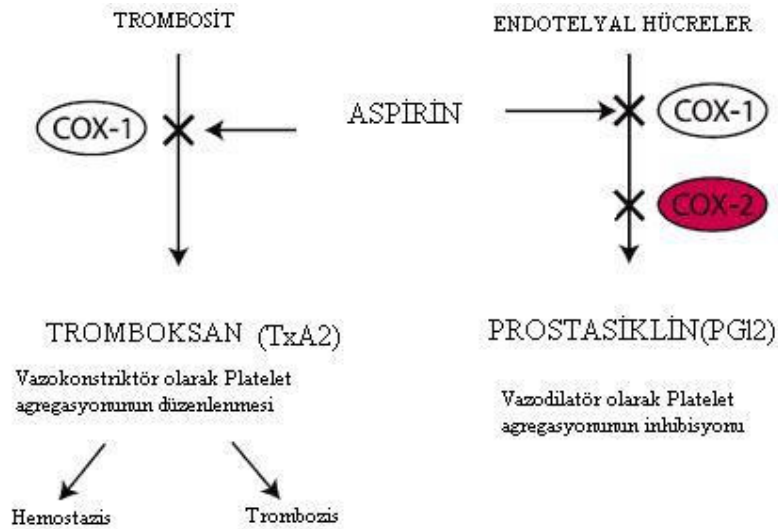
## 2.3. Aspirin ve Etki Mekanizması

### 2.3.1. Aspirinin tarihçesi

Aspirinin kökeni doğadır. Hipokrat (M.Ö 460–377), söğüt (*Salix sp.*) kabuklarından elde edilen bir özsuynun ağrı yatıştırıcı etkisinden söz eder. Ülkemizde ve dünyada ‘aspirin’ adı ile bilinen asetilsalisilik asit ve türevleri tedavide oldukça sık kullanılmaktadır. 10 Ekim 1897’de kimyacı Felix Hoffman, ilk defa kimyasal açıdan saf ve stabil bir biçimde hazırladığı asetilsalisilik asit hakkında laboratuvar defterine giriş yapmıştır. O devirde kullanılan geleneksel salisilik asitlerden daha iyi tolere edilen bir preparasyon hazırlamak için kendini sistematik bir aramaya sevk edip, sonuçta çözümü salisilik asidin asetillenmesinde bulmuştur. 1 Şubat 1899’da yapılan başvuruyu takiben, Aspirin adı, Berlin’deki Imperial Patent Ofisi’nde, 6 Mart 1899 günü bir marka olarak kaydedildi. Yeni analjezik ve antipiretik, önceleri toz şeklinde satıldı ve çok kısa zamanda büyük miktarlarda üretildi. 1900’de Friedrich Bayer, tozu 500 mg’lık tabletler haline sıkıştırmayı başardı. Böylece asetilsalisilik asit piyasaya tablet olarak çıktı. 1970’lerin başlarında, aspirinin prostaglandin sentezi inhibitörü olduğu ve sonra da trombosit yapışkanlığını inhibe ettiği (trombosit agregasyonu inhibisyonu) saptanmıştır (22,32,95). Aspirinin prostaglandinlerin yapımını engellediği 1971 yılında İngiliz farmakolog Prof. John Vane tarafından bulundu. Bu çığır açan buluşuyla Vane, 1982 yılında Nobel Tıp ödülüne layık görüldü.

### 2.3.2. Aspirin etki mekanizması

Aspirinin iltihap giderici, ateş düşürücü ve ağrı kesici etkilerini oluşturmada kullandığı ana mekanizma siklooksijenaz enzimlerinin (COX-1, COX-2) baskılanmasıdır (Şekil 2.7). COX-2 enzimleri hücrelerdeki serbest radikalleri, önemli sinyal molekülleri olan prostaglandinlere çevirir ve böylece ağrı hissi başlar. COX-2'nin çalışması engellenince prostaglandin üretilemediğinden, ağrının nedeni ortadan kalkmamış olsa da, ağrı hissedilmez. COX-1 enziminin baskılanmasıyla tromboksan-A2 adı verilen maddenin sentezi de engellenir. Bu da aspirine pıhtı oluşumunu engelleme özelliğini katar. Mide kanamasına kadar gidebilen yan etkileri yine COX-1 enziminin baskılanmasının bir sonucudur. Çünkü bu enzim, mide duvarının mide asidinden korunabilmesi için gereken düzgün yapıyı korumaktan sorumludur (98,103).

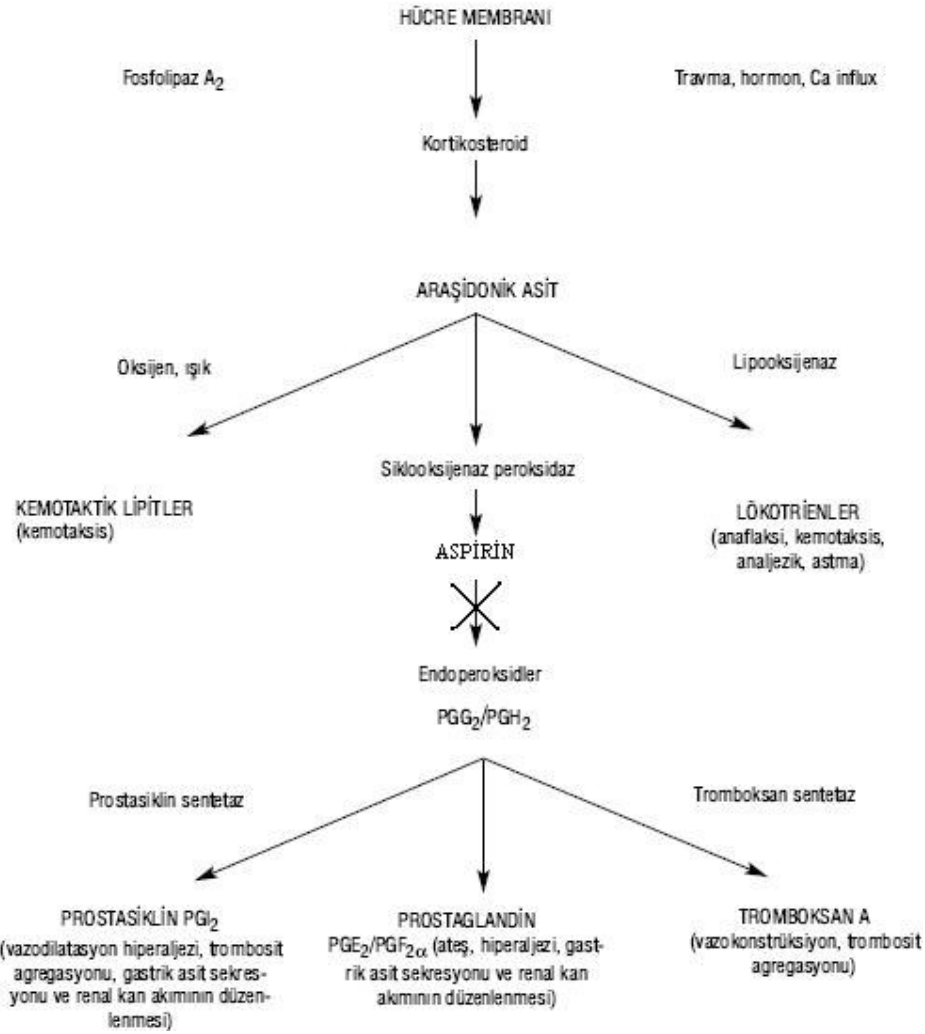


Şekil 2.7: Trombogenezde Aspirinin Etkisi

## 2.3.2.1. Analjezik (ağrı kesici) etki

Aspirin analjezik olarak kullanılan ilaçlardan birisidir. Salisilat metaboliti, orta dereceli ve özellikle inflamatuvar kökenli olan ağrılarda etkili olmaktadır. İnflamasyon sırasında prostaglandin (PG) sentezinin uyarılması, bradikinin gibi aracılarda (mediatör) sinirleri ağrılı uyarılara duyarlı hale getirmektedir. Aspirin, PG sentezini inhibe ederek sinirlerin uyarılmasını engellemekte ve ağrı oluşumunu azaltmaktadır (şekil 2.12). Aspirin sinir hücrelerinin zarları üzerinde, uyarıların merkezi sinir sistemine iletilmesinde ve hipotalamus üzerinde etkili olarak ağrıyı azalttığı bildirilmektedir. Ağrı, vücudun hasarı bildirme yoludur. Lokal doku hasarı; histamin, serotonin, asetilkolin, kinin, prostaglandinler gibi çeşitli doku hormonlarının salınımını uyarır (95). Bu maddeler hem inflamasyonu hem de nosisepsiyonu yönlendirirler. Histamin, serotonin, asetilkolin ve kinin gibi nörotransmitterler muhtemelen prostaglandinlerin varlığında, nosiseptörleri aktifleştirirler ve ayrıca prostaglandin sentezini de stimüle ederler (98).

Aspirin kısaca siklooksijenazı ve bu yolla araşidonik asidin siklik endoperoksitlere dönüşümünü inhibe etmektedir. Siklooksijenaz (COX) enzimini bloke ederek, araşidonik asitten tromboksan ve prostaglandin (PG) oluşmasını engeller (şekil 2.8). Bu inhibisyon geri dönüşümsüz olup, hem sreye hem de konsantrasyona bağlıdır. Ayrıca asetilsalisilik asidin analjezik etkisinin mekanizması; kininlerin reseptörlerinden antagonizma ile uzaklaştırılmasına, mast hücrelerinden serotonin ve histamin salınımının inhibisyonuna dayanmaktadır (32,62,64).



Şekil 2.8: Aspirinin Etkisi

Prostaglandin: Otokrin ve parakrin düzenleyici işlevlere aracılık eder, iki genel fizyolojik etkisi vardır. Birincisi düz kasın kasılma durumu üzerindeki etkisi, ikincisi de sinyal iletimini aktive eden dış uyarıya hedef dokuların yanıtını değiştirici etkidir. Trombositlerin agregasyonunu tetikleyerek kanın pıhtılaşmasını sağlar.

Prostasiklin: Damar endoteli tarafından sentezlenen temel prostaglandindir, bir vazodilatördür, damar düz kasını gevşetir, trombositlerin agregasyonunu ve endotel yüzeyine tutunmayı engeller.

Tromboksan A2: Trombositler tarafından sentezlenir, arterleri daraltır ve trombosit agregasyonunu tetikler.

## 2.3.2.2. Anti-inflamatuar etki

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ve prostasiklin, vasküler geçirgenliği arttırarak ödeme, lökosit infiltrasyonuna, endojen inflamatuvar aracılarının ve bradikininin ağrı yapıcı etkisinin artmasına neden olur. Aspirin, PG'lerin tüm hücrelerde yapım ve salınımını engelleyerek inflamatuvar yanıtı azaltır, hücre zarına direkt etki ederek nötrofil ve monosit migrasyonunun damar dışına geçişlerini engeller. Rubor (kızarıklık), kolor (sıcaklık), dolor (ağrı), tümör (şişlik) ve functio laesa (fonksiyon kaybı) inflamasyonun klasik semptomları olup çok kompleks bir sinirsel ve kimyasal mekanizma ile ilgilidir. Aspirinin anti-inflamatuar etkisi öncelikle vasküler fonksiyonlar üzerinedir. Burada da temel farmakolojik etki, prostaglandin sentezinin inhibisyonudur (32,62).

Aspirinin anti-inflamatuar etkinliği için öne sürülen farmakolojik etkileri; kapiller zarın stabilizasyonu, sayısız mediyatörün inhibisyonu, trombosit agregasyonunun önlenmesi, lizozomların stabilizasyonu, anti-inflamatuar etkili proteine bağlı peptidlerin salınımı, mukopolisakkarit metabolizmasına etkisi olarak sıralanabilir (32).

## 2.3.2.3. Antipiretik (ateş düşürücü) etki

Aspirin PG sentezini inhibe ederek antipiretik etkisini gösterir. Enfeksiyon, doku zedelenmesi, inflamasyon gibi uyarılarla dolaşımdaki pirojenler ve yerleşik monositer fagositlerden salınan pirojenler anterior hipotalamusta PG yapımını uyarır. Oluşan PGE<sub>2</sub> hipotalamusun ağrı/ateş eşiğinin değişmesine, sonuçta da ateşe neden olur. Aspirin PG yapımını engelleyerek ateşlenmeyi durdurur. Bu etkisi antiinflamatuvar etkisi için gerekli dozlardan daha düşük dozlarda ortaya çıkar. Aspirin diğer antipiretiklere göre daha yüksek ateşlerde (39°C) etkili olmakta ve sirkadian ritmini etkilememektedir. Bugünkü görüşlere göre; ağrı, ateş ve inflamasyon gibi semptomlar prostaglandinlerin aşırı üretimi sonucu oluşmaktadır. Özellikle prostaglandinlerden E1 ve E2 merkezi ısı düzenleyicileridirler. Bu yüzden, prostaglandin sentezi inhibisyonu aspirinin antipiretik etkisinin temel mekanizmasıdır (22,32). Çevresel vazodilatasyonun şiddetli terlemeyle

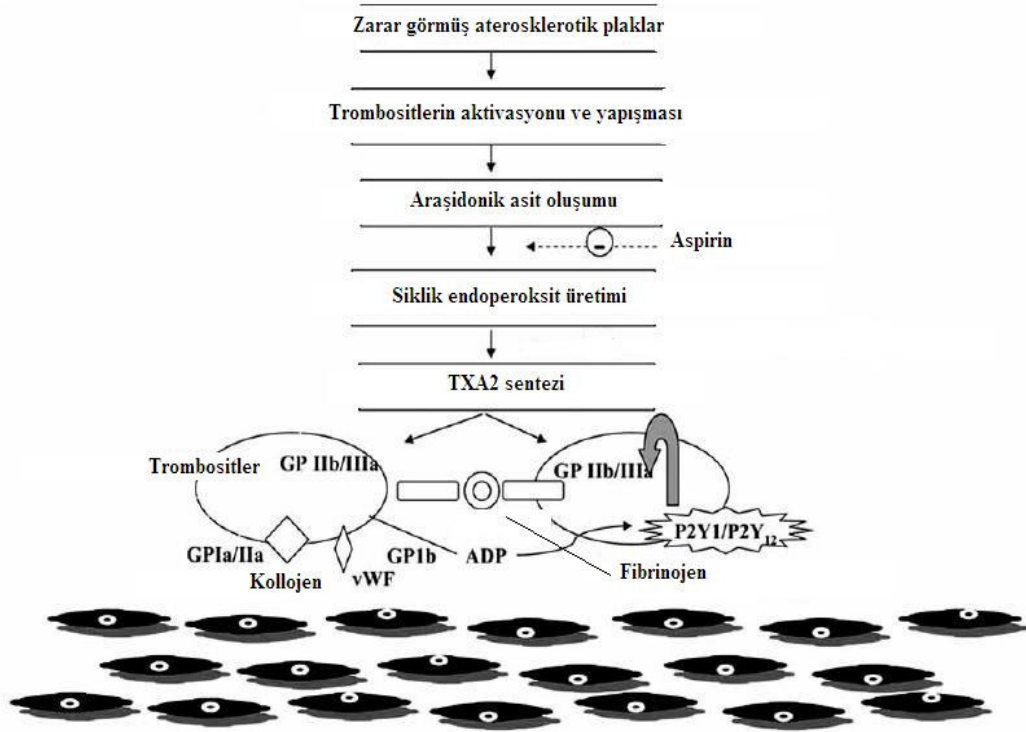
birlikte önemli ölçüde ısı kaybına yol açarak bu sayede ateşin düşmesine neden olduğu yolundaki görüş hala geçerli olsa da bu, ana mekanizma değildir.

### 2.3.2.4. Trombosit agregasyonunun inhibisyonu

Aspirin trombosit siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ederek ADP salınımını engeller ve trombosit agregasyonu oluşturulamaz. Aspirin bu etkisini düşük dozlarda ve geri dönüşümsüz olarak gösterir. Son dozu izleyen 4–7 gün boyunca etkisi sürer. Trombogenezdeki temel faktörler, trombositler ve damar duvarı arasındaki etkileşimdir. Birçok sebepten kaynaklanabilen vasküler endotel hasarı sonucunda, subendotelial yapıların kollejen lifleri açığa çıkar ve trombositler adhezyon ile bu liflere tutunurlar. Fonksiyonel davranışları, indüklenen irritasyon sebebiyle değişir. Bu, trombositlerin agregasyonuna, vazoaaktif ve prokaogulan içeriklerinin salınımına yol açar. Daha fazla trombosit aktive olur ve koagülasyon olayına kırmızı kan hücreleri katılır. Oluşan paryetal trombüs büyüyebilir ve aterosklerotik vasküler birikimlerle birleşerek tam tıkanıklığa yol açabilir. Fizyolojik koşullarda, prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) ve tromboksan (TxA<sub>2</sub>) arasında dinamik bir denge bulunmaktadır. TxA<sub>2</sub> trombositlerde oluşur ve belirgin agregasyon tetikleyici ve vazokonstriktör özelliklere sahiptir. PGI<sub>2</sub>, ise damar duvarında sentezlenir ve bu özelliklere karşıt etki eder. Hasar görmüş vasküler endotel sebebiyle PGI<sub>2</sub> sentezi bozulursa TxA<sub>2</sub> fazlalığı ortaya çıkar ki bu da artmış trombosit agregasyonuna ve adhezyonuna yol açar. Aspirin, siklooksijenazı geri dönüşümsüz olarak inaktive eder ve sonuçta trombositlerde TxA<sub>2</sub> üretimini de inhibe eder (Şekil 2.9). Bu çekirdeği olmayan trombositler yeni TxA<sub>2</sub>'yi yeniden sentezleyemezler. Fakat çekirdekli endotel hücreleri kendilerini inhibisyonundan kurtarabilirler ve hatta aspirinin etkisinden sonra bile yeniden siklooksijenaz üretebilirler. Bu nedenle, PGI<sub>2</sub> de yeniden sentezlenir (16,22,111).



Trombosit agregasyonunun inhibisyonunda aspirinin biyokimyasal etki mekanizması, trombositlerde siklooksijenazın asetilasyonla geri dönüşümsüz inhibisyonuna ve damar duvarında siklooksijenazın geri dönüşümlü inhibisyonuna dayanır (111).



Şekil 2.9: Trombosit agregasyonu

P2Y1 ve P2Y12, ADP reseptörleridir, GP Ia/Ia ve Ib kollejene bağlı trombosit zar proteinleridir, vWF trombositlerin hasar gören damarların subendoteline bağlanmasına neden olur. COX-1'in bir ürünü olan TXA2 trombosit aktivasyonunda görev alır, bir aktivatör tarafından uyarıldıklarında P2Y1 ve P2Y12 fibrinojen bağlama proteini GP IIb/IIIa'yı aktive eder ve o da TXA2'yle birlikte trombosit agregasyonunu ve salgılanmasını sağlar.

## 2.3.2.5. Aspirinin Yan Etkileri

Aspirinin yan etkileri özellikle gastrointestinal sistem üzerinedir. Aspirinin uzun zaman uygulanması gastrointestinal ülseri tetikler ve bunun sonucunda gastrointestinal kanamaya yol açar. Bu istenmeyen yan etki, siklooksijenaz (COX) inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Aspirinin siklooksijenazı inhibe etmesi, prostaglandin ve tromboksan gibi proinflamatuvar mediatörlerin sentezinin azalmasıyla alakalıdır. Gastrik mukozada COX kaynaklı hücre koruyucu prostaglandin inhibisyonu aspirinin yan etkisini açıklar (26,132).

Başka kaynaklarda da yine gastrointestinal hasar üzerine nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) ilaçların etkileri üzerinde durulmuştur. Oksijen radikali kaynaklı lipid peroksit ve nötrofil aktivasyonu NSAID kaynaklı gastrik mukozal hasarın oluşmasına neden olur. Bu hipotezi destekleyen üç unsur vardır:

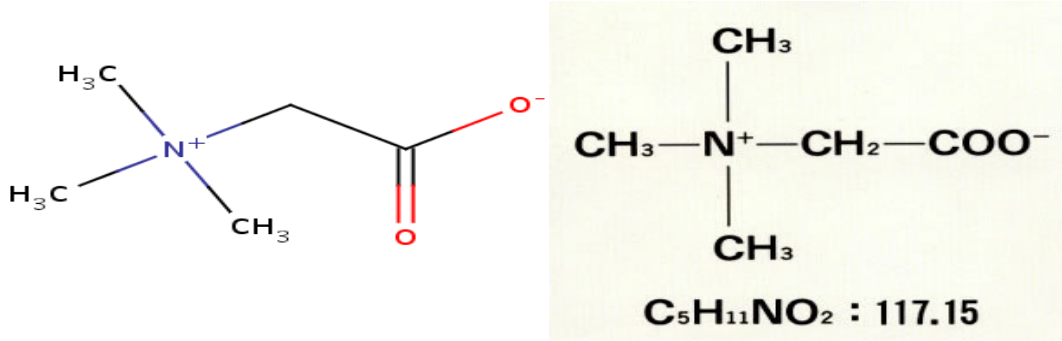
1. Hem lipid peroksitler, hem de nötrofiller aspirin uygulamasından sonra insan ve hayvan gastrik mukozasında birikir.
2. SOD ve DMSO ile muamele NSAID'ler tarafından yapılan mukozal hasarı iyileştirir.
3. Mukozal hasarlar nötrofilleri eksik olan hayvanlarda inhibe olmuştur (132).

Aspirinin karbohidrat metabolizmasında adrenal medulla ve korteksi uyarır, glukoz-6-fosfataz aktivitesini artırır (hiperglisemi) böylece glikoliz artar, glikoneogenez bozulur (hipoglisemi). Protein sentezini inhibe ederek protein degradasyonunu hızlandırır, aminoasidlerin tübüler geri emilimini inhibe eder. Lipid metabolizmasında lipogenez düşer, lipoliz artar, plazma proteinlerinde yağ asitlerinin yapısı bozulur. Trombositlerin aspirine yanıtları doza bağlı değişken sürelidir (93).

Aspirinin eritrosit ve trombosit zarı üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar, aspirinin zar akıcılığını ve lipid düzenini bozduğunu bunun yanı sıra lipid protein matriksi ve zar protein konformasyonunda düzensizliklere neden olduğunu göstermiştir (54,99,128).

## 2.4. Betain ve Metabolizması

Betain mikroorganizmalarda, tahıllarda, midyede, ıspanak ve şeker pancarı gibi pek çok besinde bulunan bir bileşiktir. Betain, Zwitteriyonik quarterner amonyum bileşiği olup trimetil glisin, glisin betain, lizin ve oksinörin isimleriyle de bilinmektedir (Şekil 2.10). Glisin aminoasidinin metillenmesiyle oluşmuştur. Betainin yapısal formülü  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ ’dür, molekül ağırlığı 117,15’dir ve kimyasal olarak 3 metil grubuna sahip olduğundan metilamin olarak karakterize edilir (34,74).



Şekil 2.10: Betain (trimetilglisin), kimyasal formülü

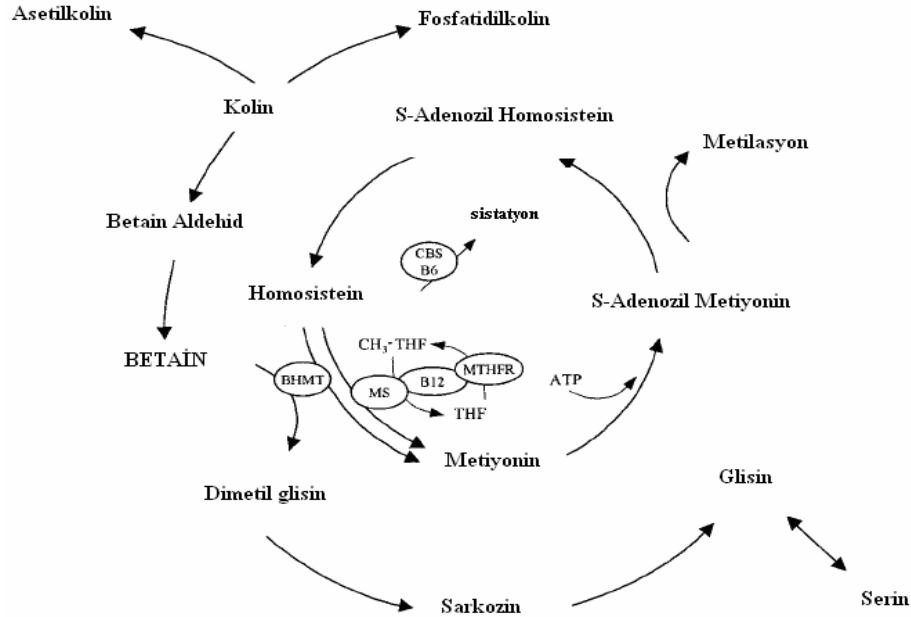
Betain ilk olarak şeker pancarında (Beta vulgaris) 19.yy’da keşfedilmiştir ve daha sonra pek çok diğer organizmada da bulunduğu görülmüştür. Stress altındaki hücreleri koruyan bir organik ozmolittir ve birçok biyokimyasal yoldaki transmetilasyon reaksiyonları için metil kaynağıdır. Bitki ve mikroorganizmaları ozmotik inaktivasyona karşı korur. Yüksek tuzluluk ve sıcaklık stresi gibi durumlarda betain sentezi artar. Betain; rekabetçi bir ozmolit olarak hücrelerin su alınımını artırır, inorganik tuzların yerine geçer ve hücre içi enzimlerin ozmotik ya da sıcaklık kaynaklı inaktivasyonuna karşı koruyucudur. Bir metil donorü olarak optimum beslenme için gerekli olan metiyonin ve kolinin oluşması için gereken tek karbon birimlerini sağlar. Büyümeyi, besin kullanım verimliliğini artırır ve vücut yağını azaltır. İnsanlar betaini, yapılarında

betain ve kolin içeren bileşikler bulunduran besinler yoluyla alırlar. Betain bir seri enzim reaksiyonuyla katabolize olur. Bu çoğunlukla böbrek ve karaciğer hücrelerinin mitokondrilerinde gerçekleşir. Transmetilasyon reaksiyonları metil (tek karbon) gruplarının metiyonin döngüsü içerisinde transferini içermektedir. Homosisteinin metiyonine dönüşümü, metiyonin düzeyini korumak, homosisteinini detoksifiye etmek ve S-adenozilmethionin (SAM) üretmek için gereklidir (10,11,34,70,74).

Total homosisteinin konsantrasyonlarındaki yükselme ve düşük SAM konsantrasyonları kronik hastalıklarla ilişkilidir. Betain; serum metiyonin, transmetilasyon oranını, homosistein remetilasyonu ve metiyonin oksidasyonunu arttırmaktadır. Betain enjekte edilen hayvanların kırmızı kan hücrelerinde protein, kreatin, fosfolipid, hormonlar, poliaminler, karnitin ve adrenalın sentezi ile DNA metilasyonunda direkt metil vericisi olarak iş gören SAM oranı doza bağlı olarak artmaktadır. Eğer betain katabolize olmazsa organik bir ozmolit olarak iş görür. Hücresel hidrasyon durumunun düzenlenmesi hücre fonksiyonunun devamlılığı açısından önemlidir. Betainin, betain-homosistein-metiltransferaz (BHMT) yoluyla homosisteini remetile ederek hepatik SAM ve glutatyon seviyelerini koruduğu ve bu yolla metionin metabolizmasındaki alkol kaynaklı değişimleri azalttığı daha önce gösterilmiştir. Ayrıca betain, hücre içi SAH seviyesindeki etanol kaynaklı değişimleri ve SAM/SAH oranını düşürür, homosistein salınımındaki artışı engeller (34,70), (Şekil 2.11). Bunun yanı sıra, betainin in vivo ortamda etanol kaynaklı hepatik steatozu azalttığı ve tersine çevirdiği gösterilmiştir. Bu nedenle, betain etanole bağlı karaciğer hasarını önler, bunu da metionin metabolik yolundaki değişimleri düzelterek ve önemli metilasyon reaksiyonlarını koruyarak yapar (10,11).

Her ne kadar hem betainin hem de SAM'in alkolik karaciğer rahatsızlıklarında potansiyel tedavi edici olarak kullanılmaları savunuluyorsa da, tedavi edici etkilerinin mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu sebeple, etanol kaynaklı karaciğer hasarlarında betain ve SAM'in iyileştirici fonksiyonlarını, bu ajanların hepatoselüler SAM/SAH oranlarını, hepatik trigliserit seviyelerini ve homosistein üretimi üzerindeki etkilerini eşzamanlı olarak incelemek suretiyle karşılaştırmalar yapmak daha uygundur.

Betain, homosisteini remetile etme yeteneği sayesinde SAH seviyelerini dűşürmekte ve SAM/SAH oranındaki etanol kaynaklı dűşűşű durdurup eski haline getirmekte, hűcresel metilasyonu uyarmakta, steatozu ve homosistein kaynaklı toksisiteyi engellemektedir. Diđer taraftan SAM, sadece SAM/SAH oranı ile metilasyon kusurları üzerinde etkili olmakta ve uzun süreli kullanımı, homosistein salınımını arttırma özelliği yüzünden zararlı olabilmektedir. Bu sebeple betain sadece karaciğer hastalıklarında değil, homosistein artışı ve metilasyon bozukluklarına bağlı diğer hastalıklarda SAM'dan daha etkili bir tedavi edici ajan olarak kullanılabilir (11,34,70).



Şekil 2.11: Betain Metabolizması

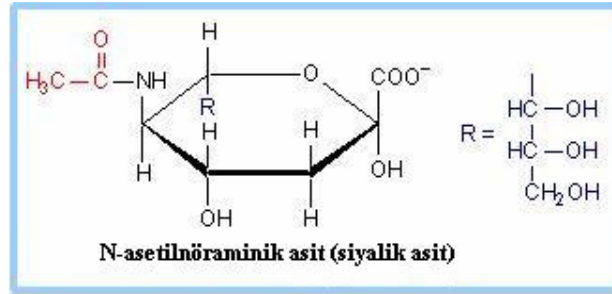
Betainin ozmolit fonksiyonuna dair pek çok örnek vardır. Örneđin, böbrekte birikerek hücreleri yüksek elektrolit ve üre konsatrasyonuna karşı korur. Betain karaciğer makrofajlarındaki (Kupffer hücreleri) ozmotik stresi, tümör nekroz faktör  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) üretimini, fagositoz ve siklooksijenaz olaylarını azaltarak imműn fonksiyonunu düzenler. Alkole beslenen hayvanlara betain desteği verilmesi alkole

## PDF Eraser Free

bağlı yağlı karaciğer durumunu kısmen d¼zeltir. Homosisteinin ve S-adenozin homosisteinin konsantrasyonlarını, endoplazmik retikulumun stresini ve karaciğer hasarını azaltır; 5-metil tetrahidrofolat (CH<sub>3</sub>-THF)'in etanole bağlı birikimini engeller; eritrosit zarlarını korur; vitamin A'nın azalmasını ve peroksidatif hasarı engeller (10,11,34).

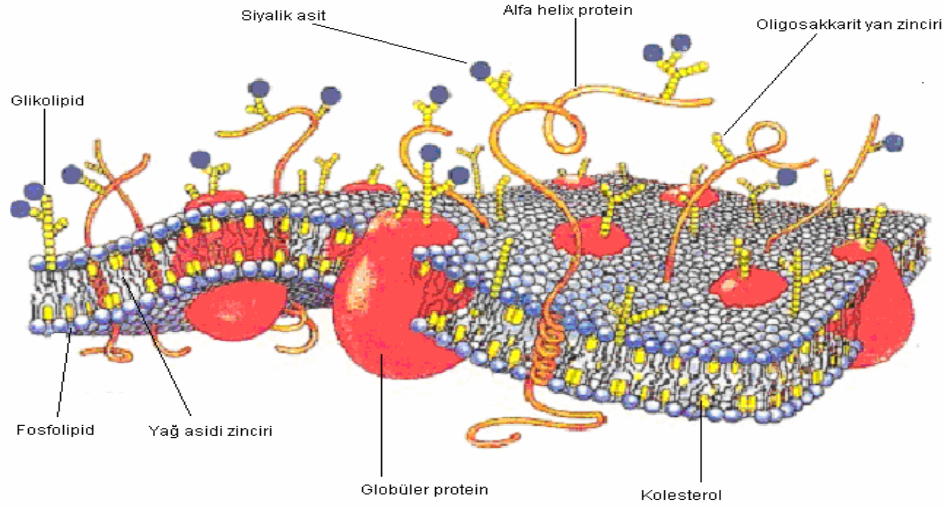
## 2.5. Siyalik Asit ve Metabolizması

Siyalik asitler, nöraminik asitin N (azot) ve O<sub>2</sub> (oksijen) açıl türevleri olup hem glikoproteinlerin hem gangliozidlerin yapı taşlarıdır (Şekil 2.12). Nöraminik asit, mannozamin ve pirüvattan türeyen dokuz karbonlu bir şekerdir. N-asetil nöraminik asit her biri değişik bölgelerinden asetillenmiş siyalik asit ailesinin bir üyesidir. Bu bileşikler genellikle glikoprotein, glikolipid veya daha nadiren glikozaminoglikanların oligosakkarid yan zincirlerinin terminal karbonhidrat kalıntıları olarak bulunurlar. İnsan dokularında bulunan başlıca SA, N-asetilnöraminik asittir (NeuAc),(107,125). Siyalik asidin yapısı şekil 2.12’de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Siyalik asidinin yapısal formülü

Zarda bulunan glikoprotein ve glikolipidlerin büyük bölümü ise N-asetilnöraminik asit olup tanınma, haberleşme ve adhezyon etkinliklerini düzenler. Bu görevlerin yanı sıra reseptör fonksiyonlarının düzenlenmesi, transport işlemleri, hücrenin büyümesi ve antijenik aktiviteyi kontrol etmek gibi yaşamsal görevler yapar (mRNA virüsleri). Siyalik asitler, zarda glikoprotein ve glikolipidlerin uç kısımlarına bağlı olarak bulunurlar (Şekil 2.13). Bu konumlarından dolayı zar kararlılığının sürdürülmesinde önemli görevler yüklenirler, katyon değişimi, reseptör fonksiyonları, zar polaritesinin sürdürülmesi ve hücre içi etkileşimler gibi olaylarda rol alırlar (125).

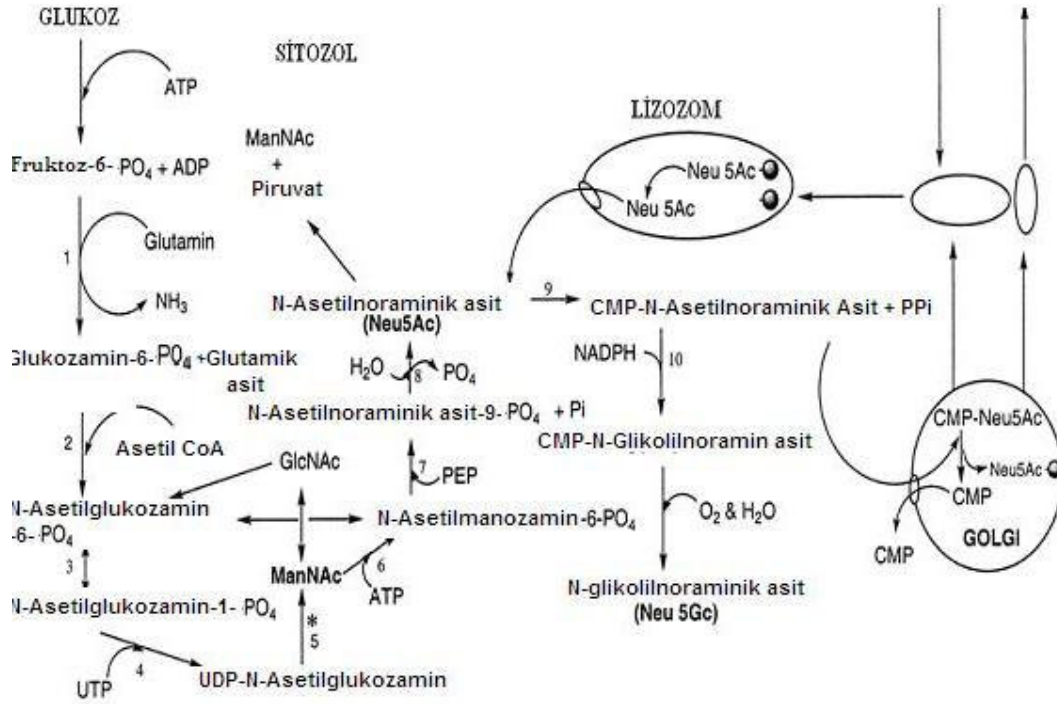


Şekil 2.13: Hücre zarında siyalik asidin yapısı

### 2.5.1. Siyalik Asit Metabolizması

Amino şekerler, glikozaminoglikan, glikoprotein, glikolipid ve bazı oligosakkaritlerin önemli yapı taşlarıdır. Bağ dokusunda amino şeker sentez yolu çok aktiftir, glikozun % 20'si bu yolda kullanılır. Fruktoz-6-fosfat monosakkaridi N-asetil glikozamin ve N-asetilnöraminik asitin ön maddesidir. Amino grubu vericisi olarak glutaminin kullanılmasıyla fruktoz-6-fosfattan glikozamin-6-fosfat oluşur. Bu reaksiyon fruktoz-6-P aminotransferaz enzimi tarafından katalizlenir. Amino şekerler genelde N-asetillenmiş biçimde bulunur. Asetil verici asetil-KoA'dır. SA'lerin sentezi sitozolde meydana gelir. Glikozamin-6-P üç basamaklı bir enzimatik reaksiyon sonucu UDP-N-asetilglikozamine çevrilir. SA biyosentezi UDP-N-asetilglikozaminin epimerizasyonu ile devam eder (Şekil 2.14). Oluşan N-asetilmannozamin, N-asetilmannozamin kinaz enzimi ile N-asetilmannozamin-6-fosfata çevrilir. N-asetilmannozamin-6-fosfat, aldol kondensasyonu ile fosfoenol piruvat ile birleşir ve N-asetilnöraminik asit-9-fosfatı oluşturur. Bu üründen fosfatın ayrılmasıyla N-asetilnöraminik asit meydana gelir. N-asetilnöraminik asidin diğer tüm SA'lerin öncüsü olduğu bildirilmiştir (125).





Şekil 2.14. Siyalik asidin sentezi

N-asetilnöraminik asit bir oligosakkarite eklenmeden önce sitozin trifosfat ile reaksiyona girerek aktif forma geçmelidir. Pirofosforilaz enzimi sitozin trifosfattan pirofosfatı uzaklaştırır ve kalan sitozin monofosfatı (CMP) SA'ya bağlar. Bu aktivasyon reaksiyonları çekirdekte gerçekleşmektedir. Glikoprotein sentezinde, CMP-SA kalıntılarının bir oligosakkarit zincirine eklenmesi golgide gerçekleşir. Bu eklenme olayından önce CMP-SA kompleksindeki SA kalıntıları sialo-glikoproteinlere transfer edilir ve bu reaksiyonu siyaliltransferaz enzimi katalizler. Lizozomlarda da lizozomal sialidaz enzimi yardımıyla SA oluşur (Şekil 2.14). Siyalik asit biyosentezinde iki geribildirim inhibisyon mekanizması bilinmektedir. Bu mekanizmaların ilki UDP-N-asetilglukozaminin fruktoz-6-fosfatı glukozamin-6-fosfata dönüştüren aminotransferaz üzerine etkisidir. Diğeri ise UDP-N-asetilmanozamini N-asetilmanozamine epimerleştiren 2-epimeraz, CMP-SA tarafından inhibe edilir (125).

İnsanda N-asetil nöraminik asit ve N-glikozil nöraminik asit olmak üzere en az iki tip siyalik asitin olduğu kabul edilmektedir. Siyalik asit insan serumunda ve vücut sıvılarında serbest halde bulunmaz. Serumdaki siyalik asidin % 85–90'nı  $\alpha$  ve  $\beta$  globülinlere bağlı haldedir. Bu formuna proteine bağlı siyalik asit (PSA) denir. Serumdaki geri kalan siyalik asit ise lipid moleküllerine bağlıdır ve lipide bağlı siyalik asit (LSA) adını alır. Proteine ve lipide bağlı siyalik asit fraksiyonları total siyalik asidi oluştururlar (107).

### 2.5.2. Siyalik Asidin Biyolojik Fonksiyonları

Siyalik asid, nöraminik asidin asetilenmiş türevlerine verilen genel isimdir. Siyalik asid zar reseptör fonksiyonlarında, hücrenin hücreyi tanıma ve etkileşimleri, hücresel zarlar ve glikoproteinlerin yapılarının dengelenmesi gibi çeşitli fonksiyonları vardır. Hücre zarının önemli parçalarından olan glikoprotein ve glikolipidlerin oligosakkarit zincirinin terminal sakkariti siyalik asittir. Zarda bulunan bu yapıdaki siyalik asit hücrenin dış yüzeyinde bir negatif yük oluşturur. Bu negatif yük diğer hücreler için bir itici güç meydana getirerek agregasyonu önler. Bu itici güç ayrıca hücrelerin sertliğini sağlar (107,127,129).

Yoğun alkol kullanımı dönemlerinde transferin içindeki karbohidrat içeriği (siyalik asit, galaktoz, N-asetilglukozamin) düşmektedir. Bu haldeki transferin “karbohidrattan yoksun transferin (CDT)” olarak adlandırılmaktadır. Eksikliğin kesin nedeni bilinmemektedir. Ancak alkol ve yıkım ürünlerinin, transferine karbohidrat ekleyen (glikotransferaz) enzimlerin aktivitesini azalttığına ve karbohidrat birikintilerini ortadan kaldıran enzimlerin (siyalidaz) aktivitelerini artırdığına inanılmaktadır (127,129).

Siyalik asidler nöraminik asidin N-asetil gruplarından köken alırlar. Biyolojik sıvıda ve hücre zarlarında glikolipid ve glikoproteinlerin terminal kalıntıları olarak bulunurlar. Alkol tüketiminde siyalik asid derecesinde bir artış gözlenmiştir (69,109,125). Bu nedenle serum siyalik asit düzeyleri, alkol kullanan kişilerde biomarker olarak kullanılmaktadır. Daha önce Kanbak ve arkadaşlarının zar lipidleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada etanol, SA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükseltmiştir (69). Aynı şekilde, Sillanaukee ve arkadaşlarının sosyal içiciler ve alkolikler üzerinde yaptığı çalışmada, etanolün SA düzeylerini yükselttiği bulunmuştur (109). Pönnio ve arkadaşları alkoliklerin serumlarında siyalik asit düzeylerini anlamlı derecede yüksek bulmuştur (102). Alkolün eritrosit zarı üzerindeki etkisini öğrenmek için yapılan çalışmalarda zara bağlı siyalik asit düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğü, zarın dış yapısını ve organizasyonunu bozduğu kanıtlanmıştır (47,61,81).

## 2.6.Nitrik Oksit ve Metabolizması

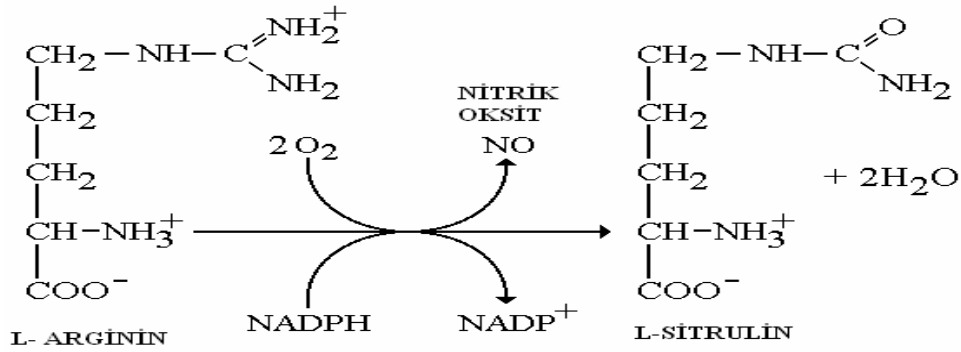
Nitrik oksit (NO) oksijen içeren bir serbest radikal olup tıpkı O<sub>2</sub> gibi yaşam için hem esansiyel hem de toksiktir. NO bir tek elektrona sahiptir ve dolayısı ile Fe<sup>+3</sup> gibi tek elektronlar içeren diğer bileşiklere bağlanır. Bir gaz olarak sitozol boyunca ve lipid zarlarından hücre içine sızar. Düşük derişimlerde iken fizyolojik olarak nörotransmitter ve vazodilatasyona neden olan bir hormon olarak görev yapar. Öte yandan, yüksek derişimlerde bulunacak olursa hem azot hem de oksijen içeren (RNOS) ilave tepkici ve toksik türler oluşturmak üzere O<sub>2</sub> veya süperoksitle birleşir. Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. NO lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir. Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür. NO düşük konsantrasyonlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol alır (24,59).

NO'nun yarı ömrü oldukça kısadır. Dokudaki yarı ömrü 10- 60 saniye kadardır; ancak ortamda doku bulunmamasıyla, oksijen varlığında yarı ömrü 4 dakikaya kadar uzayabilir. Ancak yine de uygun in vivo ve in vitro koşullarda nitrit ve nitrat birikimi, NOS aktivitesinin izlenmesi ve ölçülmesinde kullanılmaktadır. NO oluştuktan sonra redoks reaksiyonlarıyla farklı şekiller kazanır ve hızla, spontan olarak moleküler oksijen ile birleşerek çeşitli nitrojen oksitleri oluşturur (115).

NO fizyolojik koşullarda, stabil anyonik ürünleri olan nitrit ve nitrata okside olmaktadır (yaklaşık 3:2 oranında). Oksijenlenen solüsyonlarda nitritin, nitrata dönüşümü oldukça yavaştır ve nitrat oluşumu düşüktür (115).

### 2.6.1 Nitrik Oksit Sentezi

Serbest radikal olan NO, nitrik oksit sentaz (NOS) denilen enzim ailesi tarafından, bir aminoasit olan L-arginin'in terminal guanidin grubunun NO'ye çevrilmesiyle üretilir ( L-arginin → NO + L-sitrulin; şekil 2.15). Bu oluşum esnasında NO sentaza moleküler oksijen ile kofaktör olarak, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiopterin (BH4)'e ihtiyaç vardır. Bu şekilde üretilen ve işlevini yerine getiren NO, hızla hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilir veya 10 saniye içinde nitrat veya nitritlere dönüştürülür (3).



Şekil 2.15: Nitrik Oksit sentezi

### 2.6.2. NOS izoformları

NOS, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerine göre iki gruba (yapısal ve indüklenebilir) ayrılır (92). NOS'ları sentezleyen 3 gen bulunur ve bu genlerden her biri bir NOS izoformu oluşturur.

**nNOS:** Nöronal nitrik oksit sentaz olarak bilinir. İlk olarak sinir dokularında bulunmuştur. Yapısal olarak açığa çıkmıştır ve bir nörotransmitter ve bir hormon olarak oynadığı rol için gereken az miktarda NO'yu üretmek için kalsiyuma bağımlıdır.

**eNOS:** Endotelial nitrik oksit sentaz olarak bilinir. İlk olarak vasküler endotel hücrelerinde yapısal olarak tanımlanmıştır ve nNOS gibi kalsiyuma bağımlıdır.

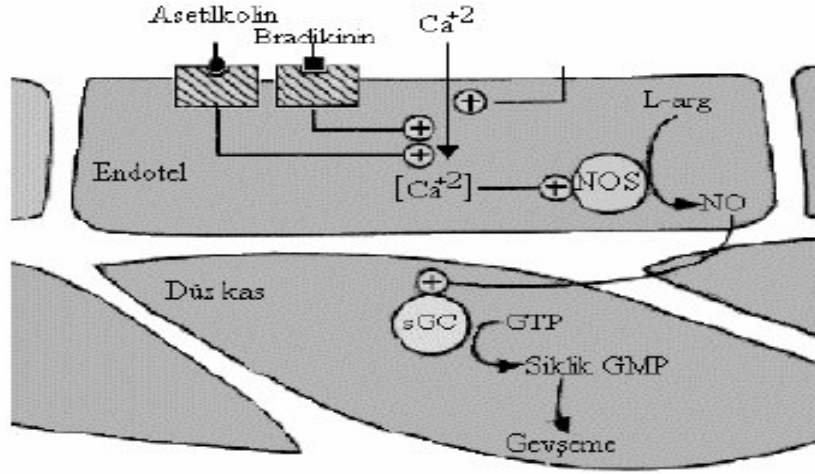
*iNOS*: İndükte edilebilir nitrik oksit sentaz olarak bilinir. İlk olarak endotoksinler ve sitokinler aracılığı ile karaciğer hücreleri ve makrofajlarda uyarılan bir enzim olarak tanımlanmıştır. Nitrik oksid sentazın bu izoenzimi esas olarak gen transkripsiyonun indüksiyonu ile düzenlenmekte olup kalsiyum değişimindeki değişiklikler bunu etkilemez. Bu enzim saldırgan mikroorganizmaların öldürülmesine yardım etmek için yüksek ve toksik düzeylerde NO üretilir. NO'nun işte bu yüksek düzeylerine RNOS ve NO toksisitesinin gelişmesi eşlik etmektedir (78).

### 2.6.3. Nitrik Oksitin Etki Mekanizması

NO üretildiği hücreden dışarı çıkarak direkt hedef hücrelerine yönelir. Sonuçta hedef molekülüne bağlanarak direkt olarak veya enzim aktivitesini değiştirerek amaçlanan etkiyi oluşturur. NO'in karakterize edilmiş en önemli hedef molekülleri; demir, kükürt ve oksijen türevi yapılarıdır (24).  
Bu enzim iki şekilde uyarılmaktadır.

#### 1. Yapısal Tipe Özgü Olarak:

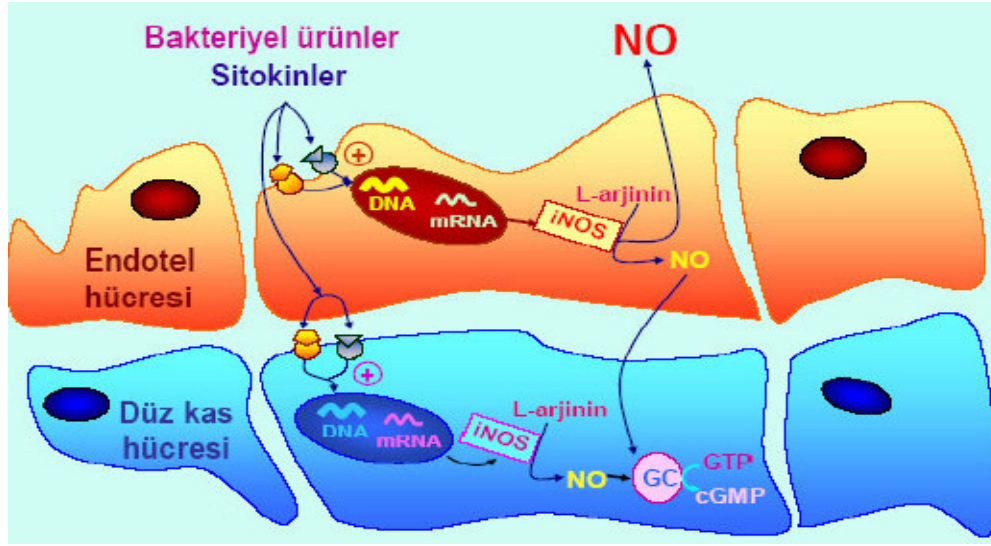
Asetil kolin gibi bir haberci, endotel hücresi üzerindeki reseptörüne yapışır ve bu impulsla  $Ca^{+2}$  iyon kanalları açılarak, hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyi yükselir. Ardından  $Ca^{+2}$ 'un kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks, yapısal bir enzim olan eNOS'ı uyarır ve L-Arginin'den NO ile sitrüllin oluşur. Oluşan NO, endotelden çıkarak komşu düz kas hücrelerine girer. Düz kas hücrelerinin sitozolindeki guanilat siklaz, hem grubundaki demire bağlanır, onu aktifleştirir ve GTP'den cGMP oluşumunun artmasına neden olur. Artan cGMP ise düz kasların gevşemesine ve damarlarda vazodilatasyona neden olur. Ayrıca diğer bir yapısal enzim olan nNOS'da aynı mekanizma ile uyarılmaktadır (24), (Şekil 2.16).



Şekil 2.16: Yapısal NOS'ın uyarılması

### 1.Uyarılabilir Tipe Özgü Olarak:

Burada lipopolisakaritler ve sitokinler gibi ajanların  $Ca^{+2}$ 'a bağımlı olmadan NOS'ı indüklemeleri söz konusudur. İlgili hücrede önceden NOS yoktur veya çok azdır. Uyarıcılar tarafından transkripsiyonel olarak (mRNA artışıyla) enzim indüklenir ve sonuçta oluşan NO amaca uygun işlevini gerçekleştirir (şekil 2.17). Bu sistem özellikle makrofajlarda görülür, bu tip enzim indüklenebilir NOS olarak adlandırılır (24).



Şekil 2.17: İndüklenebilir NOS'un uyarılması

## 2.6.4. Nitrik Oksitin Fonksiyonları

### 2.6.4.1 Kan dolaşımını Düzenlemedeki Rolü

Bilinen en güçlü endojen vazodilatör olan NO, vasküler işlevlerin kontrolünde büyük öneme sahiptir ve dolaşım dengesinin önemli bir düzenleyicisidir. Üretimindeki ve etkisindeki bozukluklar vasküler hastalıkların başlangıcında ve gelişiminde önemli rol oynar. NOS inhibitörleri sistemik vasküler dirençte artışa ve kan basıncının yükselmesine neden olur. Bu veriler damar direncinin dengelenmesinde NO'nun büyük homeostatik rolü olduğunu gösterir (83).

Damarların iç yüzeyini döşeyen endotel, kan akımının damar iç yüzeyine uyguladığı sürtünme kuvvetlerinin ve kandaki çeşitli maddelerin etkisine maruz kalır. Kayma gerilimi ve asetilkolin, bradikinin, ATP, trombin gibi maddelerin etkisiyle endotel hücresi içinde artan Ca endotelial NOS enzim aktivasyonunu tetikleyerek NO sentezine neden olur. Endotel hücresinde oluşan NO'nun bir kısmı damar düz kas hücresine difüze olurken, bir kısmı da kana geçerek dolaşımdaki trombositler ve



lökositler üzerine etkili olur (78). Ayrıca eritrositlerin içine de difüze olarak Hb ile bağlanabilir (88,89).

Düz kas hücrelerine difüze olan NO, sGC enziminin katalitik bölgesine bağlanarak bu enzimi aktive eder. Sonuçta hücre içinde cGMP düzeyi artar ve düz kas hücrelerinde gevşeme meydana gelir. cGMP artışının gevşemeye neden olması değişik mekanizmalar ile açıklanır, fakat temel olarak hücre içi serbest Ca düzeyinin azaltılması söz konusudur (83,89).

#### **2.6.4.2. NO ve Trombosit Aktivitesi**

eNOS tarafından üretilen NO sadece damar düz kasına etki ederek vazodilatasyona neden olmakla kalmaz, aynı zamanda damar lümenine difüze olarak trombositlerin damar duvarına tutunmalarını ve kümeleşmelerini de baskılar. Bu etkiler hücre içi cGMP artışıyla ilişkili olup endotel kaynaklı NO'nun antitrombosit özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (83,89). Bunun yanı sıra, insan trombositlerinde nöronlar izoforma benzeyen düşük miktarda NOS enziminin bulunduğu da gösterilmiştir. Trombosit ve endotel kaynaklı NO, trombus oluşumunun ve büyümesinin önlenmesine önemli katkıda bulunur (89).

#### **2.6.4.3. NO ve immün Sistem**

NO'nun immün sistem üzerine etkileri yaygın olarak incelenmiştir. NO, cGMP aracılı mekanizmalar aracılığıyla polimorf çekirdekli lökosit kemotaksisini inhibe eder (89). Bunun dışında cGMP'den bağımsız olarak bazı sitotoksik etkilerde gösterir. Mitokondrial enzimlerin demir-sülfür merkezleriyle etkileşimi sonucu sebep olduğu enzim inhibisyonu sayesinde sitostatik ve tümör hücrelerini öldürücü etkisi ortaya çıkar. Öte yandan, aktive makrofajlarda NOS 2 ekspresyonunun ve NO üretiminin arttığı da gösterilmiştir. Makrofajlarda NOS 2 ekspresyonunu indükleyen başlıca faktörler

lipopolisakkaridler ve başta interlökin-1, interferon- $\gamma$  ve tümör nekroz faktör-  $\alpha$  olmak üzere çeşitli sitokinlerdir (89).

#### 2.6.4.4. NO ve sinir Sistemi

NO'in öğrenme, hafıza, uyku, beslenme gibi pek çok fizyolojik fonksiyona aracılık ettiği bilinmektedir (3). İnsan ve hayvan beyninin tüm bölgelerinde değişen miktarlarda nitrik oksit sentetaz saptanmıştır (112). Beyindeki NO'in kaynağı beyin damarlarının endoteli, mikroglia hücreleri ve beyin arterlerini innerve eden nonadrenerjik-nonkolinerjik vazodilatör sinirlerdir. Nörotransmitter fonksiyonu ilk olarak beyinde gösterilen NO, diğer nörotransmitterlerden farklı olarak, sinaptik veziküllerde depolanıp ekzositozla salınımına uğramaz. Eksitatör bir nörotransmitter olan glutamat, nöronlarda NO üretimini tetikleyen önemli bir uyarandır (67).

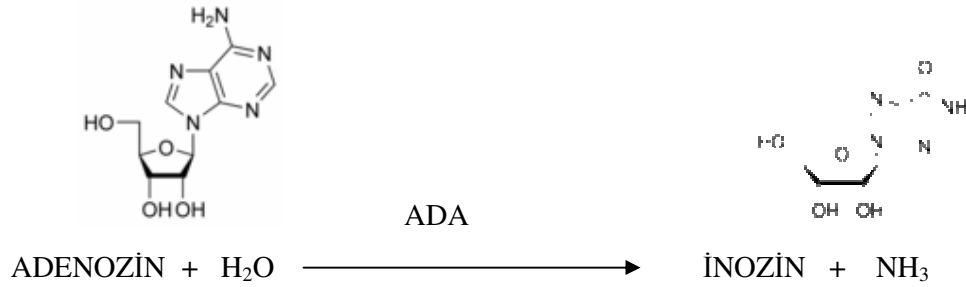
#### 2.6.5. Nitrik Oksitin Sitotoksik Etkileri

NO'nun toksit etkileri iki kategoriye bölünür ilki Fe-içeren proteinlere bağlanma sonucu gelişen doğrudan toksit etkiler, diğeri ise NO, RNOS vermek üzere  $O_2$  veya süperoksitle birleştiğinde oluşan birleşiklerin aracılık ettiği dolaylı etkiler. Bir radikal olarak NO aynı anda tek elektronlarda içeren Fe-içerikli birleşiklerle bağlanarak direkt toksik etkiler gösterir. Saldırının ana tahrip noktaları içinde Fe-S (elektron taşıma zinciri) ve Fe-hem proteinleri (hemoglobin ve elektron taşıma zinciri sitokromları) bulunmaktadır. RNOS toksisitesinde NO çok yüksek derişimlerde bulunduğu zaman peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) yapmak üzere süperoksitle veya  $N_2O_3$  yapmak üzere  $O_2$  ile enzimatik olmayan yoldan birleşir. Peroksinitrit bir serbest radikal olmamasına karşın kararlı ve direkt toksit olan güçlü bir oksitleyici ajandır. Bu madde protein metionin ve -SH grupları dahil çok geniş bir hedef grubuyla etkileşmek üzere hücreler ve lipid zarları üzerinden sızabilir. Bu madde lipid peroksidasyonunun etkin başlatıcısı olan serbest radikal azot dioksit ( $NO_2$ ) dahil ek RNOS'lar oluşturmak üzere yıkılmaya da uğrarlar. Sonuç olarak çok büyük sayıda enzimin inhibisyonunu, mitokondriyal lipid

peroksidasyonunu, elektron taşıma zincirinin inhibisyonu ve enerji boşalmasını, DNA'da tek veya çift iplikte kırılmaları ve DNA'daki bazların değişikliğe uğramasını kapsar. Şartlara göre, nitrik oksit hücrelere koruyucu olduğu gibi hücre hasarına sebep olabilecek potansiyel de taşımaktadır. Kronik alkol alımı rat karaciğerlerinde NO üretimini arttırmaktadır. NO'nun süperoksit ile etkileşiminden kaynaklanan peroksinitritin etanol kaynaklı hipoksik karaciğer hasarında rol oynadığı düşünülmektedir. Raporlar ayrıca NO'deki etanol kaynaklı yükselmenin süperoksit seviyelerini düşürdüğünü ve bu sebeple koruyucu olduğunu göstermektedir (65,75,76,104,108,124,131). Uyarılabilir nitrik oksit sentetazın alkol hastalıkları için gerekli olduğu gösterilmiştir çünkü uyarılabilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) bloke edilmiş farelerde etanol toksisitesi belirgin şekilde azalmıştır. Bu sonuçları açıklamak için endotelial nitrik oksit sentetaz tarafından üretilen NO'in koruyucu olduğu, ancak kupfer hücreleri kaynaklı NO'in alkol hastalıklarında rol aldığı ileri sürülmüştür (88). Czapski ve arkadaşları çalışmalarında, akut etanol alımının beyinde nitrik oksit seviyesini azalttığını, kronik etanol alımı nitrik oksit seviyesini artırdığını göstermiştir (35). Bunun yanı sıra, Vassiljev de nitrik oksit değerlerinin düştüğünü belirtmiştir (118). Naassila ve arkadaşları beynin farklı bölgelerinde nitrik oksit düzeylerinin farklı olduğunu rapor etmişlerdir (90).

## 2.7. Adenozin Deaminaz ve Metabolizması

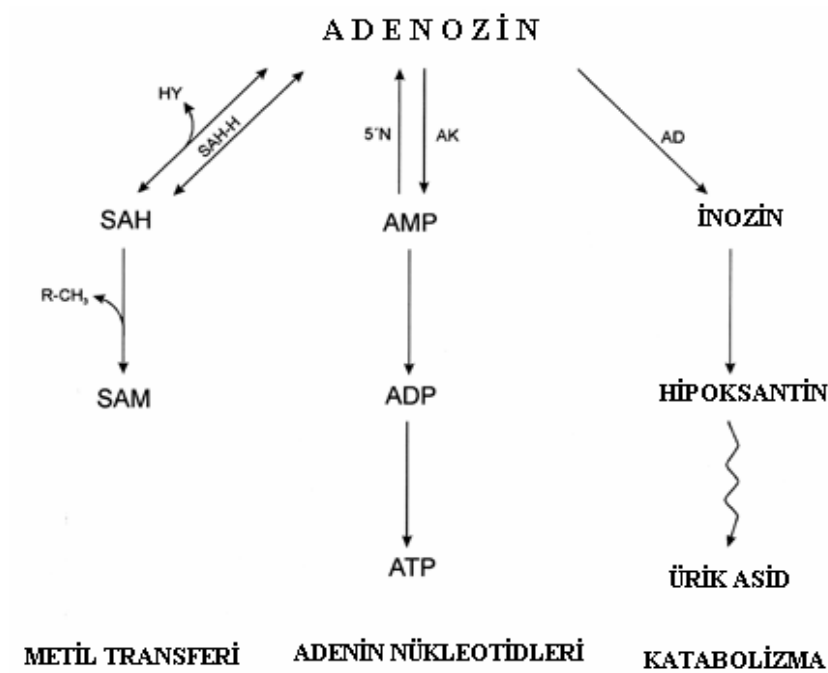
Vücuttaki tüm hücrelerde bulunan polimorfik, sitozolik bir enzim olan Adenozin deaminaz (ADA), adenin nükleotidlerin metabolizmasında aktif rol oynar (Şekil 2.19). Yiyeceklerdeki adenozinin yıkılması ve dokularda nükleik asitlere dönüşmesinde gereklidir. ADA geri dönüşümsüz olarak adenozini deamine eder. Pürin metabolizmasının bir adımı olan adenozinin inozine ve deoksiadenozinin deoksiinozine irreversible ve hidrolitik deaminasyonunu (amin grupların uzaklaştırılması) katalizler (21), (Şekil 2.18).



Şekil 2.18: Adenozinin inozine dönüşümü

Pürinler ile onların nükleozit ve nükleotid formları, gerek enerji metabolizmasında gerekse genetik materyalin oluşturulmasında oynadıkları rol açısından, tüm hücrelerde önemli moleküllerdendir. Bu iki temel görevin yanısıra, hücre içi ve hücreler arasındaki iletişime de önemli katkılar sağlarlar. Bu iletişim, hücre yüzeyinde yerleşmiş reseptörler aracılığı ile gerçekleşir. Pürinerjik reseptörler olan pürinoseptör ailesi beş alt gruba ayrılmıştır: a) adenin reseptörleri b) yapısal (metabotropik) nükleotid (P2Y) reseptörler, c) iyonotropik nükleotid (P2X) reseptörler, d) dinükleotid reseptörler ve e) adenozin reseptörleri (21).

Pürin bazlarından biri olan adenine bir pentoz halkasının eklenmesi ile oluşan adenozin, tüm hücrelerde yaygın olarak bulunan ve önemli düzenleyici etkileri olan bir moleküldür. Hücre içinde ve dışında devamlı sentezlenen ve kullanılan adenozinin çeşitli fizyolojik olaylarda rolü olduğu ilk defa Drury ve Szent-György tarafından 1929 yılında ortaya atılmıştır (44). Bu etkilerini kendine özgü reseptörler aracılığı ile oluşturduğu ise ancak 1974’de anlaşılabilmiştir (31).

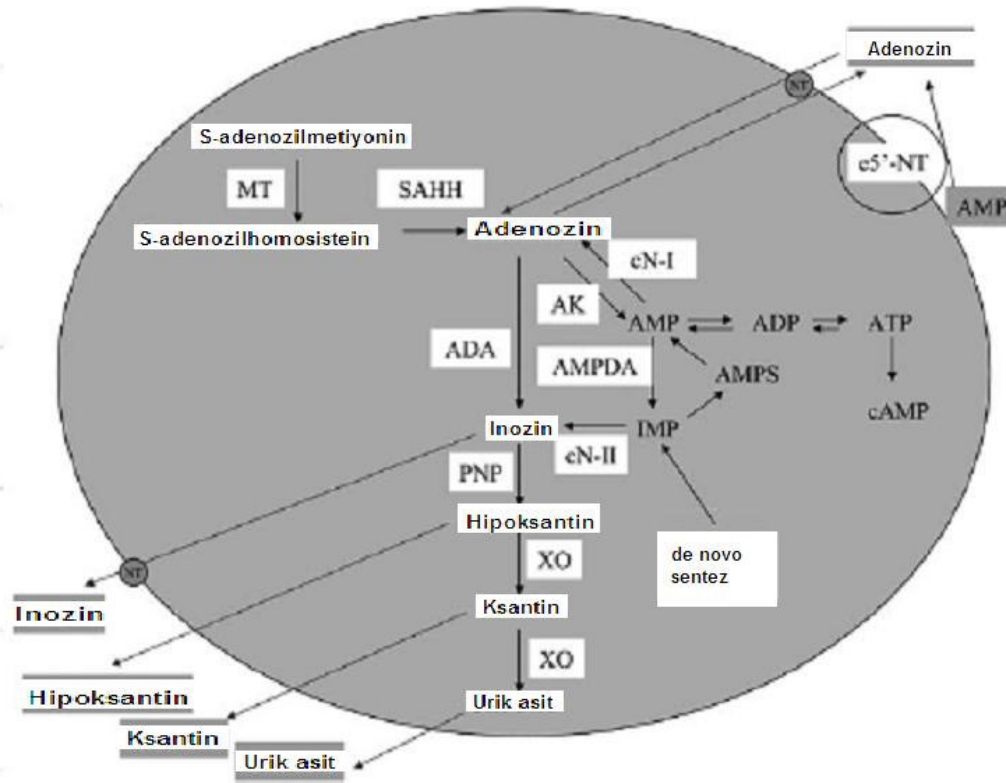


Şekil 2.19: Adenozin metabolizması

### 2.7.1. Adenozinin Sentezi, Salıverilmesi ve Yıkılımlı

Hücre adenozinini sentezlemek için çeşitli yollar kullanır. En önemli adenozin kaynağı hücre içinde devamlı kullanılan adenozin trifosfat (ATP) ve döngüsel (siklik: c) adenozin monofosfat (AMP)'dir. Bu iki nükleotid hücre içinde önce AMP'a yıkılır ve oluşan AMP, hücresel 5'- nükleotidaz enziminin katalizlediği biyokimyasal reaksiyon

ile adenozeine çevrilir. Organizmada diğer önemli bir adenozin kaynağı da katekolaminlerin ve histaminin katabolizması sırasında ortaya çıkan ve adenozeine hidrolize edilebilen S-adenozil homosisteindir (29), (Şekil 2.20). Hücre dışında üretilen adenozinin de en önemli kaynağı ATP'dir. ATP presinaptik sinir uçlarındaki veziküllerde dopamin, asetilkolin, serotonin ve norepinefrin gibi nörotransmitterler ile birlikte bulunur ve bu nörotransmitterler salıverilirken hücre dışına çıkar. Hücre dışında önce AMP'ye sonra da ekto-5'nükleotidaz enzimi aracılığı ile adenozeine çevrilir (51). Hücre içi ATP'nin adenozeine çevriminde %1'lik bir artışın adenozin miktarında 100 kat artışa neden olabileceği ileri sürülmüştür (46).



Şekil 2.20: Adenozin Biyosentezi

Hücre içinde ve dışında üretilen adenozeine hücre zarında bulunan kendine özgü taşıyıcı molekül aracılığıyla zarın içine ve dışına doğru iki yönlü olarak hareket edebilir.

Akım yönü konsantrasyon farkına göre belirlenir. Sonuçta hücre içi ve dışı adenozin konsantrasyonu kolaylaştırılmış difüzyon ile dengelenmiş olur. Fizyolojik koşullarda net akım adenozin konsantrasyonunun nispeten daha az olduğu hücre içine doğrudur. Hücre içinde adenozin arttığında ise akım tersine döner (9).

Adenozinin Reseptörleri Adenozin etkilerinin çoğunu kendine özgü reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir. A1, A2 ve A3 isimli üç farklı reseptörü vardır. A2 reseptörlerinin A2A ve A2B olmak üzere iki alt tipi tanımlanmıştır. Adenozin reseptörlerinin tümü 7 transmembran segmenti olan G proteine kenetli reseptörlerdir (52). Adenozin 25-250 nM gibi fizyolojik konsantrasyonlarda yüksek afinite gösteren alt reseptör tiplerini aktive eder (9).

Adenozin reseptörlerinin dağılımı, özgül farmakolojik agonist ve antagonistlere sahip olmaları nedeniyle daha çok A1 ve A2A alt reseptör tipleri açısından incelenmiştir. Beyinde en yaygın bulunan adenozin reseptörü A1 alt tipidir. Özellikle korteks, serebellum ve hipokampüste yoğun olarak bulunmaktadır. A2A alt tipi ise daha çok striatum, nükleus akkübens, kaudat putamen ve bazal ganglionlarda yoğunlaşmıştır (52,105). Adenozin A1 ve A3 reseptörleri Gi proteini aracılığı ile adenilat siklazı inhibe ederken, A2 reseptörleri Gs proteinleri aracılığıyla adenilat siklazı aktive eder (52).

ADA'nın majör fizyolojik rolü lenfositlerin farklılaşması ve çoğalmasıyla ilgilidir. ADA aktivitesi lenfositik hücrelerde, eritrositlere oranla 10 kat daha fazla bulunmaktadır. T lenfositlerde B lenfositlere göre daha yüksek oranlarda bulunur ve ayrıca T hücre farklılaşması esnasında özellikle immatür ve farklılaşma basamaklarında belirgin artış olur. Bunlara bağlı olarak birçok araştırmacı ADA'nın hücrel immünitinin bir belirteci olduğu hipotezini sürmüştü ve buna bağlı olarak farklı hastalıklarda serum ADA seviyelerinin artışını göstermişlerdir. Artmış serum ADA aktivitesi hücrel immünitinin uyarıldığı birçok hastalıkta gösterilmiştir. Bu hastalıklar tifo, enfeksiyöz mononükleoz, sarkoidoz, karaciğer hastalıkları, akut lösemi, bruselloz, akut pnömoni, romatoid artrit ve çeşitli malignitelerdir (9,46,51).

Adenozin, merkezi sinir sistemi içinde spontan nöral iletimin durdurulmasını nörotransmitterlerin salınmasının baskılanması ve sinaptik iletiminin durdurulması için gerekli çeşitli elektrofizyolojik olayları gerçekleştirir (100). ADA düşük moleküler ağırlıklı olarak, zara bağlı taşıyıcı proteinler ile kompleks oluşturur. İmmun sistemde hücrede bulunan önemli bir enzimdir ve genetik hasarlar ile immün yetersizlik hastalıklarında önemli rolü vardır. Davranış olarak adenozin rahatlatıcı, uyuşturucu, gevşetici ve ağrı kesicidir (45). Adenozin sinaptozomdan transmitter salınımını baskılayabilir çünkü presinaptik adenozin reseptörleri direkt olarak çeşitli nörotransmitterlerin salınımını ve bununla ilgili sinaptik iletimi durdurabilir. Bu ve diğer kanıtlar gösterir ki merkezi sinir sistemin de adenozin bir nöromodulatör olarak iş görür (48).

Etanol ise beyinde adenozinin uptake sistemini bloke eder (29,30). Nagy ve Diomand çalışmalarında göstermektedir ki adenozin hem kültüre alınmış hücrelerde hem de hayvan modellerinde etanolün akut ve kronik etkilerinin bir mediatörüdür. Etanolün bu adenozine bağlı etkileri ekstaselüler adenozin seviyelerinde etanol kaynaklı bir artışa sebep olmaktadır. Etanol kaynaklı ekstraselüler adenozin artışı adenozin A2 reseptörlerinin aktivasyonuna, bu da hücre içi cAMP seviyesinin artmasına ve heterolog reseptör duyarsızlaşmasına sebep olmaktadır (41,91,92). Kanbak ve arkadaşları kronik etanol ile muamele edilen ratların sinaptozomal fraksiyonlarında yaptıkları çalışmada kronik etanolün adenozin deaminaz aktivitesini yükselttiğini göstermişlerdir. Bunun sebebinin de, SAmE/SAH oranındaki etanol kaynaklı düşüş sonucu SAH'in serbest adenozin ve homosisteine ayrılmasının ADA aktivitesini yükseltiyor olabileceği yorumunda bulunmuşlardır (53,70).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Çalışma ve Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Deney hayvanları, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından sağlandı. Çalışma için gerekli olan etik kurul raporu alındı.

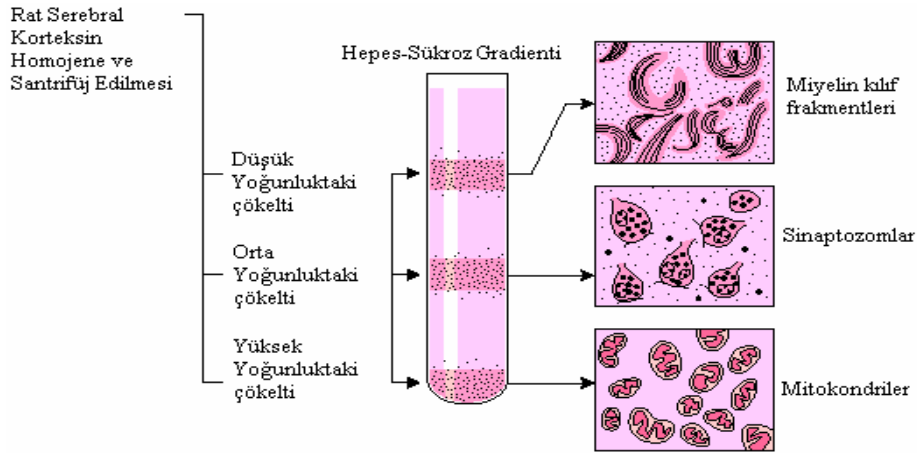
#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Deney Hayvanları ve Sinaptozomun Elde Edilme Protokolü

Sinaptozomal fraksiyon eldesi için Whittaker ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem tarafımızdan modifiye edilerek kullanıldı (130). 21 adet, 200–250 gram ağırlıkta, sağlıklı, Spraque Dawley cinsi erkek albino ratlar dekapite edilip öldürüldükten sonra frontal korteksleri (ön beyin) alındı. Büyük hemisferler sinir sisteminin diğer elemanlarından ayrıldı, üstlerinde kalan kan parçacıklarını gidermek için fizyolojik salin solüsyonunda (PSS) yıkandı. Ön beyinlerin her biri dört parçaya bölünüp tartıldı. 14 grup oluşturuldu her bir grup altı adet ön beyin parçası içeriyordu (n=6).

Grupları oluşturan ön beyin parçaları hızlıca buz soğukluğunda Heps (10 mmol/L)+Sükroz (0,32 mmol/L) solüsyonuna konuldu ve aynı ortamda homojenize edildi. Homojenat 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilip, supernatant kısmı alındı. Bu kısım 15000xg'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı atıldı. Geride kalan sinaptozomca zengin pellet kısmı 2ml'lik yapay serebrospinal sıvı (aCSF; 116mM NaCl, 5,4mM KCl, 0,9mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,8mM CaCl<sub>2</sub> ve 10mM Glukoz, pH 7,2) içinde resüspanse edildi (Şekil 3.1).

Sinaptozomlar deney gruplarının içeriğine göre etanol (50, 100, 200mM), aspirin (100µg/ml) ve betain (0,5, 1mM) varlığında 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası siyalik asit (SA), nitrik oksit (NO) ve adenzin deaminaz (ADA) düzeyleri belirlendi.



**Şekil 3.1:** Sinaptozomun elde edilmesinde santrifüj sonrası oluşan Hepes-Sükroz gradienti

Sinaptozomal fraksiyonlarda etanol (50, 100, 200mM etanol), aspirin (100µg/ml) ve betain (0,5, 1mM) inkübasyonunun deney gruplarına göre dağılımı. Her bir grupta 6 örnek (n=6) vardır. Oluşturulan deney grupları aşağıdaki gibidir;

1. grup: Kontrol grubu,
2. grup: 50mM etanol,
3. grup: 100mM etanol,
4. grup: 200mM etanol,
5. grup: 100µg/ml aspirin,
6. grup: 100µg/ml aspirin+50mM etanol,
7. grup: 100µg/ml aspirin+100mM etanol,
8. grup: 100µg/ml aspirin+200mM etanol,
9. grup: 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain,
10. grup: 100µg/ml aspirin+100mM etanol+0,5mM betain,
11. grup: 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain,
12. grup: 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain,
13. grup: 100µg/ml aspirin+100mM etanol+1mM betain,
14. grup: 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain.

## 3.1.2. İstatistiksel Analiz

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından yapıldı. Tez çalışmamızda 14 grup kendi aralarında 4 farklı istatistiksel üst gruba ayrıldı ve her üst grup kendi içinde SA, NO ve ADA düzeyleri bakımından istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Üst gruplar;

- A) Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol, 200mM etanol grupları
- B) Kontrol, 50mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+50mM etanol, 100µg/ml aspirin+50mM Etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+50mM Etanol+1mM betain.
- C) Kontrol, 100mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+100mM etanol, 100µg/ml aspirin+100mM Etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+100mM Etanol+1mM betain.
- D) Kontrol, 200mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+200mM etanol, 100µg/ml aspirin+200mM Etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+200mM Etanol+1mM betain.

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 10,0 windows programı kullanıldı. Sonuçlar  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Normal dağılıma uygunluk gösteren verilere tek yönlü varyans analizi Tukey testi uygulandı. Normal dağılıma uygunluk göstermeyen verilere ise Kruskal-Wallis testi uygulandı.

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Sinaptozomda Total Siyalik Asit Düzeylerinin Belirlenmesi

Sinaptozomlarda TSA ölçümü resorsinolün siyalik asitle oluşturduğu rengin 580 nm’de ölçülmesi prensibine dayanan Katopodis ve arkadaşlarının (72,73) tanımladığı yöntemine göre ölçüldü.

TSA değerlerinin ölçümü için 20µl sinaptozomal homojenat ve 980 µl distile su kapaklı tüplere konuldu, 1ml resorsinol reaktifi eklendi (10 ml %2 stok resorsinol suda, 0,75 ml su, 0,25 ml 0,1M CuSO<sub>4</sub> ve final hacim 100 ml HCl ile konsantre edildi). Tüpler kapatılıp, vortekslenip, 100°C’lik su banyosuna koyuldu (15 dk). Daha sonra 10 dakika buzda soğutulup, 2 ml Bütilasetat/n-Butanol (85/15 v/v) reaksiyon karışımına eklendi. Tüpler vortekslenip, 10 dakikada 2500 rpm’de santrifüj edildi ve supernatantın absorbansı 580 nm’de spektrofotometrede ölçüldü.

Standart olarak N-asetil neuraminik asidin (tip VIII; sigma katalog no: A9646) 12,5, 25, 50, 100mg/ml konsantrasyonlarındaki çözeltileri hazırlanarak, standart grafiği elde edildi. Siyalik Asit değerleri mg siyalik asit/gr ıslak ağırlık cinsinden hesaplandı.

### 3.2.2. Sinaptozomda Nitrik Oksit Düzeylerinin Belirlenmesi

Nitrik oksit çok kuvvetli bir molekül olduğu için direkt ölçümü çok güçtür. Bu nedenle biyolojik sıvılarda NO’in stabil oksidasyon ürünleri olan nitrat (NO<sup>-3</sup>) ve nitrit (NO<sup>-2</sup>) düzeyleri in vivo ve in vitro NO markırı olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda rat beyin sinaptozomlarındaki nitrit miktarı Cortas ve arkadaşının yöntemine göre belirlendi (4,33).

Kullanılan çözeltiler;

Kadmiyum granüllerinin aktive edilmesi: Kadmiyum granülleri 2,5–3g ağırlığında tartıldı. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde tutulan kadmiyum granülleri distile su içerisinde üç

defa yıkandı.  $\text{CuSO}_4$ 'ta iki dakika bekletilen granüller daha sonra glisin-NaOH tamponu ile üç defa yıkandı ve 10 dakika içerisinde kullanıldı.

Glisin-NaOH tamponu: 15g glisin distile suda çözüldü. 2mol/L NaOH ile pH 9,7'ye tamamlandı.

Renklendirici: 1g sülfanilamid, 0.1g N-1-naftiletilediamin.

Homojenat: Sinaptozomal fraksiyonlar.

Yöntem: Deproteinizasyon işlemi için 0,5 ml sinaptozomal homojenata, 2 ml NaOH, 2,5 ml  $\text{ZnSO}_4$  ilave edilip 10 dakika beklenildi. 3500xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve supernatant alındı. Bakır kaplı kadmiyum granülleri üzerine 1ml glisin tamponu eklendi. Üzerine 1ml deproteinize supernatant eklendi. Üzerine 2 ml deiyonize su ilave edildi. Oda ısısında 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımından 2 ml alınıp üzerine 2,5 ml deiyonize su ve 2 ml renklendirici ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra 545 nm'de köre karşı okundu.

Stok standart olarak 1mmol/L lik stok  $\text{NaNO}_2$  çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden, distile su ile seyreltme yoluyla 10  $\mu\text{mol/L}$  ile 100  $\mu\text{mol/L}$  arasında bir seri dilüsyonla standart grafiği çizildi. NO değerleri nmol/mg protein olarak hesaplandı.

### 3.2.3. Sinaptozomda Adenozin Deaminaz Düzeylerinin Belirlenmesi

ADA aktivitesi, adenosinin ADA tarafından inozine dönüşümü sırasında 265 nm'de gözlenen absorbans değişiminin ölçülmesine dayalı, Kaplanın uyguladığı metoda göre belirlenmiştir (71).

Substrat olarak Adenozin solüsyonu hazırlamak için 1,4mM Adenozin ile 0,05M fosfat tamponu ( pH:7,4) karıştırıldı. Ayrıca 0,05M Fosfat tamponu (pH 7,4) hazırlandı.

Yöntem: 1,4mM Adenozinden 0,1 ml ve 0,05M fosfat tamponundan (pH: 7,4) 2,88 ml alınıp karıştırıldı. Üzerine 0,02 ml sinaptozomal homojenat eklendikten hemen sonra 265 nm dalgaboyundaki absorbans değişimi izlenmeye başlandı. Absorbansta ilk

3 dakika içinde meydana gelen düşüş miktarı kaydedildi. Hesaplamada formül olarak  $\Delta A_{265}/\text{min}$  kullanıldı;

$$\text{Ünite/mg} = \frac{\Delta A_{265}/\text{min}}{8.1 \times \text{enzim (mg)} / \text{reaksiyon karışımının total hacmi (ml)}}$$

8.1 x enzim (mg) / reaksiyon karışımının total hacmi (ml)

Adenozin Deaminaz değerleri mU/mg protein olarak hesaplandı.

### 3.2.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sükroz	(Sigma)
Hepez	(Sigma)
NaCl	(Merck)
CaCl <sub>2</sub>	(Merck)
KCl	(Merck)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(Merck)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Merck)
MgSO <sub>4</sub>	(Merck)
Glukoz	(Sigma)
Adenozin	(Sigma)
CuSO <sub>4</sub>	(Merck)
Na-K Tartarat	(Sigma)
NaOH	(Merck)
Butilasetat	(Sigma)
Butanol	(Sigma)
ZnSO <sub>4</sub>	(Merck)
Kadmiyum Granülleri	(Fluka)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(Merck)
Glisin	(Merck)

# PDF Eraser Free

Sülfanilamid	(Merck)
N- Naftiletilen diamin NED	(Merck)
HCl	(Sigma)
Distile su	

## 3.2.5. Kullanılan Aygıt ve Gereçler

Spektrofotometre	(Shimadzu UV-1238)
Soğutmalı santrifüj	(Jouan MR 22)
pH metre	(Hana-HI-932)
Su banyosu	(Büchi HB-140)
Vorteks	(Nüve NM 110)
Derin dondurucu	(Jouan VX350 series)
Hassas terazi	(Sartorius BP 121S)
Homojenizatör	(Janke & Kunkel, Ultra-Turrax T25)
Plastik ve cam tüpler	
Buzdolabı	
Otomatik pipetler	
Cam pipetler	
Enjektörler	
Operasyon takımı	

#### 4. BULGULAR

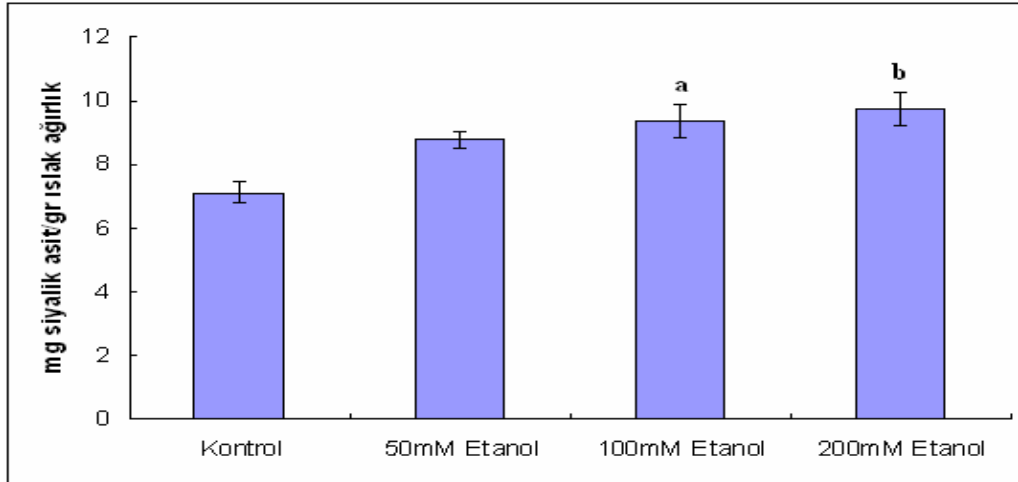
##### A) Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol grupları arasındaki istatistiksel karşılaştırma

##### Siyalik Asit bulguları

100mM etanol grubu ( $9,36 \pm 0,52$  mg/gr ıslak ağırlık) ile 200mM etanol grubunun ( $9,73 \pm 0,53$  mg/gr ıslak ağırlık) SA düzeyleri, kontrol grubuna ( $7,11 \pm 0,32$  mg/gr ıslak ağırlık) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p < 0,01$ ). 50mM etanol grubu ( $8,78 \pm 0,27$  mg/gr ıslak ağırlık) kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen anlamlı bir fark belirlenemedi ( $p > 0,05$ ). 50mM etanol grubu, 100mM etanol grubu ve 200mM etanol grupları arasında istatistiksel olarak fark yoktu ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 4.1.** Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının SA değerleri (ortalama  $\pm$  standart hata).

Gruplar	Kontrol	50mM Etanol	100mM Etanol	200mM Etanol
Ort $\pm$ SH	7,11 $\pm$ 0,32	8,78 $\pm$ 0,27	9,36 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	9,73 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>



**Şekil 4.1.** Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının Siyalik Asit değerlerinin karşılaştırılması (mg siyalik asit/gr ıslak ağırlık).

a : 100mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p < 0,01$

b: 200mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p < 0,01$

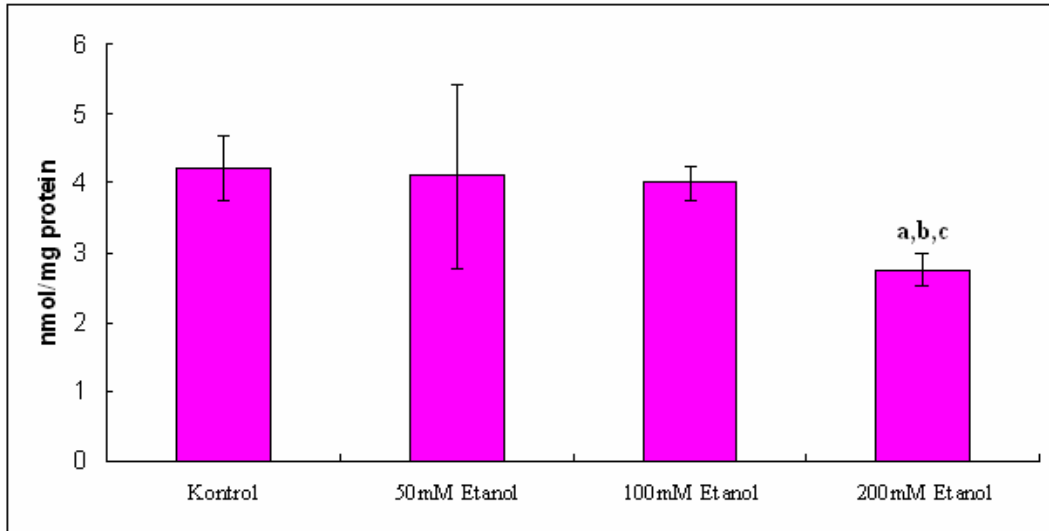


### Nitrik Oksit bulguları

200mM etanol grubunun NO düzeyleri ( $2,75 \pm 0,25$  nmol/mg protein) kontrol grubu ( $4,21 \pm 0,47$  nmol/mg protein), 50mM etanol grubu ( $4,10 \pm 1,33$  nmol/mg protein) ve 100mM etanol grubuna ( $4,00 \pm 0,25$  nmol/mg protein) göre anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,01$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 4.2.** Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının NO değerleri (ortalama  $\pm$  standart hata).

Gruplar	Kontrol	50mM Etanol	100mM Etanol	200mM Etanol
Ort $\pm$ SH	4,21 $\pm$ 0,47	4,11 $\pm$ 1,33	4,00 $\pm$ 0,25	2,75 $\pm$ 0,25 <sup>a,b,c</sup>



**Şekil 4.2.** Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının NO değerlerinin karşılaştırılması (nmol/mg protein).

a : 200mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p < 0,01$

b: 200mM etanol grubunun, 50mM etanol grubuna göre farkı  $p < 0,01$

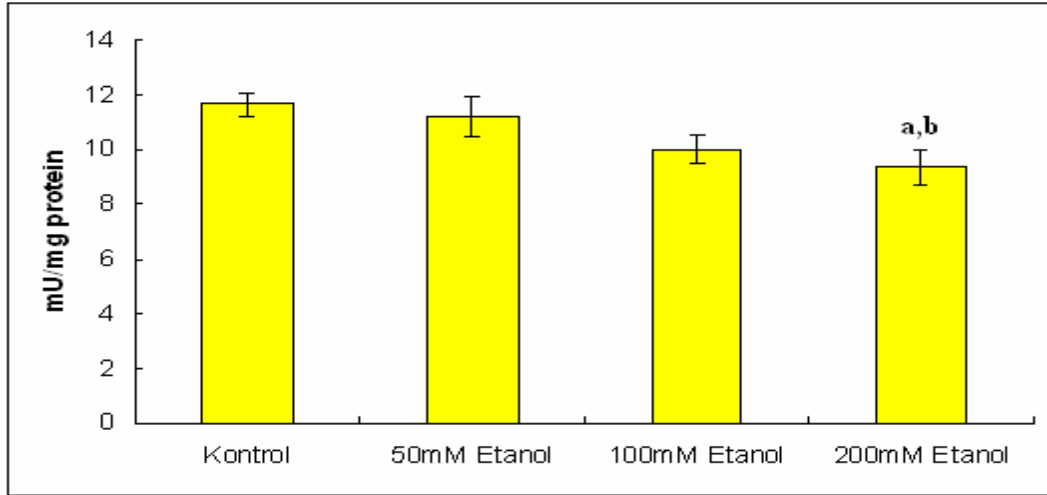
c: 200mM etanol grubunun, 100mM etanol grubuna göre farkı  $p < 0,01$

### Adenozin Deaminaz bulguları

200mM etanol grubunun ( $9,38 \pm 0,67$  mU/mg protein) ADA düzeyleri kontrol grubu ( $11,68 \pm 0,41$  mU/mg protein) ve 50mM etanol grubuna ( $11,21 \pm 0,74$  mU/mg protein) göre anlamlı şekilde düşüktü ( $p < 0,05$ ). 100mM etanol grubunun ( $10,00 \pm 0,52$  mU/mg protein) ADA düzeyi, 200mM etanol grubuna ( $9,38 \pm 0,67$  mU/mg protein) göre anlamlı değildi ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 4.3.** Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının ADA değerleri (ortalama  $\pm$  standart hata).

Gruplar	Kontrol	50mM Etanol	100mM Etanol	200mM Etanol
Ort $\pm$ SH	$11,68 \pm 0,41$	$11,21 \pm 0,74$	$10,00 \pm 0,52$	$9,38 \pm 0,67^{a,b}$



**Şekil 4.3.** Kontrol, 50mM etanol, 100mM etanol ve 200mM etanol gruplarının NO değerlerinin karşılaştırılması (mU/mg protein).

a : 200mM etanol grubunun kontrol grubuna göre farkı  $p < 0,05$

b : 200mM etanol grubunun 50mM etanol grubuna göre farkı  $p < 0,05$

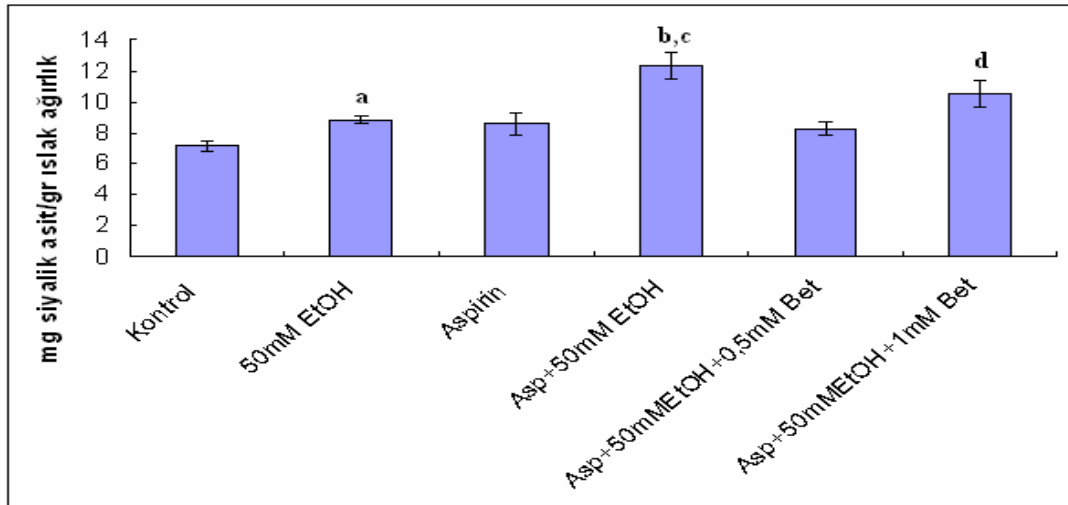
**B) Kontrol grubu, 50mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+50mM etanol, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain grupları arasındaki istatistiksel karşılaştırma**

**Siyalik Asit bulguları**

50mM etanol grubu (8,78±0,26 mg/gr ıslak ağırlık), 100µg/ml aspirin+50mM etanol grubu (12,31±0,87 mg/gr ıslak ağırlık) ve 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain grublarının (10,5±0,87 mg/gr ıslak ağırlık) SA düzeyleri kontrol grubuna (7,11±0,32 mg/gr ıslak ağırlık) göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,05). 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain grubunun (8,25±0,39 mg/gr ıslak ağırlık) SA düzeyleri 100µg/ml aspirin+50mM etanol grubuna (12,31±0,87 mg/gr ıslak ağırlık) göre düşük bulundu (p<0,05). 100µg/ml aspirin grubu (8,56±0,69 mg/gr ıslak ağırlık) ile diğer gruplar arasında anlamlı fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 4.4.** Kontrol grubu, 50mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+50mM etanol, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain gruplarının SA değerleri (ortalama ± standart hata).

Gruplar	Kontrol	50mM EtOH	100µgAspirin	100µgAspirin + 50mM EtOH	100µgAspirin + 50mM EtOH + 0,5mMBetain	100µg Aspirin + 50mM EtOH + 1mM Betain
Ort±SH	7,11±0,32	8,78±0,26 <sup>a</sup>	8,56±0,69	12,31±0,87 <sup>b,c</sup>	8,25±0,39	10,5±0,87 <sup>d</sup>



**Şekil 4.4** Kontrol grubu, 50mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+50mM etanol, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain gruplarının SA değerlerinin karşılaştırılması (mg siyalik asit/gr ıslak ağırlık).

a : 50mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,05$

b : Aspirin+50mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,05$

c : Aspirin+50mM etanol grubunun, aspirin+50mM etanol+0,5mM betain grubuna göre farkı  $p<0,05$

d : Aspirin+50mM etanol+1mM betainli grubun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,05$

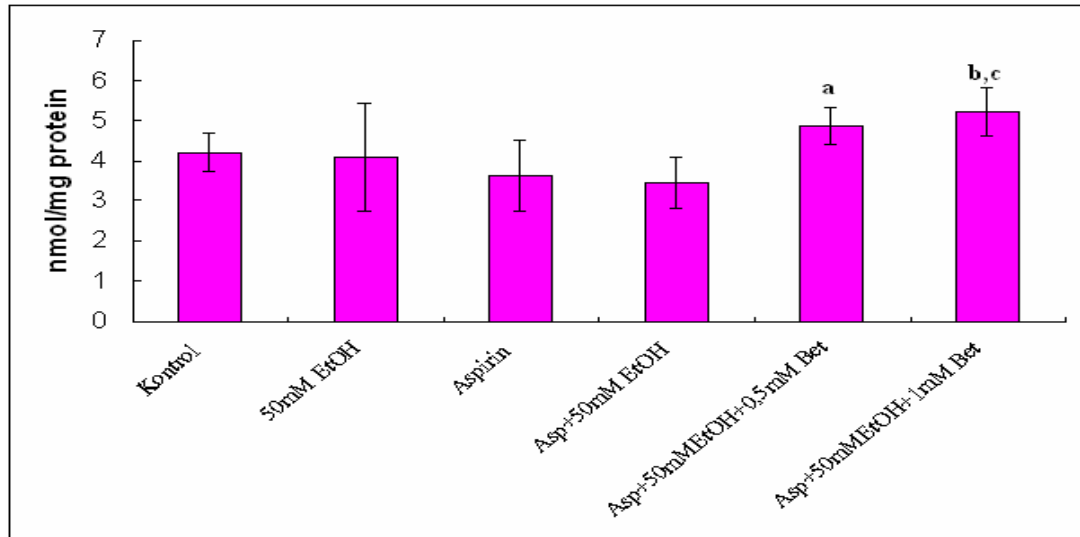
NOT: EtOH=Etanol, Asp= Aspirin 100µg/ml, Bet= Betain, mM= Milimolar

### Nitrik Oksit bulguları

100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain grubu (5,21±0,61 nmol/mg protein) ve 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain grubunda oluşan NO düzeyleri (4,86±0,47 nmol/mg protein) 100µg/ml aspirin+50mM etanol grubuna (3,46±0,63 nmol/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (sırasıyla p<0,01, p<0,05). 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain grubunda oluşan NO düzeyleri (5,21±0,61 nmol/mg protein), 100µg/ml aspirin grubuna (3,63±0,87 nmol/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). Diğer gruplar arasında fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 4.5.** Kontrol grubu, 50mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+50mM etanol, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain gruplarının NO değerleri (ortalama ± standart hata).

Gruplar	Kontrol	50mM EtOH	100µg Aspirin	100µgAspirin + 50mM EtOH	100µg Aspirin + 50mMEtOH + 0,5mM Betain	100µg Aspirin + 50mMEtOH + 1mM Betain
Ort±SH	4,21±0,47	4,1±1,33	3,63±0,87	3,46±0,63	4,86±0,47 <sup>a</sup>	5,21±0,61 <sup>b,c</sup>



**Şekil 4.5.** Kontrol grubu, 50mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+50mM etanol, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain gruplarının NO değerlerinin karşılaştırılması (nmol/mg protein).

a: Aspirin+50mM etanol+0,5mM betain grubunun aspirin+50mM etanol grubuna göre farkı p<0,05

b: Aspirin+50mM etanol+1mM betain grubunun aspirin+50mM etanol grubuna göre farkı p<0,01

c: Aspirin+50mM etanol+1mM betain grubunun aspirin grubuna göre farkı p<0,05

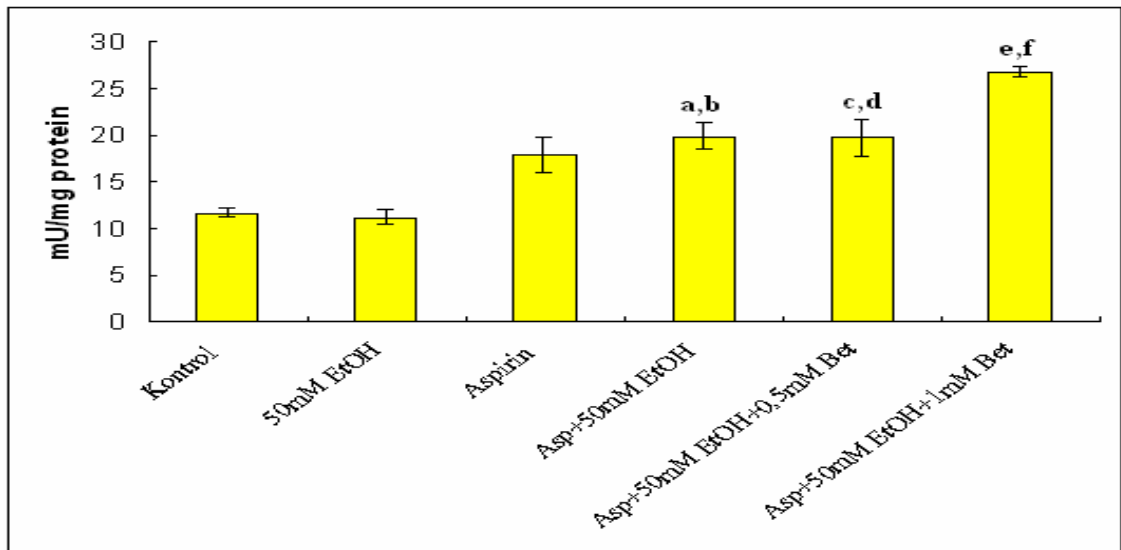
NOT: EtOH=Etanol, Asp= Aspirin 100µg/ml, Bet= Betain, mM= Milimolar

### Adenozin Deaminaz bulguları

100µg/ml aspirin+50mM etanol grubu (19,90±1,36 mU/mg protein), 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain grubu (26,85±0,56 mU/mg protein) ve 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain grubunun (19,80±1,90 mU/mg protein) ADA düzeyleri kontrol grubuna (11,68±0,41 mU/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (sırasıyla p<0,05 ile p<0,05 ve p<0,001 ). 100µg/ml aspirin+50mM etanol grubu (19,90±1,36 mU/mg protein), 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain grubu, (26,85±0,56 mU/mg protein) ve 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain grubunun (19,80±1,90 mU/mg protein) ADA düzeyleri 50mM etanol grubuna (11,21±0,74 mU/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (sırasıyla p<0,01 ile p<0,01 ve p<0,001). Diğer gruplar arasında istatistiksel bir fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 4.6.** Kontrol grubu, 50mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+50mM etanol, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain gruplarının ADA değerleri (ortalama ± standart hata).

Gruplar	Kontrol	50mM EtOH	100µg Aspirin	100µg Aspirin + 50mM EtOH	100µg Aspirin + 50mM EtOH + 0,5mM Betain	100µg Aspirin + 50mM EtOH + 1mM Betain
Ort±SH	11,68±0,41	11,21±0,74	17,96±1,95	19,90±1,36 <sup>a,b</sup>	19,80±1,90 <sup>c,d</sup>	26,85±0,56 <sup>e,f</sup>



**Şekil 4.6.** Kontrol grubu, 50mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+50mM etanol, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+50mM etanol+1mM betain gruplarının ADA değerlerinin karşılaştırılması (mU/mg protein).

- a : Aspirin grubu+50mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,05$
- b: Aspirin grubu+50mM etanol grubunun, 50mM etanol grubuna göre farkı  $p<0,01$
- c : Aspirin+50mM etanol+0,5mM betain grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,05$
- d: Aspirin+50mM etanol+0,5mM betain grubunun, 50mM etanol grubuna göre farkı  $p<0,01$
- e: Aspirin+50mM etanol+1mM betain grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,001$
- f : Aspirin+50mM etanol+1mM betain grubunun, 50mM etanol grubuna göre farkı  $p<0,001$

NOT: EtOH=Etanol, Asp= Aspirin 100µg/ml, Bet= Betain, mM= Milimolar

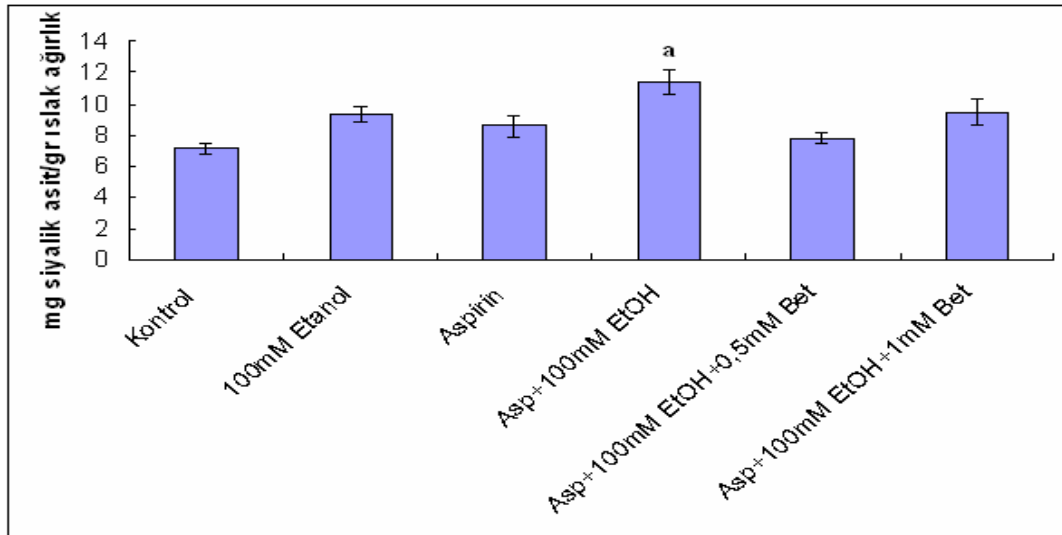
**C) Kontrol grubu, 100mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+100mM etanol, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+1mM betain grupları arasındaki istatistiksel karşılaştırma**

**Siyalik Asit bulguları**

100µg/ml aspirin+100mM etanol grubunun SA düzeyleri (11,36±0,77 mg/gr ıslak ağırlık), kontrol grubuna (7,11±0,32 mg/gr ıslak ağırlık) göre anlamlı bir şekilde yükseldi (p<0,05). Diğer gruplar arasında fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 4.7.** Kontrol grubu, 100mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+100mM etanol, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+1mM betain grupları arasındaki SA değerleri (ortalama ± standart hata).

Gruplar	Kontrol	100mM EtOH	100µgAspirin	100µg Aspirin + 100mM EtOH	100µgAspirin + 100mM EtOH + 0,5mM Betain	100µg Aspirin + 100mMEtOH + 1mM Betain
Ort±SH	7,11±0,32	9,36±0,52	8,56±0,69	11,36±0,77 <sup>a</sup>	7,81±0,32	9,41±0,85



**Şekil 4.7.** Kontrol grubu, 100mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+100mM etanol, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+1mM betain grupları arasındaki SA değerlerinin karşılaştırılması (mg siyalik asit/gr ıslak ağırlık)

a : Aspirin+100mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı p<0,05

NOT: EtOH=Etanol, Asp= Aspirin 100µg/ml, Bet= Betain, mM= Milimolar

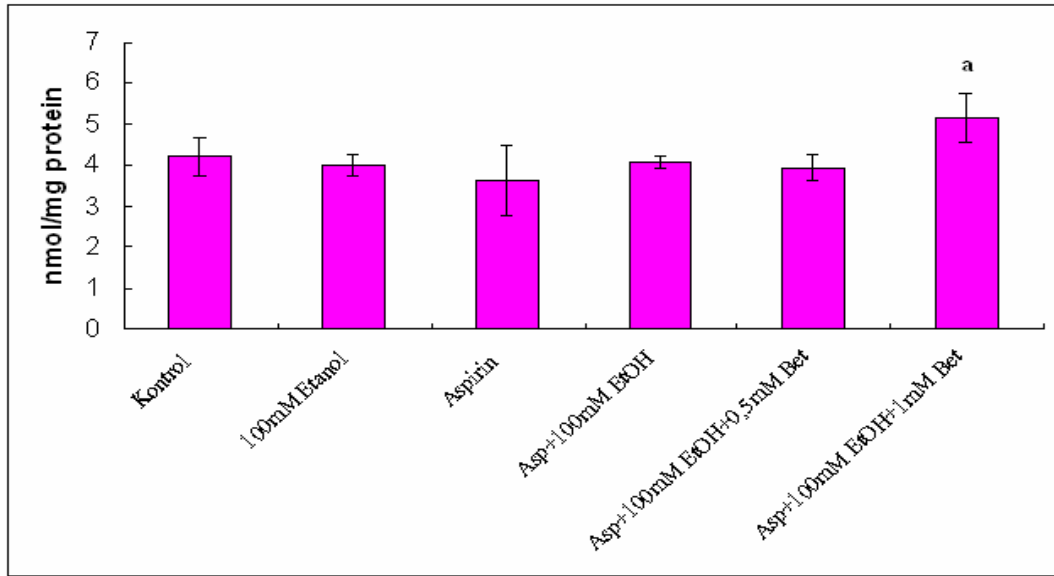


### Nitrik Oksit bulguları

100µg/ml aspirin+100mM etanol+1mM betain grubunun (5,16±0,59 nmol/mg protein) NO düzeyi 100µg/ml aspirin grubuna (3,63±0,87 nmol/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05). Diğer gruplar arasında fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 4.8.** Kontrol grubu, 100mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+100mM etanol, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+1mM betain grupları arasındaki NO değerleri (ortalama ± standart hata).

Gruplar	Kontrol	100mM EtOH	100µgAspirin	100µg Aspirin + 100mM EtOH	100µgAspirin + 100mM EtOH + 0,5mM Betain	100µg Aspirin + 100mM EtOH + 1mM Betain
Ort±SH	4,21±0,47	4,00±0,25	3,63±0,87	4,08±0,14	3,93±0,30	5,16±0,59 <sup>a</sup>



**Şekil 4.8.** Kontrol grubu, 100mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+100mM etanol, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+1mM betain grupları arasındaki NO değerlerinin karşılaştırılması (nmol/mg protein)

a: Aspirin+100mM etanol+1mM betain grubunun aspirin grubuna göre farkı p<0,05

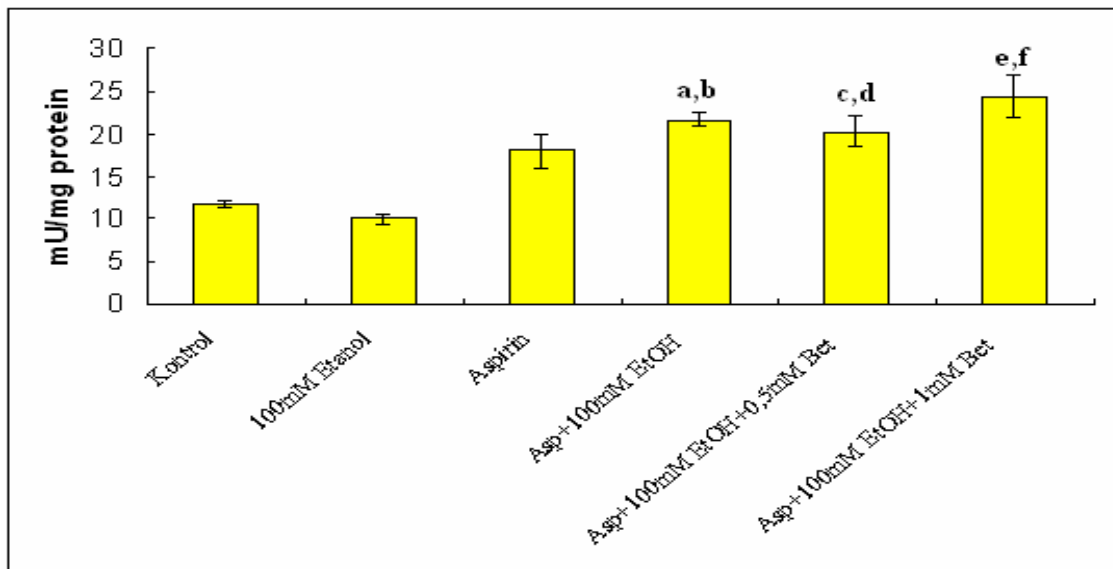
NOT: EtOH=Etanol, Asp= Aspirin 100µg/ml, Bet= Betain, mM= Milimolar

### Adenozin Deaminaz bulguları

100µg/ml aspirin+100mM etanol grubunun (21,70±0,81 mU/mg protein) ADA düzeyleri kontrol grubu (11,68±0,41 mU/mg protein) ve 100mM etanol grubuna (10,00±0,52 mU/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,01). 100µg/ml aspirin+100mM etanol+0,5mM betain grubunun (20,21±1,73 mU/mg protein) ADA düzeyleri, kontrol grubuna (11,68±0,41 mU/mg protein) ve 100mM etanol grubuna (10,00±0,52 mU/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). 100µg/ml aspirin+100mM etanol+ 1mM betain grubunun (24,38±2,48 mU/mg protein) ADA düzeyleri, kontrol grubu (11,68±0,41 mU/mg protein) ve 100mM etanol grubuna (10,00±0,52 mU/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,001). Diğer gruplar arasında istatistiksel bir fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 4.9.** Kontrol grubu, 100mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+100mM etanol, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+1mM betain grupları arasındaki ADA değerleri (ortalama ± standart hata).

Gruplar	Kontrol	100mM EtOH	100µg Aspirin	100µg Aspirin + 100mMEtOH	100µg Aspirin + 100mM EtOH + 0,5mM Betain	100µg Aspirin + 100mM EtOH + 1mM Betain
Ort±SH	11,68±0,41	10,00±0,52	17,96±1,95	21,70±0,81 <sup>a,b</sup>	20,21±1,73 <sup>c,d</sup>	24,38±2,48 <sup>e,f</sup>



**Şekil 4.9.** Kontrol grubu, 100mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+100mM etanol, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+100mM etanol+1mM betain grupları arasındaki ADA değerlerinin karşılaştırılması (mU/mg protein).

- a : Aspirin+100mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,01$
- b: Aspirin+100mM etanol grubunun, 100mM etanol grubuna göre farkı  $p<0,01$
- c: Aspirin+100mM etanol+0,5mM betain grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,05$
- d: Aspirin+100mM etanol+0,5mM betain grubunun, 100mM etanol grubuna göre farkı  $p<0,05$
- e: Aspirin+100mM etanol+1mM betain grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,001$
- f: Aspirin+100mM etanol+1mM betain grubunun, 100mM etanol grubuna göre farkı  $p<0,001$

NOT: EtOH=Etanol, Asp= Aspirin 100µg/ml, Bet= Betain, mM= Milimolar

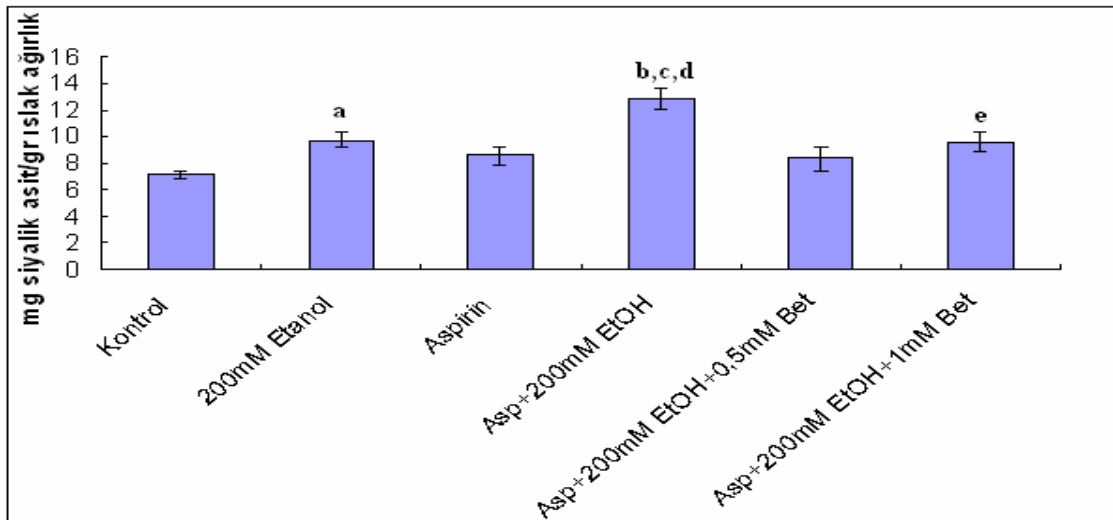
**D) Kontrol grubu, 200mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+200mM etanol, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain grupları arasındaki istatistiksel karşılaştırma**

**Siyalik Asit bulguları**

200mM etanol grubu (9,73±0,53 mg/gr ıslak ağırlık), 100µg/ml aspirin+200mM etanol grubu (12,81±0,78 mg/gr ıslak ağırlık ) ve 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun (9,6±0,71 mg/gr ıslak ağırlık) SA düzeyleri kontrol grubuna (7,11±0,32 mg/gr ıslak ağırlık) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (sırasıyla p<0,05 ile p<0,01 ve p<0,05). 100µg/ml aspirin grubu+200mM etanol grubunun (12,81±0,78 mg/gr ıslak ağırlık) SA düzeyleri aspirin grubuna (8,56±0,69 mg/gr ıslak ağırlık) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). 100µg/ml aspirin+200mM etanol grubunun (12,81±0,78 mg/gr ıslak ağırlık) SA düzeyleri 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubuna (8,31±0,87 mg/gr ıslak ağırlık) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). Diğer gruplar arasında istatistiksel bir fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 4.10.** Kontrol grubu, 200mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+200mM etanol, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain gruplarının SA değerleri, (ortalama ± standart hata).

Gruplar	Kontrol	200mM EtOH	100µgAspirin	100µg Aspirin + 200mM EtOH	100µgAspirin + 200mMEtOH + 0,5mMBetain	100µgAspirin + 200mMEtOH + 1mMBetain
Ort±SH	7,11±0,32	9,73±0,53 <sup>a</sup>	8,56±0,69	12,81±0,78 <sup>b,c,d</sup>	8,31±0,87	9,6±0,71 <sup>e</sup>



**Şekil 4.10.** Kontrol grubu, 200mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+200mM etanol, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain gruplarının SA değerlerinin karşılaştırılması (mg siyalik asit/gr ıslak ağırlık).

a : 200mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,05$

b : Aspirin+200mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,01$

c : Aspirin+200mM etanol grubunun, aspirin grubuna göre farkı  $p<0,05$

d : Aspirin+200mM etanol grubunun, aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubuna göre farkı  $p<0,05$

e : Aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,05$

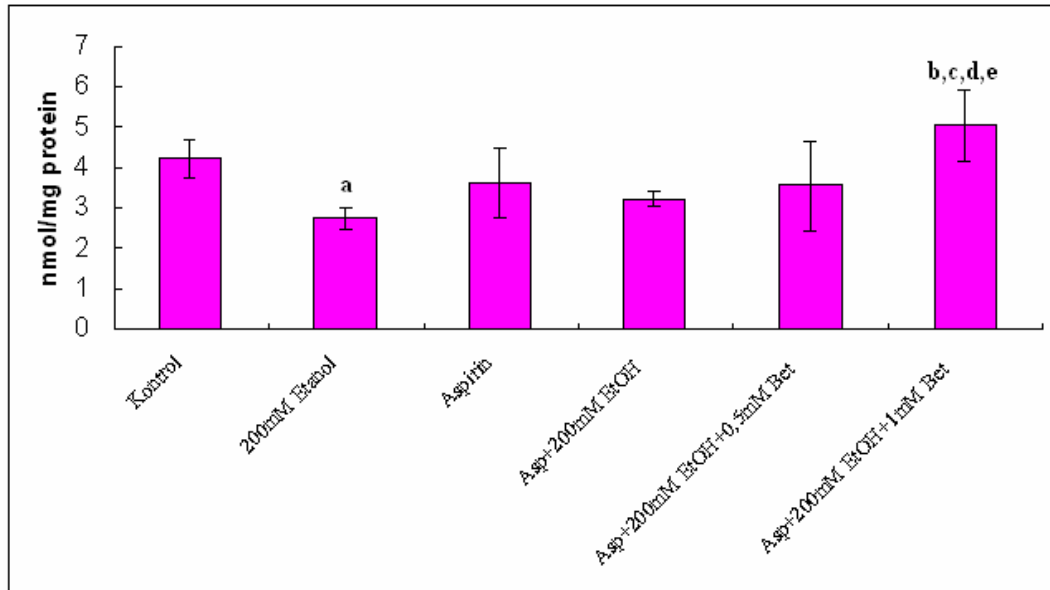
NOT: EtOH=Etanol, Asp= Aspirin 100µg/ml, Bet= Betain, mM= Milimolar

**Nitrik Oksit bulguları**

200mM etanol grubunun (2,75±0,25 nmol/mg protein) NO düzeyi kontrol grubuna (4,21±0,47 nmol/mg protein) göre anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,01). 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunda (5,03±0,83 nmol/mg protein) oluşan NO düzeyleri 200mM etanol grubuna (2,75±0,25 nmol/mg protein), 100µg/ml aspirin+200mM etanol grubuna (3,23±0,18 nmol/mg protein), 100µg/ml aspirin grubuna (3,63±0,87 nmol/mg protein) ve 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubuna (3,55±1,11 nmol/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (sırasıyla p<0,001, p<0,01, p<0,05 ve p<0,05). Diğer gruplar arasında fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 4.11.** Kontrol grubu, 200mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+200mM etanol, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain gruplarının NO değerleri (ortalama ± standart hata).

Gruplar	Kontrol	200mM EtOH	100µg Aspirin	100µg Aspirin + 200mMEtOH	100µg Aspirin + 200mM EtOH + 0,5mM Betain	100µg Aspirin + 200mM EtOH + 1mM Betain
Ort±SH	4,21±0,47	2,75±0,25 <sup>a</sup>	3,63±0,8	3,23±0,18	3,55±1,11	5,03±0,83 <sup>b,c,d,e</sup>



## PDF Eraser Free

**Şekil 4.11.** Kontrol grubu, 200mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+200mM etanol, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain gruplarının NO değerlerinin karşılaştırılması (nmol/mg protein).

a: 200mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p<0,01$

b: Aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun 200mM etanol grubuna göre farkı  $p<0,001$

c: Aspirin+100mM etanol+1mM betain grubunun aspirin grubuna göre farkı  $p<0,05$

d: Aspirin+100mM etanol+1mM betain grubunun aspirin+200mM etanol grubuna göre farkı  $p<0,01$

e: Aspirin+100mM etanol+1mM betain grubunun aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubuna göre farkı  $p<0,05$

NOT: EtOH=Etanol, Asp= Aspirin 100µg/ml, Bet= Betain, mM= Milimolar

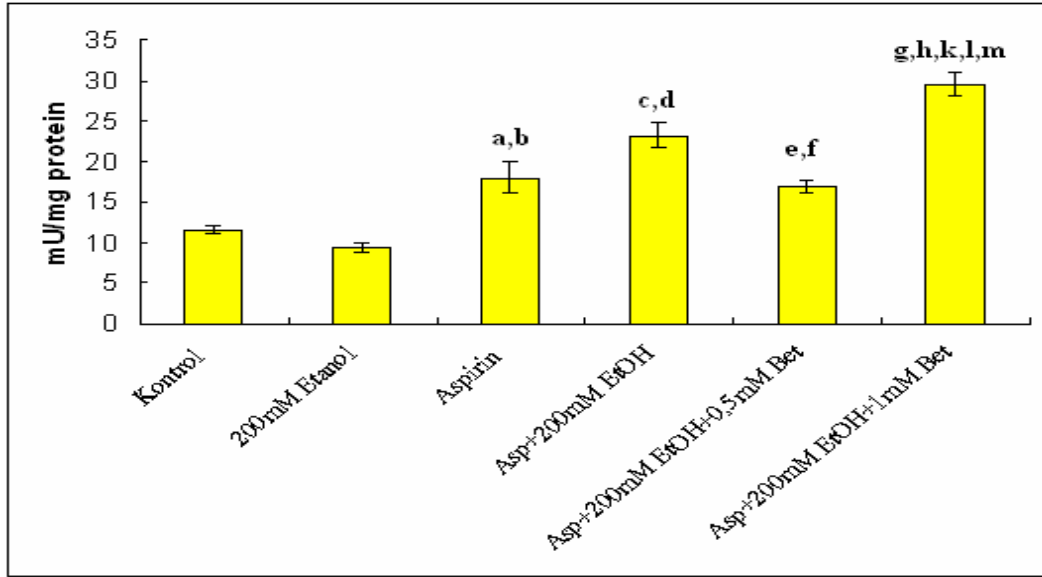
**Adenozin Deaminaz bulguları**

100µg/ml aspirin grubu (17,96±1,95 mU/mg protein), 100µg/ml aspirin+200mM etanol grubu (23,28±1,57 mU/mg protein), 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubu (16,86±0,87 mU/mg protein) ve 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun (29,48±1,46 mU/mg protein) ADA düzeyleri kontrol grubuna (11,68±0,41 mU/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (sırasıyla p<0,05, p<0,01, p<0,05, p<0,001). 100µg/ml aspirin grubu (17,96±1,95 mU/mg protein), 100µg/ml aspirin+200mM etanol grubu (23,28±1,57 mU/mg protein), 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubu (16,86±0,87 mU/mg protein) ve 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun (29,48±1,46 mU/mg protein) ADA düzeyleri 200mM etanol grubuna (9,38±0,66 mU/mg protein) göre anlamlı şekilde yüksekti (sırasıyla p<0,01, p<0,001, p<0,01 ve p<0,001). 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun (29,48±1,46 mU/mg protein) ADA düzeyleri 100µg/ml aspirin+200mM etanol grubu (23,28±1,57 mU/mg protein), 100µg/ml aspirin grubu (17,96±1,95 mU/mg protein) ve 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubuna (16,86±0,87 mU/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti (sırasıyla p<0,05, p<0,01, p<0,01). Diğer gruplar arasında istatistiksel bir fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 4.12.** Kontrol grubu, 200mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+200mM etanol, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain gruplarının ADA değerleri (ortalama ± standart hata).

Kontrol	200mM EtOH	100µg Aspirin	100µg Aspirin + 200mM EtOH	100µg Aspirin + 200mM EtOH + 0,5mM Betain	100µg Aspirin + 200mM EtOH + 1mM Betain
11,68±0,41	9,38±0,66	17,96±1,95 <sup>a,b</sup>	23,28±1,57 <sup>c,d</sup>	16,86±0,87 <sup>e,l</sup>	29,48±1,46 <sup>g,h,k,l,m</sup>





**Şekil 4.12.** Kontrol grubu, 200mM etanol, 100µg/ml aspirin, 100µg/ml aspirin+200mM etanol, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+0,5mM betain, 100µg/ml aspirin+200mM etanol+1mM betain gruplarının ADA değerlerinin karşılaştırılması (mU/mg protein)

- a : Aspirin grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p < 0,05$
- b: Aspirin grubunun, 200mM etanol grubuna göre farkı  $p < 0,01$
- c: Aspirin+200mM etanol grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p < 0,01$
- d: Aspirin+200mM etanol grubunun, 200mM etanol grubuna göre farkı  $p < 0,01$
- e: Aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p < 0,05$
- f: Aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubunun, 200mM etanol grubuna göre farkı  $p < 0,01$
- g: Aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun, kontrol grubuna göre farkı  $p < 0,001$
- h: Aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun, 200mM etanol grubuna göre farkı  $p < 0,001$
- k: Aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun, aspirin grubuna göre farkı  $p < 0,01$
- l : Aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun, aspirin+200mM etanol grubuna göre farkı  $p < 0,05$
- m: Aspirin+200mM etanol+1mM betain grubunun, aspirin+200mM etanol+0,5mM betain grubuna göre farkı  $p < 0,01$

NOT: EtOH=Etanol, Asp= Aspirin 100µg/ml, Bet= Betain, mM= Milimolar

## 5. TARTIŞMA

Etanol biyolojik zarların yapısını bozar, akışkanlıklarını artırır ve zara gömülmüş olan proteinlerin fonksiyonlarını etkiler (18,50,86,87). Lipid zarları çözerek zarlara gömülmüş reseptör ve iyon kanallarının fonksiyonlarını değiştirir (43,57). Etanolün bunlara ek olarak beyindeki sinaptik yapılar üzerine de etkileri bulunmaktadır. Sinaptik zarların lipid yapı ve kompozisyonunu değiştirir, sinaptik veziküllerin sayılarını azaltırken intramembranöz parçacıkların sayısını artırır. Plazma zarı ve mitokondriyal transmembran potansiyellerini inhibe eder (43,101). Etanol sinaptozomlardaki iyon değişiminde de önemli role sahiptir (86). Beyin sinaptozomal fraksiyonlarında oksidatif yol üzerinde peroksizomlarda bulunan katalazın etanolü metabolize ettiği (37,97,126), non-oksidatif yol üzerinde yağ asidi etil esterlerinin rol aldığı bilinmektedir (13,23,38,80). Bunun yanısıra etanolün zar üzerine direkt etkisi de bulunmaktadır (43,68).

Zımatkin ve arkadaşları, etanolün rat beyin dokusunda ortaya çıkardığı etkileri araştırdıkları çalışmalarda, merkezi sinir sisteminde dejeneratif ve inflamatuvar süreçlerle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, alınan etanol miktarına bağlı olarak zar akışkanlığını artırdığını ve zara bağlı proteinlerin fonksiyonlarını değiştirdiğini göstermişlerdir (120,121,122). Droiette ve arkadaşları, rat sinaptozomları ve eritrosit zarı üzerine yaptıkları çalışmada, etanolün lipid zarları çözdüğü ve bu sayede zarlara gömülmüş reseptör ve iyon kanallarının fonksiyonlarını değiştirdiğini belirtmişlerdir (43). Haris ve Hood, rat ve fare beyinlerinden izole ettikleri sinaptozomlarda, etanolün kalsiyum uptake sistemi üzerine olan etkisini araştırdıkları çalışmada, beyin zar yükünde ve nörolojik fonksiyonların değişmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir (63). Wallner ve arkadaşları, akut olarak 30, 100, 300mM etanol uyguladıkları rat serebral GABA<sub>A</sub> çalışmasında toksik etanol dozunu  $\geq 50$ mM etanol, lethal dozu ise  $\geq 100$ mM olarak belirtmişlerdir (123). Wu ve arkadaşları, ağır alkol intoksikasyonu geçiren hastalarda kan alkol düzeylerinin 520 ile 1127mg/dl arasında olduğunu belirtmişlerdir (135). Çalışmamızda uyguladığımız 50, 100 ve 200mM etanol dozları sırasıyla yaklaşık 228mg/dl, 457mg/dl, 914mg/dl değerlerine karşılık gelmektedir. Sinaptozomal

fraksiyon üzerine in vitro koşullarda uyguladığımız akut etanolün farklı dozlardaki etkisini görebilmek için kaynakları göz önüne alarak 50, 100 ve 200mM olarak tez çalışmamızda uyguladık.

Aspirinin eritrosit ve trombosit zarı üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar, aspirinin zar akıcılığını ve lipid düzenini bozduğunu bunun yanısıra lipid protein matriksi ve zar protein konformasyonunda düzensizliklere neden olduğunu göstermiştir (54,99,128). Bu etkide, aspirinin içerdiği düz benzen halkası sebebiyle lipofilitésinin hidrofilitésinden daha fazla olmasının rol oynadığı düşünülmektedir. Aspirinin uzun süre kullanımının gastrik mukoza hasarına sebep olduğu (94), aspirinle beraber alkol alınımının alkol dehidrogenaz aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (93). Terres ve arkadaşları, in vitro olarak yaptıkları trombolizis deneyinde aspirin konsantrasyonunu 10 ve 200µg/ml olarak kullanmışlardır (114). Zailaie, melanosit deri hücre kültürleri üzerine aspirinin uzun ve kısa dönemlerde proliferasyon ve lipid peroksidasyona etkisini incelediği çalışmasında, in vitro doz olarak 75 ve 300µg/ml aspirin kullanmıştır (119). Wollersen ve arkadaşları, aspirin alarak intihar eden bir kişinin üzerinde yapmış oldukları çalışmada beyinde 251mg/L salisilat konsantrasyonunun lethal olduğunu belirtmişlerdir (133). Bu 251µg/ml değerine karşılık gelmektedir. Park ve arkadaşları, aspirinin sağlıklı insanların kanlarında CYP2E1 aktivitesi üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada, aspirinin normal terapatik aralık içindeki yüksek doz değerini 3g/dl olarak belirtmişlerdir (96). Bu 30.000µg/ml değerine karşılık gelmektedir. Aspirin dozunu, literatürlere dayanarak 100µg/ml olarak uyguladık.

Betain transmetilasyon reaksiyonları için metil (tek karbon) donörüdür. Homosisteinin metiyonine dönüşümü, metiyonin düzeyinin korunması, homosisteinini detoksifiye etmek ve S-adenozilmethiyonini (SAM) üretmek için gereklidir. Betainin trans-sülfürasyon yolu ile redükte glutatyon oranını artırarak etanol kaynaklı hasarı azalttığı bildirilmiştir (53,70). Beumer ve arkadaşları, yemekler ve yiyeceklerin bozulmasını sağlayan, tuzluluk oranlarına hassas *Listeria monocytogenes* hücrelerini kullanarak, beyin ve kalp hücrelerinin hücre kültür ortamında yaşamının devamı için gerekli olan besi ortamını bulmak ve minimal medyum elde edebilme çalışmasında, in

vitro betain dozunu 1mM olarak uygulamışlardır (14). Barak ve arkadaşları, etanolle beslenen ratların hepatositlerinde yükselen S-adenozil-homosistein seviyesinin betainle düşürülmesi üzerine yaptıkları çalışmada, betainin in vitro dozunu 1mM olarak kullanmışlardır (11). Çalışmamızda bu kaynaklar göz önünde tutularak, betainin farklı dozlardaki etkisini görebilmek amacıyla 0,5 ve 1mM olarak uyguladık.

Siyalik asit (SA), nöraminik asitten N-asetilizasyon yoluyla türeyen bir bileşik olup, canlıda biyolojik fonksiyonlarda önemli bir role sahiptir. SA glikoprotein ve glikolipidlerin oligosakkarid zincirlerinin indirgenmemiş ucundaki terminal karbonhidrat kalıntısıdır. İnsan dokularında en önemli olan formu ise N-asetilnöraminik asit (NANA)'dir. SA'ler hücre zarlarında önemli görevleri olan glikoprotein ve glikolipidlerin oligosakkarit zincirlerinin son bölgelerindeki karbonhidrat zincirleridir. N-terminal pozisyonu üzerinde SA içeren bu oligosakkarit zincirler hücre yüzeyinde bulunur. Böylelikle gliko bileşiklerinin konfigürasyonunda ve hücre yüzeyinde önemli rolleri vardır. Bunlar; hücre-hücre haberleşmesinde, kendine ait olan ve olmayanın ayırımında tanıma görevinde, zar proteolizinden kaçınmak ve hormonlar tarafından reseptör aktivasyonunun sağlanması için gerekli arabulucu rolü üstlenmek gibi rollerdir (117).

Çalışmamızda rat beyin sinaptozomal fraksiyonları, farklı dozlarda etanolle (50,100,200mM) inkübe edildikten sonra SA düzeyleri ölçüldü (Şekil 4.1), 100mM ve 200mM etanol gruplarının SA düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ( $p<0,01$ ). Kanbak ve arkadaşlarının, etanolle beslenen ratlar üzerinde, eritrosit zar yapısındaki toksisite (69), Sillanaukee ve arkadaşlarının da sosyal içiciler ve alkolikler üzerinde yaptığı çalışmalarda (109), çalışmamızdaki bulduğumuz sonuca paralel olarak, etanolün siyalik asit düzeylerini kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yükselttiği bulunmuştur. Pönnio ve arkadaşları da alkoliklerin serumlarında siyalik asit düzeylerini anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (102). Bulgularımız da etanolün doza bağımlı olarak siyalik asit seviyesini yükselttiği yöndedir. Rat karaciğerinde yapılan çalışmalarda, etanol alınımıyla SA artışının sitozol ve plazma zarlarındaki siyalidaz aktivitelerinin artmasına ve etanolün indüklemesiyle golgi ve

sinaptozomlardaki siyaliltransferazların aktivitesinin azalmasına bağlanmıştır. Siyalidaz enzimi glikoprotein, glikolipid, gangliosid ve polisakkaritlerin karbohidrat zinciri ucunda bulunan siyalik asitlerin, glikozid bağı hidrolizini gerçekleştirir ve siyalik asit metabolizmasında önemli bir yere sahiptir. Siyaliltransferaz ve glikoziltransferazlar golgi aparatında glikolipid ve glikoproteinlerin karbohidrat grupları üzerinde bulunan indirgenmemiş terminal pozisyonlara siyalik asit transferini katalize ederler (58,84). Çalışmamızda etanol SA seviyelerini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilir. Doğrudan etkide etanol, zar akıcılığını artırarak zara gömülü protein yapılarının düzenini ve kompozisyonunun bozulmasına yol açmaktadır. Bu da zardan SA kaybını indükleyebilir. Dolaylı etkide ise etanolün non-oksidatif metabolitleri olan yağ asidi etil esterlerinin ve oksidatif metaboliti olan asetaldehitin zar üzerindeki toksik etkileri SA kaybına sebep olabilir. Asetaldehitin karaciğer plazma zarında protein adductları oluşturduğu (12), yağ asidi etil esterlerinin ise eritrosit zarı (116), ile pankreatik lizozomal zarlarda yapı bozulmasına sebep olduğu daha önce rapor edilmiştir (60).

Çalışmamızda akut olarak farklı dozlarda etanolla (50,100,200mM) beraber aspirin (100µg/ml) kullanımı ve betainin (0,5, 1mM) olası koruyucu rolünün SA düzeylerine olan etkisi incelendiğinde (Şekil 4.4, 4.7, 4.10), 50 ve 200mM akut etanol uygulanan grupların SA seviyeleri istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksekti ( $p < 0,05$ ). 100mM etanol uygulanan grubun SA düzeyi kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0,05$ ). Sinaptozomal fraksiyonlara tek dozu toksik olmayan aspirinin (100µg/ml) uygulanması, SA seviyelerini hafif ve istatistiksel açıdan anlamlı olmayacak şekilde yükseltti ( $p > 0,05$ ). Çalışmamızda çeşitli dozlarda etanolla (50,100,200mM) aspirinin (100µg/ml) beraber uygulanmasının sinaptozomal SA seviyelerini 50 ve 100mM etanol uygulanan gruplarda anlamlı düzeyde yükselttiği ( $p < 0,05$ ), en anlamlı artışın ise 200mM etanol uygulanan grupta olduğu gözlemlendi ( $p < 0,01$ ). Bu yükselme etanol (50,100,200mM) ve aspirinin (100µg/ml) tek başlarına uygulanmasıyla oluşan etkilerden daha fazlaydı. Etanolün çeşitli dozlarının (50,100,200mM) yanında aspirin (100µg/ml) ve betainin 0,5mM dozunun birlikte uygulanması ile oluşturulan gruplarda, SA düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark içermiyordu ( $p > 0,05$ ). Fakat 50 ile 200mM

etanolün yanında aspirin (100µg/ml) ve 0,5mM betainin beraber uygulandığı gruplar, 50 ve 200mM etanolle beraber aspirinin (100µg/ml) uygulanmasıyla ortaya çıkan SA düzeylerine göre anlamlı şekilde düşüktü ( $p<0,05$ ). 100mM etanolle beraber aspirin (100µg/ml) kullanımı ve yanında 0,5mM betain uygulanan grubun SA düzeyi, 100mM etanolle beraber aspirinin (100µg/ml) verilmesiyle ortaya çıkan SA düzeylerine göre düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdı ( $p>0,05$ ). 50 ve 200mM etanolün yanında aspirin (100µg/ml) ve betain 1mM olarak uygulandığı gruplar, SA seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artırdı ( $p<0,05$ ). 100mM etanolün yanında aspirin (100µg/ml) ve betain 1mM olarak uygulandığı grubun SA düzeyi ise kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p>0,05$ ).

SA pek çok zar glikoproteini ve glikolipidinin bileşenlerinden birisidir. Özellikle beyinde yoğun olarak bulunan siyaloglikolipidler (gangliosid) büyüme, farklılaşma, rejenerasyon gibi biyolojik fonksiyonları düzenleyen yapılardır (27). Akut etanol toksikasyonunun zar ganliosid oranını azalttığı ve zardan siyalik asit bileşenlerinin kopmasına sebep olduğu bilinmektedir. Sillanauke ve arkadaşları kronik alkol tüketiminde serum, plazma, tükürük salgısı ve karaciğer dokularında siyalik asit derecelerinin arttığını belirtmişlerdir (109). Aspirinin ve aspirinle beraber etanol uygulamasının, siyalik asit düzeylerine olan etkisi üzerine literatürlerde herhangi bir çalışma raslayamadık. Eritrosit ve trombosit zarının lipid düzenini aspirinin bozduğunu bildiren çalışmalar yapılmıştır (54,99,128). Rat beyinlerinde betainle aynı işlevli S-adenozil-L-metiyonin uzun ve kısa dönem etkileri incelendiğinde, uzun dönem uygulanmasının zar lipid peroksidasyonunu azalttığına dair çalışmalar De La Cruz ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (36). Kanbak ve arkadaşları da betainin aynı şekilde etanol kaynaklı hasarı azalttığını rat beyin sinaptozomlarında yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (70). Karaciğer dokusunda da etanolün yaptığı doku hasarı betainin azalttığına dair çalışmalar Barak ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (10,11). Sonuçlarımız etanolün doza bağlı olarak beyin sinaptozomlarında zar hasarının bir göstergesi olan SA seviyelerini 50 ve 200mM etanol gruplarında artırdığını göstermektedir. 100mM etanol uygulanan grupta da aynı etkiyi bekliyorduk fakat kontrol grubuna göre SA düzeyleri yüksek olmasına rağmen istatistiksel bir fark

görülmedi. SA artışının nedeni etanolün non-oksidatif metabolitleri olan yağ asidi etil esterlerinin ve oksidatif metaboliti olan asetaldehitin zar üzerindeki toksik etkileri olabilir. Önceki çalışmalar etanol toksisitesinin siyalidaz aktivitesini artırdığını bunların sonucu da SA miktarının yükseldiği yorumunu yapmışlardır (58,84). Etanolden doğan intoksikasyonun diğer sebebinin de etanolün direkt olarak sinaptosomal fraksiyonlara uygulanmasıyla zar yapısı üzerindeki bozucu etkisi olduğunu düşünmekteyiz. Böylece zara bağlı siyalik asitler serbest hale gelmektedir. Aspirinin tek başına sinaptosomal fraksiyonlara uygulanmasıyla neden olduğu ılımlı artışın, molekül yapısında içerdiği düz benzen halkası sebebiyle olduğunu söyleyebiliriz. Bu yapının lipofilitesi yüksek olduğundan zar akıcılığını ve lipid düzenini bozduğunu düşünüyoruz (54,99,128). Farklı dozlarda uyguladığımız etanolle (50,100,200mM) beraber aspirinin (100µg/ml) birlikte inkübe edilesiyle oluşturulan gruplar (Şekil 4.4, 4.7, 4.10), etanolün zar üzerindeki toksik etkisi ve aspirinin zar akıcılığını bozucu etkisinin beraber bir sonucu olarak, akut olarak farklı doz etanol (50,100,200mM) uygulanan gruplardaki toksik etkiden daha yüksekti. Farklı dozlarda etanolle (50,100,200mM) aspirinin (100µg/ml) beraber kullanımının yanında 0,5mM betain desteği, etanol ve aspirinin neden olduğu toksik etkiyi 50 ve 200mM uygulanan gruplarda kontrol grubuna yaklaştırarak anlamlı bir şekilde düşürmüştü. 100mM etanol uygulanan grupta ise bir düşme görülse de anlamı değildi. Burada betainin zar koruyucu özelliği olarak S-adenozilmetiyonin seviyelerini yükseltmesiyle etanolün toksik sonuçlarını tamamen geriye çevirdiğini düşünüyoruz. S-adenozilmetiyoninin zar akıcılığını normalleştirdiği ve zar protein içeriğindeki değişimleri engellediği daha önce rapor edilmiştir (53). Farklı dozlarda etanolle (50,100,200mM) beraber aspirin (100µg/ml) kullanımının yanında 1mM betain desteği, etanolün tüm dozlarıyla beraber aspirinin (100µg/ml) uygulamasının neden olduğu toksik etkiyi istatistiksel olarak anlamsız bir şekilde düşürmüş olsa da 50 ve 200mM etanolle beraber aspirin (100µg/ml) kullanımının yanında 1mM betain uygulandığı gruplar, kontrol grubuna göre anlamlı derece yüksek olduğundan betainin koruyucu özelliği burada görülmemiştir. 100mM etanolle beraber aspirin (100µg/ml) kullanımının yanında 1mM betain uygulandığı grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Fakat burada da 1mM betainin koruyucu rolünden bahsedemeyiz. Betainin dozunun artmasına bağlı olarak zarın yapısını koruyucu etkisinin artış göstereceğini düşünürken, 1mM betainin uygulandığı gruplardaki siyalik asit

çalışmasında, yalnızca etanol verilen gruplar kadar kontrolden yüksek olmaları anlaşılmıştır. Betainin doza bağlı etkisi üzerine daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Nitrik oksit küçük reaktif ve lipofilik bir moleküldür. Beyinde nitrik oksit bir nörotransmitter olarak fonksiyon görmektedir. Nitrik oksitin diğer nörotransmitterlerin salınımı, öğrenme, hafıza, gen ekspresyonu ve nöronal dejenerasyonda rol aldığı saptanmıştır. Glutamat NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörü aktivitesi, nitrik oksitin üretildiği temel yoldur. NMDA reseptörü glutamat bağımlı bir iyonotropik reseptördür. Bu reseptörlerin aktivasyonu iyon kanallarını açarak hücre içine sodyum ve kalsiyum, hücre dışına ise potasyum akışına neden olmaktadır. NMDA reseptörü kaynaklı kalsiyum akışı sinaptik işleyiş, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarıyla ilişkili hücresel mekanizmalarda önemli rol oynamaktadır. Dolayısıyla etanol kaynaklı NMDA reseptörü ve buna bağlı NOS inhibisyonu akut etanol toksikasyonunda görülen davranışsal ve bilişsel bozukluklarla ilişkilidir (28). NMDA reseptörleri etanolün beyindeki ana hedefleri arasındadır. Etanolün beyindeki nitrik oksit yolunu etkilediği ve bunu da NMDA reseptörlerine olan etkisi yoluyla gerçekleştirdiğine dair kanıtlar mevcuttur. Farmakolojik olarak belirgin dozlarda akut etanol NMDA bağımlı nitrik oksit sentaz aktivitesini inhibe ederek nitrik oksit sentezini azaltır (35,106).

Çalışmamızda etanolün farklı dozlarda (50,100,200mM) sinaptozomal fraksiyonlara uygulandığında (Şekil 4.2), 200mM etanol grubunun NO seviyesi, kontrol grubu, 50mM ve 100mM etanol grubuna göre anlamlı şekilde düşüktü ( $p < 0,01$ ). Czapski ve arkadaşları, rat hipokampal parçaları üzerinde etanolün nitrik oksit sentaz aktivitesini inhibe ettiğini bildirdiği çalışmada da bu bulduğumuz sonuca paralel olarak, akut etanol alımı beyinde nitrik oksit seviyesini azaltırken, kronik etanol alımı artırmıştır (35). Bunun sebebini, NMDA reseptörü bağımlı NOS aktivitesinin akut etanol alımı ile azalırken kronik etanol alımında artması olarak yorumlamışlardır. Naassila ve arkadaşları kronik alkolik ratların beyininin farklı bölgelerinde nitrik oksit düzeylerinin farklı olduğunu rapor etmişlerdir (90). Boyadjieva ve arkadaşlarıda hipotalamik hücrelerin primer kültürlerinden salınan  $\beta$ -endorfinin alkol uygulamasıyla



NO miktarına bağılı olarak nasıl deęiřtięini arařtırdıkları çalıřmada, akut etanol uygulamalarının nitrit miktarını dūřurdūęunu belirtmiřlerdir (20). Çalıřmamızda akut olarak yūksel dozda uygulanan etanol (200mM) beyin sinaptozomlarında NO seviyesini azaltmıřtır. Bu durumun etanolūn NMDA reseptōrleri üzerindeki inhibe edici etkisi nedeniyle ortaya çıktıęını dūřünmekteyiz.

Farklı dozlarda etanolla (50, 100, 200mM) beraber aspirin (100μg/ml) kullanımı ve betainin (0,5, 1mM) olası koruyucu rolūnūn NO dūzeyleri üzerindeki etkisi karřılařtırıldıęında (řekil 4.5, 4.8, 4.11), sinaptozomlar üzerine akut olarak çeřitli dozlarda inkūbe edilen etanolūn, 50 ve 100mM etanolūn uygulandıęı gruplarda NO seviyeleri kontrol grubuna gōre dūřūksel olsa da istatistiksel olarak anlamsızdı (p>0,05), en anlamlı azalmanın 200mM etanol uygulamasından sonra ortaya çıktıęı gōzlendi (p<0,01). Çalıřmamızda 100μg/ml aspirin uygulaması ve 100μg/ml aspirin ile beraber etanolūn farklı dozlarının (50, 100, 200mM) rat sinaptozomlarına uygulanması, NO seviyeleri kontrol grubuna gōre hafif ve istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir řekilde dūřūrdū (p>0,05). Etanolūn çeřitli dozlarıyla (50, 100, 200mM) beraber 100μg/ml aspirin ve 0,5mM betain birlikte uygulaması NO deęerlerini kontrol grubuna yaklařtırmıř, ayrıca 1mM betainin birlikte uygulaması ise NO deęerini kontrol grubuna gōre istatistiksel olarak anlamsız ve ılımlı bir řekilde yūkselmesine neden olmuřtur (p>0,05). Bunun yanısıra 50mM etanolla beraber 100μg/ml aspirinin yanında 0,5mM betain uygulaması, NO dūzeylerini 50mM etanolla beraber aspirin uygulanan gruba gōre anlamlı derecede yūkseltti (p<0,05). Etanolūn tūm dozlarıyla beraber aspirinin (100μg/ml) yanında 1mM betainin uygulanmasının NO seviyelerini, aspirin (100μg/ml) uygulanan gruba gōre anlamlı derecede yūkseltti (p<0,05). Etanolūn 50 ve 200mM dozlarının yanında aspirinin (100μg/ml) ve 1mM betainin beraber uygulanması, aspirinin yanında 50 ve 200mM etanol uygulanan gruplardaki NO dūzeylerine gōre istatistiksel olarak anlamlı derecede yūkselkti (p<0,01). Ayrıca 200mM etanol ile aspirinin (100μg/ml) ve 1mM betainin beraber uygulandıęı grup, 200mM etanol grubuna ve 200mM etanol ile aspirinin yanında 0,5mM betainin uygulandıęı gruba gōre NO dūzeyleri anlamlı derecede yūkselkti (sırasıyla p<0,001, p<0,05).

Czapski ve arkadaşları, rat beyin parçaları üzerinde etanolün nitrik oksit sentaz aktivitesini inhibe ettiğini bildirmiştir (35). Bulduğumuz sonuca paralel olarak, bu çalışmada da akut etanol alımı beyinde nitrik oksit seviyesini azaltmıştır. Syapin de beyin hücrelerinde alkol tarafından NO miktarının değişimlerini incelediği çalışmada, kortikal nöronlarda ve glia da NO miktarının ve NMDA reseptör aktivitesinin akut etanolle düştüğünü bunun tersine kronik etanolle NO ve NMDA aktivitesinde yükselme meydana geldiğini belirtmiştir (113). Aspirinin iNOS aktivitesini inhibe ederek NO sentezini azalttığı düşünülmektedir. Beyin mikroglial hücrelerindeki iNOS bağımlı NO sentezini aspirin tarafından düşürüldüğüne dair çalışmalar bulunmaktadır (5,75). Literatürde beyinde etanol ve aspirinin beraber alınımının NO üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Sjakste ve arkadaşlarının ratlara lipopolisakkarid uygulanmasıyla oluşan nitrik oksidin elektron paramanyetik rezonans metoduyla ölçülmesi çalışmasında betainin, etanolün neden olduğu NO değerindeki düşüşü yükselttiğine dair veriler mevcuttur (110). Çalışmamızda akut olarak yüksek dozda uygulanan etanol (200mM) beyin sinaptozomlarında NO seviyesini anlamlı şekilde azaltmıştır. 50 ve 100mM etanol uygulamasının da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamsız bir düşüş göstermesi, doza bağlı bir düşüşün olduğunu gösterir. Buna etanolün NMDA reseptörleri üzerindeki inhibe edici etkisinin sebep olduğunu düşünmekteyiz. Aspirinin de iNOS aktivitesini inhibe etmesiyle NO düzeylerini düşürdüğü söylenebilir. Ancak çalışma sonuçlarımıza göre bu etkinin yüksek dozdaki etanolün sebep olduğu NO seviyesi azalmasının yanında nispeten önemsiz olduğu söylenebilir. Betain ise doza bağlı olarak (0,5 ve 1mM), etanolün farklı dozları (50, 100, 200mM) ve aspirinle (100µg/ml) birlikte uygulanması NO seviyelerinde belirgin artışına sebep olduğu ve aspirin ile etanolün NO üzerindeki toksik etkisini 1mM betain uygulamasında tamamen ortadan kaldırdığını görmekteyiz. Burada iki muhtemel mekanizma geçerli olabilir. Birincisi, etanolün NMDA reseptörleri ve buna bağlı NO sentaz üzerindeki inhibisyonunun, zarin lipid yerleşimini bozarak zara gömülü reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını etkilemesi, betainin ise zar koruyucu özelliğinden dolayı etanolün sebep olduğu bu toksik sonuçları geriye çevirmesidir. Betainin zar koruyucu özelliği S-adenozilmetiyonin seviyelerini yükseltmesiyle alakalı olabilir. S-adenozilmetiyoninin zar akıcılığını ve lipid kompozisyonunu bozan ajanlara karşı koruyucu etki göstererek zar akıcılığını normalleştirdiği ve zar protein içeriğindeki

değişimleri engellediği daha önce rapor edilmiştir (53). İkinci muhtemel mekanizma ise molekül formülü tri-metil glisin olan betainin beyinde bir nöromodülatör olarak iş gören ve NMDA reseptörlerinin potansiyel bir agonisti olan glisini taklit ederek NMDA reseptörünün ve buna bağlı nitrik oksit sentazın aktivitelerin artırarak sinaptozomal nitrik oksit seviyelerini yükseltecek şekilde iş görmesi olabilir (28). Etanol ile betainin ve etanolla beraber aspirin uygulamasının yanında betain takviyesinin NO ile olan ilişkilerinin mekanizmasını ortaya çıkarmak için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Adenozin deaminaz (ADA) bütün omurgalıların dokularında yaygın olarak bulunan bir enzimdir. Bu enzim pürin metabolizması içinde önemli bir yere sahiptir. ADA, Adenozin ile 2-deoksiadenozin nükleotidlerini sırasıyla inozin ve deoksiinozine dönüştürmekle görevlidir. Adenozin deaminaz zara bağlı bir enzim olarak kabul edilmektedir (21). Hücre adenozini sentezlemek için çeşitli yollar kullanır. En önemli adenozin kaynağı hücre içinde devamlı kullanılan adenozin trifosfat (ATP) ve döngüsel (siklik:c) adenozin monofosfat (AMP)'dir. Bu iki nükleotid hücre içinde önce AMP'a yıkılır ve oluşan AMP hücresel 5-nükleotidaz enziminin katalizlediği biyokimyasal reaksiyon ile adenozine çevrilir. Organizmada diğer önemli bir adenozin kaynağı da katekolaminlerin ve histaminin katabolizması sırasında ortaya çıkan ve adenozine hidrolize edilebilen S-adenozil homosisteindir. Hücre dışında üretilen adenozinin de en önemli kaynağı ATP'dir (46,51).

Çalışmamızda sinaptozomal fraksiyonlar çeşitli dozlarda etanole (50, 100, 200mM) maruz bırakıldıktan sonra ADA düzeyleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.3), 200mM etanol uygulanan grubun ADA seviyeleri, kontrol grubuna ve 50mM etanol uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşüktü ( $p<0,05$ ). Bu düşüşte NO düzeyinde olduğu gibi akut etanolün doza bağlı olarak ADA seviyelerini düşürdüğünü söyleyebiliriz. Bovadjieva ve Sarkar tarafından hipotalamik hücrelerde etanol ve adenozine bağlı olarak intraperitoneal cAMP ve  $\beta$ -endorfin salınımı üzerine yaptıkları çalışmada, akut etanolün adenozin miktarını düşürdüğünü, hücresel cAMP içeriğini ve  $\beta$ -endorfin salınımını artırdığını belirtmiştir, adenozin seviyelerinde oluşan düşüş

adenozin deaminaz enziminin de düşüşüne neden olduğu düşünülebilir (19). Çalışmamızda bulduğumuz sonucun tersine Nagy ve Diomand çalışmalarında, kültüre alınmış hücrelerde hem de hayvan modellerinde etanolün akut ve kronik etkilerinin adenozini etkilediğini göstermişlerdir. Etanolün adenozine bağlı etkileri ekstraselüler adenozin seviyelerinde etanol kaynaklı bir artışa sebep olmaktadır (41,91,92). Buna göre etanolün ekstraselüler adenozin seviyelerinde oluşturduğu yükselmenin adenozin deaminaz enziminin de yükselmesine neden olduğu düşünülebilir. Fakat çalışmamızdaki muhtemel mekanizma akut etanolün NMDA reseptörü üzerindeki inhibe edici etkisinden kaynaklanıyor olabilir. NMDA reseptörü aktivasyonu hücre içi adenozin seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Delaney ve arkadaşları rat striatumlarında yaptığı çalışmaya göre NMDA reseptörü aktivatörleri olan N-Metil-D-Aspartat ve kainik asit endojen adenozin seviyelerini artırırken NMDA antagonistisi olan dizocilpine adenozin seviyelerini düşürmektedir (39). Bu sebeple akut etanol kaynaklı NMDA reseptörü inhibisyonunun ve buna bağlı adenozin seviyesi düşüşünün ADA aktivitesini de düşürdüğü söylenebilir.

Çalışmamızda sinaptosomal fraksiyonların in vitro koşullarda çeşitli dozlarda akut etanolle (50, 100, 200mM) beraber aspirin (100µg/ml) kullanımı ve betainin (0,5, 1mM) olası koruyucu rolünün ADA düzeyleri üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında (Şekil 4.6, 4.9, 4.12), etanolün tüm dozları ADA seviyelerini kontrol grubuna göre hafif ve istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir şekilde düşürdü ( $p>0,05$ ). Aspirin (100µg/ml) sinaptosomal fraksiyonlara uygulaması ADA seviyelerini istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir şekilde 50 ve 100mM etanolün olduğu gruplarda artırdı ( $p>0,05$ ), (Şekil 4.6, 4.9). Fakat 200mM etanol uygulanan grupta aspirinin (100µg/ml) tek başına uygulanması (Şekil 4.12) hem kontrol grubuna hem de 200mM akut etanol dozuna karşı oluşan ADA seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti (sırasıyla  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ). Aspirinle (100µg/ml) beraber 50mM etanol uygulanan grupta oluşan ADA seviyeleri, kontrol grubuna ve 50mM akut etanol uygulanan gruba göre yüksekti (sırasıyla  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ). Aspirinle beraber 100mM etanol uygulanan grup, hem kontrol grubuna hem de 100mM akut etanol uygulanan gruba göre yüksekti ( $p<0,01$ ). Aspirinle beraber 200mM etanol uygulanan grupta ise oluşan ADA seviyeleri,

kontrol grubuna ve 200mM etanol uygulanan gruba göre yüksekti ( $p<0,01$ ). Aspirinle (100 $\mu$ g/ml) beraber 50mM etanol yanında betainin 0,5mM'lık dozunun kullanılmasıyla oluşan ADA seviyeleri, hem kontrol hem de 50mM etanol grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti (sırasıyla  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ). Aspirinle beraber 100mM etanol yanında betainin 0,5mM'lık dozunun kullanılmasıyla oluşan ADA seviyeleri, kontrol ve 100mM etanol grubuna göre yüksekti ( $p<0,05$ ). Aspirinle beraber 200mM etanol yanında betainin 0,5mM'lık dozunun kullanılmasıyla oluşan ADA seviyeleri ise, kontrol ve 200mM etanol grubu göre yüksekti (sırasıyla  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ). Aspirinle (100 $\mu$ g/ml) beraber 50mM etanol yanında betainin 1mM'lık dozunun kullanılmasıyla oluşan ADA seviyeleri, hem kontrol hem de 50mM etanol grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti ( $p<0,001$ ). Aspirinle beraber 100mM etanol yanında betainin 1mM'lık dozunun kullanılmasıyla oluşan ADA seviyeleri, kontrol ve 100mM etanol grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti ( $p<0,001$ ). Aspirinle beraber 200mM etanol yanında betainin 1mM'lık dozunun kullanılmasıyla oluşan ADA seviyeleri, kontrol, 200mM etanol, aspirin, aspirinle beraber 200mM etanol ve aspirinle beraber 200mM etanolün yanında 0,5mM betain uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak yüksekti (sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ).

Bovadjieva ve Sarkar, hipotalamik hücrelerde akut etanolün adenozin miktarını düşürdüğünü belirtmiştir (19). Delaney ve arkadaşları, rat striatumlarında yaptıkları çalışmaya göre NMDA reseptörünün inhibe edilmesinin adenozin miktarını düşürdüğünü belirtmişlerdir (39). Girouard ve Savard; floresans anizotropi yöntemiyle, aspirinin lipozomal zarı, zar yüzey proteinlerinde ve reseptörlerinde düzensizliklere neden olduğunu ve adenozin deaminazı artırdığını göstermişlerdir (55). Bizim bulduğumuz sonuçlarda aspirinin ADA seviyelerini artırdığı yönündedir. Fakat Kopff ve arkadaşları, kardiyovasküler sistemlerde bazı ilaçların ADA aktivitesi üzerinde nasıl etkileri olduğunu araştırdıkları çalışmalarında, in vitro ortamda aspirinin adenozin deaminazı inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (77). Ajdoo ve arkadaşları da, izotermal titrasyon ve UV spektrometre kullanarak aspirin ve bazı ilaçların ADA enzim kinetiğindeki ve termodinamiğindeki değişimleri ölçtüğü çalışmalarında, ADA aktivitesinin aspirinle düştüğünü bulmuşlardır (2). Dolayısıyla aspirinin ADA aktivitesi

üzerindeki değişiklikler konusunda daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda akut olarak uygulanan betainle, ADA arasında olan etkileşim hakkında bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Kanbak ve arkadaşlarının kronik etanol ile muamele edilen ratların sinaptozomal fraksiyonlarında yaptığı çalışmada adenozin deaminaz aktivitesini yükselttiğini bulmuşlardır. Bununda SAME/SAH oranının düşmesi sonucunda SAH'in serbest adenozin ve homosisteine ayrılmasının ADA aktivitesini yükselttiği sonucuna varmışlardır (70). Betain takviyesi ise SAME/SAH oranındaki bu bozulmayı tersine çevirerek serbest adenozin seviyesini azaltmış ve adenozin deaminaz aktivitesini düşürmüştür (53). Delaney ve arkadaşları rat striatumlarında yaptığı çalışmaya göre NMDA reseptörleri ile adenozin seviyeleri arasında pozitif ilişki bulmuşlardır (39). NMDA düzeyi artıkça ADA seviyesinde aynı şekilde yükselir görüşünü sunmuşlardır. Çalışmamızdaki muhtemel mekanizma şöyle olabilir; akut etanol NMDA reseptörlerini inhibe ederek hücre içi adenozin miktarını düşürmekte ve bu da ADA aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. Betainin ise bu etkiyi tersine çevirerek NMDA aktivasyonunu ve buna bağlı adenozin seviyelerini yükselterek ADA aktivitesinin artmasına yardımcı olmaktadır. Betainin bu özelliği S-adenozilmetiyonin seviyelerini yükseltmesine bu da zar akıcılığını ve lipid kompozisyonunu bozan ajanlara karşı koruyucu etki gösterdiğini gösterir (53). Diğer bir yol ise betainin beyinde bir nöromodülatör olarak iş gören ve NMDA reseptörlerinin potansiyel bir agonisti olan glisini taklit ederek NMDA reseptörünün aktivitelerini artırmasıdır. Bu yolla yükselen sinaptozomal adenozin düzeyleri ADA aktivitelerini de yükseltebilir. Etanol ve betainin ADA ile olan ilişkilerinin mekanizmasını ortaya çıkarmak için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışma bulgularımız sonucunda farklı dozlarda uygulanan etanolün doza bağımlı olarak rat beyin sinaptozomları üzerinde nörotoksik olduğunu göstermektedir. Toksik ve yüksek dozlarda uygulanan etanolün SA parametresinde gösterildiği gibi sinaptozomal zarlarda hasar yaratabileceği ve yine yüksek dozda uygulanan etanolün NO ve ADA parametresinin gösterdiği gibi fonksiyonel metabolik yollarda değişimlere sebep olduğunu, buna bağlı olarak zarda protein yapıdaki reseptör ve enzimlerin

## PDF Eraser Free

yapılarıyla fonksiyonlarını bozabileceğini işaret etmektedir. Aspirin (100µg/ml), rat beyin sinaptozomlarında SA ve NO seviyelerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Etanol ile aspirin (100µg/ml) beraber uygulandığı zaman bu hasarın doza bağlı olarak SA ve NO parametrelerinde toksik etkiyi artırabileceğini göstermektedir. Betain'in ise doza bağımlı olarak aspirin ile etanolün birlikte kullanımıyla artan sitotoksiteyi azaltabileceğini düşünöyoruz.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmamızda Spraque-Dawley türü ratların beyinlerinden izole edilen sinaptozomal fraksiyonlarda, çeşitli dozlarda etanol (50, 100, 200mM), aspirin (100µg/ml) ve betain (0,5, 1mM) ile inkübe edilerek SA, NO ve ADA içeriklerini ölçtük.

Sonuç olarak,

- 1) Sinaptozomlar üzerine çeşitli dozlarda etanol uygulanması siyalik asit değerlerini doza bağımlı olarak yükseltirken nitrik oksit ve adenzin deaminaz değerlerini doza bağımlı olarak düşürdü. Siyalik asit değeriindeki yükselme etanolün zar bütünlüğü ve fonksiyonu üzerindeki sitotoksik etkilerini göstermektedir. Nitrik oksit ve adenzin deaminaz seviyelerindeki düşme ise etanolün beyindeki sinaptik iletim yolları üzerindeki inhibe edici etkisini işaret etmektedir.
- 2) Sinaptozomlar üzerine aspirin uygulanması siyalik asit ve nitrik oksit değerlerinde istatistiksel olarak değışikliğıe sebep olmazken, adenzin deaminaz düzeylerinde sadece yüksek etanol dozunun uygulandığı istatistiksel gruplandırma anlamlı şekilde yüksekti. Bu parametreler açısından bakıldığında aspirinin sinaptozomlar üzerindeki etkileri hakkında herhangi bir yorumda bulunmak pek olası değildir. Bunun için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.
- 3) Sinaptozomlar üzerinde çeşitli dozlarda etanol ve aspirinin birlikte uygulanması siyalik asit ve adenzin deaminaz seviyelerini anlamlı bir şekilde artırdı. Nitrik oksit değeri de istatistiksel olarak belirgin olmayan bir şekilde düşürmüştü. Bu veriler göstermektedir ki; siyalik asit ve nitrik oksit açısından bakıldığında aspirin agonistik etki göstererek alkolün etkisini artırmakta, adenzin deaminaz açısından bakıldığında ise aspirin antogonistik bir etki yapmaktadır.



- 4) Sinaptozomlar üzerinde çeşitli dozlarda etanol ile verilen aspirine ek olarak betainin uygulanması doza bağımlı olarak siyalik asit değerlerini kontrol grubuna yaklaştıracak şekilde düşürmüştü. Nitrik oksit ve adenozin deaminaz değerlerini ise anlamlı olarak yükseltmişti. Bu veriler göz önüne alındığında etanolün zar üzerindeki negatif etkisini ve etanolle verilen aspirinden doğan hasarı siyalik asit, nitrik oksit ve adenozin deaminaz deneysel çalışmalarında uyguladığımız betainin doza bağımlı olarak azalttığı görülmüştür. Nitrik oksit ve adenozin deaminaz çalışmalarında etanolle beraber aspirin ve betainin uygulanması etanolden doğan negatif etkiyi tamamen yok etmiştir. Fakat siyalik asit deneysel çalışmasında uygulanan betainin 1mM'lık dozu toksiteyi artırıcı yönde etki yaratmıştır. Betain dozu ve etanolle etkileşimleri hakkında daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak çalışma bulgularımız etanolün beyin sinaptozomlarının, siyalik asit parametresinin işaret ettiği gibi zar yapılarında ve nitrik oksit ile adenozin deaminaz parametrelerinin işaret ettiği gibi fonksiyonel metabolik yollarda değişimlere sebep olduğunu göstermektedir. Etanolün yanında verilen aspirin ve betain, etanol kaynaklı bu değişimlere, doza ya da metabolik yolun türüne göre agonistik ya da antogonistik etki içinde bulunmaktadır. Önerimiz etanol, aspirin ve betain arasındaki etkileşimler hakkında bulgularımızın çeşitli dokularda, in vivo ve klinik çalışmalarla desteklenerek, alkol tüketimi-ilaç tüketimi arasındaki etkileşimlerin daha ileri düzeyde anlaşılmasına yardımcı olmasıdır.

## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1- Ahluwalia, B., Ahmad, S., Adeyiga, O., Wesley, B., Rajguru, S., 2000, Low level of ethanol stimulate and high levels decrease phosphorylation in microtubule-associated proteins in rat brain: an in vitro study, *Alcohol Alcohol.*, 35 (5), 452-457, p.

2- Ajloo, D., Saboury, A.A., Haghi-Asli, N., Ataei-Jafarai, G., Moosavi-Movahedi, A.A., Ahmadi, M., Mahnam, K., Namaki, S., 2007, Kinetic, thermodynamic and statistical studies on the inhibition of adenosine deaminase by aspirin and diclofenac, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 22 (4), 395-406, p.

3- Aladağ, M.A., Türköz, Y., Özerol, I.H., 2000, Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri, *T. Klin. J. Med. Sci.*, 20, 107-111, s.

4- Altıntaş, S., 2006, Kahramanmaraş'ta bazı iş kollarında çalışan boya işçilerinde plazma ve eritrosit membran siyalik asit, glutatyon, plazma nitrik oksit ve lipid peroksidasyonu düzeylerinin değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.

5- Amin, A.R., Vyas, P., Attur, M., Leszczynska-Piziak, J., Patel, I.R., Weissmann, G., Abramson, S.B., 1995, The mode of action of aspirin-like drugs: Effect on inducible nitric oxide synthase, *Med. Sci.*, 92, 7926-7939, p.

6- Anand, C.V., Anand, U., Sadasivudu, B., 1985, Acute effects of ethanol on production and disposal of adenosine from rat myocardium, *Biochem. Int.*, 10 (2), 311-317, p.

7- Ansari, G.A, Kaphalia, B.S., Khan, M.F., 1995, Fatty acid conjugates of xenobiotics, *Toxicol. Lett.*, 75, 1-17, p.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

8- Aragon, C.M.G., Abitbol, M., Amit, Z., 1986, Acetaldehyde may mediate reinforcement and aversion produced by ethanol, *Neuropharmacology*, 25, 79-83, p.

9- Ballarin, M., Fredholm, B.B., Ambrosio, S., Mahy, N., 1991, Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism, *Acta Physiol. Scand.*, 142, 97-103, p.

10- Barak A.J., Beckenhauer, H.C., Tuma, D.J., 1996, Betaine, ethanol, and the liver : a review, *Alcohol*, 13, 395-398, p.

11- Barak, A.J., Beckenhauer, H.C., Mailliard, M.E., Kharbanda, K.K., Tuma, D.J., 2003, Betaine lowers elevated S-adenosylhomocysteine levels in hepatocytes from ethanol-fed rats, *J. Nutr.*, 133, 2845-2848, p.

12- Barry, R.E., Williams, A.J., McGiven, J.D., 1987, The detection of acetaldehyde/liver plasma membrane protein adduct formed in vivo by alcohol feeding, *Liver*, 7 (6), 364-368, p.

13- Baker, R.C. and Kramer, R.E, 1999, Cytotoxicity of short chain alcohols, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39, 127-150, p.

14- Beumer, R.R., Te Giffel, M.C., Cox, L.J., Rombouts, F.M., Abee, T., 1994, Effect of exogenous proline, betaine and carnitine on growth of *listeria monocytogenes* in a minimal medium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (4), 1359-1363, p.

15- Blantz, R.C., Satriano, J., Gabbai, F., Kelly, C., 2000, Biological effects of arginine metabolites, *Acta Physiol. Scand.*, 168, 21-25, p.

16- Brandon, R.A., Eadie, M.J., 1987, The basis for aspirin dosage in stroke prevention, *Clin. Exp. Neurol.*, 23, 47-54, p.

### “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

17- Broch, O.J., Ueland, P.M., 1980, Regional and subcellular distribution of S - adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain, *J. Neurochem.*, 35, 484-488, p.

18- Bora, P.S., Lange, L.G., 1993, Molecular mechanism of ethanol metabolism by human brain to fatty acid ethyl esters, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 17 (1), 28-30, p.

19- Boyadjieva, N., Sarkar, D.K., 1999, Effects of ethanol on basal and adenosine-induced increases in  $\beta$ -endorphin release and intracellular cAMP levels in hypothalamic cells, *Brain Res.*, 824 (1), 112-118, p.

20- Boyadjieva, N., Chen, P.C., Sarkar, D.K., 2003, Role of nitric oxide in alcohol alteration of endorphin release from hypothalamic cell in primary cultures, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 27 (11), 1813-1818, p.

21- Borowiec, A., Lechward, K., Stachowska, K.T., Skladanowski, A.C., 2006, Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases, *Acta Biochim. Pol.*, 53 (2), 269-278, p.

22- Bunge, R., 1977, Acetylsalicylsäure (ASS) und Prostaglandine, *Med. Welt*, 28, 1834-1839, p.

23- Calabrese, V., Rizza, A., 1999, Effects of L-carnitine on the formation of fatty acid ethyl esters in brain and peripheral organs after short-term ethanol administration in rat, *Neurochem. Res.*, 24 (1), 79-84, p.

24- Çekmen, M.B., Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, A.D, Gözükar, E.M., 2001, Nitrik oksit (NO) ve Nitrik oksit sentazın (NOS) fizyolojik ve patolojik özellikleri, *T. Klin. J. Pediatr.*, 10, 226-236, s.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

- 25- Chandler, L.J., Sutton, G., Norwood, D., Sumners, C., Crews, F.T., 1997, Chronic ethanol increases N-Methyl-D-Aspartate-Stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons, *Mol. Pharm.*, 51, 733-740, p.
- 26- Charalambos, A., Dimitris, T., Christodoulos, S., 2007, Nitric oxide-releasing aspirin: Will it say NO to atherothrombosis?, *Int. J. Cardiol.*, 118, 170-172, p.
- 27- Cherian, L., Mathew, J., Klemm, W.R., 1989, Ethanol-induced hydrolysis of brain sialoglycoconjugates in the rat: Effect of sialic acid in antagonizing ethanol intoxication, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 13 (3), 435-438, p.
- 28- Choi, S.J., Kim, K.J., Cho, H.S., Kim, S.Y., Yim, D.S., Cho, Y.J., Hahn, S.J., Sung, K.W., 2006, NMDA Receptor-dependent inhibition of synaptic transmission by acute ethanol treatment in rat corticostriatal slices, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 10, 303-307, p.
- 29- Clark, M., Dar, M.S., 1988, Mediation of acute ethanol-induced motor disturbances by cerebellar adenosine in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 30, 155-161, p.
- 30- Clark, M., Dar, M.S., 1989, Effect of acute ethanol on uptake of [<sup>3</sup>H] adenosine by rat cerebellar synaptosomes, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 13 (3), 371-377, p.
- 31- Cobbin, L.B., Einstein, R., McGuire, M.H., 1974, Studies on the coronary dilatoractions of some adenosine analogues, *Br. J. Pharmacol.*, 50, 25-33, p.
- 32- Cohen, L.S., 1976, Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid, *Semin. Thromb. Hemost.*, 2, 146-175, p.
- 33- Cortas, N.K., Wakid, N.W., 1990, Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method, *Clin. Chem.*, 36 (8), 1440-1443, p.

### “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

- 34- Craig, S.A., 2004, Betaine in human nutrition, *Am. J. Clin. Nutr.*, 80, 539–549, p.
- 35- Czapski, G.A., Sun, G.Y., Strosznajder, J.B., 2002, Inhibition of N-Methyl-D-Aspartic Acid nitric oxide synthase in rat hippocampal slices by ethanol, *J. Biomed. Sci.*, 9, 3-9, p.
- 36- De La Cruz, J.P., Pavia, J., Gonzalez-Correa, J.A., Ortis, P., Sanchez De La Cuesta, F., 2000, Effects of chronic administration of S-adenosyl-L-methionine on brain oxidative stress in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 361 (1), 47–52, p.
- 37- Deitrich, R.A, Zimatkin, S.M., Pronko, S., 2006, Oxidation of ethanol in the brain and its consequences, *Alcohol. Res. Health*, 29 (4), 266–273, p.
- 38- Deitrich, R.A., Zimatkin, S.M., 1997, Ethanol metabolism in the brain, *Addict. Biol.*, 2, 387-399, p.
- 39- Delaney, S.M., Shepel, P.N., Geiger, J.D., 1998, Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285, 561–567, p.
- 40- Dey, A., Cederbaum, A.I., 2006, Alcohol and oxidative liver injury, *Hepatology*, 43, 63-74, p.
- 41- Diamond, I., Nagy, L., Gordon, A., 1991, The role of adenosine and adenosine transport in ethanol-induced cellular tolerance and dependence. Possible biologic and genetic markers of alcoholism, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 625 (1), 473–487, p.
- 42- Diaz-Ruiz, A., Ibarra, A., Perez-Severiano, F., Guizar-Sahgun, G., Grijalva, I., Rois, C., 2002, Constitutive end inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats, *Neurosci. Lett.*, 319, 129-132, p.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

43- Droitte, P., Lamboeuf, Y., Saint Blanquat, G., 1984, Lipid composition of the synaptosome and erythrocyte membranes during chronic ethanol-treatment and withdrawal in the rat, *Biochem. Pharmacol*, 33, 615–624, p.

44- Drury, A.N., Szent-Gyorgy, A., 1929, The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart, *J. Physiol.*, 68, 213–237, p.

45- Dunwiddie, T.V., Worth, T., 1982, Sedative and anticonvulsive effects of adenosine analogs in mouse and rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 220, 70-76, p.

46- Dunwidde, T.V., Masino, S.A., 2001, The role and regulation of adenosine in the central nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.*, 24, 31-55, p.

47- Durocher, J.R., Payne, R.C., Conrad, M.E., 1975, Role of sialic acid in erythrocyte survival, *Blood*, 45, 11-20, p.

48- Ebstein, R.P., Daly, J.W., 1982, Release of norepinephrine and dopamine from brain vesicular preparations: Effects of adenosine analogs, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2, 193-204, p.

49- Edelforsl, S., Hass, U., Hougaard, K.S., 2002, Changes in markers of oxidative stress and membrane properties in synaptosomes from rats exposed prenatally to toluene, *Pharmacol. Toxicol.*, 90, 26–31, p.

50- Fatta, F. and Rossetti, Z.L., 1998, Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration, *Prog. Neurobiol.*, 56 (4), 385-431, p.

51- Fredholm, B.B., Fried, G., Hedqvist, P., 1982, Origin of adenosine released from rat vas deferens by nerve stimulation, *Eur. J. Pharmacol.*, 79, 233-243, p.

### “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

52- Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacopson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J., 2001, International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol. Rev.*, 53, 527-552, p.

53- Galan, A.I., Munoz, M.E., Jimenez, R., 1999, S-Adenosylmethionine protects against cyclosporin A-induced alterations in rat liver plasma membrane fluidity and functions, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290, 774-781, p.

54- Ghosh, A.K., Basu, R., Dey, S., Das, S., Nayak, N.P., Barat, B., Nandy, P., 1995, Lipid disordering effect of aspirin on the liposomal membrane of dipalmitoyl phosphatidyl choline a fluorescence anisotropy study, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 4, 5, 309–311, p.

55- Girouard, H., Savard, R., 1998, The lack of bimodality in the effects of endogenous and exogenous prostaglandins on fat cell lipolysis in rats, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 56, 43–52, p.

56- Goldstein, D.B., 1983, Biophysical pharmacology: alcohol effects on biomembranes. *The Pharmacology of Alcohol*. New York, Oxford University Press, 48–64, p.

57- Gonzales, R.A., Ganz, N., Crews, F.T., 1987, Variations in membrane sensitivity of brain region synaptosomes to the effects of ethanol in vitro and chronic in vivo treatment, *J. Neurochem.*, 49 (1), 158-162, p.

58- Guasch, R., Renau-Piqueras, J., Guerri, C., 1992, Chronic ethanol consumption induces accumulation of proteins in the liver golgi apparatus and decreases galactosyltransferase activity, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16 (5), 942-948, p.



## “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

59- Güray, A., Türköz, Y., Özerol, H., 1997, Nitrik oksit: fizyolojisi ve klinik Önemi, T. Klin. J. Med. Sci., 17, 115-119, s.

60- Haber, P.S., Wilson, J.S., Apte, M.V., Pirola, R.C.,1993, Fatty acid ethyl esters increase rat pancreatic lysosomal fragility. J. Lab. Clin. Med., 121, 759–764, p.

61- Hadengue, A.L., Del Pino, M., Simon, A., Levenson, J., 1998, Erythrocyte disaggregation shear stress, sialic acid, and cell aging in humans. Hypertension, 32, 324-330, p.

62- Halla, J.T., Hardin, J.G., 1988, Salicylate ototoxicity in patients with rheumatoid arthritis, a controlled study, Ann. Rheum. Dis., 47, 134-137, p.

63- Harris, R.A., Hood, F.W., 1980, İnhibition of synaptosomal calcium uptake by ethanol, J. Pharmacol. Exp. Ther., 213 (3), 562-568, p.

64- Hart, F.D., Huskisson, E.C., 1984, Non-steroidal anti-inflammatory drugs, Drugs, 27, 232-255, p.

65- Hon, W.M., Lee, K.H., Khoo, H.E., 2002, Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby?, Ann. N. Y. Acad. Sci., 962, 275-295, p.

66- Hungund, B.L., Mahadik, S.P., 1993, Role of gangliosides in behavioral and biochemical actions of alcohol: cell membrane structure and function, Alcohol Clin. Exp. Res., 17 (2), 329-338, p.

67- Ignaro, L.J., 1999, Nitric Oxide: A Unique Endogenous Signaling Molecule in Vascular Biology, Biosci. Rep., 19 (2), 51-71, p.

### “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

68- Kanbak, G., Akyüz, F., İnal, M., 2001, Preventive effect of betaine on ethanol-induced membrane lipid composition and membrane ATPases, Arch. Toxicol., 75, 59-61, p.

69- Kanbak, G., Özdemir, F., Çalışkan, F., Şahin, F., İnal, M., 2007, Betaine prevents loss of sialic acid residues and peroxidative injury of erythrocyte membrane in ethanol-given rats, Cell Biochem. Funct., 1, 103-108, p.

70- Kanbak, G., Arslan, O.C., Dokumacıoğlu, A., Kartkaya, K., İnal, M.E., 2008, Effects of chronic ethanol consumption on brain synaptosomes and protective role of betaine, Neurochem. Res., 33 (3), 539-544, p.

71- Kaplan N.O., 1955, Specific adenosine deaminase from intestine, Meth. Enzymol., 2, 473-475, p.

72- Katopodis, N., Stock, C.C., 1980, Improved method to determine lipid bound sialic acid in plasma or serum, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 30, 171–180, p.

73- Katopodis, N., Hirshaut, Y., Geller, N.L., Stock, C.C., 1982, Lipid associated sialic acid test for the detection of human cancer, Cancer Res., 42, 5270–5275, p.

74- Kidd, M.T., Ferket, P.R., Garlich, J.D., 1997, Nutritional and osmoregulatory function of betaine, Worlds. Poult. Sci. J., 53, 125-139, p.

75- Kim, H.M., Lee, E.H., Skin, T.K., Chung, C.K., An, N.H., 1998, Inhibition of the induction of the inducible nitric oxide synthase in murine brain microglial cells by sodium salicylate, Immunology, 95, 389-394, p.

### “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

76- Kim, Y.M., Kim, T.H., Chung, H.T., Talanian, R.V., Yin, X.M., Billiar, T.R., 2000, Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8, *Hepatology*, 32, 770-778, p.

77- Kopff, M., Kowalczyk, E., Kopff, A., 2004, Inhibition of adenosine deaminase activity by drugs influencing the cardiovascular system, 111 (6), 667-671, p.

78- Koşay, S., 1996, Nitrik oksitin patolojik olaylardaki rolü, E. Ü. Tıp Fak. Yayınları, İzmir, 5-9, s.

79- Kurtul, N., Cil, M.Y., Bakan, E., 2004, The effects of alcohol and smoking on serum, saliva, and urine sialic acid levels. *Saudi. Med. J.*, 25 (12), 1839-44, p.

80- Laposata, M., 1997, Fatty acid ethyl esters: short-term and long-term serum markers of ethanol intake, *Clin Chem.*, 43 (8), 1527-1534, p.

81- Lindi, C., Marciani, P., Montorfano, G., Omode, S.F., 1996, Age-related effects of chronic ethanol intake on physical properties lipid composition and galactosyltransferase activity of rat small intestine microsomes. *Alcohol Alcohol.*, 31, 183-189, p.

82- Liu, C., Jin, A., Zhou, C., Chen, B., 2002, Gene expression of inducible nitric oxide synthase in injured spinal cord, *Med. J.*, 115 (5), 740-72, p.

83- Loyd-Jones, D.M., Bloch, K.D., 1996, The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis, *Annu. Rev. Med.*, 47, 365-375, p.

### “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

84- Malagolini, N., Dall’Olio, F., Serafini-Cessi, F., Cessi, C., 1989, Effect of Acute and Chronic Ethanol Administration on Rat Liver  $\alpha$  2,6-Sialyltransferase Activity Responsible for Sialylation of Serum Transferin, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 13 (5), 649-653, p.

85- Martines-Martos, J.M., Raminez-Exposito, M.J., Mayas-Torres, M.D., Garcia-Lopez, M.J., Ramirez-Sanchez, M., 2000, Utility of the MTT assay to measure mitochondrial activity in  $K^+$ - and ATP- stimulated rodent cortex synaptosomes, *Neurosci. Res. Commun.*, 2, 103-107, p.

86- Mayas, M.D., Ramirez-Exposito, M.J., Garcia, M.J., Ramirez, M., Martines-Martos, J.M., 2002, Ethanol modifies differently aspartyl- and glutamyl-aminopeptidase activities in mouse frontal cortex synaptosomes, *Brain Res. Bull.*, 2, 195-203, p.

87- Mayas, M.D., Ramirez-Exposito, M.J., Garcia, M.J., Carrera, P., Martines-Martos, J.M., 2004, Ethanol modulates neuropeptide-degrading aminopeptidases at synapse level in calcium-dependent conditions, *Alcohol alcohol.*, 39 (5), 393-405, p.

88- Mc Kim, S.E., Gabele, E., Isayama, F., Lambert, J.C., Tucker, L.M., Wheeler, M.D., Connor, H.D., Mason, R.P., Doll, M.A., Hein, D.W., Artell, G.E., 2003, Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice, *Gastroenterology*, 125, 1834–1844, p.

89- Mizutani, T., Syon, A.J., 1996, Clinical applications of nitric oxide, *Chest*, 110, 506-524, p.

90- Naassila, M., Pierrefiche, O., Beauge, F.J., Sebire, N., Daoust, M., 2003, Chronic ethanol exposure differentially regulates NOS1 mRNA levels depending on rat brain area, *Neurosci. Lett.*, 338, 221-224, p.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

91- Nagy, L.E., 1992, Ethanol metabolism and inhibition of nucleoside uptake lead to increased extracellular adenosine in hepatocytes, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 262, 1175-1180, p.

92- Nagy, L.E., Diamond, I., Collier, K., Lopez, L., Ullman, B., Gordon, A.S., 1989, Adenosine is required for ethanol-induced heterologous desensitization, *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.*, 36 (5), 744-748, p.

93- Negoro, M., Wakabayashi, I., 2005, Enhancement of alcohol dehydrogenase activity in vitro by acetylsalicylic acid, *Eur. J. Pharmacol.*, 523, 25-28, p.

94- Newgreen, D.B., 2005, Should consumers be warned about aspirin, alcohol and gastric bleeding? *Aust. Prescr.*, 28, 9-18, p.

95- Nietsch, P., 1991, Aspirinin terapötik uygulamaları, Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti, İstanbul, 10- 99, s.

96- Park, J.Y., Kim, K.A., Park, P.W., Ha, J.M., 2006, Effect of high dose aspirin on CYP2E1 activity in healthy subjects measured using chlorzoxazone as a probe, *J. Clin. Pharmacol.*, 46, 109-114, p.

97- Pastor, R., Sanchis-Segura, C., Aragon, C.M.G., 2002, Ethanol-stimulated behaviour in mice is modulated by brain catalase activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rate of production, *Psychopharmacology*, 165, 51–59, p.

98- Pawar, D., Shahani, S., Maroli, S., 1998, Aspirin the novel antiplatelet drug, *Hong Kong Med. J.*, 4, 415-418, p.

### “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

99- Petrescu, I., Tarpa, C., 1997, Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat, *Biochim. Biophys. Acta*, 1318 (3), 385-394, p.

100- Phillis, J.W., Wu, P.H., 1981, The role of adenosine and its nucleotides in the central synaptic transmission, *Prog. Neurobiol.*, 16, 187-239, p.

101- Piqueras, J.M., Miraqali, F., Marques, A., 1987, Chronic ethanol consumption affects filipin-cholesterol complexes and intramembranous particles of synaptosomes of rat brain cortex, *Alcohol. Clin. Exper. Res.*, 11, 486-493, p.

102- Pönnio, M., Alho, H., Heinala, P., Nikkari, S.T., Sillanaukee, P., 1999, Serum and saliva levels of sialic acid are elevated in alcoholics, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23 (6), 1060-1064, p.

103- Ranjan, C., Das, S.K., 2007, Advances in antithrombotic agents, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, 5 (3), 175-185, p.

104- Rai, R.M., Lee, F.Y., Rosen, A., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Koteish, A., Liew, F.Y., Zaragoza, C., Lowenstein, C., Diehl, A.M., 1998, Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 95, 13829-13834, p.

105- Ribeiro, J.A., Sebastiao, A.M., De Mendonca, A., 2003, Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications, *Prog. Neurobiol.*, 68, 377-392, p.

106- Rossetti, Z.L., Crespi, F., 2004, Inhibition of nitric oxide release in vivo by ethanol, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 28 (10), 1746-1751, p.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

107- Schauer, R., 1982, Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40, 131-134, p.

108- Sergent, O., Griffon, B., Morel, I., Chevanne, M., Dubos, M.P., Cillard, P., Cillard, J., 1997, Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture, *Hepatology*, 25, 122–127, p.

109- Sillanaukee, P., Pönnio, M., Kaija, S., 1999, Sialic acid: new potential marker of alcohol abuse, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23 (6), 1039-1043, p.

110- Sjakste, N., Baumane, L., Boucher, J.L., Dzintare, M., Meirena, D., Sjakste, J., Lauberte, L., Kalvinsh, I., 2004, Effects of gamma-butyrobetaine and mildronate on nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated rats, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 94 (1), 46-50, p.

111- Smith, J.B., Willis, A.L., 1971, Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets, *Nature New Biol.*, 231, 235-237, p.

112- Stuehr, D.J., Griffith, O.W., 1992, Mammalian nitric oxide synthase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 65, 287-346, p.

113- Syapin, P.J., 1998, Alcohol and nitric oxide production by cells of the brain, *Alcohol.*, 16 (2), 159-165, p.

114- Teres, W., Beythien, C., Kupper, W., Bleifeld, W., 1989, Effect of aspirin and prostaglandin E1 on in vitro thrombolysis with urokinase, *Circulation*, 79, 1309-1314, p.

115- Tunçtan, B., Abacıoğlu, N., 1998, Biyolojik örneklerde nitrik Oksit Ölçümü: Diazotizasyon yöntemi, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 23, 161-170, s.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

116- Tyulina, O.V., Prokopieva, V.D., Dodd, R.D., Hawkins, J.R., Clay, S.W., Wilson, D.O., Boldyrew, A.A., Johnson, P., 2002, In vitro effect of ethanol acetaldehyde and fatty acid ethyl esters on human erythrocytes, *Alcohol Alcohol.*, 37 (2), 179-186, p.

117- Uslu, E., Belçe, E., Seymen, P., Kokoğlu, E., 2000, Kolorektal kanserde metastazın serum total siyalik asit düzeyleri üzerine etkisi, *Cerrahpaşa J. Med.*, 31, 231-234, p.

118- Vassiljev, V., 2004, Influence of nitric oxide syntase inhibitors on the effects of ethanol after acute and chronic ethanol administration and withdrawal, Ph. D. thesis, department of pathological anatomy and forensic medicine, Tartu University, Estonia, 1-57, p.

119- Zailaie, M.Z., 2004, Short and long term effects of acetylsalicylic acid treatment on the proliferation and lipid peroxidation of skin cultured melanocytes of active vitiligo, *Saudi Med. J.*, 25 (11), 1656-1663, p.

120- Zimatkin, S.M., Ostrovsky, .Yu M., 1988, Aldehyde dehydrogenase activity in barrier brain structures, *Bull. Eksp. Bio. Med.*, 9, 283-284, p.

121- Zimatkin, S.M., 1991, Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS, *J. Neurochem.*, 56, 1-11, p.

122- Zimatkin, S.M., Liopo, A.V., Deitrich, R.A, 1998, Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 22 (8), 1623-1627, p.

123- Wallner, M., Hanchar, H.J., Olsen, R.W., 2006, Low dose acute alcohol effect on GABA reseptor subtypes, *Pharmacol. Ther.*, 112, 513-528, p.



### “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

124- Wang, J.F., Greenberg, S.S., Spitzer, J.J., 1995, Chronic alcohol administration stimulates nitric oxide formation in the rat liver with or without pretreatment by lipopolysaccharide, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 19, 387-393, p.

125- Wangi, B., Brand-Miller, J., 2003, The role and potential of sialic acid in human nutrition, *Eur J Clin Nutr*, 57, 1351–1369, p.

126- Ward, R.J., Kest, W., Bruyeer, P., Lallemand, F., De Witte, P., 2001, Taurine modulates catalase, aldehyde dehydrogenase and ethanol elimination rates in rat brain, *Alcohol Alcohol.*, 36, 1, 39-43, p.

127- Warren, L., 1959, Sialic Acid in Human Semen and in the Male Genital Tract, *J. Clin. Invest.*, 38, 755-761, p.

128- Watata, C., Gwozdziński, K., 1993, Effect of aspirin on conformation and dynamics of membrane proteins in platelets and erythrocytes, *Biochem. Pharmacol.*, 24 (45), 1343-1349, p.

129- Water, R.J., Lewry, E., Pennok, E.A., 1992, Measurement of sialic acid in serum and urine, clinical application and limitations, *Ann. Clin. Biochem.*, 29 (6), 625-637, p.

130- Whittaker, V.P., Michaleson, I.A., Jeanette, R., 1964, The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles (synaptosomes). *Biochem. J.*, 90, 293–303, p.

131- Wiest, R., Groszmann, R.J., 2002, The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough, *Hepatology*, 35, 478-491, p.

132- Wolfe, M.M., Lichtenstein, D.R., Sing, G., 1999, Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs, *N. Engl. J. Med.*, 340 (24), 1888-1899, p.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)”

133- Wollersen, H., Preuss, J., Thierauf, A., Musshoff, F., Madea, B., 2007, Suicide with acetylsalicylic acid, Arch. Kriminol., 219 (3-4), 115-123, p.

134- Wood, W.G., Rao, A.M., Igbaboa, U., Semotuk, M., 1993, Cholesterol exchange and lateral cholesterol pools in synaptosomal membranes of pair-fed control and chronic ethanol-treated mice, Alcohol. Clin. Exp. Res., 17 (2), 345-350, p.

135- Wu, H., Cai, P., Clemens, D.L., Jerrells, T.R., Ansari, G.A.S., Kaphalia, B.S., 2006, Metabolic basis of ethanol-induced cytotoxicity in recombinant HepG2 cells: Role of nonoxidative metabolism, Toxicol. Appl. Pharmacol., 216, 238-247, p.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel bilgiler

**Adı Soyadı** : İbrahim SÖĞÜT  
**Doğum Tarihi, Yeri** : 12.04. 1982, KONYA  
**Uyruğu** : T.C.  
**Medeni Durumu** : Bekâr  
**İletişim Adresi** : Bahçelievler mah. Onarıcı sok. Şafak Apt. B blok 1\1  
Pk: 26170 ESKİŞEHİR  
**Telefon** : 0 555 295 17 77  
**Ev Telefonu** : 0 222 323 59 12  
**Email:** : [ibrahim.sogut@gmail.com](mailto:ibrahim.sogut@gmail.com)

### Eğitim Durumu

**İlköğretim** : 1989–1994, Konya Zeliha ve Lütfi Kulluk İlkokulu  
**Ortaöğretim** : 1994–1997, Eskişehir Mehmetçik Orta Okulu  
**Lise** : 1997–2000, Eskişehir Prof. Dr. Orhan Oğuz Lisesi  
**Üniversite** : 2001–2005, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat  
Fakültesi Biyoloji Bölümü  
**Yüksek Lisans** : 2005–2008 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Ana Bilim Dalı

### Mesleki Deneyim

Sözleşmeli Biyolog, 2006–2007, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi ve Hematoloji Laboratuvarı.

Burslu Araştırmacı, 2007–\_\_\_\_, Marmara Araştırma Merkezi Tübitak, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Kocaeli/Gebze.

### Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Biyologlar Derneği  
Tübitak

### Burslar

Burslu Araştırmacı, Marmara Araştırma Merkezi Tübitak, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Kocaeli/Gebze

## **Sözlü Konferans, Poster veya Seminerler**

1. **SOĞUT, I.**, HATIPOĞLU, I., SAATÇILAR, C., AKCAEL, E., YUCEL, F., BASALP, A., 2008, HBVe ve HBVc antijenine karşı monoklonal antikor geliştirme çalışmalarında dalak, lenf düğümü ve intraperitoneal hücrelerin kullanılması, 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Poster 32.
2. SAATÇILAR, C., AKCAEL, E., **SOĞUT, I.**, BASALP, A., YUCEL, F., 2008, Yarışımli kit sistemlerinde kullanmak üzere Hepatit B kor antijenine karşı monoklonal antikor geliştirilmesi, 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Poster 33.
3. **SOĞUT, I.**, HATIPOĞLU, I., OZDEMİR, A., BALCIOĞLU, K.B., ERDAG, B., BASALP, A., 2008, Generation of M13 Phage Specific Monoclonal Antibody by HBe Antigen Expressing Phage Immunization, Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Poster.
4. BALCIOĞLU, K.B., OZDEMİR, A., HATIPOĞLU, I., **SOĞUT, I.**, BASALP, A., ERDAG, B., 2008, Expression of hepatitis B surface antigene on phage as PIII fusion protein, XIV. International Congress of Virology (IUMS), Poster 1207.

## **Katılan Kurslar ve Eğitim**

1. III. Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM), 20-22 Ekim 2004
2. Apoptosis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 7-8 Aralık 2006
3. Hücre Füzyonu Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi. Türkiye Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü( TÜBİTAK, MAM, GMBE), 4-8 Haziran 2007
4. “3. Kök Hücre Biyolojisinde Güncel Kavramlar ve Klinik Uygulamalar Sempozyumu, Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) ve Hacettepe Üniversitesinin Birlikteliğiyle, 5 Ekim 2007
5. Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı, 9 Nisan 2008
6. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara mikrobiyoloji derneği ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı, 25-28 Haziran 2008

## **Devam Eden Projeler**

1. Hepatit B Enfeksiyonunun Tanısında serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanı kitlerinin geliştirilmesi. Tübitak-GMBAE Projesi 2006-