"DOKTORA TEZİ

2023

ANATOMİ

Mehtap ERDOĞAN

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

FORMALDEHİT İLE APOPTOZİS VE OKSİDATİF STRESE İNDÜKLENEN SIÇAN HİPPOCAMPUSLERİNDE ARBUTUS UNEDO L. ÖZÜTÜNÜN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mehtap ERDOĞAN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Anatomi Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2023

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

FORMALDEHİT İLE APOPTOZİS VE OKSİDATİF STRESE İNDÜKLENEN SIÇAN HİPPOCAMPUSLARİNDE ARBUTUS UNEDO L. ÖZÜTÜNÜN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mehtap ERDOĞAN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Anatomi Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tuncay ÇOLAK

Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından 2021/2706 proje numarasıyla desteklenmiştir
Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KOÜ HADYEK) Proje No:2021/17 Karar Numarası 7/2-2021 Karar Tarihi: 10/09/2021

KOCAELİ
2023

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Formaldehit ile Apoptozis ve Oksidatif Strese İndüklenen Sıçan Hippocampuslarinde Arbutus Unedo L. Özütünün Etkilerinin İncelenmesi

Tez Yazarı: Mehtap ERDOĞAN

Tez Savunma Tarihi: 27.10.2023

Tez Danışmanı: Prof Dr Tuncay ÇOLAK

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Anatomi Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
ÜNVANI	**ADI SOYADI**	**İMZA**
BAŞKAN (ÜYE)	Prof Dr Belgin BAMAÇ	
DANIŞMAN (ÜYE)	Prof Dr Tuncay ÇOLAK	
ÜYE	Prof Dr Çağatay BARUT	
ÜYE	Prof Dr Hale MARAL KIR	
ÜYE	Dr Ögr Üyesi Ayla TEKİN ORHA	
ÜYE	Dr Öğr Üyesi Derya ÇINAR	

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

/ /2023

Prof. Dr. Sema
Aşkın KEÇELİ KOÜ
Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Müdürü

ÖZET

FORMALDEHİT İLE APOPTOZİS VE OKSİDATİF STRESE İNDÜKLENEN SIÇAN HİPPOCAMPUSLERİNDE ARBUTUS UNEDO L. ÖZÜTÜNÜN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Amaç: Formaldehit (FA), tıbbi laboratuvarlarda kadavra, doku, hücre tespit ve tahnitinde kullanılan temel kimyasal maddedir. FA; protein, DNA, RNA ve doymamış yağ asitleri ile birleşerek toksik etki oluşturmaktadır. FA insan vücudunda başta sinir sistemi olmak üzere pekçok sistemi olumsuz etkilemektedir. FA; hippocampus üzerinde nörotoksik etkiler oluşturarak öğrenme ve hafıza fonksiyonları etkilemektedir.

Ericaceae familyasından olan Arbutus Unedo L. (AUL), Akdeniz ülkelerinde yaygın şekilde yetişen meyveli bir bitkidir. AUL meyve ve yapraklarında yüksek antioksidanlar ihtiva ettiği için bazı toplumlarda gıda ve tıbbi amaçlı kullanımları rapor edilmiştir. AUL'den elde edilen farklı özütler ile yapılan araştırmalarla AUL'un antioksidan, antienflamatuar, antibiyotik, antifungal, antiparazitik, antiagregan, antidiyabetik, antihipertansif, antitümoral ve spazmolitik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda yüksek doz FA inhalasyonuna maruz bırakılan sıçanlarda Arbutus unedo L. Ekstratı/Özütü (AUE) içeriğindeki antioksidan oranlarından dolayı hippocampus üzerinde oksidatif stresi ve apoptotik hücre ölümünü azaltabileceğini stereolojik ve biyokimyasal parametrelerle göstermeyi amaçladık.

Yöntem: Çalışmamızda; 36 adet Wistar-Albino cinsi dişi sıçan kullanılmıştır. Deneye başlamadan önce AUE mevsiminde toplanan AUL meyvelerinden uygun yöntemler ile elde edilmiştir. Elde edilen ekstratın HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analizi yapılarak deneye başlanmıştır. Sıçanlar rastgele seçilerek her grupta 9'ar adet olmak üzere toplam 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol Grubu (KG) sıçanlara deney süresince normal hava verilmiştir. Deney Grubu (DG) ve Formaldehit Grubu (FG) sıçanlara günlük oral gavaj ile 20 mg/kg AUE ve 10 ppm FA inhalasyon yöntemi ile uygulanmıştır. Sham Grubu (SG) sıçanlara günlük 10mg/kg AUE oral gavaj ile uygulanmıştır. Uygulamalar günde 4 saat, haftanın beş günü olmak üzere totalde 5 hafta boyunca tekrar edilmiştir.
Deney sonunda sıçanlar, kan örnekleri alındıktan sonra derin aneztezi altında dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir. Sonrasında hayvanların cerebral hemisferleri çıkarılmıştır. İmmünohistokimyasal değerlendirme için beyin dokusunun ilgili bölümünde (hippocampus CA3), Kaspaz-3(Caspase-3) metodu ile apoptotik hücre sayı indeksine bakılmıştır. Biyokimyasal analizlerde, serumda BDNF (Beyin Türevli Nörotrofik Faktör Protein), MDA (Malondialdehit), NO (Nitrik Oksit) ve GSH (Glutatyon) değerleri incelenmiştir.

Bulgular: Deneyimizde FA'e maruz kalan sıçanların ağırlık oranlarında diğer gruplara oranla anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0,05$)

Gruplar arası karşılaştırmalarda, MDA, NO ve H-score değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmuş ($p<0,05$, $p<0,05$ ve $p<0,001$) ancak BDNF ve GSH değerlerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0,05$, $p>0,05$)
İmmünohitokimyasal Kaspaz-3 değerlendirmelerinde deney grubundaki hücre oranı sham ve kontrol grubuna göre farklılık gösterse de deney ve sham gruplarındaki apoptoz hücre oranında azalama belirlenmiştir.

Sham grubunun MDA değerleri hem DG hem de FA gruplarından anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$, $p<0,05$). Grupların ortalama MDA değerleri incelendiğinde; en düşük MDA değeri Sham grubunda olduğu belirlenmiştir.

AUE uygulanan gruplarda ortalama MDA değerlerinin düşme eğilimi gösterdiği gözlemlenmiştir. Deney grubuna uygulanan AUE'nin FA'in oluşturduğu oksidatif stresi azaltma eğiliminde olduğu ancak bu düşüşün anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur.

Sonuç: Araştırma çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ile; apoptotik hücre sayısının en yüksek FA grubunda olması, FA 'in hippocampuste sebep olduğu oksidatif hasara işaret etmektedir. FA grubundaki apoptotik hücre sayısının deney grubuna göre yüksek olması ve sham grubunda ise tüm gruplara oranla en az apoptotik hücre sayısı varlığı AUE'nın cerebral hücre hasarını azalttığı şeklinde yorumlanabilir.

BDNF değerlerinin KG ratlarda FA grubu ratlara oranla daha yüksek olması; nöranal ölüme protein düzeyinde ölümün de eşlik ettiği şeklinde yorumlanabilir. BDNF değerinin sham grubunda, FA grubuna göre daha düşük bulunması ise AUE 'nin FA maruziyetine bağlı olarak ortaya çıkan negatif etkileri kısmen düzelttiği şeklinde yorumlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Formaldehit, Arbutus Unedo L., BDNF, Glutatyon, Hippocampus

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ARBUTUS UNEDO L. EXTRACT ON RAT HYPPOCAMPUS INCUDED WITH APOPTOSIS AND OXIDATIVE STRESS BY FORMALDEHYDE

Object: Formaldehyde (FA) is the basic chemical used in cadaver, tissue and cell fixation and embalming in medical laboratories. FA; It creates a toxic effect by combining with proteins, DNA, RNA and unsaturated fatty acids. FA; It negatively affects many systems in the human body, especially the nervous system. FA; It affects learning and memory functions by creating neurotoxic effects on the hippocampus.

Arbutus Unedo L. (AUL), from the Ericaceae family, is a fruiting plant that grows widely in mediterranean countries. Since AUL contains high antioxidants in its fruits and leaves, its use for food and medicinal purposes has been reported in some societies. With research conducted with different extracts obtained from AUL; AUL has been found to have antioxidant, anti-inflammatory, antibiotic, antifungal, antiparasitic, antiplatelet, antidiabetic, antihypertensive, antitumoral and spasmolytic effects.

In our study, we aimed to demonstrate with stereological and biochemical parameters that Arbutus unedo L. Extract (AUE) can reduce oxidative stress and apoptotic cell death on the hippocampus in rats exposed to high dose FA inhalation, due to the antioxidant rates it contains.

Method: In our study; 36 Wistar-Albino female rats were used. Before starting the experiment, Arbutus unedo extract was obtained from AUL fruits collected in season by appropriate methods. The experiment was started by performing HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysis of the obtained extract. Rats were randomly selected and divided into 4 groups, 9 in each group. Control Group (CG) rats were given normal air throughout the experiment. Experimental Group (EG) and Formaldehyde Group (FG) rats were administered daily oral gavage with 20 mg/kg AUE and 10 ppm FA by inhalation method. Sham Group (SG) rats were administered 10mg/kg AUE daily by oral gavage. The applications were repeated 4 hours a day, five days a week, for a total of 5 weeks.

At the end of the experiment, the rats were sacrificed by decapitation method under deep anesthesia after blood samples were taken. Afterwards, the cerebral hemispheres of the animals were removed. For immunohistochemical evaluation, the apoptotic cell number index was examined in the relevant section of the brain tissue (hippocampus CA3) with the Caspase-3 method. In biochemical analyses, BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor Protein), MDA (Malondialdehyde), NO (Nitric Oxide) and GSH (Glutathione) values were examined in serum.

Results: In our experiment, there was a decrease in the weight ratios of rats exposed to FA compared to other groups ($p < 0.05$).

In comparisons between groups, a significant difference was found in MDA, NO and H-score values ($p<0.05$, $p<0.05$ and $p<0.001$), but no significant difference was found in BDNF and GSH values. ($p>0.05$, $p>0.05$).

In immunohytochemical Kaspaz-3 evaluations, although the cell rate in the experimental group differed compared to the sham and control groups, a decrease in the rate of apoptosis cells in the experimental and sham groups was determined.

MDA values of the Sham group were found to be significantly lower than both the Experiment and FA groups ($p<0.05$, $p<0.05$). When the average MDA values of the groups are examined; the lowest MDA value was determined to be in the Sham group.

It was observed that the average MDA values tended to decrease in the AUE applied groups. It was found that AUE applied to the experimental group tended to reduce the oxidative stress caused by FA, but this decrease was not significant.

Conclusions:

With the results we obtained from our research study; The fact that the number of apoptotic cells was highest in the FA group indicates the oxidative damage caused by FA in the hippocampus. The fact that the number of apoptotic cells in the FA group was higher than the experimental group and the presence of the lowest number of apoptotic cells in the sham group compared to all groups can be interpreted as AUE reducing cerebral cell damage.

BDNF values were higher in CG rats than in FA group rats; It can be interpreted that neuronal death is accompanied by death at the protein level. The fact that the BDNF value was found to be lower in the sham group than in the FA group can be interpreted as AUE partially correcting the negative effects that occur due to FA exposure.

Key words: Formaldehit, Arbutus Unedo L., BDNF, Glutatyon, Hippocampus

TEŞEKKÜR

Her aşamasında farklı birimlerdeki değerli akademisyenlerin tecrübe ve bilgilerinden faydalanarak, yıllar süren büyük bir emek ve özveri ile hazırlanan tezimi tamamlamanın heyecanı ve gururunu yaşıyorum.

Öncelikle, tüm asistan ve öğrencilerini kendi evladı gibi koruyup kollayan profesyonelliği, adaletli duruşu, akademik bilgi ve tecrübesi ile mentor kabul ettiğim öğrencisi olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Tuncay ÇOLAK hocama,

Doktora sürecimdeki çalışmalarımda istatistiksel analizlerde her daim yol gösterici destekleri için sayın Prof. Dr. Serap ÇOLAK hocama,

Eğitim, yeterlilik ve tez izlem süreçlerindeki ilgi, alaka ve yardımları için Sayın Prof. Dr. Aydın ÖZBEK, Prof. Dr. Belgin BAMAÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Ayla TEKİN ORHA hocalarıma,

Histolojik ve biyokimyasal deney aşamalarında fikir ve destekleri için sayın Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN ve Prof. Dr. Hale MARAL KIR hocalarıma,

Doku kesit alma ve görüntüleme işlemlerinde yardım ve destekleri için Kocaeli Histoloji ve Embriyoloji AnaBilim Dalı'nda görevli asistan arkadaşım Dr. Arş. Gör. Sema KURNAZ'a ve biyokimyasal test ve değerlendirmelerdeki yardımları için Kocaeli Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görevli Dr. Arş. Gör. Özgür Doğa ÖZSOY'a

Bu çalışmamın gerçekleşmesinde maddi imkan sağlayan Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine,

Her daim desteklerini hissettiren; Kocaeli Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalındaki değerli asistan arkadaşlarıma,

Beni her konuda destekleyen, benden ilgi, sabır ve koşulsuz sevgilerini hiç eksik etmeyen aileme,

Doktora eğitimimde, tezimin herhangi bir aşamasında katkısı olan, akademik hayatımda imzası olan burada ismini yazmayı unutmuş olabileceğim herkese,

En içten minnet, sevgi ve saygılarımla...

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Formaldehit ile Apoptozis ve Oksidatif Strese İndüklenen Sıçan Hippocampuslarinde Arbutus Unedo L. Özütünün Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

06 / 10 / 2023

Mehtap ERDOĞAN

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET iii
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
ŞEKİLLER xiii
TABLOLAR xv
1. GİRİŞ 1
1.1. Arbutus Unedo L. 2
1.1.1. AUL içeriği ve antioksidan özelliği: 4
1.2. Formaldehit 4
1.2.1. Formaldehitin kimyasal Özellikleri 4
1.2.2. Formaldehit'in doğada oluşum şekilleri, üretimi ve kullanım alanları: 6
1.2.3. Formaldehitin sağlık üzerine etkileri 1
1.3. Embriyoloji 2
1.3.1. Hippocampus embriyolojisi: 2
1.4. Histoloji 2
1.4.1. Hippocampus histolojisi: 2
1.5. Anatomi 4
1.5.1. Hippocampus anatomisi 4
1.5.2. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF, Brain derived neurotrophic factor) Proteini 8
1.6. Oksidatif Stres 9
1.7. Apoptozis 10
1.7.1. Malondialdehit (MDA): 11
1.7.2. Nitrik oksit (NO) 12
1.7.3. Glutatyon (GSH) 13
1.8. Kaspaz-3 (cysteine-containing aspartate specific proteases-3) yöntemi 13
2. AMAÇ 13
3. YÖNTEM 14
3.1. A. unedo L özütü hazırlanması: 15
3.1.1. Arbutus unedo L. meyvesinin temin edilmesi 15
3.1.2. Ekstraksiyon işlemi 15

3.1.3. Meyve ekstratlarının hplc analizleri 17
3.2. Deney hayvanları 17
3.3. Deney düzeneği 19
3.4. Deney hayvanlarının sakrifikasyonu 22
3.5. Ağırlık takipleri 25
3.6. Histolojik analizler 25
3.6.1. Caspase- 3 antikoru immünohistokimyası 26
3.7. Biyokimyasal analizler 27
3.7.1. Kanda BDNF analizi 27
3.7.2. Kanda MDA analizi 28
3.7.3. GSH tayini 28
3.7.4. NO tayini 28
3.7.5. Glutatyon (GSH) düzey ölçümü: 28
3.7.6. Malondialdehid (MDA) düzey ölçümü: 30
3.7.8. Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Ölçümü 31
3.8. Etik kurul onayı 34
3.9. İstatistiksel analiz 35
4. BULGULAR 36
4.1. Veri analizi 40
4.1.1. Ağırlık değerleri 40
4.1.2. Işık mikroskobi bulguları: 40
4.2. Biyokimya bulguları 49
5. TARTIŞMA 52
5.1. Sınırlılıklar 56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 58
7. KAYNAKLAR 60
8. ÖZGEÇMİŞ ..... **Error! Bookmark not defined.**
9. EKLER ..... **Error! Bookmark not defined.**
EK 1. Etik Kurul Onayı 88
EK 2. Tez Denetleme Listesi 89

SİMGELER VE KISALTMALAR

AUE: Arbutus Unedo L. Ekstratı

AUL: Arbutus Unedo L.

BDNF: Beyin Türevli Nörotrofik Faktör Protein

CA: Cornu Ammonis

Caspase-3: Cysteine-Containing Aspartate Specific Proteases-3

$CuSO_4$: Bakır Sülfat

DG: Deney Grubu

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

FA: Formaldehit

FAG: Formaldehit Grubu

FDH: Formaldehit dehidrogenaz

GD: Gyrus Dentatus

GSH: Glutatyon

H&E: Hematoksilen-Eozin

HCL: Hidroklorik Asit

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

ISEL: İn Situ End- Labeling

İHK: İmmünohistokimya

İp: İntraperitoneal

KCL: Potasyum Klorür

KG: Kontrol Grubu

KNaC4H4O6·4H2O: Potasyum Sodyum Tartarat

m: Metre

µM: Mikrometre

MDA: Malondialdehit

MI: Miyokard Infarktüsü

mRNA: Mesajcı Ribo Nükleik Asit

MS: Multiple Skleroz

$Na_2B_4O_7$: Sodyum Borat

Na2HPO4: Disodyum Fosfat (DSP)

NaCL: Sodyum Klorür

NaOH: Sodyum Hidroksit

NED: N-Naphthylethylenediamine

NO: Nitrik Oksit

OECD: The Organisation for Economic Co-operation and Development

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PET: Pozitron Emisyon Tomografi

Ppb: Parts per million

Ppm: Parts per billion

PPS: Periferik Sinir Sistemi

RNS: Reactive Nitrogen Species (Reaktif Nitrojen Türleri)

ROS: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)

ROS: Reaktif Oksijen Radikalleri

S100B: Kalsiyum Bağlayıcı Protein

SG: Sham Grubu

TBA: Tiyobarbitürik asit

TCA: Trikloro Asetik Asit

TEP: Tetra Etoksipropan

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-dUTP Nick end Labeling

WBC: Lökosit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Hippocampus illüstrasyonu (Denizatı benzerliği) (Çizim Mehtap ERDOĞAN) . 4
Şekil 1.2. Koronal bir kesitte hippocampus yerleşimi (Çizim Mehtap ERDOĞAN) 6
Şekil 1.3. Hippocampus bölümleri illüstrasyonu (Çizim Mehtap ERDOĞAN) 7

Şekil 3.1. Deneyde kullanılan mevsiminde toplanmış Arbutus Unedo L meyvelerinin görseli 15
Şekil 3.2. Deneyde kullanılan A. Unedo L ekstratının lliyofilize halinin görseli (vakumlu poşet) 16
Şekil 3.3. Deney Hayvanlarının gruplara ayrılmış görseli 18
Şekil 3.4. Deney hayvanlarının deney öncesi gruplara ayrılmış bir görseli..... 19
Şekil 3.5. Deneyde kullanılan cam kabin modelinin illüstrasyonu. (Çizim Mehtap ERDOĞAN) 20
Şekil 3.6. Ortamdaki FA düzeyinin Honeywell ToxiRAE PRO (HCHO) markalı dozimetre ile takibi 21
Şekil 3.7. Deney sırasında çekilmiş deney düzeneği görseli (cam kabin) 22
Şekil 3.8. Derin anestezi altındaki bir sıçan görseli 23
Şekil 3.9. Sıçan vena jugularisten kan örneği alınması illüstrasyonu. (Çizim Mehtap ERDOĞAN) 23
Şekil 3.10. Sakrifikasyonda kullanılan giyotin görseli 24
Şekil 3.11. Deney Hayvanlarının cerebral dokularının izolasyon aşamaları görseli..... 25

Şekil 4.1. DG sıçanların ilk hafta sonunda özellikle kuyruk bölgesinde başlayan sararmalara ait bir görsel. 37
Şekil 4.2. FA inhalasyonuna maruz kalan sıçanların; kabinin köşelerine kaçma, birbiri üzerine kapanma ve yüzlerini saklama eğiliminde olduğunu gösteren bir deney görseli ... 38
Şekil 4.3. Deneyin son günlerinde kuyruk lekelenmeleri ve tüylerinde yoğun sararmalar olan FA grubu bir sıçan görseli 39
Şekil 4.4. Deneyin son günlerinde FA maruziyeti yaşamamış tüylerinde renk değişimi olmayan KG' na ait bir sıçan görseli..... 39
Şekil 4.5. KG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 20X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)..... 41
Şekil 4.6. KG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 40X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)..... 42
Şekil 4.7. SG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 20X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği) 43
Şekil 4.8. SG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 40X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği) 44
Şekil 4.9. FA sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 20X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği) 45
Şekil 4.10. FA sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 40X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)..... 46
Şekil 4.11. DG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 20X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)..... 47

Şekil 4.12. DG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 40X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)..... 48
Şekil 4.13. Gruplara ait Anti-Kaspaz-3 H-SCORE Düzeyleri 49

TABLOLAR

Tablo 1.1. Formaldehit'in Fizyokimyasal Özellikleri (Aydın, 2009) 5
Tablo 1.2. Formaldehit ara ürünleri ve kullanım yerleri (Aydın, 2009) 7

Tablo 3.1. A. Unedo L özütündeki antioksidan bileşiklerinin analitik yüzdeleri 17
Tablo 3.2. İmmünohistokimyasal Boyanma Yoğunluğunun Derecelendirilmesi..... 27
Tablo 3.3. GSH çalışma yöntemi oranları 29
Tablo 3.4. GSH süpernatan çalışma yöntemi oranları 29
Tablo 3.5. MDA çalışma yöntemi oranları 30
Tablo 3.6. Doku proteini çalışma yöntemi oranları 31
Tablo 3.7. NO ayıraç çözelti oranları..... 33
Tablo 3.8. Griess ayıracı ve süpernatant ekleme oranları 33

Tablo 4.1. Deneyde kullanılan sıçanların gruplara göre ağırlık ortalamaları ve standart sapmaları..... 40
Tablo 4.2. MDA, BDNF, NO, GSH ve H-Score sonuçlarının gruplara göre karşılaştırılması..... 50
Tablo 4.3. MDA, NO, H-score post-hoc ikili grup karşılaştırma testleri 50
Tablo 4.4. MDA, BDNF, NO, GSH ve H-score korelasyonu 52

1. GİRİŞ

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya birden çok eşlenmemiş elektron taşıyan moleküllerdir. (Bast, Haenen & Doelman, 1991; Nawar, 1996; Halliwell & Gutteridge, 1985) Bu radikaller dış orbitallerinde eşlenmemiş bir elektron taşıdığı için başka moleküller ile kolayca reaksiyona girebilmektedirler. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olmasına göre iki gruba ayrılmaktadır. Oksijen kaynaklı serbest radikallere Reaktif Oksijen Türleri (ROS-Reactive Oxygen Species) ve nitrojen kaynaklı olan serbest radikallere Reaktif Nitrojen Türleri (Reactive Nitrogen Species (RNS) denir (Valko ve ark., 2007; Halliwell, & Gutteridge,1999).

Aerobik organizmalar büyüme ve gelişme için oksijene ihtiyaç duymaktadırlar. Bu organizmalarda oksijen kullanımının sonucu olarak reaktif oksijen metabolitleri ortaya çıkmaktadır (Burçak & Andican, 2004). Kısaca reaktif oksijen türleri moleküler oksijenin indirgenmesi ile ortaya çıkmaktadır. (Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008; Dworakowski, Anilkumar, Zhang, & Shah, 2006). Moleküler oksijenin indirgenmesi ile oluşan ROS biyolojik açıdan organizmadaki önemli hücresel moleküllere (DNA, lipit, karbonhidrat, proteinler gibi) zarar verebilmektedir. ROS metabolizmanın doğal bir sonucu olarak oluşabileceği gibi vücuda dışardan da alınabilmektedir. Oksijen her nekadar insan yaşamı için önemli olsa da, normal metabolizma sürecinde ortaya çıkan reaktif oksijen türleri metabolizma için oldukça zarar verici olabilmektedir. (Diplock, 1998)

Reaktif oksijen türleri; antioksidan-prooksidan dengesini, prooksidanların artışına neden olarak bozmaktadır. (Cooke, Evans, Dizdaroglu, & Lunec, 2003; Kopáni, Celec, Danisovic, Michalka, & Biró 2006). Endojen antioksidanlar organizma içinde savunma mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin artışı ile antioksidan - oksidan dengesinin serbest radikaller yönüne yani oksidan yönünde bozulması ile endojen antioksidanlar artış göstererek dengeyi korumaya çalışırlar. Ancak serbest radikallerin sayıca antioksidan miktarının dengeleyebileceği miktardan fazla olması durumunda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. (Kopani ve ark., 2006; Serafini & Del Rio, 2004; Mercan, 2004; Henricks, & Nijkamp, 2001).

Oksidatif stres durumunda, biyomoleküller zarar görerek hücre düzeyinde yapısal hasarlar oluşmaktadır (Burçak, & Andican, 2004; Cooke ve ark., 2003; Kopani ve ark., 2006).

Antioksidanlar ROS ve RNS olarak isimlendirilen serbest radikalleri süpürerek, ortadan kaldırarak veya en aza indirerek vücudun hücre ve dokularında meydana gelen

hasarı onarmakla görevlidirler. (Gutteridge, 1995). Çeşitli nedenlere bağlı olarak antioksidan oranının, prooksidan olarak isimlendirilen serbest radikallere göre düşmesi ile ortaya çıkan oksidatif stres belli bir seviyeye kadar tolere edilebilmektedir. (Halliwell, 2011). Oksidatif stresin tolere edilemediği durumlarda hücre hasarı, apoptozis veya doku hasarı ve hücre metabolizma hasarları ortaya çıkmaktadır (Durackova, 2010).

Formaldehit (FA), aldehit grubunda yeralan oldukça reaktif bir kimyasal bileşiktir. (Ünsaldı, & Çiftçi, 2010; Sclink ve ark., 1999; Canbilen, Sezen, Avunduk & Con, 1999). Diş hekimliği malzemelerinden, sanayi sektörüne, otomotiv sektöründen, kadavra tahnitine uzanan geniş bir kullanım alanına sahip olan FA'in maruziyet alanı da oldukça geniştir. Sigara dumanı, egzos dumanı gibi günlük yaşamda da FA maruziyeti oldukça kolaydır. (Pabst, 1987; Canbilen ve ark., 1999; Fló-Neyret, Lorenzi-Filho, Macchione, Garcia & Saldiva, 2001; Schlink ve ark., 1999). Anatomistler, FA üretiminde çalışan işçiler, patologlar; FA ile çalışan meslek grupları arasında yer alır dolayısıyla sözü edilen meslekler FA'in olumsuz etkilerine maruz kalmaktadır. Yapılan çalışmalara göre FA ile çalışan meslek gruplarının beyin, kolon ve kan kanserine bağlı mortalite oranında artış olduğu belirlenmiştir (Schlink ve ark., 1999; Shaham ve ark., 1996).

Ericaceae ailesine ait olan olan AUL ülkemizde dağ çileği ve kocayemiş isimleriyle bilinmektedir. Kırmızı renkli meyveli bir funda türü olan AUL ılıman iklime sahip olan kıyı bölgelerde kendiliğinden yetişmektedir.

Bu tez çalışmasında Oksidatif stres durumuna yol açan prooksidanlardan olan FA ile indüklenen sıçanların hippocampuslerinde ‘’*Arbutus Unedo L.’’* özütünün olumlu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Arbutus Unedo L.

Ülkemizde Kocayemiş adı ile bilinen Arbutus Unedo L. (AUL) akdenize kıyısı olan ülkelerde doğal olarak yetişmektedir. Her daim yeşil kalan yaprakları olan kocayemiş, fundagiller familyasına ait bir çalı türüdür (İslam, & Pehlivan, 2016). Ülkemizde geniş bir spektruma sahip olan bu bitki akdeniz iklimine sahip, kıyı şeritlerinde; çeşitli çalı türleriyle birlikte yetişmektedir. (Gözlekçi, Aklaya, & Yaşin, 2003; Yaltırık & Erdinç, 2002; Gomes 2011; Karadeniz, Kurt & Kalkışım, 1996). Sert ve kurak hava şartlarına dayanıklı olmayan bu çalı türü dünya üzerinde denize kıyısı olan ılıman bölgelerde özellikle kuzeybatı Afrika ve Asya ülkelerinde genellikle denizden 600m. yükseklikte yetişmektedir. (Miguel, Faleiro, Guerreiro, & Antunes, 2014; Gomes 2011). Meyveleri sonbaharda olgunlaşan AUL'nun yaprakları yıl boyu yeşil kalmaktadır. (Cheesa, & Nieddu, 2004). Tüm kıyılarımızda doğal

olarak yetişen bu bitkinin anayurdu Türkiye, Yunanistan, İrlanda ve Lübnan olarak kabul edilmektedir (Karadeniz, & Şişman, 2003).

Yöresel olarak ülkemizde dağ çileği, kocayemiş, davulga, dağ-ayı-kocakarı yemişi, pridim gibi isimlendirmeleri mevcut olan Arbutus Unedo L. bitkisi ülkemizde pek bilinmemektedir. (Çelikel, Demirsoy & Demirsoy 2008). Bu bitkinin meyveleri dünya üzerinde de yöresel olarak pek çok isimlendirmeye sahiptir; örneğin Fransa'da 'Arbousier commun', İtalya'da 'Corbezzolo', Almanya'da 'Erdbeerbaum' olarak anılmaktadır. (Soro, & Paxton,1999)

İngilizce'de; çilek ağacı anlamına gelen "Strawberry tree" olarak adlandırılsa da ve olgun meyveleri görsel olarak çileğe benzese de pomolojik olarak çilek meyvesi ile ilgisi yoktur. Bodur çalı şeklinde olan ağaç gövdesi alçaktan dallanma gösterir. Süngerimsi lifli bir yapıya sahip olan kırılmaya dayanıklı olan bir yapıya sahiptir. (Pekdemir, 2010). Yaprakları testere görünümlü ucu sivri parlak koyu yeşil renktedir. Çiçekleri çan biçiminde, beyaz renkte, uç bölümleri yeşil ya da pembe renklidir. Çiçekleri dalların uç kısmında salkım şeklinde 15-20 adet öbek şeklindedir. Meyveler 4-10 gr ağırlığında kırmızı renkte ve yuvarlak ya da yassı şekildedir. (Cheesa, & Nieddu, 2004). Meyvelerin tam olarak olgunlaşması 1 yıl kadar sürer. Meyvelerin olgunlaşma zamanı sonbahar döneminde başlar. Yenilebilir olgunluğa eriştiklerinde kırmızı, pembe ya da turuncu renge dönerler ve hoş bir kokuya sahiptirler. AUL meyveleri olgunlaştıktan sonra uzun bir süre ağaçta kalırlar (Yaltırık, & Erdinç, 2002; Karadeniz ve ark., 1996). Tam olgunluğa erişmiş meyvelerde yüksek düzeyde şeker mevcuttur (Ayaz, Küçükismailoğlu, Reunanen, & Sugar, 2000; Olveria, Baptista, Malherio, Casal, & Pereira, 2011)

AUL meyvesi doğrudan tüketilebilmektedir. Ayrıca alkollü içeçeklerin üretiminde ve reçel marmelat şeklinde de kullanımı vardır. Kullanım alanı oldukça fazla olan AUL aromatik yoğurtlarda tat verici olarak ve pastalarda dolgu malzemesi olarak da tercih edilmektedir (Miguel ve ark., 2014; Gomes, 2011; Ayaz ve ark., 2000; Şeker, Yücel, & Nurdan., 2004)

AUL insan sağlığı üzerinde oldukça önemli faydalara sahiptir. Bitki meyveleri yüksek oranda C vitamini içermektedir (Baytop, 1984). Entegratif tıpta AUL; koroner hastalıklar, arterial hipertansiyon gibi hastalıkların tedavisinde; laksatif, antioksidan, antihipertansif özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir (Miguel ve ark., 2014, Ruiz-Rodriguez ve ark., 2011) AUL meyvesinin antimikrobiyal özelliklere sahip olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Ruiz-Rodriguez ve ark., 2011)

1.1.1. AUL içeriği ve antioksidan özelliği:

AUL ihtiva ettiği yüksek flavonidler nedeniyle antioksidan özellik göstermektedir. Sadece meyvesi değil bitkinin yaprakları da yüksek düzeyde fenolik madde içermektedir. (Mendes, de Freitas, Baptista, & Carvalho, 2011). Literatüre bakıldığında bitkinin içeriğinde; uçucu bileşenler ile birlikte sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum gibi önemli mineraller bulunduğu belirtilmiştir. İçeriğinde ayrıca beta karoten, E ve C vitamini gibi vitaminlerin de mevcut olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Miguel ve ark., 2014; Özcan & Hacıseferoğulları, 2007; Olveria ve ark., 2011) Benzer diğer çalışmlar da AUL meyvesinde yüksek oranda gentisik asit ve gallik asit gibi bileşenlerin mevcut olduğunu belirtmektedir (Miguel ve ark., 2014; Olveria ve ark., 2011; Ayaz ve ark., 2000.)

Pabuçcuoğlu ve ark. 'nın 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada AUL bitkisinin yapraklarında vitamin E, fenol ve flavanol glikozitler tespit etmişler ve yapraklarının yüksek oranda antioksidan özelliğini vurgulamışlardır. (Pabuçcuoğlu, Kıvçak, Baş, & Mert, 2003).

Ayaz ve ark.'nın 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada Samsun ve çevresinden elde edilen AUL meyvelerinin içeriğinde başta gentisik asit ve gallik asit olmak üzere, prokateşik asit, vanilik, m-anisik asit ve p-hidrosibenzoik asit gibi fenolik asit türevlerini analiz etmişlerdir (Ayaz ve ark., 2000).

Arbutus Unedo L. içeriğindeki yüksek C vitamini nedeniyle güçlü bir antioksidandır. Antioksidanlar; FA gibi vücutta biriken serbest radikalleri yakalayabilme özelliğine sahiptir.

1.2. Formaldehit

Literatürde ilk olarak 1855 yılında tanımlanan formaldehit (FA), renksiz oldukça keskin kokulu bir kimyasaldır. 1867 yılında metanolün dehidrasyonu ile sentezlenerek Alman bilimadamı August Wilhem von Hofman tarafından keşfedilmiştir. FA'nın ilk saf olarak izolasyonu ise 1892 yılında Friedrich August Kekule 'von Stradonitz tarafından sağlanmıştır (The perspective; Salthammer, Mentese, & Marutzky, 2010).

1.2.1. Formaldehitin kimyasal Özellikleri

Oda sıcaklığında renksiz, oldukça keskin kokulu bir gaz olan FA; oksometan, metanal oksimetilen, metilen oksit, formik aldehid, metil aldehid ve Uluslarası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)) 'nın tanımı ile methanol olarak bilinmektedir. (Windholz, Budavari, Blumetti, & Otterbein, 1983; IARC 2006; Winkler 2011, Viegas ve ark. 2010). -21 °C ile -19 ° C arasında kaynama noktasına ulaşan FA'nın molekül ağırlığı ise 30.03 'dır. FA'nın kimyasal formülü CH2O' dır. (IARC 2006; OSHA 2010). Yanıcı, uçucu ve pek çok kimyasal ile biaraya geldiğinde reaksiyona

girerek patlayıcı özellik göstermektedir. Sıcaklık 150 °C'nin üstüne çıktığında karbondioksit ve monoksite parçalanmaktadır. Polar çözücülerde (örneğin su ve alkol) oldukça kolay çözünen FA'nın polar olmayan (örneğin pentan, benzen, hekzan, toluen) çözücülerde çözünmesi zordur. % 37 'lik en yaygın ticari formu formalin'dir. Katı formu polimer paraformaldehit ve trioksan $(CH_2O)_3$ ticari isimleri ile bulunmaktadır (Tablo 1.1) (Howard, 1990; IPCS, 2002; Winkler, 2011; ATSDR 1999).

Tablo 1.1. Formaldehit'in Fizyokimyasal Özellikleri (Aydın, 2009)

ÖZELLİKLER	BİLGİ
Kimyasal adı:	Formaldehit
Iupac Adı:	Metanal
Sinonimleri:	Formik aldehit, metanal, metil aldehit, metilen oksit, oksimetilen, oksometan
%37'lik Sulu Çözeltisine Ait Kayıtlı Ticari İsimlendirilmesi	Formalin, formol, morbicid, veracur Sulu çözeltisi stabilize edici % 10-15 metanol içerir.
Polimerik Formunun Ticari İsimlendirilmesi	Paraformaldehit, polioksimetilen, metilen glikol, paraform, formagen
Kimyasal Formülü	CH_2O
Kimyasal Yapısı	
Molekül Ağırlığı	30.03 g/mol
Erime Noktası	-118 °C ve -92 °C arasıdır.
Kaynama Noktası	-21 °C ve -19 °C arasıdır
Spesifik Yoğunluğu	0.815 g/ml (-20 °C) ve 1.08 g/ml (20 °C)
Ph	2.8-4.0
Koku	Keskin, bogucu ve rahatsız edici kokulu
Havada Eşik Koku Limiti	0.5-1.0 ppm
Suda Eşik Koku Limiti Ve Tat Limiti	50ppm
Polimerizasyonu	Suda hızla polimerize olur
Fotoliz	Güneş ışığında yarı ömrü 1.6-19 saattir ve fotoliz sonras1 H2 ve CO veya H+ ve HCO-oluşur.
Parlama Noktası	60 °C
Geçimsizlik	Alkali, asit ve oksidanlar, izosiyanat ve anhidritler ile reaksiyona girer. Hidroklorik asitle reaksiyonunda etkin karsinojen bis-klorometil eter oluşur. Nitrojen oksit, nitro metan, perklorik asit ve anilin ile reaksiyona girer veya peroksiformik asit ile patlayıcı ürün oluşturur.

1.2.2. Formaldehit'in doğada oluşum şekilleri, üretimi ve kullanım alanları:

FA'nın ortaya çıkış şekilleri çeşitlilik gösterir. Doğal olarak oluşum çeşitleri aşağıdaki gibi özetlenebilir;

FA sularda ve havada doğal olarak veya insan kaynaklı olarak bulunmaktadır. Sularda organik materyallerin güneş enerjisi ile parçalanması sebebiyle bulunmaktadır. Doğada ise çöplerin ve ormanın tam olarak yanmaması ve organik materyallerin çeşitli aktiviteleri ile doğaya salınmaktadır. FA, atmosferin traposfer katmanında bulunan, izopren, metan ve hava kirliliğine bağlı olarak bulunan aldehitler, alken ve alkoller karbonların oksidasyonu ile meydana gelebilmektedir. (IPCS, 1989). Canlılarda metabolik bir madde olarak küçük miktarlarda bulunabilmektedir. Tam olarak yanmayan yakıtlar sebebi ile motorlu taşıtlardan salınabilmektedir. Pek çok türevde maddenin yanması ile salınabilir. Örneğin tarım alanlarının yakılması, sigara dumanı, atık tesislerindeki yanma işlemi, gıda sektöründe pişirme esnasında FA oluşabilir. (IPCS, 2002) Evlerde yemek pişirme de kullanılan gazlar ve ev dışında otomobil egzoslarından yayılan gazlarda ortama FA yayar. (Imbus, 1985).

Ucuz bir kimyasal katalizör olduğu için endüstride kullanım alanları oldukça geniş bir yayılım gösteren FA 'in iki şekilde üretimi mevcuttur; Birincisi gümüş telleri ve gümüş kristallerinin metanol ile oksidatif dehidrojenasyonuyla meydana gelir. İkinci şekli isenmetanolün, demir molibden oksitleri ile oksidatif dehidrojenasyonu ile gerçekleşmektedir. (IPCS,1989; Walker, 1975).

FA kimya endüstrisinde; melamin ve fenolik- formaldehit, pentaeritriol gibi reçine elde etmek üzere; kağıt ve tekstil işleme sanayisinde, kağıt ve tekstil ürünlerini işlemek üzere oldukça sık kullanılır. Tıbbi ve diğer alanlardaki kullanım oranı toplam FA kullanımının yaklaşık %1.5'unu oluşturur (Tablo 1.2) (Aydın S, 2009).

FA'nın sanayi ve endüstriyel alanda kullanımlarının dışında dokuların bozulmasını önlediği için anatomi laboratuvarlarında kadavra tahnitinde ve morglarda mumyalama solüsyonu olarak kullanılmaktadır (Winkler, 2011).

Tablo 1.2. Formaldehit ara ürünleri ve kullanım yerleri (Aydın, 2009)

Ara ÜRÜN	KULLANILDIĞI ÜRÜNLER
Üre Formaldehit Reçineleri	Sunta ve fiber levhalar, kontrplak, kagıt ve tekstil ürünleri, kalıplama karışımları, yüzey kaplamaları, köpükler
Fenolik Reçineler	Kontrplak yapıştırıcıları, yalıtım maddeleri, döküm bağlayıcıları
Melamin Reçineler	Yüzey kaplamalan, kalıplama karışımları, laminantlar, agaç tutkalları
Hekzametilentetramin	Fenolik termofiksaj, reçine sertleştirici maddeler, patlayıcılar
Trimetilolpropan	Üretanlar, kaydırıcılar, alkid reçineler, çok fonksiyonlu akrilatlar
1,4-butandiol	Tetrahidrofuran, büttirolakton, polibütiren terefitalat
Poliasetal Reçineler	Oto uygulamalan, sıhhi tesisat bileşenleri
Pentaeritriol	Alkid reçineler, sentetik kaydırıcılar, agaçtan elde edilen tall yagı esterleri (biyodizel üretiminde kullanılır,), döküm reçineleri, patlayıcılar

1.2.3. Formaldehitin sağlık üzerine etkileri

Oldukça toksik bir kimyasal olan FA'in zaralı etkilerini ortaya koyan pek çok çalışma yapılmıştır. FA maruziyetinde ortaya çıkan bazı belirtiler; başağrısı, bulanık görme, diyare, kusma, öksürük ve boğaz ağrısı olarak sıralanabilir (Tang ve ark., 2009).

Yapılan bir çalışma ile 0,3-0,4 ppm FA maruziyetinde burun-boğaz ve gözde irritasyon ve gözyaşında artış olduğu belirtilmiştir (Aydın, 2009).

FA'nın inhale edilmesi, cilt ile doğrudan teması ciddi toksisitelere neden olabilmektedir (Arıcı ve ark., 2014). Cilt üzerinde de olumsuz etkileri bulunan FA'in, kontakt dematit ve dermatolojik olarak inflamasyonlara neden olduğu rapor edilmiştir (Saito ve ark., 2011; Winkler 2011). FA'in inhalasyonundan hemen sonra akciğerler tarafından hızla tutulmaktadır. Literatürde pek çalışma ile FA'in solunmasıyla burun, pharynx (yutak), akciğer kanseri ve lösemiye neden olduğu belirtilmiştir (Çuğlan 2012; Aşık 2016; Aydın 2015).

FA sinir sistemi üzerine toksik etkileri bulunan bir kimyasaldır (Jiang ve ark., 2015; Songur, Ozen, & Sarsılmaz, 2010). Yapılan sayısız çalışma ile merkezi sinir sistemi üzerine olumsuz etkileri ortaya konan FA'in özellikle öğrenme ve hafıza merkezlerinde tahrip edici etkileri rapor edilmiştir (Karacan ve ark. 2017)

1994 yılında yapılan bir çalışma ile uzun yıllar FA 'e maruz kalmış üç anatomistie uygulanan nörolojik testlerde anatomi çalışanlarının yetersiz performans gösterdiği belirtilmiştir (Kilburn, 1994). Histoloji laboratuvarlarında çalışan teknikerler ve büro çalışanları ile yapılan bir araştırma çalışmasında FA'e maruz kalan teknikerlerin büro çalışanlarına göre daha sinirli, dikkat dağınıklığı ve uyku düzensizliği daha yüksek olarak rapor edilmiştir (Kilburn ve ark., 1985). Oral gavaj ile haftada 5 gün 40mg/kg/gün olarak FA'e maruz bırakılan tavşanların merkezi sinir sistemleri (MSS)'nde nöronal hasar, DNA hasarı ve apoptotik hücreler rapor edilmiştir. (Arıcı ve ark., 2014) Nie ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışma ile FA'in tau proteininin yanlış katlanmasıyla ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Nie ve ark., 2007).

1.3. Embriyoloji

1.3.1. Hippocampus embriyolojisi:

Lobus limbicus, embriyolojik olarak korteksin farklılaşmaya başlayan ilk bölümüdür. Limbik lob önce hemispherium cerebrinin alt ve iç tarafında dairesel bir şerit şeklinde uzanır. Fissura choroidea'nın dış tarafı hippocampal formasyonu oluşturur. Choroid fissurun dışındaki alanda cortex cerebrinin öncül nöral hücreleri çoğalır ve göç eder. Böylece hemisferlerin duvarı kalınlaşır ve ventriküllerin iç yüzünde bir kabarıklık oluşturur. Bu kabarıklık hippocampustur. Hippocampus fetal hayatın yaklaşık 13-14. haftalarında lobus temporalisin iç kenarında hippokampal oluk tarafından sınırlanmaktadır. Sulcus hippocampalis, hippokampal oluşumu boyunca sığ bir oluk olarak hemispherium cerebrilerin iç yüzeyini çaprazlar. Takip eden ilk iki haftada dentat gyrus ve hippocampus proprius medial yönde katlanmaya başlar. Bu aşamada gyrus dentatus "U" harfine benzemektedir. CA1-CA2 ve CA3 alanları ise düz bir hat halindedir. 18-20. haftalarda subiculum ve hippocampus birbirlerine yaklaşır. CA1 ve CA3 alanları yay şeklini alırken CA4 alanı dentat gyrusun içine doğru sokulur. Hacimsel olarak büyüyen hippocampusun ventrikule bakan yüzü mediale doğru çıkıntı yaparken hemisfere bakan tarafı kalınlaşır ve erişkin formuna kavuşur. (Erzurumlu, Sengul, & Ulupınar, 2019; Gray's Anatomy 2016)

1.4. Histoloji

1.4.1. Hippocampus histolojisi:

Piramidal nöronlar hippocampus'u oluşturan temel hücre gruplarıdır. Bu hücre tiplerinin bazal dentritleri, ventriküle doğru; apikal olanları ise dentat gyrus yönünde uzanırlar.

Mikroskobik olarak hippocampus ventriküllere komşu yüzden gyrus dentatusa doğru sıralanan altı tabakadan oluşur.

Stratum plexiforme externum (alveus): En derin tabakadır. Bu katmanda entorhinal korteksten hippocampuse gelen lifler yer alır.

Stratum oriens: Horizantal trilaminar hücreler, esas piramidal hücrelerin bazal dentritleri ve sepet hücreleri bu tabakada yer alır.

Stratum pyramidalis: Bu tabaka CA3 bölgesinde yeralan pekçok internöron tipine ait hücre gövdelerini ve yosunsu lif sinapslarını ihtiva eder.

Stratum lucidum: Sadece CA3 alanına özgü bir katmandır. İnsanda diğer canlılara oranla daha belirgin şekilde yer alır. En ince hippocampus katmanıdır. İçeriğinde yosunsu lifler yer alır.

Stratum radiatum: Sepet ve radial trilaminar hücrelerden oluşan bu katman aynı zamanda Schaffer Kollateral Liflerini de içerir. Schaffer Kollateral Lifleri, CA3 ten CA1'e uzanır. Bu lifler; septal, bellek ve comissural iletim ağının temelini oluşturmaktadır.

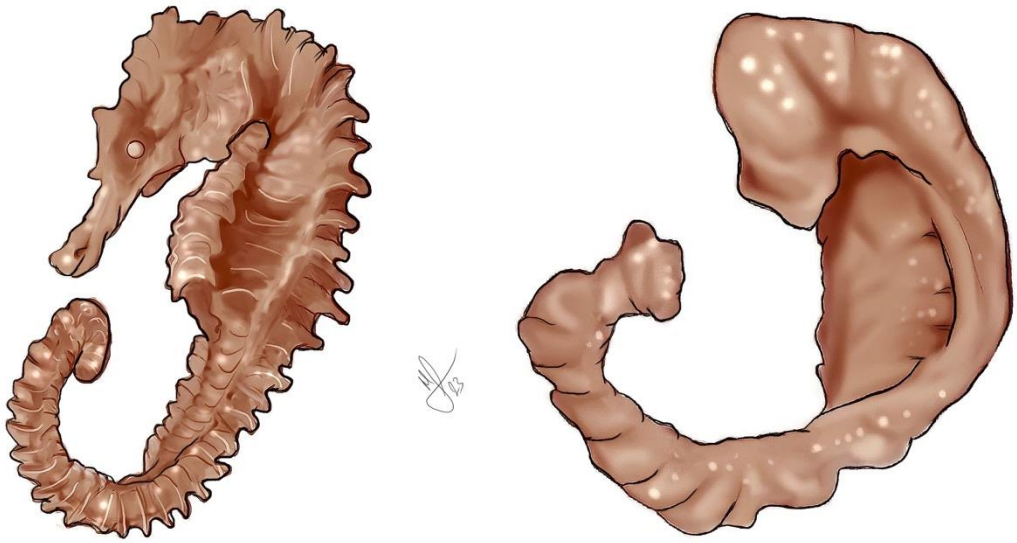
Stratum Lacunosum moleculare: Hem schaffer kollateral liflerini hem de entorhinal korteks yüzeyel tabakasından hippocampus'a gelen perforan yolak liflerini barındırır.

Gyrus dentatus: Gyrus parahippocampalis ile fimbria hippocampi arasında uzanan gri cevher yapısıdır. Mikroskobik olarak üç katmanlıdır. En dışta polimorfik tabak bulunur. Granüler tabaka polimorfik tabakadan sonra gelen tabakadır ve çok sayıda modifiye piramidal hücre ve pekçok internörondan meydana gelir. Bu tabakanın derininde moleküler tabaka yer alır ve bu katmanda temel hippokampal afferent lifler yer alır. (Erzurumlu ve ark., 2019).

1.5. Anatomi

1.5.1. Hippocampus anatomisi

Genel bir ifade ile "formatio hippocampi" olarak bilinen hippocampus; emosyon, anlama, öğrenme gibi işlevleri nedeniyle sürekli olarak araştırmalara konu olmaktadır. Hippocampus; lateral ventrikülün cornu inferior bölümündeki beyin dokusunun kendi üzerine kıvrılması ile oluşan temporal loba uyan gri cevher kitlesidir. Vasati olarak 5cm. uzunluğunda olan hippocampus şekil olarak deniz atına benzer (Şekil 1.1). Bu benzerlikten dolayı Grekçe (hippo:at, kampos: deniz) denizatı anlamına gelen hippocampus ismi ile bilinmektedir.



Şekil 1.1. Hippocampus illüstrasyonu (Denizatı benzerliği) (Çizim Mehtap ERDOĞAN)

Hippocampus'ün "alveus" ve "pes hipokampi" olmak üzere iki bölümü mevcuttur. Anteriora doğru genişleyerek parmaksı şekilde sonlanan bölümüne pes hippocampi denir. Bu bölümde yeralan çıkıntılı uzantılara digitationes hippocampi denir. Alveus hippocampi, miyelinli akson liflerinden oluşan ventriculus lateralise komşu olan bölümüdür. Alveus içerisindeki lifler arkaya mediale doğru birleşerek fimbria hippocampi adı verilen lif demetini oluşturur. (Guyton, 1989; Taner, 2002; Erzurumlu ve ark., 2019).

Fimbria hippocampiye dahil olan lifler arkaya doğru fornix adını alır. Fornixte karşılıklı olarak uzanan afferent lifler ile birlikte efferent lifler mevcuttur. Hippocampusün en belirgin efferent yolağı olan fornix, hipothalamusun afferent yollarının en sarih olanıdır. Fornix; subiculum ve hippocampusten aksonlar taşır. Hippocampusten başlayan fornix ventrikulus lateraliste C harfi şeklinde ilerleyerek septum pellucidum civarında diklemesine aşağı doğru ilerleyerek hypothalamusa iner. Fornix'in fimbria hippocampusten sonraki bölümü olan crura fornicisler septum pellucidum corpusu civarında birbirlerine yaklaşarak corpus fornicise dönüşür. Corpus fornicis comissura antrerior yakınında iki sütuna ayrılarak columna fornicis adını alır. Crura fornicisler arasındaki akson lifleri çaprazlaşarak comissura fornicisi meydana getirirler. Comissura fornicisler her iki cerebral hemisferde yeralan hippocampuslerin senkronize çalışmasını sağlar (Thoma ve ark.,2009; Erzurumlu ve ark., 2019). Fornix; corpus mamillare, hippocampus ve thalamus ön çekirdekleri ile bağlantı sağlamaktadır.

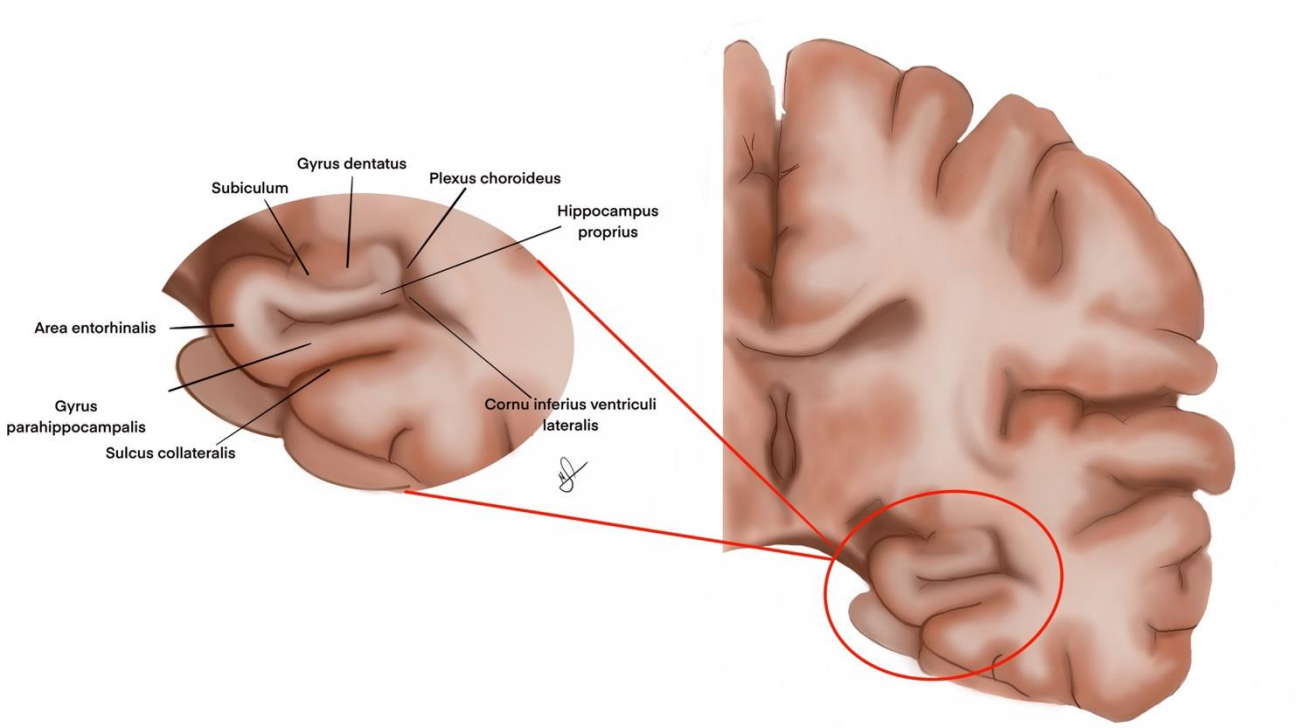
Subiculum, hippocampus proprius ve gyrus dentatus olmak üzere hippocampus üç ana alt başlık altında toplanabilir (Şekil 1.2). Hippocampus proprius ve gyrus dentatus birlikte cornu ammonis olarak ifade edilebilir.

Subiculum:

Histolojik olarak piramidal hücre tabakası hippocampusten daha kalın olan subiculum entorinal cortex ve hippocampus arasındaki bağlantı bölgesidir. Devamında gyrus parahippocampalis bulunmaktadır.

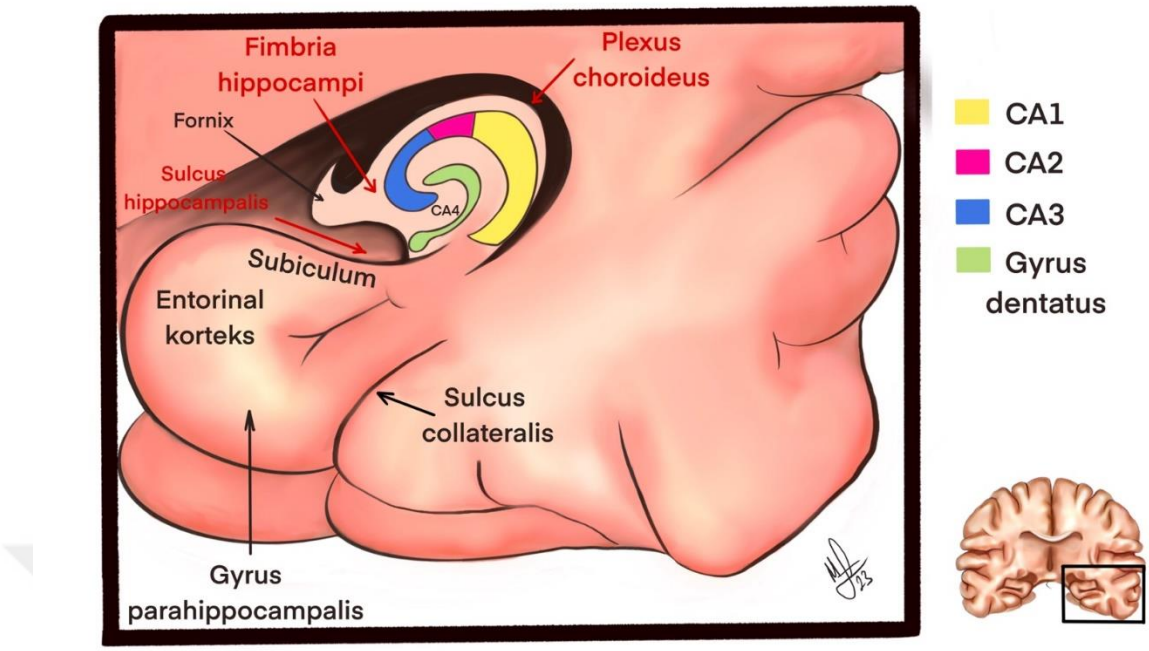
Hippocampus Proprius (Cornu Ammonis):

Bu kısım cornu ammonis olarak tabir edilir. Bu isimlendirme bahse konu hippocampus bölümünün frontal kesitlerde koç boynuzuna benzediği için kullanılmaktadır. Zira "Ammon" kelime manası olarak koç başlı bir mısır tanrısının ismidir. Cornu ammoniste 4 tip hücre türü bulunmaktadır, bu sebeple cornu ammonis baş harflerinden oluşan CA kısaltmasına eklenen rakamlar ile 4 ana alt birime ayrılmaktdır. (CA1-CA2-CA3-CA4).



Şekil 1.2. Koronal bir kesitte hippocampus yerleşimi (Çizim Mehtap ERDOĞAN)

CA3 ve CA2; CA1 ve CA4 alanları arasında yer almaktadır (Şekil 1.3) ve birbirlerinden kesin bir sınır ile ayrılmamaktadır. CA1 alanı subiculuma yakın olan alandır. CA4 ise gyrus dentatus sınırlarında yer alan kısımlardır. CA3 en büyük piramidal hücre grubuma sahip olan alandır, CA2 ise bu alanın zıddına en küçük piramidal hücre grubuna sahiptir. CA3 alanı hem gyrus dentatus hem de entorhinal korteksten gelen perforan yolak lifleri ile bağlantı sağlar. Bu bağlamda CA3 hippocampusun senkronize aktiviteler üreten pili olarak görev yapar. CA1 diğer bölümlere göre en karmaşık olanıdır zira katman lifleri hem rostrocaudal hem de transvers olarak uzanır (Knierim 2015, Erzurumlu ve ark. 2019).



Şekil 1.3. Hippocampus bölümleri illüstrasyonu (Çizim Mehtap ERDOĞAN)

Gyrus Dentatus:

Formatio hippocampus bileşenlerinden biridir. Hilus ve fascia dentata denilen yapılardan oluşmaktadır. Facia dentata cerebral korteksin en ilkel kısımlarından biridir. Facia dentatanın ana nöron tipi küçük granüler nöronlardır. Küçük granüler hücre tabakasının CA3 alanına giden miyelinsiz aksonlarına yosunsu lifler denir. Yani gyrus dentatus yosunsu lifler aracılığıyla CA3 alanında yer alan piramidal hücreler ile bağlantı kurar (Erzurumlu ve ark., 2019).

1.5.2. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF, Brain derived neurotrophic factor) Proteini

BDNF santral ve periferik sinir sistemi içerisinde yer alan nöronların büyüme, yaşama ve fonksiyonlarını yerine getirmesinde rol oynar. Kısaca nöronların büyüyüp gelişmesini ve sinaps fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlayan önemli bir nörotrofindir (Kazak, & Yarım, 2015). Temel olarak periferik sinir sisteminde yeralan nöronların devamlılığıyla ilişkilendirilmektedir. (Lewin, & Barde, 1996).

Yapılan çalışmalar BDNF proteininin; hypothalamus, thalamus, amygdala, colliculus superior, medulla spinalis, bulbus olfactorius ve cerebellumda mevcut olduğunu göstermiştir. Hippocampus CA1 bölgesi, yoğun nucleuslu veziküller, cerebral kortekste yer alan piramidal hücreler BDNF'nin spesifik sinir sistemi lokalizasyon alanları olarak tanımlanmaktadır (Lessman, Gottman, & Malcangio, 2003). BDNF geni onbirinci kromozomda yer alır ve görevi BDNF 'yi kodlamaktır (Luo ve ark., 2019). BDNF görevleri arasında sinir sistemi yaralanmalarında nöron hasarını önlemek ve oksidatif hasarı engellemek yer alır (Yin ve ark., 2014, Jiang ve ark., 2015). BDNF'ninde bir üyesi olduğu nörotrophin ailesi nörogenezi başlatmakla görevlidir (Zigova, Pencea, Wiegand, & Luskin, 1998; Benraiss, Chmielnicki, Lerner, Roh, & Goldman, 2001; Pencea, Bingaman, Wiegand, & Luskin, 2001). Nörogenez, yeni nöronların oluşmasıdır. Eskiden nörogenezin sadece gelişmekte olan canlılarda mevcut olduğu düşünülse de; yapılan son araştırmalara göre nörogenez hayat boyu devam etmektedir. Nörogenezi düzenleyenler büyüme faktörleridir. Büyüme faktörlerinin nörogenezi düzenlemesi ile yeni hücreler oluşmaya başlar. Anlatılanlardan anlaşılacağı üzere başta BDNF olmak üzere büyüme faktörleri nöronlar ve glia hücrelerinin gelişiminde ve bu hücrelerin canlı kalmalarında önem arzeder (Dobbing 1970; Cameron, Hazel & McKay, 1998). Memeli organizmasında cerebral nörogenez iki alan ile sınırlıdır. Bu alanlardan biri gyrus dentatusta yer alan subgranüler alan diğeri ise ventriculus lateralis'in subventriculer alanıdır. Hippocampüsün gyrus dentatusununda yer alan subgranüler alanda oluşan hücreler hippocampusun granüler katmanına doğru ilerler. Subventriculer alanda üretilen hücreler ise rostral göç akımı ile bulbus olfactoriusa giderler (Eriksson ve ark., 1998; Whitman, & Greer, 2009).

Fareler üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki yetişkin olanların cerebral subventriculer alanında günde ortalama otuz bin nöron oluşmaktadır. Bu sayı her bir farenin total cerebral nöron sayısı olan 110 milyon hücrenin yaklaşık 0.03'üne denk gelir. Gyrus

dentatusta ise günlük ortalama yeni nöron sayısı 9 bindir ki bu sayı da toplam yetişkin fare beynindeki ortalama nöron sayısının binde üçüdür (Whitman, & Greer, 2009; Bordiuk, Smith, Morin & Semënov, 2014). Başta BDNF olmak üzere diğer büyüme faktörleri bu hücrelerin canlı kalmalarını sağlarlar (Cameron ve ark., 1998)

BDNF mRNA dizisi olan genlerin fonksiyonel protein yapılara dönüşüm aşamaları patolojik ve fizyolojik durumlarda farklılık gösterir (Castrén, Thoenen, Lindholm, 1995; Howells ve ark., 2000, Chen, Dowlatshahi, MacQueen, Wang, & Young, 2001). Hafıza ve öğrenme ile ilgili uyarılarda RNA ve BDNF ekspresyonu artmaktadır (Patterson, Grover, Schwartzkroin, & Brothwell, 1992; Bramham, Southard, Sarvey, Herkenhem, & Brady, 1996). BDNF ekspresyonu oestrus ve fiziksel aktivite yoğunluğu ile değişmektedir (Neeper, Gomez-Pinilla, Choi, & Cotman, 1995; Scharfman, Mercurio, Goodman, Wilson, & MacLusky, 2003) Nöronun devamlılığını sürdürebilmesi için sitümülasyonu ve fonksiyon görmesi elzemdir. Bu fonksiyonları gerçekleştiriken salgıdağı BDNF sayesinde hücrenin sitümülasyona uyumunu arttıran yapısal sinaptik farklılıklara neden olurken aynı zamanda apoptozisede engel olmaktadır (Gönül, & Akdeniz, 2002).

Nörodejeneratif Hastalıklarda BDNF serum düzeyi farklılık göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalar ile, multiple skleroz (MS) gibi MSS'ni tutan hastalıklarda, serumda BDNF düzeyinin yükseldiği belirlenmiştir (Frota ve ark., 2009). Bazı araştırmacılar bu durumun vücudun patolojik bir durumda yangısal reaksiyon göstererek nöronları koruduğunu ileri sürerek açıklamışlardır (Hohlfeld, Kerschensteiner, Stadelmann, Lassmann, & Wekerle, 2000; Lommatzsch ve ark., 2005). MS hastaları ile diğer MSS hastalarının karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise, MS hastalarında mRNA BDNF ekspresyonunun diğer hastalıklara ve kontrol gruplarına oranla yüzde altmış oranında daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (Gielen, Khademi, Muhallab, Olsson & Piehl 2003). Başka bir çalışmada ise, MS'in ilerleyen evrelerindeki hastalarda BDNF üretimindeki azalmanın, atak ve azalma dönemine göre daha belirgin olduğunu ifade etmişlerdir (Tongiorgi ve ark., 2012).

1.6. Oksidatif Stres

Oksidatif Stres tanım olarak reaktif oksijen türleri (ROS) 'nin meydana gelme hızının organizmada mevcut antioksidanların koruyucu etkisini aşması ile bozulan denge olarak tanımlanmaktadır. ROS, oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. ROS ve serbest radikaller canlı organizmanın metabolik süreçlerinde doğal olarak ortaya çıktığı gibi FA gibi toksik kimyasallar, sigara dumanı, endüstriyel kimyasallar ve hava kirleticilerine maruz kalma ile

de ortaya çıkabilmektedir. Sözü geçen serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri metabolizmanın antioksidan sistemi ile organizmadan uzaklaştırılmaktadır (Zelzer ve ark., 2018, Gökpınar, Koray, Akçiçek, Göksan, & Durmaz 2006).

Pekçok antioksidan özelliği gösteren enzimler, C ve E vitamini bileşikleri ve mineraller oksidasyona karşı denge işlevi görür. Bu dengenin reaktif oksijen türleri lehine bozulması oksidatif stresi meydana getirir (Altıner, Atalay, & Bilal, 2017). ROS'in artması ile ortaya çıkan oksidatif stres ile proteinler, lipit ve deksiribo nükleik asit (DNA)' ler yapısal hasara uğrar ve bu durum hücre ölümlerine sebep olur (Giordano, 2005).

Hücresel hasar mekanizmalarından biri lipid peroksidasyonudur. Lipit peroksidayonu oksidatif stresin göstergelerinden biridir. Lipit peroksidayonunda hücre zarı geçirgenliği artar ve zarda perforasyon gelişebilir. Özetle lipit peroksidasyonu hücresel fonsiyonların bozulmasına neden olur (Betteridge, 2000). Lipit peroksidasyonu ile oldukça mutajenik olan malondialdehit (MDA) gibi pekçok aldehit grubu ikincil ürün olarak ortaya çıkabilir (Esterbaur, & Cheeseman, 1990).

1.7. Apoptozis

Apoptozis (apoptoz) artık görevini tamamlamış ya da DNA 'sı bozulmuş hücrelerin etrafındaki hücre ve dokulara zarar vermeden ortadan kaldırılması işlemidir. Döllenme gerçekleşmesinden itibaren tüm organizma hayatı boyunca dokuların devamlılığı apoptozis, mitoz ve hücre ölümü üçlüsü arasındaki denge ile sağlanmaktadır (Öktem, Özhan, & Özol, 2001; Parlakpınar, Koç, & Acet, 2004; Elmore, 2007). Yunanca yaprak dökümü anlamına gelen apoptozis, programlı hücre ölümüdür. Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmeleri ile artan hücre sayısının programlı hücre intiharı ile hücre sayısının dengelenir (Mak, 2003; Pınarbaşı, 2007; Cumming, Winterfold, & Walker, 1997). Bu süreç fizyolojik bir durum olduğu için fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak ta adlandırılmaktadır (Schwartzman & Cidloski 1993, Cohen 1993, Bellamy, Malcomson, Harrison, & Wylie, 1995). Apoptoz, artık gereksinim duyulmayan hücre için haberci sistemlerden bir sinyal alındıktan sonra başlayan bir süreçtir. Bu süreçte hücrede, morfolojik ve biyokimyasal değişim ortaya çıkar. Bu değişimler, hücre küçülmesi, apoptotik cisimcikler gözlenmesi, DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması, fosfotidilserin moleküllerinin hücre zarı dışına çıkması şeklinde sıralanabilir.

Apoptoza uğrayan hücrede sitoplazma küçülüp büzüşmeye başlar. Bazı yapısal proteinlerin parçalanması ile nucleus yoğunlaşmaya başlar ve genellikle çekirdek kromatin, çekirdek zarının iç tarafına doğru yer değiştirir, bu sebeple at nalı veya C harfine benzer bir şekil alır. Bu görüntü ile makrofajların dikkatini çeken küçülmüş membranla çevrili hücrelere dönüşür. Bu küçük apoptotik yapıların içerisinde; sıkıca sarılmış organeller, sitoplazma ve bazıları içerisinde nucleus parçaları yer alır (Mountz, & Zhou, 2001; Pınarbaşı 2007; Trump, Berezesky, Chang, & Phelps, 1997). Apoptoziste hücre DNA'sında ortalama üçyüzbin kırılma meydana gelmektedir (Zhang, & Xu, 2002)

Apoptozis yaşamın her döneminde devam eden bir süreçtir. Örneğin embriyolojik hayatta el ve ayak parmakları başlangıçta bitişi iken aralardaki hücreler zamanla yıkıma uğrar ve parmaklar birbirinden ayrılması, laktasyon döneminin bitmesi ile glandula mammariada meydana gelen gerileme, geriatrik dönemdeki organ atrofileri fizyolojik olarak apoptozise örnek olarak gösterilebilir. Radyasyon, kemoterapi, hipoksiye bağlı hücre ölümleri, Miyokard infarktüsü (MI) gibi iskemik hastalıklarda ortaya çıkan hücre ölümleri ise patolojik apoptozis olarak tanımlanmaktadır (Kiess & Brian 1998; Öktem ve ark. 2001; Elmore 2007).

Apoptozis ile hücrede meydana gelen bu değişimleri teşhis edebilmek için kullanılan apoptoz belirteçleri arasında; "M30 Yöntemi", "Agoroz jel elektroforezi", "Real- Time, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)", "Western Blot Yöntemi", "DNA Microarray", "PET (Pozitron Emisyon Tomografi) taraması" ve "ELİSA" gibi biyokimyasal yöntemler ve yüksek çözünme gücü olan tranmisyon elektron mikroskopisi ve önemli histolojik yötemlerden olan "TUNEL", "Anneksin V yöntemi", "ISEL (İn Situ End- Labeling) Yöntemi", "M30 yöntemi", "Kaspaz-3 (Caspase-3) yöntemleri" yer almaktadır (Yazıcı, Alizadehshargh, & Akdoğan, 2009).

1.7.1. Malondialdehit (MDA):

Reaktif oksijen türlerinin organizmada aşırı üretilmesi ile oksidan ve prooksidanlar arasındaki denge bozulur ve hücreler aşırılıkları dengeleyemezse oksidatif stres ortaya çıkar. ROS lipitlere, membranlara, DNA gibi yapılara zarar verir.

Üç karbonlu bir dialdehit olan malondialdehit (MDA) canlı organizmada serbest radikallerin sebep olduğu; membranlarda disfonksiyon ve apoptozis ile sonuçlanan zincirleme bir reaksiyon süreci olan lipit peroksidasyonun son ürünüdür. Kısaca MDA lipit

peroksidasyonu ile ortaya çıkan yıkım ürünlerinden biridir. Mutajenik ve karsinojenik olarak bilinen MDA lipidlerde çapraz bağlanmaya neden olur (Kılıç, Malhatun, Elmali & Altan, 1988). Mutajenik ve karsinojenik olan MDA oksidatif hasar neticesinde oluşur (Marnett, 2002). Serum MDA oksidatif hasarı tespit etmede önemli bir belirteçtir.

1.7.2. Nitrik oksit (NO)

Apoptozis; kaspaz enziminin aktive olması, DNA dejenerasyonu, zar bütünlüğünün mitokondriyel seviyede bozulması gibi durumlar ile karakterizedir (Sen, & D'lncalci, 1992). NO, kaspaz zincirini uyararak apoptozise sebep olabilir (Mohr, McCormick, & Lapetina, 1998).

İnsanda MSS'nin atipik nörotransmitter moleküllerinden biri olan NO, Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enziminin katalizörlüğünde meydana gelen bir reaksiyon ile üretilir (Denninger, & Marletta, 1999; Baranano ve Ferris, 2001; Eşsizoğlu, Yıldırım, Mengi, Oral, & Yurdakoş, 2009). Canlıda MSS'nde ikincil haberci olarak nöronal fonksiyonları modüle eder (Eşsizoğlu ve ark., 2009). Hareketlilik, öğrenme, saldırganlık, depresyon gibi duygusal ve bilişsel proseslerde rol oynar (Dzoljic, De Vries, & Dzoljic, 1997; Kleppisch & Feil, 2009).

Oksidatif strese neden olan serbest radikaller nitrojen kaynaklı olabilir. Nitrik oksit ve nitrojen dioksit Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)'dir. Nitrik oksit, sitotoksik etkilerini DNA sentezi ve poliferasyonu engelleyerek gerçekleştirir. DNA sentezi ve poliferasyonunu ise timidin kinaz ve ribonükleotid redüktaz enzimlerini baskılayarak sağlar. Karsinojenik hücrelerin ve hücre içindeki patojenlerin yok edilmesinde NO üretimi önemli bir aşamadır. Fazla düzeyde NO üretilmesi ile meydana gelen sitotoksisitenin apoptozisi indüklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Jadeski, Hum, & Lala, 2000).

ROS ile sürekli iletişim halinde oan NO stres durumunda mesajcı olarak rol oynamaktadır. Çok kısa ömürlü bir serbest radikal olan NO'in son yıllarda yapılan çalışmalar ile pekçok biyolojik olayda önemli role sahip olduğu kanıtlanmıştır (Huerta, Chilka, & Bonavida, 2008)

NO mitokondride değişimler meydana getirerek Sitokrom C (Sit C) salınımını uyarmaktadır. Mitokondriden sitoplazma içerisine sit C salınımı apoptozi'in indüklenmesi ile ilişkilidir. APAF-1 (Apopitotik Protease activating factor-1) sit C salınımı ile eğer ATP varlığı söz konusu ise çeşitli mekanizmalar ile kaspazları aktif hale getirir. Bu aktivasyon sonrası kaspaz-3 kaspaz-7'den ayrılarak aktif hale gelirler. Bu mekanizmalar neticesinde Inositol Trifosfat (IP3) yoluyla yüksek düzeyde hücresel kalsiyum salınımına sebep olur. Hücresel kalsiyum salınımı hücre ölümü yani apoptozis ile sonuçlanır (Zou, ve ark., 1999)

1.7.3. Glutatyon (GSH)

Glutatyon peroksidazın iki substratından biri olan glutatyon, vücudun serbest radikallere karşı savunmada anahtar bileşendir. Yoğunluğu ve hücreden bırakılma hızı oksidatif stresin bir göstergesidir. Oksidatif stres ve GSH düzeyleri arasında pozitif ilişki bulunmaktadır. Literatüre bakıldığında hayvan deneyleri ile yapılan deneylerde oksidatif stres arttığında GSH düzeyleri de yükselmektedir (Smith, Michael, & Anderson., 1993)

1.8. Kaspaz-3 (Cysteine-Containing Aspartate Specific Proteases-3) yöntemi

Kaspaz-3 yalnızca apoptotik hücrelerde oluşmaktadır. Bu yöntem ile immunohistokimyasal boyama ile aktif kaspaz-3 tespit edilebilmektedir. Bu metodun basarılı olabilmesi için apoptoza yol acan faktörün kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi veya araştırılan dokunun kaspaz-3'ü eksprese edip etmediğinin bilinmesi gerekmektedir (Overbeeke, Steffens-Nakken, Vermes, Reutelingsperger, & Hanen, 1998).

2. AMAÇ

Tibbi laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan FA solusyonlarının insan vücudunda özellikle öğrenme ve hafıza merkezi olan hippocampus üzerindeki hücresel ve biyokimyasal düzeyde olumsuz etkilerini saptayarak, bu etkileri azaltmada olumlu yönde etki gösterebileceğini düşündüğümüz ‘’Arbutus Unedo L.’’ Özütünün (içeriğindeki C vitamini ve fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinden dolayı) etkilerini ortaya koymayı amaçlamaktayız.

3. YÖNTEM

Araştırma çalışmamıza Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (KOÜ HADYEK) 10.09.2021 tarih ve 7/2-2021 sayılı onayı alındıktan sonra başlanmıştır. Deney aşaması Kocaeli Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Birimi (DETAB)'nde yürütülmüştür. Çalışmamızın diğer aşamaları Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi, Histoloji ve Embriyoloji ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dallarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. A. unedo L özütü hazırlanması:

3.1.1. Arbutus unedo L. meyvesinin temin edilmesi

Arbutus unedo L. meyvesi Sakarya ili Pamukova ilçesinde eylül-kasım ayları içerisinde toplandı. Meyveler Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Pamukova Meslek Yüksekokul Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümünde Öğr. Gör. Dr. Zuhal ŞAHİN tarafından teşhis edilmiş olup toplanarak ekstraksiyon (özüt) aşamasına geçilmiştir.



Şekil 3.1. Deneyde kullanılan mevsiminde toplanmış Arbutus Unedo L meyvelerinin görseli (Şekil 3.1.)

3.1.2. Ekstraksiyon işlemi

Ekstraksiyon için kullanılan materyal Freeze Drying yöntemi ile kurutulup muhafaza edilmiştir. Kocayemiş meyvesi (AUL) metil alkol ile 18000 rpm'de homojenize edilip, oda koşullarında ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar buhner hunisinde vakum altında kuruluğa kadar süzülmüştür. (Şekil 3.2). Süzüntü rotary evoparatörde uzaklaştırılmıştır. Ekstraktlar (özüt) HPLC ve diğer uygulama alanları için uygun solvent ile istenilen konsantrasyonlarda hazırlanıp kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Deneyde kullanılan A. Unedo L ekstratının liyofilize halinin görseli (vakumlu poşet)

3.1.3. Meyve ekstratlarının hplc analizleri

A.Unedo L. özütündeki (ekstrat) antioksidan özellikli fenolik (kateşin, epikateşin, resrevatrol ve gallik asit) bileşiklerinin analitik yüzdeleri HPLC (High Performance Liquid Chromatography) yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstraksiyon analizleri Tarım ve Orman Bakanlığı Tekirdağ Bağcılık ve Araştırma Enstitüsü müdürlüğüne bağlı Gıda Teknolojileri Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Arbutus Unedo L. özütü numunelerinde Shimadzu LC-20A HPLC cihazında 3 tekerrür şeklinde analizler gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki tabloda 3 tekrar sonrası elde edilen ortalama gallik asit, epikateşin, kateşin ve resrevatrol değerleri gösterilmektedir (Tablo 3.1)

Tablo 3.1. A. Unedo L özütündeki antioksidan bileşiklerinin analitik yüzdeleri

	Gallik asit (mg/kg)	**Kateşin (mg/kg)**	**Epikateşin (mg/kg)**	**t-Resveratrol (mg/kg)**
AUL-1	2.276,57	325,11	366,94	0,092
AUL-2	2.124,37	313,10	385,19	---
AUL-3	1.986,86	209,56	345,77	0,085
Ortalama	2.129,27	282,59	365,97	0,09

3.2. Deney hayvanları

Çalışmamızda; 36 adet Wistar-Albino cinsi 6 aylık dişi sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanların temini Kocaeli Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Birimi (DETAB)'nden sağlanmıştır. Sıçanların beden ağırlıkları deneye başlanmadan önce ölçülüp kaydedilmiştir (239,13± 13,26 gr). Hayvanlar günlük döngü içerisinde oniki karanlık ve oniki saat aydınlık ortamda takip edilmiştir. Stres yaşamalarını engellemek için sıçanlar kendi kafeslerinde hareket alanları kısıtlanmadan izlenmiştir. Hayvanların beslenmesinde; pelet yem ve normal su kullanılmıştır. Ortam sıcaklığı ise hayvanların doğal yaşam ısısı olan 20 derece olarak belirlendi. Ortamdaki nem miktarı ise yüzde 20-40 olarak düzenlendi.

Hayvanlar rastgele seçilerek her grupta 9 adet olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Her gruptaki sıçanların kuyrukları farklı renge boyanarak ayrılmıştır (Şekil 3.3). Grup I'deki sıçanlar Kontrol Grubu (KG) olarak Grup II'deki sıçanlar Deney Grubu (DG) olarak Grup III'deki sıçanlar Formaldehit Grubu (FAG) olarak, grup IV'deki sıçanlar Sham Grubu (SG) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Deney Hayvanlarının gruplara ayrılmış görseli

Çalışma öncesi ve çalışma sonunda tüm grupların ağırlık ölçümleri ile morfometrik özellikleri incelendi. Önce 30 gün olarak belirlenen deney süresi inhalayon ve gavaj kayıpları göz önüne alınarak 5 hafta olarak devam ettirilmiştir.

KG (n=9); ratlara sadece normal hava verilirken,

DG (n=9); ratlara; haftada beş gün, günlük 4 saat süre ile 10ppm FA ile birlikte liyofilize A.Unedo L. özütü (AO) oral gavaj ile günlük 20 mg olarak verilmiştir.

SG (n=9); ratlara AU özütü oral gavaj ile 30 gün boyunca günlük 10 mg olarak verilmiştir.

FAG (n=9); ratlara deney boyunca subakut FA maruziyeti (10 ppm FA) haftanın beş günü, günlük 4 saat şeklinde uygulanmıştır.

Subakut FA maruziyeti Ekonomik işbirliği ve Kalkınma Örgütünün en son yayınlanan "OECD Guideline for the Testing Chemicals" protokolüne uygun olarak sağlanmıştır.

Deney hayvanları deney öncesinde rastgele olarak seçilerek gruplara ayrılmıştır. Deneyden 10 gün önce deney yapılacak alana getirilen sıçanlar bu alanda normal yem ve su verilerek takip edilmiştir. Deney öncesi bu alana alışmaları ve deney sırasında stres yaşamamaları için bu şekilde takip edilmişlerdir (Şekil 3.4)



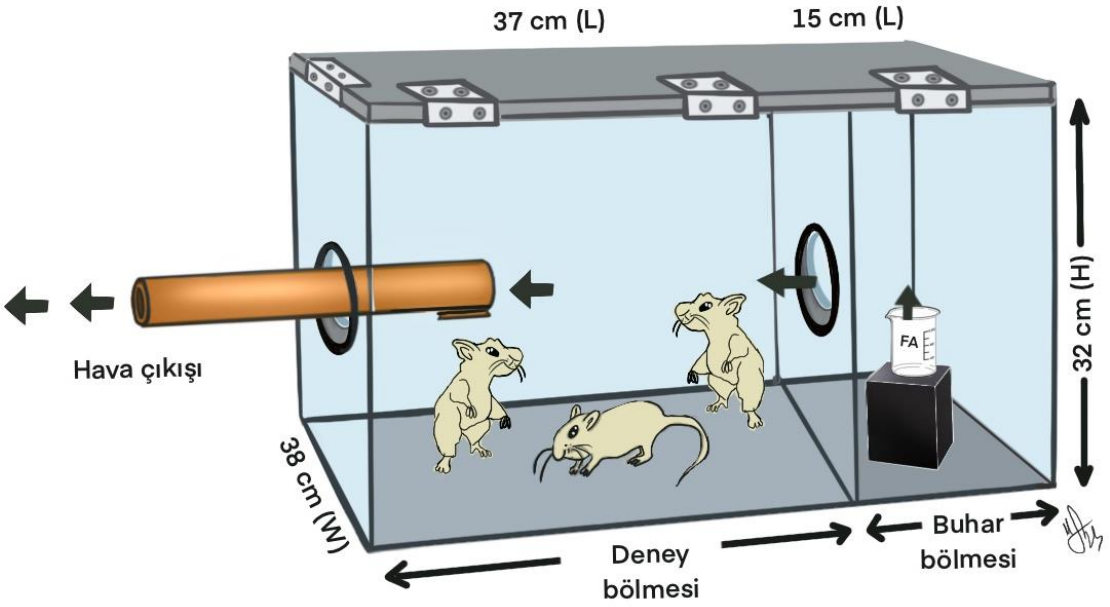
Şekil 3.4. Deney hayvanlarının deney öncesi gruplara ayrılmış bir görseli

3.3. Deney düzeneği

Çalışmamızda kullanılan deney kabini Kocaeli Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'nda mevcut olan ve benzer bir çalışmadan referans alınarak hazırlanan (Matsuoka, Takaki, Ohtaki, & Shioda, 2010) cam bir kabindir. 100/70/30 cm ebatlarındaki kabinin iç kısmında 37 cm genişliğinde bir büyük ve 15 cm genişliğinde bir küçük olmak üzere iki bölme yer almaktadır. Büyük bölmeye deney hayvanları yerleştirilirken; küçük olan bölmeye FA solüsyonu konulmuştur. Her iki bölme arasında 6cm çapında küçük bir delik

ile formaldehit geçişi sağlanmaktadır (Şekil 3.5). Deney kabininin cam tercih edilmesinin sebebi oldukça toksik olan FA maruziyetine bağlı olarak sıçanlarda gelişebilecek olumsuz durumları takip edebilmektir.

Kabin içindeki ortamda 10 ppm FA düzeyine erişmek için dar bölmeye ortalama 10-12 damla FA damlatılmış kap bırakıldı.



Şekil 3.5. Deneyde kullanılan cam kabin modelinin illüstrasyonu. (Çizim Mehtap ERDOĞAN)

Günlük ortalama 4 saat süren deney boyunca uçucu bir gaz olan FA düzeyini takip edebilmek için Honeywell ToxiRAE PRO (HCHO) markalı dozimetre kullanıldı (Şekil 3.6). Sözü edilen dozimetre her altı ayda bir kalibre edilmesi gereken hassas bir ölçüm cihazıdır. Deneye başlamadan önce cihazın kalibrasyonu yetkili firma tarafından gerçekleştirildi. Ortamdaki FA düzeyi 10 ppm'in altına düştükçe FA damlatılmış pamuk yenisi ile değiştirildi. Güvenilir değerler elde etmek için dozimetre hergün deneye başlanmadan önce kalibre edildi.



Şekil 3.6. Ortamdaki FA düzeyinin Honeywell ToxiRAE PRO (HCHO) markalı dozimetre ile takibi

Deney süresi boyunca hayvanların mümkün olduğunca doğru dozlarda FA maruziyetine ve AUE miktarı uygulanmasına azami ölçüde dikkat edilmiştir. Deney hayvanları merkezinde takip edilen hayvanlar deney odasına alınmadan önce hergün cam kabin düzeneği uygun şekilde hazırlanmış (Şekil 3.7) ve kabin içerisindeki FA düzeyi sabitlenmiştir. Dozimetre kalibrasyonu her gün deney öncesi yeniden yapılarak cam kabin içerisindeki FA düzeyi 10 ppm'e eşitlendikten sonra hayvanlar deney kabinine alınmıştır. Deney düzeneğine alınan hayvanların fiziki ve genel durumları sürekli araştırmacı tarafından takip edilerek ani değişimlerin yaratabileceği olumsuzlukların önüne geçilmiştir.



Şekil 3.7. Deney sırasında çekilmiş deney düzeneği görseli (cam kabin)

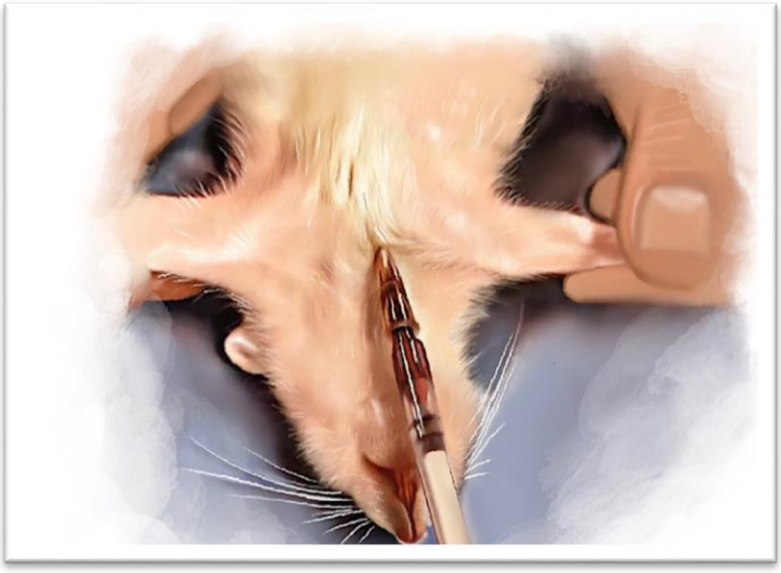
3.4. Deney hayvanlarının sakrifikasyonu

Deney beşinci haftanın sonunda sonlandırıldı. Deney sonunda tüm sıçanlar 6 mg/kg Xylazine Hydrochloride (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) ve 30 mg/kg Ketamine Hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis,İstanbul,Türkiye) ile derin anesteziye alındı (Şekil 3.8)



Şekil 3.8. Derin anestezi altındaki bir sıçan görseli

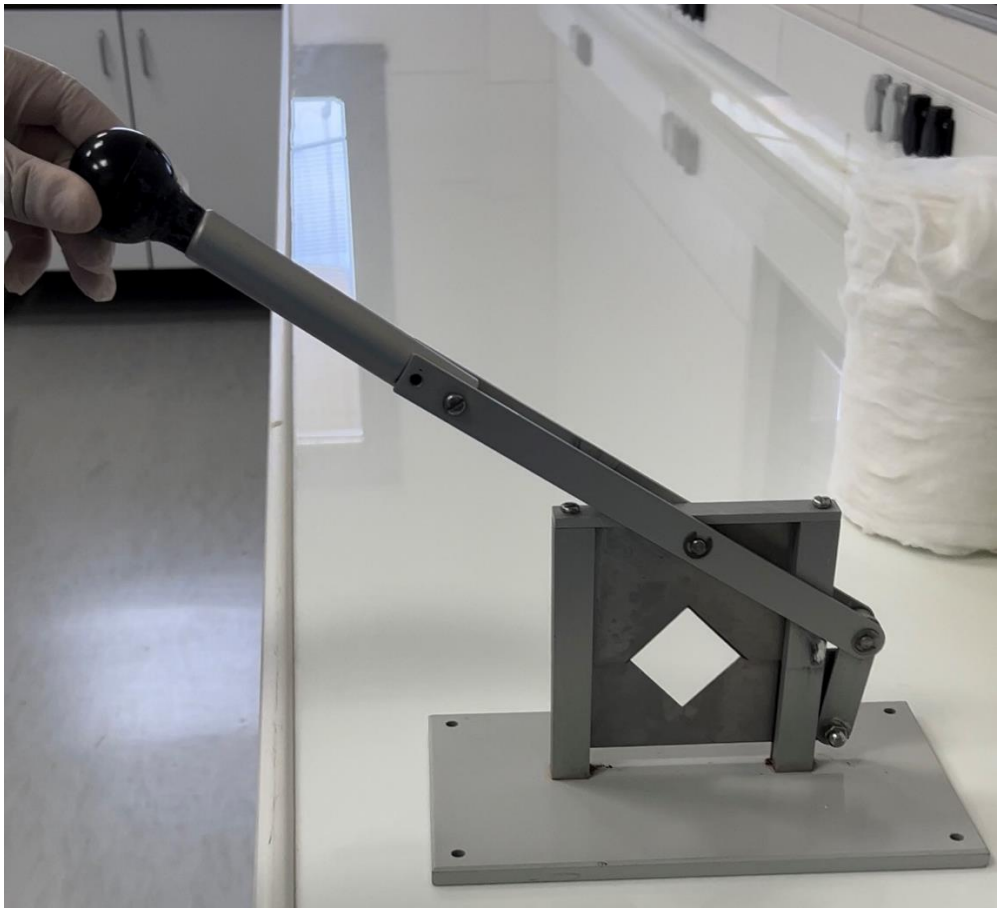
Sonrasında derin anestezi altındaki hayvanların jugular venlerinden biyokimyasal analizler için kullanılacak kan örnekleri alınmıştır (Şekil 3.9)



Şekil 3.9. Sıçan vena jugularisten kan örneği alınması illüstrasyonu. (Çizim Mehtap ERDOĞAN)

Alınan kan örnekleri uygun tüplere alındıktan sonra 15 dakika oda ısısında santrifüj işlemi yapıldıktan sonra biyokimyasal tahlillerin yapılacağı güne kadar +4 derecede kapağı kapalı şekilde muhafaza edilmiştir.

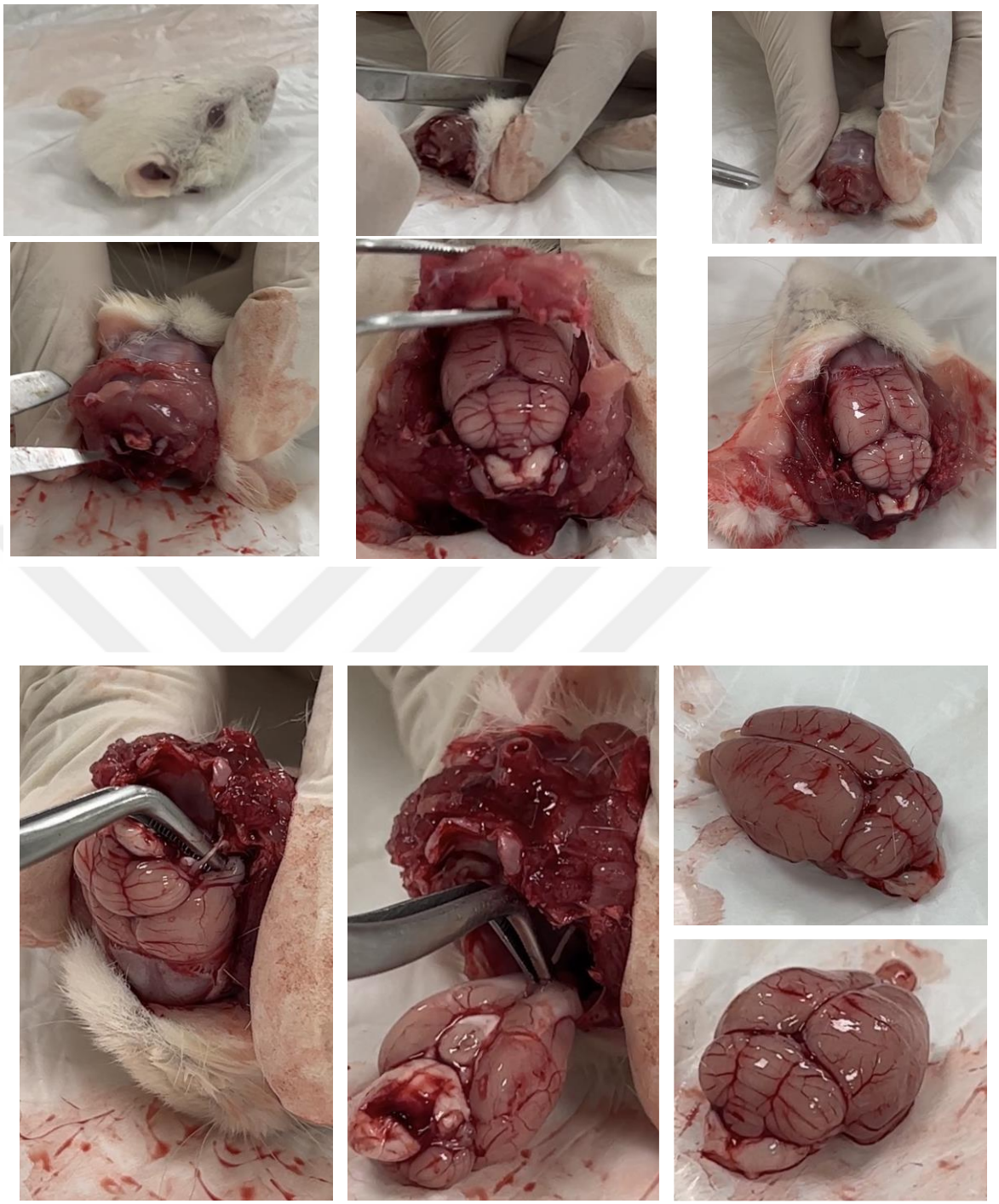
Kan örnekleri alındıktan sonra sıçanlar giyotin (Şekil 3.10) ile sakrifiye edildi.



Şekil 3.10. Sakrifikasyonda kullanılan giyotin görseli

Giyotin ile sakrifikasyonu sağlanan sıçanların beyin dokuları, prosedüre uygun izolasyon tekniği ile çıkarıldı (Şekil 3.11)

Beyin dokuları %10' luk tamponize FA solusyonu içerisine alındı. Histolojik analizlere kadar cerebral dokular solüsyon içerisinde saklandı.



Şekil 3.11. Deney Hayvanlarının cerebral dokularının izolasyon aşamaları görseli

3.5. Ağırlık takipleri

Scaltec-STB31 markalı hassas terazi ile deneye başlamadan önce ve deney sonunda tüm hayvanların ağırlık takipleri yapılarak deney sonunda karşılaştırmalar yapıldı.

3.6. Histolojik analizler

3.6.1. Caspase- 3 antikoru immünohistokimyası

Deney sonunda hayvanlardan elde edilen beyin dokuları (her grupta totalde 9 adet), %10' luk tamponize FA solüsyonu içerisinde 3-7 gün boyunca fikse edildi. Bu işlem sonunda beyin dokuları kasetlere alındı sonrasında çeşme suyu ile yıkandı ve etanol serilerinde artan derecelerde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) bir gün bırakılarak dehidrate edildi.

Sonrasında %100' lük etanol solüsyonu içerisinde toplamda yarım saatlik süre zarfında iki kez tutuldu ve 30 dakikalık periyotta şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Bu işlemden hemen sonra şeffaflaşan cerebral dokular etüve alındı 56 °C'de önce yumuşak parafin içerisinde, akabinde 45 dakika boyunca sert sıvı parafin blok içerisinde bekletilerek parafin bloklara gömülme işlemi tamamlandı. Elde edilen parafin bloklarından lamlar üzerine 4 μm kalınlığında kesitler alındı.

Bu çalışmada, apoptozisi tespit etmek amacıyla Kaspaz-3 antikoru ile immünohistokimyasal işaretleme yapıldı. Bloklardan alınan kesitlerden parafini uzaklaştırmak için 56 derecelik etüvde yaklaşık 12 saat bekletildi.

Sonrasında beş dakikalık periyotta totalde 3 kez toluolde bekletilen kesitlerin yüzeyinden parafinin büyük oranda arındırılması sağlandı. Bu işlemlerin ardından kesitler; önce %100 sonra %96 ve %79 derecelerinde etanol serilerinden geçirilerek saf su içerisine alındı. Saf su içerisinde ise toplamda iki kez olmak üzere beş dakikalık periyotlarda bekletildi. Rehidratasyon ve deparafinasyon işlemleri tamamlanan kesitlerin membran permeabilizasyonu işlemine geçildi. Bu işlem için Phosphate Buffered Saline (PBS)(Sigma,pH:7,4) kullanılarak yüzde 0,3'lük Triton X100 hazırlandı ve on dakika inkübe edildi. Akabininde kesitler, her seferinde 5'er dakika olmak üzere üç kez PBS kullanılarak yıkandı. Kesitler sitrat tamponu (sigma pH:6) içerisine alınarak 10 dakika boyunca 700 watt ayarında mikrodalga fırında kaynatıldı. Oda ısısında soğuması için yirmi dakika bekletildi ve sonra tekrar PBS ile iki kez beş dakikalık süre ile yıkandı. Lam üzerindeki hippocampus doku kesitleri Pap-Pen (hidrofobik kalem) kullanılarak etrafı çevrildi. Kesitler yüzde üçlük hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonunda endojen peroksidaz aktivitelerini bloklamak için on dakika bekletildi. İki kez tekrarlanan PBS yıkamalarından sonra protein bloklama solüsyonu içerisinde on dakika bekletilen kesitlerin özgül olmayan antikor bağlanmalarının bloklanması sağlandı. Bir kez PBS ile yıkamanın ardından kesitlere 1/500 dilüsyon oranında hazırlanan Kaspaz-3 primer antikoru (Cell signaling, #9662) uygulandı ve +4 °C'de overnight (bir gece) inkübasyon sağlandı. Sonrasında PBS işlemi negatif kontrol kesitlere uygulandı. Bu işlem sonrasında oda ısısında kesitler PBS ile üç sefer

beş dakikalık periyotta yıkanarak on dakika boyunca Mouse Specifying Reagent (Complement) solüsyonunda tutuldu ve beş dakikalık sürelerde üç kez PBS ile yaıkandı. Yıkama işlemi tamamlanan kesitlere streptavidin peroksidaz solüsyonu (Goat anti-rabbit HRP-conjugate) on beş dakika boyunca uygulandı. Yıkama işlemi tamamlanan kesitlere DAB (3,3'- Diaminobenzidine) (abcam) solüsyonu beş dakika boyunca kromojen olarak uygulandı. Bu işlem sonrasında kesitlerde renk oluşumu gözlendi. Reaksiyonu durdurmak için kesitler distile su içerisine alındı. Kesitlere sonrasında Mayer's Hematoksilen solüsyonu (abcam) uygulanarak 45 saniye boyunca zıt boyama gerçekleştirildi. Bu işlem sonrasında kesitler çeşme suyu ile birkaç dakika yıkandı. Sırasıyla yüzde yetmiş, yüzde seksen, yüzde 90 ve %100' lük derecelerdeki alkol serilerinden geçirilen kesitler yirdi dakika boyunca toluolde bekletildi. Şeffaflaştırıcı solusyon (su bazlı) kullanılarak kapatma işlemi tamamlandı. Deneysel inceleme aşamasına kadar kesitler +4 derecede takip edildi. Deneyde kullanılan sıçan hippocampüslerinde Anti-caspase- 3 boyama en çok nucleuslarda yoğunlaşmıştır. Deneyde kullanılan dört farklı gruba ait olan hippocampuslerindeki hücreler Leica DM 1000 Led marka ışık mikroskopu kullanılarak değerlendirildi. Buna göre Anti-Kaspaz-3 boyaması şiddeti Tablo 3.2 de ifade edildiği gibi sıfır ve +3 aralığında semikantitatif olarak hesaplandı. H-Skor= ∑Pi (i+1) formülü kullanılarak H-Skor hesaplaması yapıldı. Bu yöntem ile elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Formül içerisinde yer alan i: (0,1, 2 veya 3) Boyanma yoğunluk derecesini ifade eder.

Pi: Tüm yoğunluklar için boyanan hücrelerin yüzde karşılığını ifade etmektedir (Arici ve ark., 2014).

Tablo 3.2. İmmünohistokimyasal olarak boyanma oranının derecelendirilmesi

Derece	Anlamı
0	Ekspresyon yok
+ 1	Zayıf
+ 2	Orta
+ 3	Güçlü

3.7. Biyokimyasal analizler

3.7.1. Kanda BDNF analizi

Deney sonunda sıçanlardan alınan kan örnekleri uygun biyokimya tüplerine alınarak 15-20 dakika bekletilmiştir. 2000-3000 RPM 'de ortalama 15-20 dk santrifüj edildikten sonra supernatantlar dikkatlice toplandı. Elde edilen serumdan BDNF seviyeleri rutin biyokimya otoanalizörü ile analiz edilmiştir.

3.7.2. Kanda MDA analizi

Serumların Saklanması: Serumlar alındıktan sonra 15dk 3500rpm'de santrifüj edilerek eppendorflara alındı ve -80°C de değerlendirme zamana kadar saklandı.

Malondialdehid (MDA) düzeylerinin tayini: MDA bir lipit peroksidasyon ürünüdür. Tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren MDA; 535 nm'de en yüksek absorbansını veren pembe renkli bir kompleks yapı oluşturur. Bu kompleksin spektrofotometrik olarak değerlendirilen renk şiddeti, numune içerisindeki MDA konsantrasyonu tayin etmede kullanılır (Buege & Aust 1978).

3.7.3. GSH tayini

Non-protein sülfidril gruplarının hepsi redükte glutatyon formunda bulunmaktadır. DTNB disülfid bir kromojen olan 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) DTNB; yapısında sülfirid grubu barındıran bileşiklerle kolay bir şekilde redükte olabilen koyu sarı renginde bir bileşik oluşturur. Sözü geçen redükte kromojen 412 nm'deki absorbansı GSH yoğunluğu ile doğrudan orantılıdır (Ellman GL, 1959).

3.7.4. NO tayini

Gries yöntemi olarak da bilinen ABTS (2,20-azinobis-(3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit) veya SULF=NEDD (sülfanilamid)=(N-(1-naftil)-etilen-diamin dihidro) tekniği NO solusyonlarında belirgin renk değişimine neden olan bir yöntemdir. Bu çözeltilerdeki renk değişimlerine dayanan tahliller, NO dozlama veya uygulama içeren laboratuvar deneylerindeki testler için yararlıdır. NO konsantrasyonunun 25 mM 'ın üzerindeki hallerde Ferrosiyonür oksidasyon yöntemi kullanılırken, 2 mM' nin altındaki konsantrasyonlarda ABTS tercih edilmektedir. (Nims ve ark., 1996). Deney sonunda 40°'de saklanarak muhafaza edilen serumlar çözdürülerek, Elabscience (Wuhan, China) Rat Galanin ELISA Kit (E-EL-R0396) kullanılarak çalışıldı.

3.7.5. Glutatyon (GSH) düzey ölçümü:

Ayıraçlar:

1- **Proteinsizleştirme çözeltisi:**

1,67 g glasiyel metafosforik asit,

0,20 g disodyum EDTA

30 g NaCl

Yukarıdaki maddeler 100mL'lik balon joje içerisinde distile su ile çözüldü.

2- **Disodyum fosfat çözeltisi (0,3M):**

42,59 g Na2HPO4 1000mL'lik balon joje içerisinde distile su ile hazırlandı. 4oC'de saklanabilir. Eğer kristalize olursa ısıtılarak çözülür.

3- **Ellman renk ayracı:**

100 mL'lik balonjoje içerisinde, 40 mg DTNB %1' lik sodyum sitrat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

4- **GSH standartı (0,1 mg/mL):**

1 mg glutatyon 10 mL distile su ile çözülerek hazırlandı. Stabil olmadığı için taze hazırlandı.

5- **KCl (0,15 M):**

2,8 g KCl, 250 mL'lik balon jojede distile su ile çözülerek hazırlandı.

Çalışma Yöntemi:

Tüplere aşağıdaki tablodaki oranlar kullanılarak çalışıldı (Tablo 3.3)

Tablo 3.3. GSH çalışma yöntemi oranları

Çözelti	Kör (mL)	Standart(mL)	Örnek(mL)
KCL	2	1,5	1,5
GSH standartı	-	0,5	-
Proteinsizleştirme	3	3	3

Bütün tüpler 3000 rpm'de 10 dk. Santrifüj edildi.

Tüplerin üst kısmındaki süpernatanlar alındı ve bundan sonraki aşamada onlar kullanıldı (Tablo 3.4)

Tablo 3.4. GSH süpernatan çalışma yöntemi oranları

Çözelti	Kör (mL)	Standart(mL)	Örnek(mL)
Süpernatan	0,5	0,5	0,5

Na2HPO4	2	2	2
Ellman	0,5	0,5	0,5

Tüpler vortrekslenip 412 nm'de absorbans tayinleri yapıldı.

3.7.6. Malondialdehid (MDA) düzey ölçümü:

Ayıraçlar:

1- **Stok Standard (10mM):**

1,1,3,3 tetra etoksipropan (TEP) maddesinden standard çözeltisi hazırlandı. 0,1 mM'lık TEP'in stok standardı içerisinden 0,1 mL alınrark üzeri distile su ile 100 mL 'ye tamamlandı.

2- **Stok TBA-TCA-HCl ayıracı:**

Öncelikle balon joje içerisine %100 (w/v)'lük TCA çözeltisinden 15 mL alındı. TBA ise 0,375 g tartılarak balon jojeye eklendi üzerine 2,083 mL HCL eklendi. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Çalışma yöntemi:

Tüplere aşağıdaki oranda eklenerek vorteksilendi (Tablo 3.5)

Kaynar su banyosunda 15 dakika boyunca tutuldu.

Sonra 10 dk. boyunca 2500 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı.

Süpernatanların 535 nm'de absorbansları okutuldu.

Tablo 3.5. MDA çalışma yöntemi oranları

Çözelti	Kör (mL)	Standart(mL)	Örnek(mL)
KCl	1	0,75	0,75
Distile H2O	-	-	-
Standart	-	0,25	-
Ayıraç	2	2	2

3.7.7. Doku protein düzey ölçümü:

Ayıraçlar:

1- **Ayıraç A (%2 Na2CO3):**

100 mL 2lik balon joje içerisinde 0,4 gr NaOH distile su ile hazı hale getirildi.

2 g Na2CO3 tartıalrak çözlnmüş halde bulunan NaOH üzerine eklenerek ve toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2- **Ayıraç B (%2 K-Na Tartarat):**

0,2 g K-Na Tartarat distile su ile10 mL'lik balon joje içerisinde hazırlandı.

3- **Ayıraç C (%1 CuSO4):**

0,1 g CuSO4 10 mL'lik distile su ile balon joje içerisinde hazırlandı.

4- **Ayıraç D (A+B+C):**

98 mL ayıraç A, 1'er mL'de ayıraç B ve C çözeltileri karıştırılarak hazırlandı.

5- **Folin Ayracı:**

Ticari olarak satın alınmış Folin ayıracı direkt olarak kullanıldı.

6- **Standart serum bovin albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL):**

%0,9'luk serum fizyolojik içerisinde 10 mg BSA kullanılarak 10 mL hazırlandı.

Çalışma Yöntemi:

Tablo 3.6. Doku proteini çalışma yöntemi oranları

Çözelti	Kör (mL)	Standart(mL)	Örnek(mL)
Serum Fziyolojik	0,1	0,05	0,05
Ayıraç D	1	1	1
BSA standardı	-	0,05	-

Bütün tüpler 10 dk. Bekletildi. Yukarıda gösterildiği üzere (Tablo 3.6), üzerlerine 0,05'er mL Folin ayıracı eklendikten sonra 45 dk. Oda ısısında bekletildi. Daha sonra 660 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı.

3.7.8. Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Ölçümü

NO biyolojik olarak sistemlerde üretildikten sonra 2ila 30 saniye kadar çok kısa sürelerde nitrit ve ardından nitrata oksitlenir. Ntrik oksit türevlerinin en kararlı olan nitrat formudur.

$2NO^{\cdot}$ + 1/2 O_2 ⟶ $NO_2^{-\cdot}$ + $1/2O_2$ ⟶ NO_3

Nitrik oksit Nitrit Nitrat

Kararlı yapıda olmaması nedeniyle nitrik oksiti doğrudan ölçmek oldukça zordur. Bu sebeple total nitrik oksit miktarı, aktifleştirilmiş kadmiyum granüllerinin nitratı nitrite indirgemesinden sonra renklendirilmesi griess ile yapılarak spektrofotometrede dalga boyun 545 nm belirlenerek ölçüldü.

AYIRAÇLAR:

Standart çözeltiler:

Stok sodyum nitrat ve nitrit çözeltileri kullanılarak 2,5,5,10,50 µM yoğunluklarda standarlar tedarik edildi.

10 mM sodyum borat ($Na_2B_4O_7$) standart ve stok hazırlarken çözücü olarak kullanıldı.

Stok ve standartlar hazırlanırken çözücü olarak 10 mM sodyum borat ($Na_2B_4O_7$) kullanıldı.

Glisin-NaOH (0,2 M):

Glisinin çözünmesi için distile su kullanıldı. Sonrasında NaOH ile ph'ı 9,7 'ye ayarlandı.

Bakır sülfat ($CuSO_4$) (100 mM):

Bakır sülfat distile su ile çözülerek hazırlandı.

Sülfanilamid:

3 M sıcak HCL içerisinde eritilen 5 gramlık sülfanilamid, toplam hacmi 500 ml'ye yükseltildi.

N-Naphthylethylenediamine (NED) çözeltisi:

Distile su içinde çözdürülen 100 mg NED, toplam son hacim olarak toplam 500 ml'ye tamamlandı.

Griess Ayıracı:

NED ve sülfinamid çözeltisi birer birim alınarak karıştırıldı. İfade edilen karışım taze olarak deneye başlamadan önce hazırlandı.

Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi (55 mM):

Sodyum hidroksit distile su ile çözülerek 55 mM'lık konsantrasyona getirildi.

Çinko sülfat çözeltisi (75 m M):

Çinko sülfat distile su içinde çözülerek 75 mM'lık konsantrasyona getirildi.

Doku homojenatı (% 10):

0,5 gramlık doku alınarak 5 ml 0,15 M KCL çözeltisi içinde homojenize edildi.

Prosedür:

Deproteinizasyon işlemi: 0,25 ml serum üzerine 0,5 ml çinko sülfat ile 0,5ml NaOH ilave edildi. İyice karıştırıldı VE 5000xg'de 15 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulandı. Sonrasında elde edilen süpernatantlar deney aşamasında kullanıldı.

Kadminyum hazırlanması: Kadminyum en az 24 saat 0,2 M'lık sülfürik asit içinde bekletildi. Santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatanlar deney aşamasında kullanıldı.

Kadminyum hazırlanması: Kadminyum en az 24 saat 0,2 M'lık sülfürik asit içinde bekletildi. Böylece kadminyumun reaksiyonu sağlandı. Kadminyum granülleri sülfürik asit

boşaltıldıktan sonra üç kez distile su ile yıkandı.100 mM $CuSO_4$ çözeltisinde 2 dakika cam bagetle karıştırıldı.0,2 M Glisin-NaOH tamponu ile 3 kez yıkandı.

Çalışma Yöntemi:

- Çözeltilerin tüplere eklenme oranları aşağıdaki gibidir (Tablo 3.7)

Tablo 3.7. NO ayıraç çözelti oranları

Çözeltiler	Kör	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	Numune
Glisin-NaOH	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Deproteinize numune	-	-	-	-	-	0,5ml
2,5µM	-	0,5ml	-	-	-	-
5µM	-	-	0,5ml	-	-	-
10µM	-	-	-	0,5ml	-	-
50µM	-	-	-	-	0,5ml	-
Aktive edilmiş Cd granülleri	2,5g	2,5g	2,5g	2,5g	2,5g	2,5g
Deiyonize su	1ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml

- 90 dakika ağızları kapatılarak karanlıkta bekletildi. Sonra tüpler 3000 xg'de 3 dakika santrifüj edilerek bir sonraki aşama için süpernatant (Tablo 3.8) kullanıldı.

Tablo 3.8. Griess ayıracı ve süpernatant ekleme oranları

Süpernatant	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Griess ayıracı	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

- 45 dakika karanlıkta bekletildikten sonra numune ve standartların 545 nm' de absorbansları okutuldu.

Kimyasal listesi

1- NaOH / sodyum hidroksit (Sigma 06203)
2- Na2CO3/ sodyum karbonat (Sigma S7795)
3- CuSO4/ bakır (II) sülfat (merck A810587 504)
4- KNaC4H4O6·4H2O / potasyum sodyum tartarat (merck A655285)
5- BSA / sığır serum albümin (sigma A4563)
6- Folin&Ciocalteu's Fenol Reaktifi 2N (sigma F9252)
7- PBS / fosfat tamponu (sigma P 4417)
8- DTNB / 5,5′-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (sigma D8130)
9- Sodium citrate dihydrate (sigma W302600)
10- EDTA / Etilendiamin tetraasetik asit (sigma E9884)
11- NED / N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (sigma 222488)
12- Glisin / (sigma G7126)
13- TEP / 1,1,3,3 tetra etoksipropan (sigma T-9889)
14- TCA / trikloro asetik asit (merck k45499307 432)
15- TBA / Tiyobarbitürik asit (sigma T-5500)
16- HCl / hidroklorik asit Redei-de Haen 30721)
17- KCl/ potasyum klorür (sigma P-9333)
18- Glasiyel metafosforik asit (merck K45762146 444)
19- NaCl / sodyum klorür Riedel-de Haen 13423)
20- Na2HPO4 / disodyum fosfat (merck A335874 223)
21- Sülfanilamid (sigma S9251)
22- Çinko sülfat (sigma Z4750)

KULLANILAN CİHAZLAR

1- IKA T18 Digital ULTRA TURRAX homojenizatör
2- Alisei Quality System Seac Radim Company analyser (Italy/Rome)-ELISA READER
3- UVmini-1240 UV-VIS Spectrophotometer- SHIMADZU
4- BECKMAN COULTER DXI-600 otoanalizörü

3.8. Etik kurul onayı

Çalışmamız Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KOÜ HADYEK) tarafından 10.09.2021 tarih, 7/2-2021 karar numarası ve 2021/17 proje numarası ile tıbbı etik açısından uygun bulunmuştur (Ek. 1).

3.9. İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde; sürekli veri değerleri için minimum-maksimum değerler, standart sapma, ortalama, ortanca değerleri kullanılırken; nominal ve ordinal değerler için yüzde ve rakamları ile gösterilmiştir.

Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testleri ile sürekli verilerin normal dağılıma uygunluğu incelenmiştir. Bağımsız iki grup karşılaştırmalarında; nonparametrik grupların karşılaştırması için Mann-Whitney U testi kullanılırken parametrik grupların karşılaştırmasında t-testi kullanılmıştır. İkiden fazla olan bağımsız grup karşılaştırmalarında; parametrik gruplarda Varyans Analizi (ANOVA), nonparametrik gruplarda ise Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Post-Hoc analizi ise anlamlılığın hangi grupta olduğunu belirlemek üzere uygulanmıştır. Tek yönlü yapılan varyans analizi ile belirlenen farklılıkların hangi gruplarda olduğunu ortaya koymak için Tukey testi uygulanmıştır.

Nonparametrik sayısal değişkenlerin kıyaslanmasında Spearman korelasyon analizi yapılırken, parametrik özellik gösteren sayısal değişkenlerin kıyaslanmasında ise Pearson korelasyon analizi uygulanmıştır.

Değerlendirme yapılırken elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı kabul edebilmek için yüzde 95 güven aralığı ve p değeri için 0,05'in altındaki değerler anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler için IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) programının 21.0 versiyonu kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamıza FA maruziyetine bağlı olarak gelişen hippocampal hasara karşı AUL ekstratının etkilerini incelemek üzere toplam 36 Winstar Albino dişi sıçan dahil edilmiştir. Dört gruba ayırdığımız sıçanlardan ilk grup KG olarak belirlenerek; günlük normal hava, su ve besin verilerek hiçbir işleme tabi tutulmadan takibi sağlanmıştır. İkinci grup olarak belirlenen DG'daki sıçanlara günlük 20mg AUE oral gavaj ile verilmiştir.

DG ve FAG sıçanlara günlük 4 saat olmak üzere haftanın beş günü beş hafta boyunca FA inhalasyonu sağlanmıştır. SG ratlara günlük 10mg AUE verilerek beş hafta boyunca takibe devam edilmiştir.

Deneyin ilk haftası sonunda FA maruziyetine uğrayan DG ve FG sıçanların tüylerinde sararma gözlendi (Şekil 4.1)

Deney esnasında FA inhalasyonuna maruz kalan sıçanların; kabinin köşelerine kaçma, birbiri üzerine kapanma ve yüzlerini saklama eğiliminde oldukları ve halsiz tavırları gözlendi (Şekil 4.2)

Deney sonunda gözlemsel olarak değerlendirilen hayvanlardan FA maruziyetine uğrayanların tüylerinde sararma hareketlerinde yavaşlama ve fiziksel görünüm olarak da zayıf oldukları gözlendi. Tüylerdeki sararma 7. günden itibaren başlangıçta kuyruk gölgesi üzerinde; sonraki günlerde tüm vücut tüylerinde belirgin şekilde gözlenmiştir. Özellikle deneyin son günlerinde kuyruk bölgelerinde hem renk değişimi hem de lekelenmelerin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.3)

Deneyin son günleride dahil olmak üzere FA maruziyeti yaşamamış gruplardaki sıçanların tüylerinde renk değişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.4)



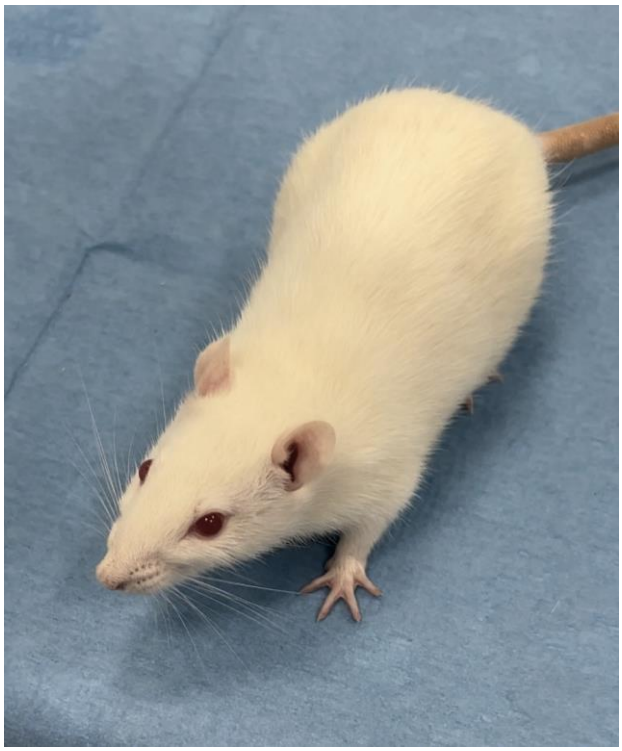
Şekil 4.1. DG sıçanların ilk hafta sonunda özellikle kuyruk bölgesinde başlayan sararmalara ait bir görsel.



Şekil 4.2. FA inhalasyonuna maruz kalan sıçanların; kabinin köşelerine kaçma, birbiri üzerine kapanma ve yüzlerini saklama eğiliminde olduğunu gösteren bir deney görseli



Şekil 4.3. Deneyin son günlerinde kuyruk lekelenmeleri ve tüylerinde yoğun sararmalar olan FA grubu bir sıçan görseli



Şekil 4.4. Deneyin son günlerinde FA maruziyeti yaşamamış tüylerinde renk değişimi olmayan KG' na ait bir sıçan görseli

4.1. Veri analizi

4.1.1. Ağırlık değerleri

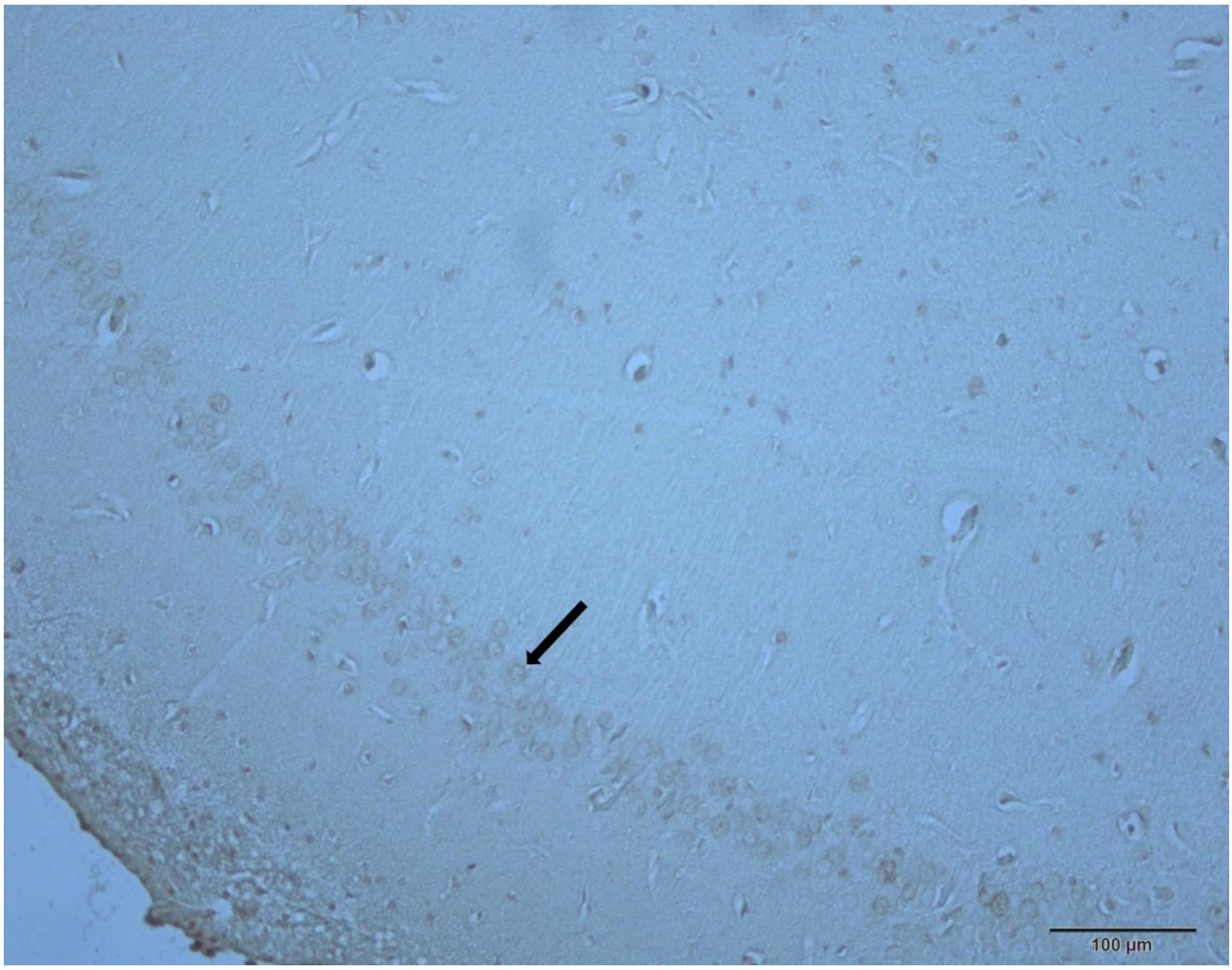
Deney öncesinde ve sonunda çalışmamızda yer alşan sıçanların ağırlık takipleri yapılmıştır. Sıçanlara ait ağırlık ortalamaları Tablo.4.1'de gösterilmiştir. Deney öncesi ve sonrası veriler eşleştirilmiş t-testi ile incelenmiş olup anlamlı bir fark bulunmamıştır. (p>0,05) (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Deneyde kullanılan sıçanların gruplara göre ağırlık ortalamaları ve standart sapmaları

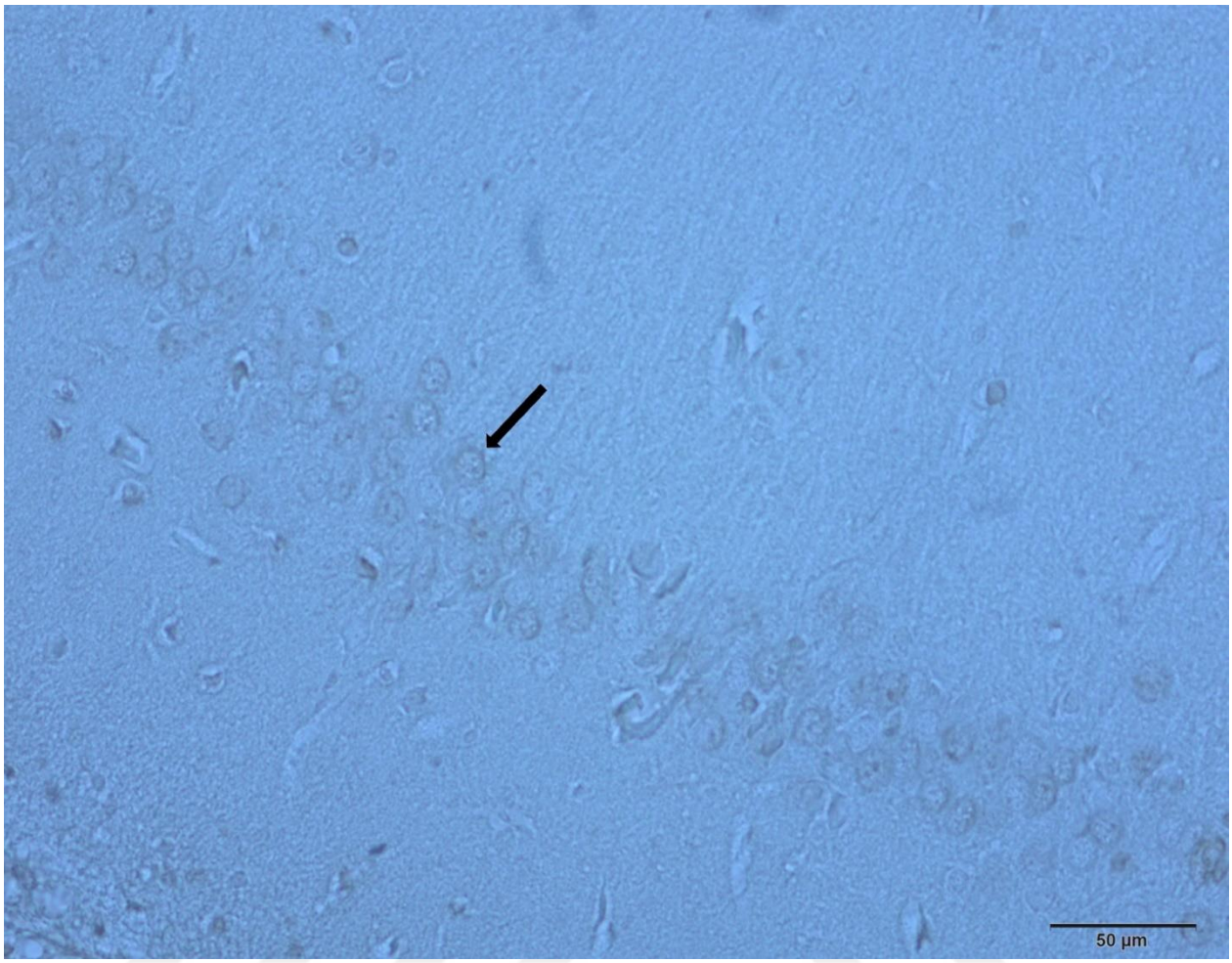
	Deney Öncesi	Deney Sonrası	p
Kontrol Grubu	221,78 ± 14,09	231,78 ± 15,21	p>0,05
Deney Grubu	259,22 ± 27,55	255,44 ± 19,26	p>0,05
Sham Grubu	246,33 ± 21,85	255,89 ± 24,84	p>0,05
FA Grubu	229,22 ± 19,08	241,89 ± 14,16	p>0,05

4.1.2. Işık mikroskobi bulguları:

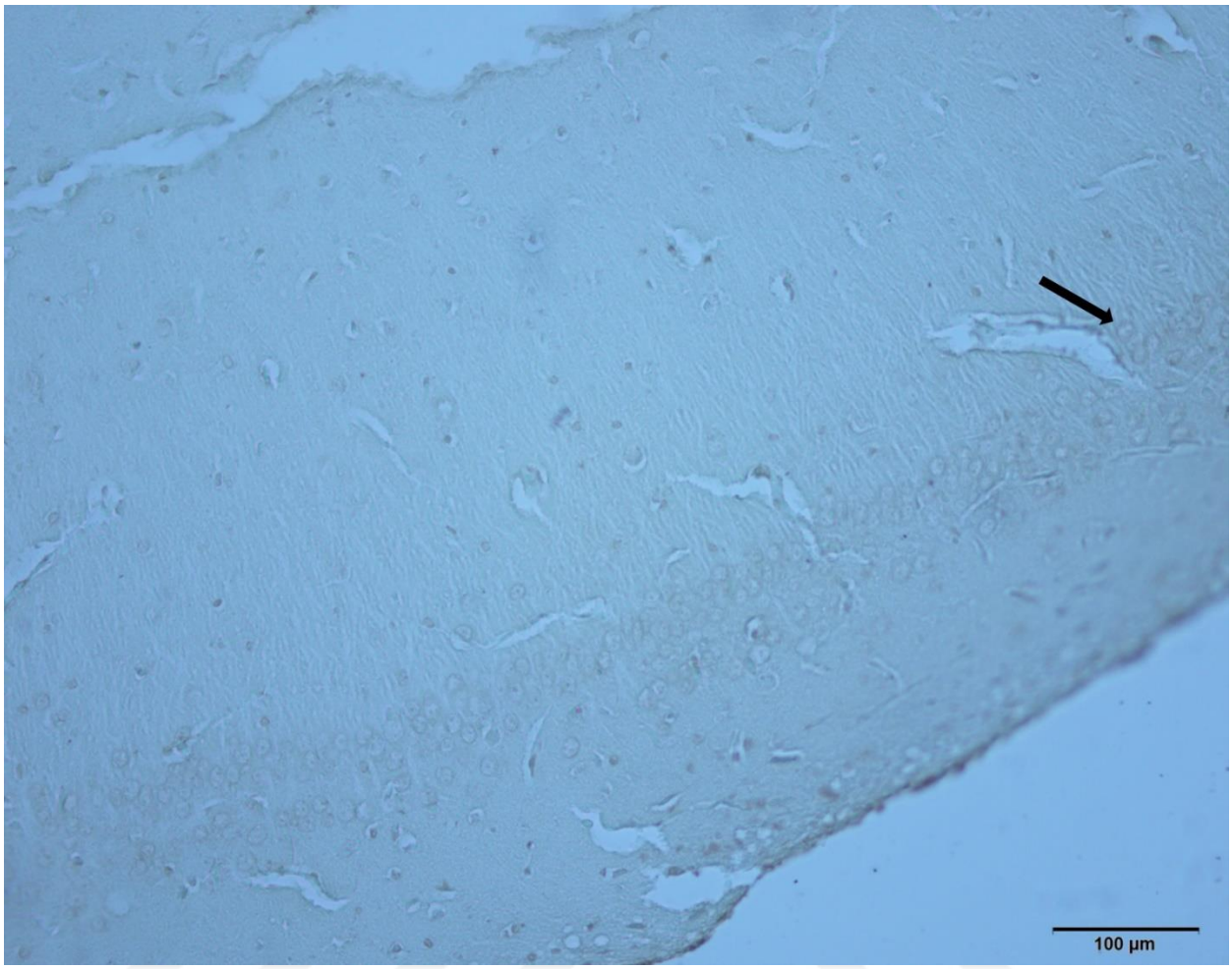
Çalışmamızın sonunda FA ile oksidatif stres ve apoptoza indüklediğimiz sıçanların hippocampuslerinde; Arbutus Unedo L. ekstratının etkilerini göstermek üzere beyin dokularının nöron hücreleri morfolojik olarak incelenmiştir. Yapılan Anti-Kaspaz-3 pozitif boyamalarında deney ve sham gruplarındaki apoptoz oranı ile FA ve kontrol grupları arasındaki apoptotik hücre oranları arasında ayrılmalar gözlenmiştir. (Şekil 4.5.;4.6.; 4.7.;4.8.; 4.9.;4.10.).



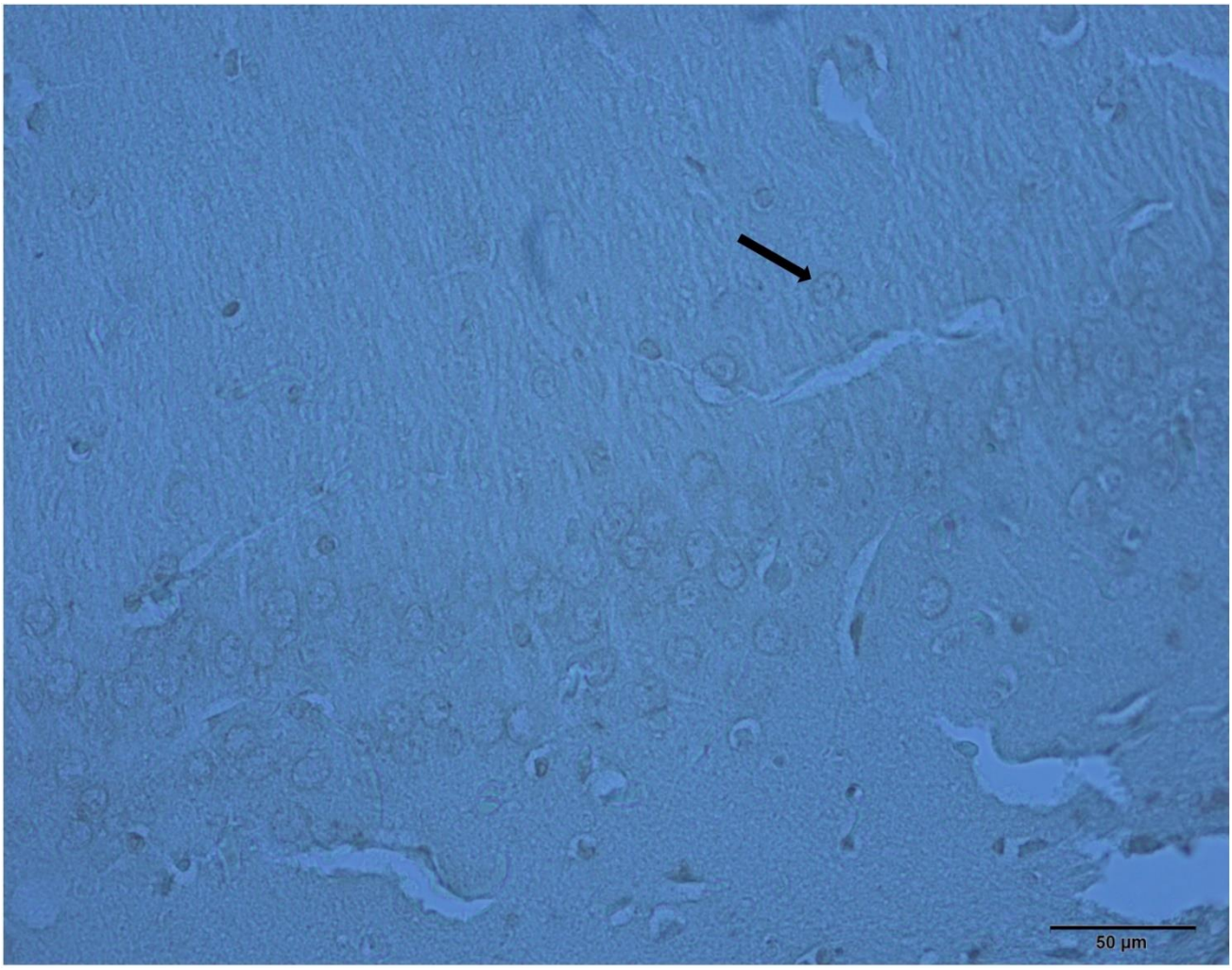
Şekil 4.5. KG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 20X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)



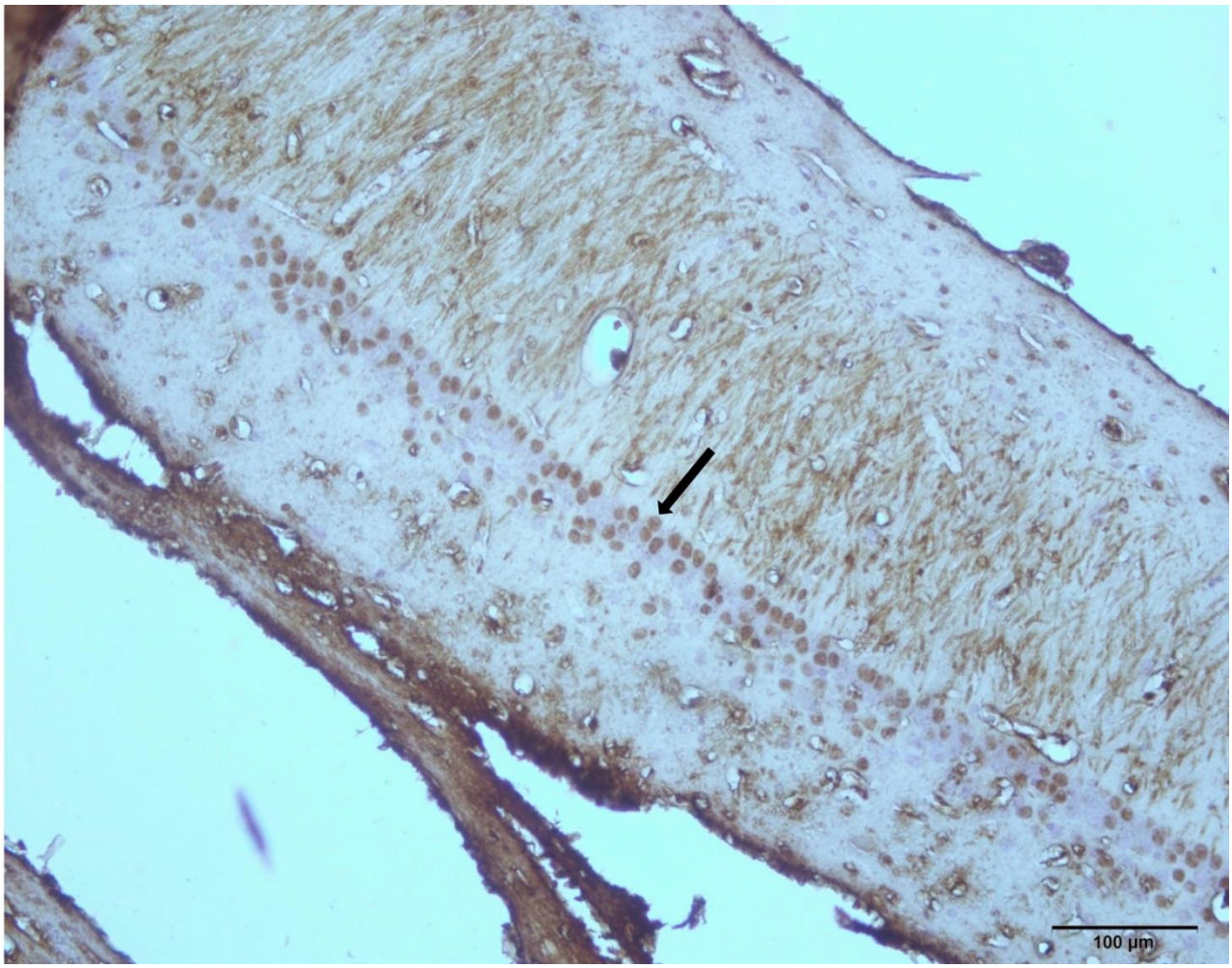
Şekil 4.6. KG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 40X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)



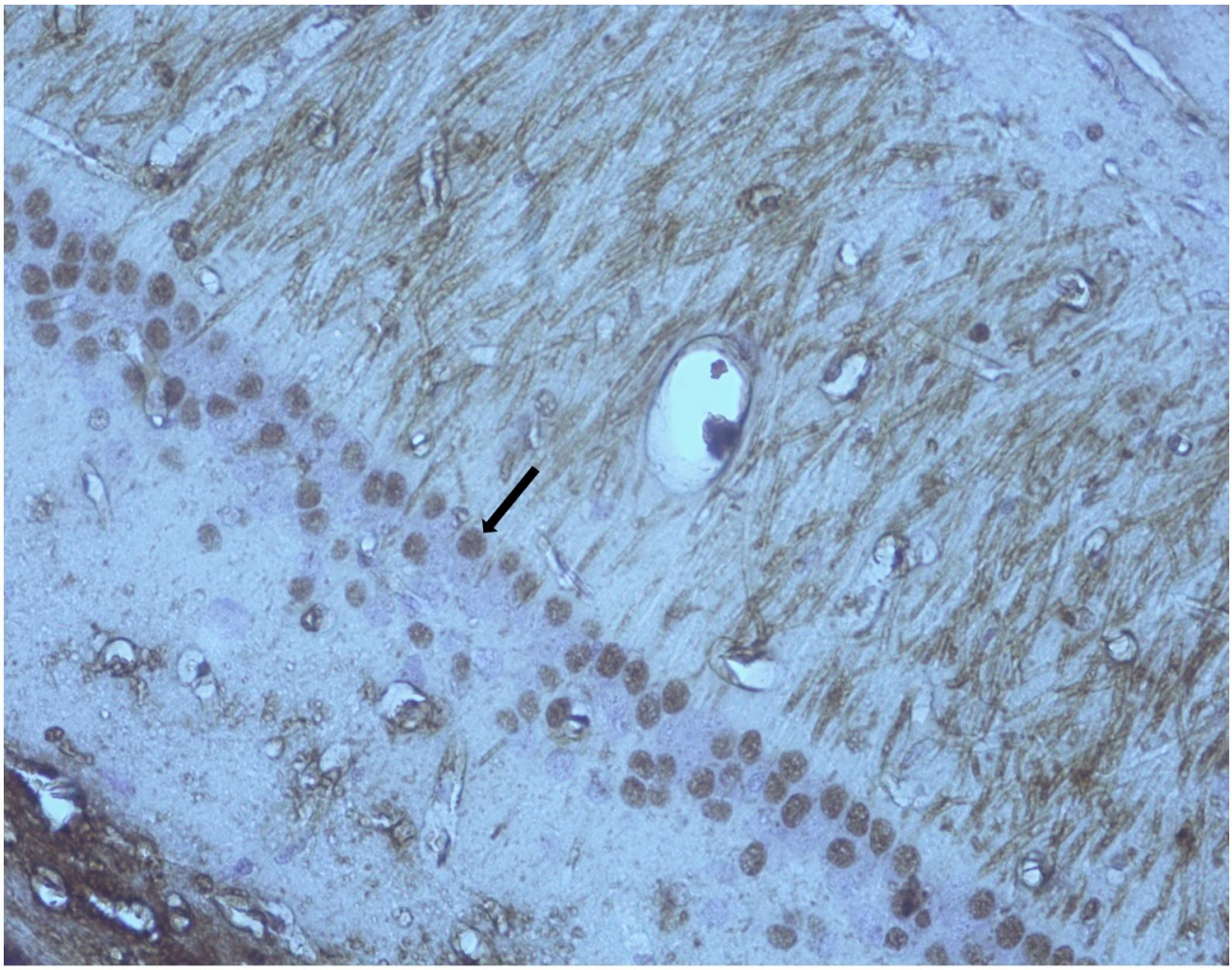
Şekil 4.7. SG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 20X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)



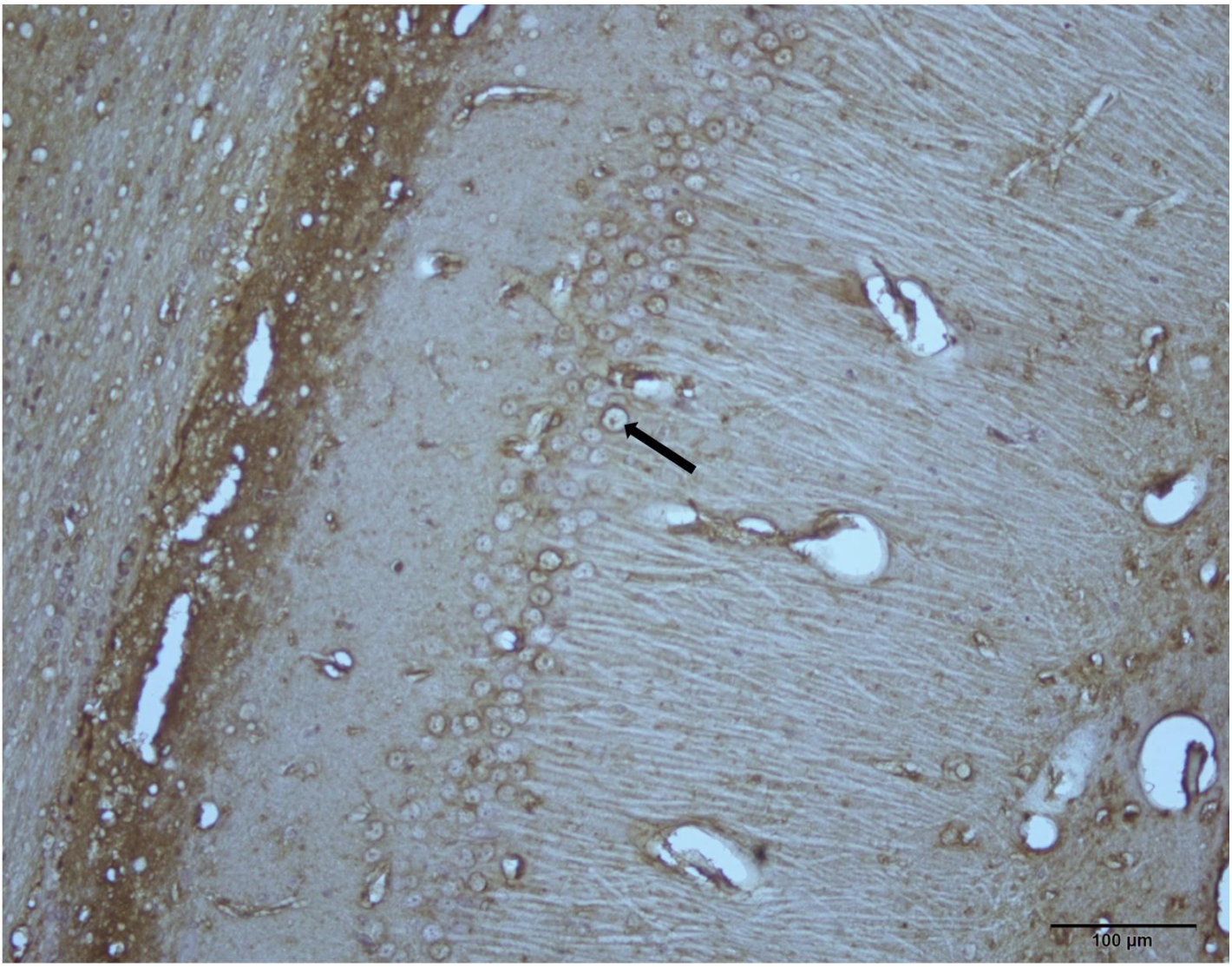
Şekil 4.8. SG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 40X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)



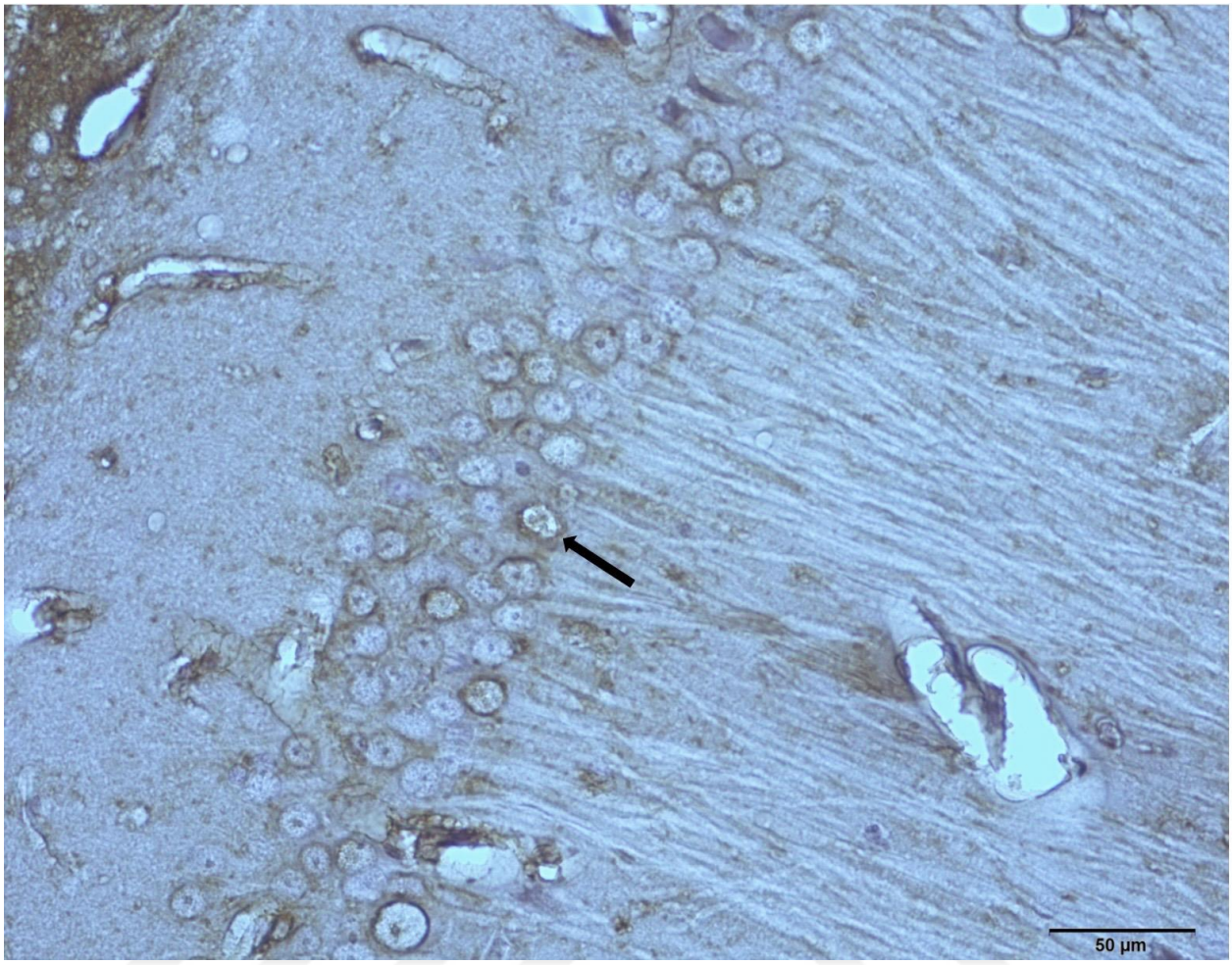
Şekil 4.9. FA sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 20X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)



Şekil 4.10. FA sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 40X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)

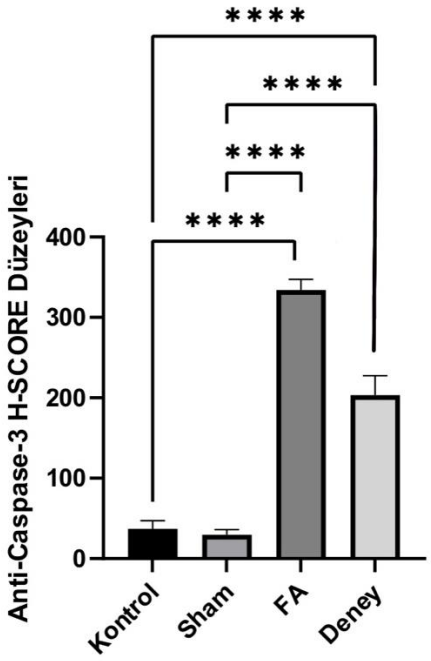


Şekil 4.11. DG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 20X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)



Şekil 4.12. DG sıçanların hippocampus CA3 bölgesine ait Kaspaz-3 işaretlenmesini gösteren ışık mikrografı 40X (Ok ile gösterilen immünpozitif hücre örneği)

Beyindeki apoptotik hücre sayısını ifade eden H-score değerleri incelendiğinde (Şekil 4.13) Deney ve FA gruplarının hem kontrol grubundan hem de sham grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir. FA grubunda ortalama olarak en yüksek ölü hücre sayısının görülmesi hem sham hem de kontrol gruplarının deney ve FA gruplarından anlamlı derecede az sayıda ölü hücre içermesi formaldehitin hippocampuste yaptığı hasara işaret etmektedir. Deney grubunda FA grubuna göre ortalama olarak daha düşük ölü hücre sayısı görülmüş olsa da bu fark anlamlı bulunmamıştır. Sham grubunda ortalama olarak kontrol grubuna göre daha düşük ölü hücre sayısı görülmüş olsa da bu fark anlamlı bulunmamıştır. Ancak A Undeo L özütünün beyindeki hücre ölümünü yavaşlatma eğiliminde olduğu söylenebilir.



Şekil 4.13. Gruplara ait Anti-Kaspaz-3 H-SCORE Düzeyleri

**** = p<0,0001

4.2. Biyokimya bulguları

Deneyde kullandığımız sıçanların biyokimyasal analizinde Serum BDNF, MDA, GSH ve NO değerlerine bakılmıştır.

Verilerin tanımlayıcı istatistikleri (ortalama, standart sapma) yapılmıştır. Normal dağılıma uygunluğu için Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı. Normal dağılıma uyan verilerin gruplar arası karşılaştırılması için ANOVA testi, korelasyon için Pearson testi, uymayan verilerin gruplar arası karşılaştırması için Kruskal-Wallis testi, korelasyon için Spearman testi uygulanmıştır. Gruplar arası fark çıkan parametreler için ikili grup testleri uygulandı (Tablo 4.2).

HAVA	10ppm FA + 20 mg/kg Aunedo L özütü	10ppm FA	10 mg/kg Aunedo L özütü

Tablo 4.2. MDA, BDNF, NO, GSH ve H-Score sonuçlarının gruplara göre karşılaştırılması

	Kontrol (n=9) Ort. ± SS	Deney (n=9) Ort. ± SS	FA (n=9) Ort. ± SS	Sham (n=9) Ort. ± SS	p
MDA	79,32 ± 27,48	84,24 ± 15,14	92,64 ± 34,88	71,55 ± 15,66	**p<0,05**
BDNF	4,43 ± 1,44	4,17 ± 1,37	3,51 ± 0,49	3,38 ± 1,27	p>0,05
NO	16,04 ± 5,42	12,62 ± 0,65	12,39 ± 0,95	12,83 ± 0,61	**p<0,05**
GSH	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,01	p>0,05
Hscore	37,11 ± 10,01	203,3 ± 24,08	334,22 ± 13,132	29,78 ± 6,52	**p<0,001**

MDA, NO ve H-score'un gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuş **(p<0,05, p<0,05 ve p<0,001)** ancak BDNF ve GSH'ın gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05, p>0,05) (Tablo 4.3)

Tablo 4.3. MDA, NO, H-score post-hoc ikili grup karşılaştırma testleri

	MDA	NO	H-score
Sham-Kontrol	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Sham-Deney	**p<0,05**	p>0,05	**p<0,01**
Sham-FA	**p<0,05**	p>0,05	**p<0,001**
Kontrol-Deney	p>0,05	**p<0,05**	**p<0,01**
Kontrol-FA	p>0,05	**p<0,01**	**p<0,001**
Deney-FA	p>0,05	p>0,05	p>0,05

İkili grup karşılaştırma testleri sonucunda Sham grubunun MDA değerleri hem Deney hem FA gruplarından anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0,05, p<0,05). Grupların ortalama MDA değerleri incelendiğinde; en düşük MDA değeri sham grubunda iken en yüksek MDA değeri FA grubundadır. FA'in oksidatif stres oluşturucu etkisi açıktır. A unedo L özütü uygulanan gruplar Sham ve Deney grubunda ortalama MDA değerlerinin düşme eğilimi gösterdiği gözlemlenmiştir. Deney grubuna uygulanan A unedo L özütünün FA'in oluşturduğu oksidatif stresi azaltma eğiliminde olduğu ancak bu düşüşün anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur. Sağlıklı ratlara uygulanan A unedo L özütünün MDA

düzeyini kontrol grubu ortalamasının da altına çekerek hem deney hem de FA grupları ile arasında anlamlı derecede MDA düzeyi farkını oluşturmuştur.

BDNF beyindeki hücrelerin plastisitesi, rejenerasyonu, hafıza fonksiyonlarında önemli role sahiptir. BDNF ortalama olarak en düşük Sham, en yüksek kontrol grubunda olduğu bulunmuş. Ancak gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0,05$) FA grubundaki BDNF düzeyinin ortalama olarak kontrol grubuna göre düşük olması FA'e bağlı hafıza fonksiyonlarının bozulması ile ilişkili olabilir. A undeo L özütünün FA'in BDNF üzerine negatif etkilerini kısmen düzelttiği söylenebilir. Ancak bu konuda örneklemi daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

NO düzeyleri incelendiğinde ortalaması en düşük grup FA grubuyken en yüksek grup kontrol grubudur. Deney ve FA grubunun NO değerleri kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. ($p<0,05$, $p<0,01$) Ancak deney ve FA gruplarında NO bakımından anlamlı bir fark olmamasından dolayı A undeo L özütünün formaldehite bağlı düşen NO düzeyine bir katkısı olmadığı söylenebilir.

GSH bakımından grupların ortalama değerleri birbirine çok yakın olup gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0,05$) FA ortamında bulunan ratlarda GSH düzeyinin etkilenmediği, A undeo L özütünün de GSH düzeylerini düzenleyici bir etki yapmadığı söylenebilir.

Beyindeki apoptotik hücre sayısını ifade eden H-score değerleri incelendiğinde Deney ve FA gruplarının hem kontrol grubundan hem de Sham grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir. FA grubunda ortalama olarak en yüksek ölü hücre sayısının görülmesi hem sham hem de kontrol gruplarının Deney ve FA gruplarından anlamlı derecede az sayıda ölü hücre içermesi formaldehitin hippocampuste yaptığı hasara işaret etmektedir. Deney grubunda FA grubuna göre ortalama olarak daha düşük ölü hücre sayısı görülmüş olsa da bu fark anlamlı bulunmamıştır. Sham grubunda ortalama olarak kontrol grubuna göre daha düşük ölü hücre sayısı görülmüş olsa da bu fark anlamlı bulunmamıştır. Ancak A undeo L özütünün beyindeki hücre ölümünü yavaşlatma eğiliminde olduğu söylenebilir.

Yapılan korelasyon analizlerinde MDA ile H-score arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur ($p<0,001$) (Tablo 4.4). Oksidatif stres indikatörü MDA ile beyin dokusunda hücre ölümünü ifade eden H-score arasında pozitif güçlü korelasyon olması, oksidatif stresin beyindeki apoptozisi indüklediğini (uyardığını) göstermektedir. Ancak BDNF, NO ve GSH ile H-score arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0,05$, $p>0,05$ ve $p>0,05$)

Tablo 4.4. MDA, BDNF, NO, GSH ve H-score korelasyonu

	H-score
MDA	**KK: 0,558** **p <0,001**
BDNF	KK: -0,085 p>0,05
NO	KK:-0,264 p>0,05
GSH	KK: -0,079 p>0,05

5. TARTIŞMA

Mutajenik ve kanserojenik etkilere sahip olan FA; proteinler, yağ asitleri DNA ve RNA ile non-enzimatik olarak birleşme eğilimindedir. Literatürde bakıldığında FA ile yapılan çalışmalarda, FA'nın birçok sistem üzerine olumsuz etkilerinden bahsedilmiştir (Smith 1992; Kilburn, Warshaw & Thornton 1987; Morgan, Patterson, & Gross, 1986). FA inhalasyonu etkilerini başta solunum yolu olmak üzere gözler, MSS ve ciltte akut ve kronik olarak gösterir (Attia ve ark., 2016) FA canlı organizmada endojen olarak bulunabildiği gibi ayrıca çevresel maruziyet ile de mevcut olabilir (Heck ve ark., 2004). Hematolojik etkileri de bulunan FA'nın insan kanındaki fizyolojik konsantrasyonu 0,1 mmol/L'dir. İnsan sağlığı üzerine oldukça olumsuz etkileri bulunan FA'in organizmada metabolit olarak üretildiğini göz önüne alınırsa, FA maruziyetinden daha çok FA'in hangi düzeyde sağlık üzerine olumsuz etki oluşturduğunun bilinmesi önemlidir.

FA ile yapılan araştırmalara göre FA'e respiratuvar olarak maruz kalan sıçanların tüylerinde sararma, maruziyet esnasında sağa sola kaçınma birbirleri üzerine kapanma gibi hareketler belirtilmiştir (Arıcan, 2005; Aydın, 2015) Bizim de çalışmamızda literatüre pararlel olarak benzer kaçınmalar ve tüylerde sararma ile göz kırpma hareketlerinde artış ve hareketlerde ilk önce kaçınma; ilerleyen dakikalarda hareketlerde yavaşlama eylemi fiziksel olarak not edilen gözlemler arasında idi.

Biyokimyasal olarak FA organizma üzerinde mitokondriyal zar potansiyeline etki göstererek oksijen radikallerinin oluşumunu indüklediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. FA reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetikleyerek toksikolojik ve karsinojenik etki oluşturmaktadır (Tang ve ark., 2011). Pek çok hücresel yolak üzerinde etkisi bulunan FA'in yapılan bir çalışma ile MSS'nde nörodejeneratif değişiklikler oluşturarak motor aktiviteyi yavaşlattığı belirtilmiştir (Boja ve ark., 1985). Bizim çalışmamızda da FA maruziyeti uygulanan gruplardaki sıçanlar; maruziyet öncesi motor hareketleri normal iken maruziyet sonrası hareketlerde yavaşlamalar gözlemlenmesi bu açıklamayı doğrular niteliktedir.

2014 yılında yapılan bir çalışma ile akut oral FA maruziyeti sonrasında MSS'deki apoptotik hücre sayısı değerlendirilen tavşanlarda kortikal ve hippokampal düzeyde apoptotik hücre sayısında artış gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre apoptozisde görevli önemli belirteçlerden olan Bcl-2 geni tarafından kodlanan bcl-2 proteini ile hem intrensek hem de ekstrensek apoptozda rol oynayan Kaspaz-3'teki artışın anlamlı düzeyde olduğu belirlenmiştir (Arıcı ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda da immünohistokimyasal değerlendirmeleride benzer şekilde FA maruziyeti uygulanan gruplarda apoptotik hücre sayısında artış saptanmıştır.

2015 yılında yapılan bir çalışmada oksidatif stres belirteçlerinden biri olan MDA ile yapılan bir çalışmada Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)'nda ve beyin dokusunda MDA tespit edilmiştir (Pisoschi, & Pop, 2015). Lipit peroksidasyonu ve oksidatif stresin göstergesi olan MDA'nın bir parametre olarak kullanıldığı 2004 yılında yapılan bir çalışmada; MDA değerinin FA maruziyeti oluşturulan grupta anlamlı şekilde yükseldiği gözlenmiştir (Zararsız ve ark., 2004). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da en yüksek MDA değeri FA grubunda tespit edilmiştir. Bu durum oksidatif hasarın en fazla FA grubunda meydana geldiği şeklinde yorumlanabilir. Güçlü bir antioksidan olan Arbutus Unedo L. ekstratı uygulanan deney ve sham grubunda ise MDA değerinin düşme eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Bu durumda AUE 'nın oksidatif hasarı dengelemekde etkili olduğu şeklinde açıklanabilir. Tüm gruplar arası değerlendirmede en düşük MDA değerinin Sham grubunda olması ise halihazırda ROS ve antioksidanlar arasındaki dengeyi etkileyecek bir etken olmaması ve doğal apoptozis sürecinde meydana gelecek değişiklikler üzerinde de AUE'nin olumlu etkiler oluşturduğu şeklinde yorumlanabilir.

GSH oldukça güçlü bir antioksidan olup ROS'ne karşı savunma sisteminin bir üyesidir. Literatürde oksidatif stres oluşturulan hayvanlar ile yapılan çalışmalarda oksidatif stres arttıkça GSH düzeyinin de yükseldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Farelerle yapılan bir çalışmada glutatyon seviyesi düşüklüğünde; akciğer hasarının oksijene bağlı olarak daha fazla olduğu öne sürülmüştür (Smith ve ark., 1993). Bizim çalışmamızda ise oksidatif stresin en yüksek MDA değeri ile en yüksek oranda tespit ettiğimiz FA grubu ile diğer gruplar arasındaki GSH değeri arasında ilişki bulunamamıştır.

Organizmada doğal olarak bulunan FA metabolitlerin bir sonucudur. Vücuda çevresel maruziyet ile dışardan alınan FA, depo edilmez FDH (Formaldehit dehidrogenaz) ile formik asite yükseltgenir. Formik asit primatlarda memelilere oranla daha yavaş bir şekilde karbondioksit (CO_2) ve suya metabolize olur. Formik asit gözler ve MSS'nde lezyonlara neden olur (Monteiro Riviere, & Popp, 1986; Usanmaz, Akarsu, & Vural, 2002). FA ayrıca DNA molekülü gibi diğer moleküllerle çapraz bağlar oluşturarak canlı organizmada değişikliklere neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada FA maruziyetine uğratılan rat grubunda cerebral dokularda oksidatif stresin arttığı ve buna paralel olarak DNA hasarı rapor edilmiştir (Çiftçi ve ark., 2015). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre en yüksek oksidatif hasar FA grubunda yaşanmıştır.

2013 yılında yapılan bir çalışmada FA maruziyetine uğratılan ratlarda öğrenme ve hafızaya ilişkin dejenerasyonlar ile hippocampus bölgesindeki apoptotik hücre sayısında artış rapor edilmiştir (Tang ve ark., 2013). Bizim de çalışmamızda FA maruziyetine bağlı

olarak FG ve DG'nun immünohistokimyasal değerlendirmelerinde apoptotik hücre indeksi ve nöronal hasar arasında bağlantı kurulmuştur. Hippocampus CA3 bölgesinde apoptotik hücre indekslerinin FG ve DG sıçanlarda SG ve KG'na oranla anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Canlı organizmada antioksidanlar serbest radikaller ile bir denge halinde olmalıdır. Serbest radikallerden olan ROS türleri yükseldğinde antiosidan ve serbest radikal dengesi bozulur ve oksidatif stres meydana gelir. Bozulan bu dengeyi sağlamak üzere fenolik bileşikler önem arzetmektedir. Son yıllarda fenolik bileşikler içeren meyvelerin çeşitli hastalıklarda koruyucu tedavi edici özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Bunun sebebi içerdikleri yüksek antioksidan miktarlarıdır (Park ve ark., 2014). Literatüre bakıldığında yüksek antioksidan içerikli farklı meyve ve çekirdekleri ile yapılan çalışmalarda olumlu nöroprotektif etkiler ön plana çıkmaktadır. Bizim de çalışmamız kullandığımız AUE benzer şekilde içeriğindeki fenolik asitler ve flavonoidler ile oldukça güçlü bir antioksidandır.

2019 yılında yapılan bir çalışma ile yüksek flavonoid bileşikler içeren üzüm çekirdeği ekstresi verilen parkinson hastası fare modelinde ROS'nin seviyesinin azaldığını ve iltihaplanman düştüğünü belirtmişlerdir (Youssef ve ark., 2019). Antioksidan, antienflamatuar, antiapoptoz özelliklere sahip olan üzüm çekirdeği ile hipoksik-iskemik yenidoğanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada üzüm çekirdeğinin beyin hasarını azalttığını ortaya koymuşlardır (Tu ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda DG apoptotik hücre sayısının FG na göre ortalaması daha olarak tespit edilmiş olsa da bu fark anlamlı değildi. Yine de DG sıçanların apoptotik hücre sayısının FG göre ortalama daha düşük olması AUE'nın apoptozisi yavaşlatma eğiliminde olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Apoptoza uğrayan hücrede sitoplazma küçülüp büzüşmeye başlar. Bazı yapısal proteinlerin parçalanması ile nucleus yoğunlaşmaya başlar ve genellikle çekirdek kromatin, çekirdek zarının iç tarafa doğru yer değiştirir, bu sebeple at nalı veya C harfine benzer bir şekil alır. Küçülmüş membran ile çevrili hücreler makrofajların dikkatini çeker. Değişen bu apoptotik yapıların içerisinde sitoplazma, nukleus parçacıkları ve sıkıca sarılmış organeller bulunur (Mountz ve Zhou 2001, Pınarbaşı 2007, Trump ve diğ 1997). Bizim çalışmamızdan elde edilen immünohistokimyasal görüntülemelerde FG ve DG ratlara ait hippocampus kesitlerinde büzüşmüş membran ile çevrili apoptotik hücreler dikkat çekmekteydi. Bu grupların hem mikroskobik görüntülemelerde hem de H-Score analizinde çekirdek yapısındaki apoptotik değişimleri yukarıdaki ifadeyi doğrular şekilde idi. FG ve DG ratların mikroskobik görüntüleri karşılaştırıldığında belirtilen özelliklere sahip hücre formunun FG

da olduğu gözlenmekteydi. H-score değerlerine göre FG'nun apoptotik hücre sayısının DG 'na göre daha olması AUE'nın nöroprotektif etkisi olduğunu göstermektedir.

Glutatyon, glutatyon peroksidazın iki substratından biridir ve metabolizmanın serbest radikallere karşı savunmasında aktif bir öğedir. Yoğunluğu ve hücreden bırakılma hızı oksidatif stresin bir göstergesidir. Oksidatif stres ve GSH düzeyleri arasında pozitif ilişki bulunmaktadır. Literatüre bakıldığında hayvan deneyleri ile yapılan araştırmalarda oksidatif stres arttığında GSH düzeyleri de yükselmektedir (Smith vd, 1993) . Literatürden farklı olarak çalışmamızdaki GSH değerleri bakımından grupların ortalama değerleri birbirine çok yakın olup gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durum FA ortamında bulunan ratlarda GSH düzeyinin etkilenmediği, A undeo L özütünün de GSH düzeylerini düzenleyici bir etki yapmadığı şeklinde yorumlanabilir.

NO stres anında mesajcı rol oynayan ve ROS ile sürekli olarak iletişim halinde olan bir serbest radikaldir. NO'in proapoptotik etkilerinin yanında anti-apoptotik etkileri de bulunmaktadır. Kısa ömürlü olan NO son yıllarda biyolojik önemi yapılan çalışmalar ile ön plana çıkmıştır (Huerta vd, 2008). Stres anında mitokondri üzerinde etki göstererek SitC salınımını uyararak apoptozisi indüklemektedir. SitC salınımı çeşitli mekanizmalar ile hücresel kalsiyum salınımına sebep olur. Bu durum hücre ölümü yani apoptozis ile sonuçlanır (Zou vd, 1999).

2000 yılında yapılan bir çalışma ile NO'in kollateral damar oluşumunu arttırarak tümör hücrelerinin büyüme ve metastazına sebep olduğu tespit edilmiştir (Jadeski ve ark., 2000). NO seviyelerindeki farklılaşmanın apoptoziste önemli bir belirteç olduğu pek çok çalışma ile öne çıkarılsada, bazı mekanizmalar henüz açık değildir (Inagaki ve ark., 1999)

Çalışmamızın sonuçlarına göre, literatüre paralel şekilde FA maruziyeti ile apoptozis arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Hippocampus dokularında formaldehit maruziyetine bağlı olarak apoptotik hücre oranlarında diğer gruplara oranla belirgin artış gözlenmiştir. Biyokimyasal ve histolojik veriler doğrultusunda Arbutus Unedo L ekstratı uygulanan gruplardaki hücre ölümlerinin uygulanmayan gruplara göre azaldığı tespit edilmiştir.

FA özellikle kadavra tahnit laboratuvarlarında sık kullanılan oldukça reaktif bir serbest radikaldir. Literatür verilerine göre FA ile çalışan meslek grupları özellikle kronik maruziyet yaşayan gruplarda sinir sistemi üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. FA'in hippocampus üzerine etkileri öğrenme ve hafıza ile ilgili dejeneratif etkilerini minimize edebilecek AUL gibi yüksek antioksidan içeriklerinin çok yönlü araştırılmasının hücresel düzeyde oluşabilecek hasarların engellenmesine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

5.1. Sınırlılıklar

Çalışmamızın hazırlık ve deney aşamasının özellikle ilk zamanlarının Covid-19 pandemisine denk gelmesi nedeniyle; uluslararası ulaşım aksaklığına bağlı ithal kitlerin geç gelmesi ve hatalı çıkması gibi sıkıntılar yaşanmıştır. Ulaşım ve malzeme temininde yaşadığımız sıkıntılar deney süresinin planladığımız süreden daha uzun sürmesine sebep olmuştur; ithal olarak temin edilen TUNEL kitinin geç gelmesi ve hatalı çıkması yaşadığımız aksaklıklardan biridir. Yeniden kit temin etmek için gereken sürede sıçanların deney için uygun gelişim haftası kaçırılacağı için apoptozis değerlendirmesi için Kaspaz-3 metodu ile çalışılmıştır. Bu konular yaşadığımız sınırlılıklardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deney öncesi ve sonrası ağırlıklar eşleştirilmiş t-testi sonuçlarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0,05$)

Beyindeki apoptotik hücre sayısını ifade eden H-score değerleri incelendiğinde deney ve FA gruplarının hem kontrol grubundan hem de sham grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir. FA grubunda ortalama olarak en yüksek ölü hücre sayısının görülmesi hem sham hem de kontrol gruplarının Deney ve FA gruplarından anlamlı derecede az sayıda ölü hücre içermesi formaldehitin hippocampuste yaptığı hasara işaret etmektedir. Deney grubunda FA grubuna göre ortalama olarak daha düşük ölü hücre sayısı görülmüş olsa da bu fark anlamlı bulunmamıştır. Sham grubunda ortalama olarak kontrol grubuna göre daha düşük ölü hücre sayısı görülmüş olsa da bu fark anlamlı bulunmamıştır. Ancak A undeo L özütünün beyindeki hücre ölümünü yavaşlatma eğiliminde olduğu söylenebilir.

Lipit peroksidasyonunun ve oksidatif hasarın önemli bir göstergesi olan MDA ile yapılan değerlendirmelerde en yüksek MDA değeri FA grubundadır. FA'in oksidatif stres oluşturucu etkisi açıktır. A unedo L özütü uygulanan gruplar sham ve d eney grubunda ortalama MDA değerlerinin düşme eğilimi gösterdiği gözlemlenmiştir. Deney grubuna uygulanan A unedo L özütünün FA'in oluşturduğu oksidatif stresi azaltma eğiliminde olduğu ancak bu düşüşün anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur. Sağlıklı ratlara uygulanan A unedo L özütünün MDA düzeyini kontrol grubu ortalamasının da altına çekerek hem deney hem de FA grupları ile arasında anlamlı derecede MDA düzeyi farkını oluşturmuştur.

Yapılan korelasyon analizlerinde MDA ile H-score arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur ($p<0,001$). Oksidatif stres indikatörü MDA ile beyin dokusunda hücre ölümünü ifade eden H-score arasında pozitif güçlü korelasyon olması, oksidatif stresin beyindeki apoptozisi indüklediğini (uyardığını) göstermektedir.

İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde DG ve FA grubu hippocampus bölgesindeki apoptotik hücre sayısı KG ve SG' na kıyasla daha yüksek bulunmuştur.

Araştırma çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ışığında; apoptotik hücre sayısının en yüksek FA grubunda olması, FA 'in hippocampuste sebep olduğu oksidatif hasara işaret etmektedir. FA grubundaki apoptotik hücre sayısının deney grubuna göre yüksek olması ve sham grubunda ise tüm gruplara oranla en az apoptotik hücre sayısı varlığı AUE'nın cerebral hücre hasarını azalttığı şeklinde yorumlanabilir.

BDNF değerlerinin KG ratlarda FA grubu ratlara oranla daha yüksek olması; nöranal ölüme protein düzeyinde ölümün de eşlik ettiği şeklinde yorumlanabilir. BDNF değerinin sham grubunda, FA grubuna göre daha düşük bulunması ise AUE 'nin FA maruziyetine bağlı olarak ortaya çıkan negatif etkileri kısmen düzelttiği şeklinde yorumlanabilir.

7. KAYNAKLAR

Altıner A, Atalay H, Bilal T. Bir antioksidan olarak E vitamini. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi. 2017;6 (3):149-157.

Arıcan RY. Formaldehit inhalasyonunun sıçan burun mukozosındaki hücrelerarası bağlantı kompleksleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005.

Arici, S., Karaman, S., Dogru, S., Cayli, S., Arici, A., Suren, M., ... & Kaya, Z. (2014). Central nervous system toxicity after acute oral formaldehyde exposure in rabbits: an experimental study. Human & experimental toxicology, 33(11), 1141-1149.

Aşık G. Formaldehit maruziyeti sonucu sıçan testislerinde oluşan morfolojik değişiklikler üzerine üzüm çekirdeği ekstratının (vitis vinifera) koruyucu etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2016

Ayaz FA, Küçükismailoğlu M, Reunanen M. Sugar. Non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (Arbutus Unedo L.var.ellipsoidea) fruits. Journal of Food Composition and Analysis.2000; 13:171-177.

Aydın S. Formaldehite maruz bırakılan işçilerin immün ve genetik göstergelerinin incelenmesi. Doktora tezi. Hacettepe. Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,2009.

Aydın S. Sıçan akciğer ve karaciğerinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara ve irisin hormon değişimlerine karşı karnozinin etkisinin biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2015.

Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. The American Journal of Medicine. 1991 Sep 30;91(3C):2S-13S. doi: 10.1016/0002-9343(91)90278-6. PMID: 1928207.

Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis. Cancer Biology. 1995; 6:3-16.

Benraiss, A., Chmielnicki, E., Lerner, K., Roh, D., & Goldman, S. A. (2001). Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. Journal of Neuroscience, 21(17), 6718-6731.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? Metabolism: Clinical and Experimental. 2000; 49 (2 Suppl.1):3-8. doi:10.1016/s0026-. 0495(00)80077-3.

Boja JW, Nielsen JA, Foldvary E, Truitt EB Jr. Acute low-level formaldehyde behavioural and neurochemical toxicity in the rat. rogress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.1985;9(5-6):671-4. doi: 10.1016/0278-5846(85)90038-7. PMID: 4089191.

Bordiuk OL, Smith K, Morin PJ, Semënov MV. Cell Proliferation and Neurogenesis in Adult Mouse Brain. PLoS ONE 2014, 9, e111453.

Bramham CR, Southard T, Sarvey JM, Herkenhem M, Brady LS. Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neutrotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. Journal of Comparative Neurology. 1996; 368:371-382.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978;52:302-10.

Burçak G., Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. Cerrahpaşa Tıp Dergisi. 2004; 35:159-69.

Cameron HA, Hazel TG, McKay RD. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. Journal of Neurobiology. 1998;36: 287-306.

Canbilen A, Sezen S, Avunduk MC, Con NE (1999). Formaldehit ve toksik etkileri. Genel Tıp Dergisi,9:33-39.

Castrén E, Thoenen H, Lindholm D. Brain Derived neurotrophic factor messenger RNA is. expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem neuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus. Neuroscience.1995;64: 71-80.

Chessa I., Nieddu G., 2004. Description of the Strawberry Tree. Dipartimento di Economia e Sistemi Arborei, Università di Sassari–Italy.

Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subhects treated with antidepressant medication. Biological Phychiatry.2001;50:260-265.

Cohen JJ. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. American College of Physicians, CHEST. 1993;103: 00-101.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB Journal. 2003 Jul;17(10):1195-214. doi: 10.1096/fj.02-0752rev. PMID: 12832285.

Cumming MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. The American Journal of Surgical Pathology. 1997; 21:88-101.

Çelikel G, Demirsoy L, Demirsoy H. The Strawberry Tree (Arbutus unedo L.) Selection in Turkey. Scientia Horticulturae.2008;118:115-119.

Çiftçi G, Aksoy A, Cenesiz S, Ünlü Söğüt M., Yarım G. F., Nisbet C., Güvenç D., Ertekin A. Therapeutic Role of Curcumin in Oxidative DNA Damage Caused by Formaldehyde. Microscopy Research and Technique. 2015; 78 (5):391-395.

Çuğlan S. Gebe ratlarda formaldehit maruziyetinin fetusların morfolojik yapıları ile karaciğer dokusunun gelişimi üzerine zararlı etkilerinin araştırılması; chrysin'in muhtemel koruyucu rolünün incelenmesi. Yüksek lisans tezi. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012.

Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/ cGMP signaling pathway. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1999; 1411:334-350.

Diplock AT, "Healty Lifestyles Nutrition and Physical Activity: Antioxidant Nutrients," ILSI Europe Concise Monograph Series, Belgium, 1998, p. 59.

Dobbing J. Undernutrion and the developing brain: The revelance od animal models to the human problem. American Journal of Diseases of Children. 1970; 120: 411.

Durackova Z (2010). Some current insights into oxidative stress. Physiological Research, 59(4):459-469.

Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, Shah AM. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. Biochemical SocietyTransactions. 2006 Nov; 34:960-964.

Dzoljic E, De Vries R, Dzoljic MR. New and potent inhibitors of nitric oxide synhase reduce motor activity in mice. Behavioural Brain Research. 1997;87: 209-212.

E.F. Hartree. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry Volume 48, Issue 2, August 1972, Pages 422-427.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics.1959; 82: 70-77.

Elmore D. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.Toxicologic Pathology. 2007; 35:495-516

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. Nature Medicine. 1998;4(11):1313-7.

Erzurumlu R, Sengul G, Ulupınar E. Nöroanatomi. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2019.s:104-114.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology.1990;186 (C):1350-53.

Eşsizoğlu A, Yıldırım EA, Mengi M, Oral T, Yurdakoş E. Kronik İmmobilizasyon stresine maruz bırakılmış sıçanlarda 7-Nitroindazolün anksiyete ve mekansal bellek üzerine etkileri. Nöropsikiyatri Arşivi. 2009; 46:157-162.

Fló-Neyret C, Lorenzi-Fılho G, Macchione M, Garcia MLB, Saldiva PHN. (2001). Effects of formaldehyde on the frog's mucociliary epithelium as a surrogate to evaluate air pollution effects on the respiratory epithelium. Brazilian Journal of Medical and Biological Research,34(5):639-643.

Frota ER, Rodrigues DH, Donadi EA, Brum DG, Maciel DR, Teixerira AL. Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) after multiple sclerosis relapse. Neuroscience Letters.2009;460:130-132.

Gielen A, Khademi M, Muhallab S, Olsson T, Piehl F. Increased brain derived neurutrophic factor expression brain derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing multiple sclerosis patients. Scandinavian Journal of Immunology. 2003; 57:493-497.

Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. Journal of Clinical Investigation.2005 Mar;115(3):500-8. doi: 10.1172/JCI24408.

Gomes MFFN.2011. Strategies for the improvement of Arbutus unedo L. (strawberry tree): in vitro propagation, mycorrhization and diversity analysis. Universidade De oimbra PhD thesis, Portugal, 216p.

Gökpınar Ş, Koray T, Akçiçek E, Göksan T, Durmaz Y. Algal Antioksidanlar. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi. 2006;23(1/1):85-89.

Gönül AS, Akdeniz F. Depresyon, Nöroplastite, Nörogenesis ve Nörotrofik Faktörler. Klinik Psikiyatri,2002; 4:51-56.

Gözlekçi, Ş., Aklaya, C.E., Yaşin, D., 2003. Antalya çevresinde doğal olarak yayılış gösteren çilek ağacı (Arbutus andrachne L.)'nın bazı fenolojik ve pomolojik özelliklerinin incelenmesi. Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu. 472-475.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical Chemistry. 1995 Dec;41(12 Pt 2):1819-28. PMID: 7497639.

Guyton A.C. Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 1989;980-82.

Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Molecular Aspects of Medicine. 1985;8(2):89-193. doi: 10.1016/0098-2997(85)90001-9. PMID: 3908871.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants-quo vadis? Trends in Pharmacol Sciences. 2011 Mar;32(3):125-30. doi: 10.1016/j.tips.2010.12.002. Epub 2011 Jan 6. PMID: 21216018.

Halliwell B, Gutteridge JMC Free Radicals in Biology and Medicine. 3th ed. Oxford: Oxford Science Publications.1999;617-624.

Heck HD. Casanova-Schmitz M, Dodd PB, Schachter EN , Witek TJ , Tosun T. Formaldehyde (CH2O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH2O under controlled conditions. American Industrial Hygiene Association Journal, 01 Jan 1985, 46(1):1-3. DOI: 10.1080/15298668591394275.

Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. Pulmonary Pharmacology&Therapeutics. 2001;14(6):409-20. doi: 10.1006/pupt.2001.0319. PMID: 11782121.

Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of inflammation: Impications for the therapy of multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology. 2000; 107:161-166.

Howard PH (1990).Formaldehyde (Howard, P.H. Ed.) Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals (p.342-350). Chelsea, MI: Lewis Publishers.

Howells DW, Porritt M, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donan GA. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's diseases substantia nigra. Experimental Neurology. Experimental Neurology. 2000; 166: 127-135.

Huerta S, Chilka S, Bonavida B. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics. International Journal of Oncology, 2008;33:909-27.

IARC International agency for research on cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. https://monographs.iarc.fr/wp-content7uoloads/2018/06/mono88.pdf, 39-325. (Erişim: 01.05.2023).

Imbus HR. Clinical evaluation of patients with complaints related to formaldehyde exposure. Journal of Allergy and Clinical Immunology.1985;76:831-40.

IPCS (1989). The International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria Monographs: Formaldehyde. http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc89.htm. (Erişim :1 Mayıs 2023)

IPCS (2002). The International Programme on Chemical Safety. Concise international chemical assessment document (CICADS),40. https://www.inchem.org/pages/cicads.html. (Erişim :1 Mayıs 2023)

Inagaki R, Taniguchi T, Sakai T, Hayashi N, Ishii I, Muramatsu I. Anticancer drugs inhibit induction of NO synthase in rat in vivo. General Pharmacology.32:185-188.

İslam A, Pehlivan F. Marmara adasında yetişen kocayemişlerin (Arbutus unedo L.) pomolojik özellikleri. Akademik Ziraat Dergisi 5(1):13-20 (2016) ISSN: 2147-6403 http://azd.odu.edu.tr

Jadeski L, Hum K, Lala PK. Nitric oxide promotes murine mammary tumour growthand metastasis by situmulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis. İnternationalJournal of Cancer.2000;86:30-39.

Jiang J, Zhou CF, Gao SL, Tian Y, Wang CY, Wang L, Gu HF, Tang XQ. BDNF-TrkB pathway mediates neuroprotection of hydrogen sulfide against formaldehyde-induced toxicity to PC12 cells. PLoS One.2015;10(3): e0119478.

Karacan K, Baylan H, Erdogan M, Arslan F. A Review: A look At Formaldehyde. Journal of Human Rhythm. 2017;3(3): p.168-171.

Karadeniz, T., Kurt, H. ve Kalkışım, Ö. (1996). Yomra(Trabzon) çevresinde yetişen kocayemiş kocayemiş (Arbutus Unedo L.) tiplerinin meyve özellikleri üzerinde çalışmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 6(4):65-70.

Karadeniz, T., Şişman, T., 2003. Giresun'da yetiştirilen bir kocayemiş (Arbutus unedo L.) tipinde biyolojik özellikler. Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu, 47-49.

Kazak F, Yarım GF. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi. 2015;10(2):120-129. DOI: 10.17094/avbd.02290.

Kiess W, Brian G. Hormonal Control of Programmed Cell Death/Apoptosis. European Journal of Endocrinology. 1998; 138:482-491.

Kilburn 1KH. Neurobehavioral impairment and seizures from formaldehyde. Archives of Environmental Health. 1994; 49(1):37-44. Https://doi.org/10.1080/00039896.1994.9934412.

Kilburn KH, Warshaw R, Thornton JC. Formaldehyde impairs memory, equilibrium, and dexterity in histology technicians: Effects which persist for days after exposure. Archives Environmental Health. 1987; 42:117-120.

Kiliç N, Malhatun E, Elmali E, Altan N. An investigation into the Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Glutathione peroxidase activity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Muscle Tissue. General Pharmacology. 1988; 30:399-401.

Kilburn, K. H., Warshaw, R., Boylen, C. T., Johnson, S. J., Seidman, B., Sinclair, R., & Takaro, T. (1985). Pulmonary and neurobehavioral effects of formaldehyde exposure. Archives of Environmental Health: An International Journal, 40(5), 254-260.

Kleppisch T, Feil R. cGMP signalling in the mammalian brain role in synaptic plasticity and behaviour. Handbook of Experimental Pharmacology. 2009; 191:549-579.

Knierim JJ. The hippocampus. Current Biology.2015;25(23):1116-1121.Https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.10.049.

Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C. Oxidative stress and electron spin resonance. Clinica Chimica Acta. 2006 Feb;364(1-2):61-6. doi: 10.1016/j.cca.2005.05.016. Epub 2005 Aug 25. PMID: 16125687.

Lessman V, Gottman K ve Malcangio (2003). Neutrophin secretion: Current facts and Futute prospect. Progges in Neurobiology, 69 (5), 69 (5) 341-367. doi: 10.1016/S0301-0082(03)00019-4

Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. Annual Review Neuroscience. 1996;19:289-317. doi: 10.1146/annurev.ne.19.030196.001445. PMID: 8833445.

Lommatzch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Scloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. Neurobiology of Aging. 2005; 26:115-123.

Luo L, Li C, Du X, Shi Q, Huang Q, Xu X, Wang, Q. Effect of aerobic exercise on BDNF/proBDNF expression in the ischemic hippocampus and depression recovery of rats after stroke. Behavioural Brain Research.2019;362, 323-331.

Mak T. The E. Donnall Thomas Lecture-apoptosis:"tis death that makes life live". Biology of Blood Marrow Transplantation. 2003; 9:483-8. doi: 10.1016/s1083-8791(03)00215-5. PMID: 12931116.

Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage, Toxicology. 2002; 181-182:219-222

Matsuoka, T., Takaki, A., Ohtaki, H., & Shioda, S. (2010). Early changes to oxidative stress levels following exposure to formaldehyde in ICR mice. The Journal of Toxicological Sciences, 35(5), 721-730.

Mendes L, de Freitas V, Baptista P, Carvalho M. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (Arbutus unedo L) leaf and fruit. Food Chemical Toxicology.2011Sep; 49(9):2285-91.doi: 10.1016/j.fct.2011.06.028. Epub 2011 Jun 14. PMID: 21703325.

Mercan, U.Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.2004; 15 (1-2);91-96 .

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. 2014. Arbutus Unedo: Chemical and Biological Properties. Molecules.2014;19(10):15799-15823.

Mohr S, McCormick TS, Lapetina EG. Macrophages resistant to endogenously generated nitric oxide-mediated apoptosis are hypersensivite to exogenously added nitric oxide donors: Dichotomous apoptotic response independent of caspase 3 and reversal by the mitogen- activated protein kinase (MEK) inhibitor PD 098059. The Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998;95: 5045-5050.

Monteiro Riviere NA, Popp JA. Ultrastructural evaluation of acute nasal toxicity in the rat respiratory epitelium in response to formaldehyde gas. Fundamental and Applied Toxicology.1986; 6:251-262.

Morgan KT, Patterson DL, Gross EA. Responses of the nasal mucociliary apparatus of F-344 rats to formaldehyde gas. Toxicology and Applied Pharmacology. 1986; 82:1-13.

Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and autoimmunity (in) A Textbook of Rheumatology: Artritis and allied conditions. WJ Kopman (Editor), 2001, Lippincort-Williams&Wilkins.

Nawar WW.1996. Lipids. In "Food Chemistry", OR Fennema (Ed), pp:225-319. Marcel Dekker, New York.

Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. Nature.1995;373:109.

Nie CL, Wei Y, Chen X, Liu YY, Dui W, Liu Y, Davies MC, Tendler SJ, He RG. Formaldehyde at low concentration induces protein tau into globular amyloid-like aggregates in vitro and in vivo. PLoS One. 2007 Jul 18;2(7): e629. doi: 10.1371/journal.pone.0000629. PMID: 17637844; PMCID: PMC1913207.

Nims R W, Cook J C, Krishna M C, Christodoulou D, Poore C M, Miles A M, Grisham M B, Wink DA. Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. Methods Enzymol.1996; 268:93–105.

Olveria I, Baptista P, Malherio R, Casal A, Pereira JA. Influence of Strawberry tree (Arbutus unedo L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity.Food Research International. 2011;44(5):1401-1407.

OSHA Ocupational Safety and Health Administration. Formaldehyde Standard; Extension of the Office of Management and Budget's (OMB) Approval of Information Collection (Paperwork)Requirements.2010. https://www.osha.gov/laws-regs/regulations/standardnumber/1910/1910.1048.(Erişim:1 Mayıs 2023).

Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. Early features o f apoptosis detected by four different flow cytometry assays. Apoptosis.1998;3:115.

Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin Önemi, Toraks Dergisi. 2001;2 (1):91-95

Özcan MM, Hacıseferoğulları H. The Strawberry (Arbutus Unedo L.) fruits: Chemical composition, phsical properties and mineral contents. Journal of Food Engineering2007; 78(3):1022-1028.

Pabst R. Exposure to formaldehyde in anatomy: an occupational health hazard? The Anatomical Record.1987;219(2):109-112.

Pabuçcuoğlu, A., Kıvçak, B., Baş, M., & Mert, T. Antioxidant activity of Arbutus unedo leaves. Fitoterapia. 2003; 74(6): 597-599.

Park YS, Namiesnik J, Verarasilp K, Leontowicz H, Leontowicz M, Barasch D, Nemirovski A, Trackhtenberg S, Gorinstein S. Bioactive Compounds and the Antioxidant Capacity in Neww Kiwi Fruit Cultivars. Food Chemistry. 2014; 165:354-361.

Parlakpınar H, Koç M, Acet A. Yaşlanmada Apoptozis ve Melatonin Etkisi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri. 2004; 24:62-67.

Patterson SL, Grover LM, Schwartzkroin PA, Brothwell M. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. Neuron. 1992; 9:1081-1088.

Pekdemir M. Espiye ve Bulanca ilçelerinde (Giresun) yetişen Kocayemişlerin (Arbutus Unedo L.) fenolojik ve pomolojik özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Ordu-2010.

Pencea, V., Bingaman, K. D., Wiegand, S. J., & Luskin, M. B. (2001). Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. Journal of Neuroscience, 21(17), 6706-6717.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. International Journal of Biomedical Science.2008; 4(2):89–96.

Pınarbaşı E. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) (in)Moleküler Biyoloji. A yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör). 2007;423-468, Nobel Yayın, Ankara.

Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European Journal of Medicinal Chemistry. 2015; 97:55-74.

Thoma RJ, Monnig M, Hanlon FM, Miller GA, Petropoulos H, Mayer AR, Yeo R, Euler M, Lysne P, Moses SN, Cañive JM. Hippocampus volume and episodic memory in schizophrenia. Journal of the International Neuropsychological Society. 2009 Mar;15(2):182-95. doi: 10.1017/S1355617709090225. Epub 2009 Feb 10. PMID: 19203430; PMCID: PMC2878285.

Ruiz-Rodriguez BM, Morales P, Fernandez- Ruitz, V, Sanches-Mata MC, Camara M, Diez-Marques C, Pardo-de Santayana M, Molina M, Tardio J. Valorization of wild strawberry-tree fruits (Arbutus UnedoL.) through nutritional assesment and natural production data. Food Research International.2011; 44,1244-1253.

Saito, A., Tanaka, H., Usuda, H., Shibata, T., Higashi, S., Yamashita, H., ... & Nagai, H. (2011). Characterization of skin inflammation induced by repeated exposure of toluene, xylene, and formaldehyde in mice. Environmental Toxicology, 26(3), 224-232.

Salthammer T, Mentese S, Marutzky R. Formaldehyde in the Indoor Environment Chemical Reviews. 2010;110(4);2536-2572.

Scharfman HE, Mercurio TC, Goodman JH, Wilson MA, MacLusky NJ. Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. The Journal of Neuroscience.2003;23:11641-52.

Schlink K, Janssen K, Nitzsche S, Gebhard S, Hengstler JG, Klein S, Oesch F. Activity of O6-methylguanine DNA methyltransferase in mononuclear blood cells of formaldehyde-exposed medical students. Archives Toxicology. 1999 Feb;73(1):15-21. doi: 10.1007/s002040050581. PMID: 10207610.

Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Reviews. 1993; 14:133-144.

Sen S, D'Incalci M. Apoptosis. Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. FEBS Letters. 1992 Jul 27;307(1):122-7. doi: 10.1016/0014-5793(92)80914-3. PMID: 1639187.

Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? Redox Report. 2004;9(3):145-52. doi: 10.1179/135100004225004814. PMID: 15327744.

Shaham J, Bomstein Y, Meltzer A, Kaufman Z, Palma E, Ribak J (1996). DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde—in vitro and in vivo studies. February 1996; Carcinogenesis 17(1):121-5.

Smith AE. Formaldehyde.Occupational Medicine. 1992; 42:83-88.

Smith LJ, Houston M, Anderson J. Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. American Review of Respiratory Disease. 1993 Jun;147(6 Pt 1):1461-4. doi: 10.1164/ajrccm/147.6_Pt_1.1461. PMID: 8503557.

Songur A, Ozen OA, Sarsilmaz M. The toxic effects of formaldehyde on the nervous system. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 2010; 203:105-18. doi: 10.1007/978-1-4419-1352-4_3. PMID: 19957118.

Soro A. ve Paxton, RJ. Strawberry Tree: A significant source of nectar around the Mediterranean basin. Bee World.1999; 80(3):140-144.

Şeker M, Yücel Z, Nurdan E.2004. Çanakkale yöresi doğal florasında bulunan kocayemiş (Arbutus Unedo L.) popülasyonunun morfolojik ve pomolojik özelliklerinin incelenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 10(4),422-427.

Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi.Metu Press Yayınları, Ankara 2002;226-30.

Tang, X. Q., Ren, Y. K., Chen, R. Q., Zhuang, Y. Y., Fang, H. R., Xu, J. H., ... & Hu, B. (2011). Formaldehyde induces neurotoxicity to PC12 cells involving inhibition of paraoxonase-1 expression and activity. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 38(4), 208-214.

Tang XQ, Zhuang YY, Zhang P, Fang HR, Zhou CF, Gu HF, Zhang H, Wang CY. Formaldehyde impairs learning and memory involving the disturbance of hydrogen sulfide generation in the hippocampus of rats. Journal of Molecular Neuroscience. 2013 Jan;49(1):140-9. doi: 10.1007/s12031-012-9912-4. Epub 2012 Oct 30. PMID: 23108488.

The Perspective. Erişim tarihi:22.04.2023. http://www.theperspective.org/formaldehyde.htm.

Tongiorgi E, Sartori A, Baj G, Bratina A, Di Cola F, Zorzon M, Pizzolato G. Altered serum content of brain-derived neurotrophic factor isoforms in multiple sclerosis Journal of the Neurological Science.2012;320:161-165.

Trump BF, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. Toxicolology Pathology. 1997 Jan-Feb;25(1):82-8. doi: 10.1177/019262339702500116. PMID: 9061857.

Tu X, Wang M, Liu Y, Zhao W, Ren X, Li Y, Liu H, Gu Z, Jia H and Li G. Pretreatment of grape seed proanthocyanidin extract exerts neuroprotective effect in murine model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury by its antiapoptotic property. Cellular and Molecular Neurobiology. 2019;39(7): 1-9.

Usanmaz SE, Akarsu ES, Vural N. Neurotoxic effects of acute and subacute formaldehyde exposures in mice. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2002 Mar;11(2):93-100. doi: 10.1016/s1382-6689(01)00109-0. PMID: 21782590.

Ünsaldı E, Çiftçi MK. Formaldehit, Kullanım Alanları, Risk Grubu, Zararlı Etkileri ve Koruyucu Önlemler. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi. 2010; 21(1): 71-75.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal Biochemistry&Cell Biology. 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16978905.

Viegas S, Ladeira C, Nunes C, Malta-Vacas J, Gomes M, Brito M, Mendonca P, Prista J. Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: A study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production. Journal of Occupational Medicine and Toxicology.2010 Aug 20;5(1):25. doi: 10.1186/1745-6673-5-25. PMID: 20727169; PMCID: PMC2933706.

Walker, JF. Formaldehyde. (3rdEd). RE: Krieger Publishing Company.Huntington, New York (1975). p:25-30.

Whitman MC, Greer CA. Progress in Neurobiology. 2009; 89: 62-175.

Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R. F., & Otterbein, E. S. (1983). The Merck Index. Merck & Co. Inc., Rahway, NJ, 1051.

Winkler KW. Formaldehyde Exposures in a UniversityAnatomy Laboratory. Thesis (MS). The University of Toledo, 2011.

Yaltırık, T., Erdinç, S., 2002. Ağaçlar. Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayını No:39.

Yazıcı P, Alizadehshargh S, Güner Akdoğan G. Apoptosis: Regulatory Molecules, Its Relationship with Diseases and Apoptosis Detection Methods: Review.Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. 2009;29(6):1677-86.

Yin JB, Wu HH, Dong YL, Zhang T, Wang J, Zhang Y, Wei YY, Lu YC, Wu SX, Wang W, Li YQ. Neurochemical properties of BDNF-containing neurons projecting to rostral ventromedial medulla in the ventrolateral periaqueductal gray. Frontiers in Neural Circuits. 2014 Nov 20;8:137. doi: 10.3389/fncir.2014.00137. PMID: 25477786; PMCID: PMC4238372.

Youssef S, Brisson G, Doucet-Beaupré H, Castonguay AM, Gora C, Amri M, Lévesque M. Neuroprotective benefits of grape seed and skin extract in a mouse model of Parkinson's disease. Nutritional Neuroscience. 2021 Mar;24(3):197-211. doi: 10.1080/1028415X.2019.1616435. Epub 2019 May 25. PMID: 31131731.

Zararsız İ, Kuş İ, Yılmaz H.R, Pekmez H, Ögetürk M, Sarsılmaz M. Sıçan prefrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etkisi. Fırat Tıp Dergisi 2004; 9: 35-9.

Zelzer S, Wonisch W, Rinnerhofer S, Niedrist T, Tatzber F, Cvirn G, Wultsch G, Mangge H. The workload of heavy workers is associated with increased low-grade inflammation, emotional and oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine.2018;124:577.

Zhang J, Xu M. Apoptotic DNA Fragmentation And Tissue Homeostasis.Trends in Cell Biology 2002;12(2):84-89.

Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S. J., & Luskin, M. B. (1998). Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. Molecular and Cellular Neuroscience. 1998;11(4): 234-245.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., & Wang, X. An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. Journal of Biological Chemistry. 1999;274(17):11549-11556.