



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**NONİLFENOL İLE OLUŞTURULAN
NÖROTOKSİSİTEDE ALFA LİPOİK ASİTİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ümran ERSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Kübra Tuğçe KALKAN

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Seda KOÇAK

KIRŞEHİR – MAYIS/2026



**T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**NONİLFENOL İLE OLUŞTURULAN
NÖROTOKSİSİTEDE ALFA LİPOİK ASİTİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ümran ERSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Kübra Tuğçe KALKAN

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Seda KOÇAK

KIRŞEHİR – MAYIS/2026

KABUL VE ONAY

“Nonilfenol İle Oluşturulan Nörotoksisitede Alfa Lipoik Asitin Etkilerinin Araştırılması” adlı bu çalışma, 14.05.2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Kübra Tuğçe KALKAN (Danışman)

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Tıp Fakóltesi

Prof. Dr. Nureddin CENGİZ

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakóltesi

Doç. Dr. Gülistan Sanem SARIBAş

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

GATA Tıp Fakóltesi

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Bu araştırma kapsamında herhangi bir kurum, kuruluş veya fondan maddi destek alınmamıştır. Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.

Ümran ERSOY

ÖNSÖZ

Bu çalışmada nonilfenol ile oluşturulan nörotoksisitede alfa lipolik asitin etkileri incelenmiştir. Tüm çalışma sürecinde desteğini esirgemeyen tez danışmanım Dr.Öğr. Üyesi Kübra Tuğçe KALKAN'a ve ikinci tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Seda KOÇAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Histoloji ve Embryoloji A.D. Öğretim Üyesi Dr. Halime TOZAK YILDIZ'a, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D Öğretim Üyesi Doç.Dr. Hasan ÇALIŞKAN'a davranış deneylerinde verdiği destek için, ayrıca Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsüne, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi BAP birimine teşekkür ediyorum.

Yaptığım çalışmalarda beni her zaman destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2026

Ümran ERSOY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sinir Sistemi Histolojisi	3
2.1.1. Sinir Dokusunun Bileşenleri	3
2.1.2. Merkezi Sinir Sistemi	4
2.2. Beyin Gelişimi	6
2.3. Beyin Anatomisi	7
2.3.1. Rombensefalon	8
2.3.1.1. Serebellum.....	8
2.3.1.2. Medulla Oblongata	8
2.3.1.3. Pons	8
2.3.2. Mesensefalon	8
2.3.3. Trunkus serebri.....	9
2.3.4. Prosensefalon	9
2.3.4.1. Telensefalon.....	9
2.3.4.2. Diensefalon.....	10
2.4. Beyin Histolojisi	10

	Sayfa
2.4.1. Beyin Korteksi	11
2.4.1.1. Beyin Korteksinin Nöron Tipleri	11
2.4.1.2. Beyin Korteksinin Sinir Lifleri	12
2.4.2. Beyin Medullası	15
2.4.3. Meninksler	15
2.4.3.1. Dura Mater	15
2.4.3.2. Araknoid Mater	16
2.4.3.3. Pia Mater	17
2.5. Kan Beyin Bariyeri	18
2.6. Endokrin Bozucular	18
2.6.1. Endokrin Bozucu Kimyasalların Sınıflandırılması	18
2.6.1.1. Doğal Kökenli Endokrin Bozucular	18
2.6.1.2. Sentetik Endokrin Bozucular	19
2.6.2. Endokrin Bozucuların Biyolojik Etkileri	19
2.6.3. Endokrin Bozuculara Maruziyet Yolları	19
2.6.4. Nonilfenolün Genel Özellikleri	20
2.6.4.1. Nonilfenolün Tarihçesi	21
2.6.4.2. Nonilfenolün Kimyasal Yapısı	21
2.6.4.3. Nonilfenolün Genel Toksisitesi	22
2.6.4.4. Nonilfenolün MSS Üzerindeki Toksik Etkileri	23
2.7. Alfa Lipoik Asit	24
2.7.1. Alfa Lipoik Asitin Tarihçesi	24
2.7.2. Alfa Lipoik Asitin Kimyasal Yapısı	24
2.7.3. Alfa Lipoik Asitin Metabolizması	25
2.7.4. Alfa Lipoik Asitin Antioksidan Etkisi	26
2.8. İnterlökin-1 Beta	26
2.9. IBA-1: Mikroglia Aktivasyonunun Spesifik Bir Belirteci	27

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Etik Kurul Onayı.....	28
3.2. Hayvan Deney ve Çalışma Düzeni	28
3.3. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.4. Histopatolojik Analizler	29
3.4.1. Beyin Histopatolojik Skorum Yöntemi	31
3.5. İmmünohistokimyasal Analizler	31
3.6. Davranış Deneyi Analizleri.....	33
3.6.1. Açık Alan Testi.....	33
3.6.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	34
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Vücut Ağırlıklarına İlişkin Bulgular	36
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	37
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	41
4.4. Açık Alan Testi Analiz Bulguları	43
4.4.1. Merkez Bölgede Geçen Süre, Merkez Bölgeye Giriş Sayısı ve Toplam Kat Edilen Mesafe.....	43
4.4.2. Desteksiz İki Ayağa Kalkma, Destekli İki Ayağa Kalkma ve Toplam İki Ayağı Üzerine Kalkma	44
4.5. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Analiz Bulguları	45
4.5.1. Açık Kolda Geçen Süre, Açık Kola Giriş Sayısı ve Yüksekten Aşağı Bakma	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR.....	53
EKLER	62
EK 1. Etik Kurul İzni	62
ÖZGEÇMİŞ	64

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Merkezi sinir sisteminde yer alan nöronlar ve glia hücrelerinin sembolize edilmiş hali	3
Şekil 2.2: Sinir hücresi yapısı.....	4
Şekil 2.3: Beyin gelişimini gösteren şematik çizim	7
Şekil 2.4: Beyin anatomik şekli.....	11
Şekil 2.5: Luxol fast blue ile boyanan beyin korteksinin 6 tabakadan oluştuğu görülüyor.	14
Şekil 2.6: Beyin zarlarını gösteren şematik çizim.....	17
Şekil 2.7: Nonylphenol'ün kimyasal yapısı	22
Şekil 2.8: α -lipoik asitin okside formu ile dihidrolipoik asit'in indirgenmiş formunun kimyasal yapılarının şematik gösterimi.....	25
Şekil 4.1: Deney gruplarının gün 0, gün 21 ve gün 28'deki vücut ağırlıkları.....	36
Şekil 4.2: Beyin kesitleri H&E, x400 büyütme kontrol ve Sham grubu normal histolojik görünüm sergilemektedir.	39
Şekil 4.3: Beyin kesitleri H&E, x400 büyütme ALA grubu normal histolojik görünüm sergilemektedir.	39
Şekil 4.4: Beyin kesitleri Toluidin Blue, x400 büyütme kontrol, Sham ve ALA grupları normal histolojik görünüm sergilemektedir.....	40
Şekil 4.5: Beyin dokusunda perivasküler ödem, eozinofilik nöron ve nöropilde vakuolizasyon bulgularının gruplar arası karşılaştırılması verilmektedir.	40
Şekil 4.6: Beyin dokusunda koyu görünümlü nöron, vasküler konjesyon ve dejeneratif morfolojiye sahip nöron sayısı bulgularının gruplar arası karşılaştırılması verilmektedir.	41
Şekil 4.7: Beyin dokusunda IBA-1 immünohistokimyasal boyanmasına ait ışık mikroskopik görüntüler ve gruplar arası karşılaştırma grafikleri verilmiştir.....	42
Şekil 4.8: Beyin dokusunda IL-1 β immünohistokimyasal boyanmasına ait ışık mikroskopik görüntüler ve gruplar arası karşılaştırma grafikleri verilmiştir.	42
Şekil 4.9: Deney gruplarının açık alan testi parametrelerinin karşılaştırılmasını göstermektedir.	43

Şekil 4.10: Deney gruplarının destekli ve desteksiz iki ayak üzerine kalkma davranışları ile toplam iki ayak üzerine kalkma sayılarının karşılaştırılmasını göstermektedir.	45
Şekil 4.11: Deney gruplarının açık alan testi kapsamında değerlendirilen davranış parametrelerinin karşılaştırılmasını göstermektedir.....	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: Deney grupları.	29
Tablo 3.2: Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği.	30
Tablo 3.3: Hematoksilen&eozin boyama tekniği.....	30
Tablo 3.4: Toluidin Blue boyama tekniği.....	30
Tablo 3.5: Beyin dokusunda histopatolojik skarlama tablosu.	31
Tablo 3.6: İmmünohistokimya boyama metodu.	32

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	:	Açıklamalar
H ₂ O ₂	:	Hidrojenperoksidaz

Kısaltmalar	:	Açıklamalar
AFEO	:	Alkilfenol Polietoksilat
ALA	:	Alfa Lipoik Asit
BFA	:	BisfenolA
BOS	:	Beyin Omurilik Sıvısı
CAT	:	Katalaz
COX-2	:	Siklooksijenaz-2
CPSIA	:	Tüketici Güvenliğini İyileştirme Yasası
DDT	:	Dikloro-Difeniltri-kloroetan
DES	:	Dietilstilboestrol
DHLA	:	Dihidrolipoik Asit
EBK	:	Endokrin Bozucu Kimyasallar
GER	:	Granüllü Endoplazmik Retikulum
GPx	:	Glutasyon Peroksidaz
GR	:	Glutasyon Reduktaz
GSH	:	Glutasyon
IBA-1	:	İyonize Kalsiyum Bağlayıcı Adaptör Molekülü 1
IL-1 β	:	İnterlökin-1 Beta
İNOS	:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KBB	:	Kan Beyin Bariyeri
LA	:	Lipoik Asit
M1	:	Klasik Olarak Aktive Edilmiş Mikroglia/Makrofaj Fenotipi
MDA	:	Malondialdehit
MSS	:	Merkezi Sinir Sistemi
NP	:	Nonilfenol

Kısaltmalar	:	Açıklamalar
NPE	:	Nonilfenol Etoksilat
PBDE	:	Polibrominat Difenil Eter
PCB	:	Poliklorinat Bifenil
PSS	:	Periferik Sinir Sistemi
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
TDI	:	Tolere Edilen Günlük Alım
TNPP	:	Tri 4-Nonnil Fenil Fosfat
TNF- α	:	Tümör Nekroz Faktörü Alfa

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NONİLFENOL İLE OLUŞTURULAN NÖROTOKSİSİTEDE ALFA LİPOİK ASİTİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ümran ERSOY

**Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Kübra Tuğçe KALKAN

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seda KOÇAK

Nonilfenol (NP), çevrede yaygın olarak bulunan ve nörotoksik etkileri bildirilen bir endokrin bozucudur. Bu çalışmada, NP ile oluşturulan deneysel nörotoksosite modelinde gelişen histopatolojik ve nöroinflamatuvar değişikliklerin değerlendirilmesi ve alfa lipoik asidin (ALA) bu değişiklikler üzerindeki terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada sıçanlar kontrol, sham, NP, NP+ALA ve ALA olmak üzere beş gruba ayrılmıştır. Deney süresi sonunda beyin dokuları histopatolojik olarak incelenmiş; mikrogliyal aktivasyon IBA-1 ve inflamatuvar belirteç olarak IL-1 β immünreaktivitesi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca davranışsal testler aracılığıyla motor ve keşif davranışları analiz edilmiştir. Bulgular, NP uygulamasının beyin dokusunda dejeneratif histopatolojik değişikliklere ve mikrogliyal aktivasyonda anlamlı artışa yol açtığını göstermiştir. IL-1 β immünreaktivitesinde değişim gözlenmiş olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. NP+ALA grubunda ise NP'ye bağlı histopatolojik bozulmaların azaldığı ve artmış IBA-1 immünreaktivitesinin anlamlı düzeyde gerilediği belirlenmiştir. Davranışsal değerlendirmelerde ALA'nın sınırlı düzeyde iyileştirici etki gösterdiği saptanmıştır. Sonuç

olarak ALA'nın NP ile indüklenen histopatolojik ve nöroinflamatuvar değişiklikler üzerinde terapötik etki gösterdiği ortaya konmuştur.

Mayıs 2026, 82 Sayfa.

AnahtarKelimeler: Nonilfenol, Nörotoksisite, Alfa lipoik Asit, Sıçan, Nöroinflamasyon.

ABSTRACT

M.s.C THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ALPHA LIPOIC ACID ON NONYLPHENOL-INDUCED NEUROTOXICITY

Ümran ERSOY

Kırşehir Ahi Evran University

Institute of Health Sciences

Department of Histology and Embryology

Supervisor: Lecturer Dr. Kübra Tuğçe KALKAN

Co-Supervisor: Lecturer Dr. Üyesi Seda KOÇAK

Nonylphenol (NP) is an environmental endocrine disruptor widely present in the environment and reported to exert neurotoxic effects. The present study aimed to evaluate histopathological and neuroinflammatory alterations in an experimental NP-induced neurotoxicity model and to investigate the therapeutic effects of alpha-lipoic acid (ALA) on these changes. Rats were divided into five groups: Control, Sham, NP, NP+ALA, and ALA. At the end of the experimental period, brain tissues were examined histopathologically; microglial activation was assessed using IBA-1, and the inflammatory marker IL-1 β was evaluated by immunoreactivity. In addition, behavioral tests were performed to analyze motor and exploration activities. The findings demonstrated that NP administration caused degenerative histopathological changes in brain tissue and significantly increased microglial activation. Although changes in IL-1 β immunoreactivity were observed, the increase was

not statistically significant. In the NP+ALA group, NP-induced histopathological alterations were reduced and the increased IBA-1 immunoreactivity significantly decreased. Behavioral assessments indicated that ALA exhibited limited ameliorative effects. In conclusion, ALA demonstrated therapeutic effects on NP-induced histopathological and neuroinflammatory alterations.

May 2026, 82 Pages

Keywords: Nonylphenol, Neurotoxicity, Alpha-lipoic acid, Rat, Neuroinflammation.

1. GİRİŞ

Günümüzde endüstriyel ve çevresel kimyasallara maruziyetin artması, insan sağlığı üzerinde önemli biyolojik etkiler oluşturmaktadır (1). Endokrin bozucu kimyasallar arasında yer alan nonilfenol (NP), deterjanlar, plastikler, pestisitler ve çeşitli endüstriyel ürünlerde yaygın olarak kullanılmakta olup çevrede kalıcılığı nedeniyle biyolojik sistemlerde birikim gösterebilmektedir (2). Lipofilik yapısı sayesinde biyolojik membranları kolaylıkla geçebilen NP'nin özellikle sinir sistemi üzerinde toksik etkiler oluşturduğu bildirilmektedir (3). Deneysel çalışmalar, NP maruziyetinin beyin dokusunda oksidatif stres artışı, nöroinflamasyon, mikrogial aktivasyon ve buna eşlik eden histopatolojik değişiklikler ile ilişkili olduğunu göstermektedir (4). Beyin dokusunda gelişen bu inflamatuvar ve histopatolojik süreçler, nöronal bütünlüğün bozulmasına ve fonksiyonel kayıplara yol açabilmektedir (5). Nöroinflamasyon sürecinde mikrogial hücreler merkezi rol oynamaktadır (6). Mikroglia aktivasyonu, IBA-1 (Ionized calcium-binding adaptor molecule-1) gibi belirteçler aracılığıyla değerlendirilebilmekte ve artmış IBA-1 immünreaktivitesi aktif mikrogial yanıtın göstergesi olarak kabul edilmektedir (7). Aktive mikrogial hücreler proinflamatuvar sitokinler (özellikle IL-1 β gibi) salgılayarak inflamatuvar yanıtı şiddetlendirebilmekte ve bu durum histopatolojik düzeyde nöronal hasarı artırabilmektedir (5, 7). Bu nedenle mikrogial aktivasyonun baskılanması, nöroinflamatuvar ve histopatolojik hasarın azaltılmasında önemli bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir (5). Alfa lipoik asit (ALA), güçlü antioksidan özelliklere sahip, hem suda hem yağda çözünebilen bir molekül olup mitokondriyal enerji metabolizmasında kofaktör olarak görev yapmaktadır (8, 9). ALA'nın serbest radikal temizleyici etkisinin yanı sıra inflamatuvar sinyal yollarını modüle ettiği, mikrogial aktivasyonu baskıladığı ve histopatolojik hasarı azaltabildiği bildirilmektedir (8, 10). Deneysel nörodejenerasyon ve inflamasyon modellerinde ALA'nın oksidatif stresi azalttığı, proinflamatuvar sitokin üretimini düşürdüğü ve glial hücre yanıtını düzenlediği gösterilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle ALA, nörotoksik ajanlara bağlı gelişen beyin hasarında potansiyel terapötik ajan olarak dikkat çekmektedir (10, 11).

Bu çalışmanın amacı, nonilfenol ile oluşturulan deneysel nörotoksisite modelinde gelişen histopatolojik ve nöroinflamatuvar değışikliklerin değlendirilmesi ve alfa lipoik asidin bu süreç üzerindeki terapötik etkisinin araştırılmasıdır. Bu kapsamda beyin dokusunda histopatolojik incelemeler yapılmış, IBA-1 ve IL-1 β immünreaktiviteleri değlendirilmiş ve davranışsal parametreler analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda ALA'nın NP'ye bağı gelişen doku hasarı ve inflamatuvar yanıt üzerindeki etkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

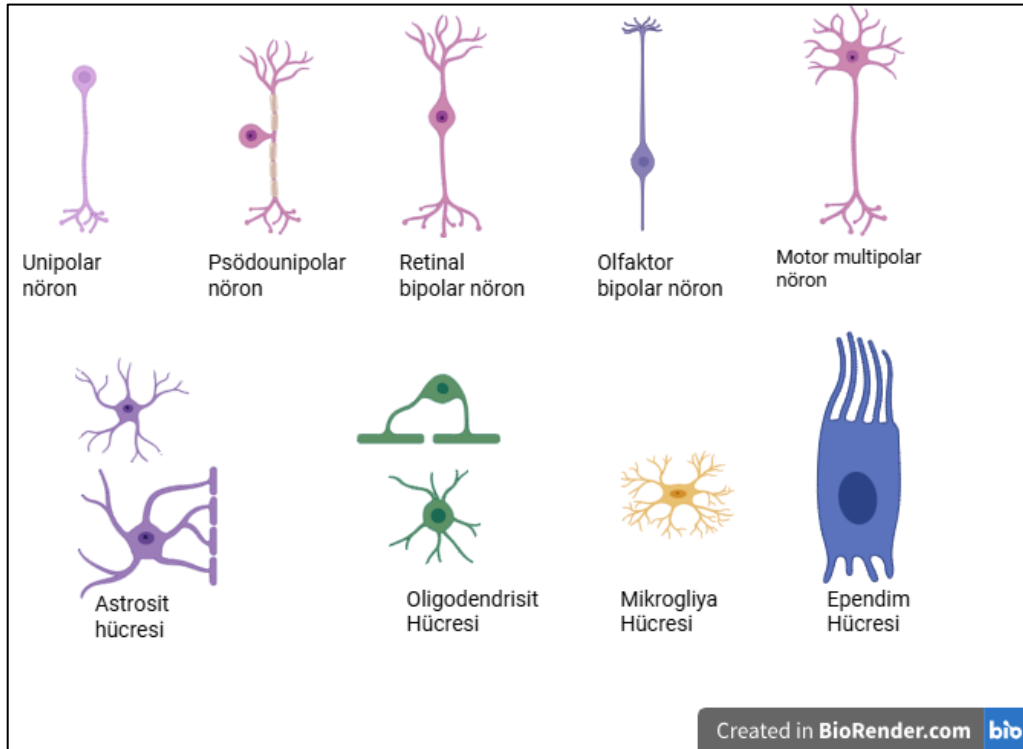
2.1. Sinir Sistemi Histolojisi

Sinir sistemi vücudun en karmaşık sistemlerindendir. Temel görevi; vücuda gelen tüm uyarıları almak, bunları analiz etmek, değerlendirmek ve cevap oluşturmaktır. Ayrıca bu sistem organların ve diğer sistemlerin işleyişini kontrol ederek bu yapıların çalışmasında bir bütünlük sağlar (12).

Anatomik açıdan sinir sistemi merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere ikiye ayrılır. Sinir sistemi fonksiyonel olarak somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi şeklinde sınıflandırılır. Otonom sinir sistemi de kendi içerisinde sempatik, parasempatik ve enterik sinir sistemi olarak kategorize edilir (13).

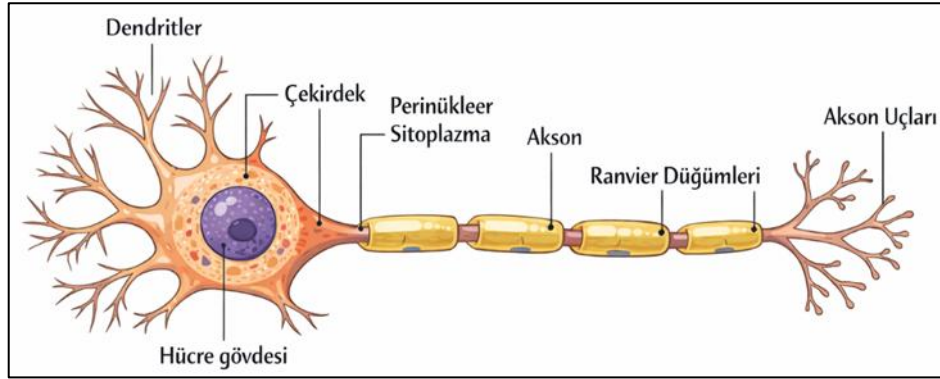
2.1.1. Sinir Dokusunun Bileşenleri

Sinir sistemi nöronlar olarak isimlendirilen hücrelerden ve bunları destekleyen nöroglialardan (destek hücreleri) oluşur (Şekil 2.1) (12).



Şekil 2.1: Merkezi sinir sisteminde yer alan nöronlar ve glia hücrelerinin sembolize edilmiş hali (14).

Sinir sisteminin temel işlevsel birimi nöron veya sinir hücresidir. Sinir hücre gövdesi diğer bir ifade ile perikaryon, çekirdek ve perinükleer sitoplazma, uzunlukları farklılık gösteren sitoplazmik uzantılardan (dendritler ve aksonlar) meydana gelir. Perikaryon, gelen uyarıları algılayıp bunlara uygun yanıtlar üreten merkezidir. Büyüklükleri ve şekilleri görevlerine ve bulundukları yere göre değişebilmektedir (Şekil 2).



Şekil 2.2: Sinir hücresi yapısı (13).

Sinir hücreleri, uyarıları hücrelerden alır ve elektriksel uyarılar halinde sistemin diğer hücrelerine iletir. Bu hücreler arasında birinden diğerine bilgi aktarılması ile sinaps meydana gelir (12, 13). Sinir dokuda yer alan bir başka hücre tipi glia (nöroglia) hücreleridir. Bu hücreler nöronların çevresinde bulunan ve iletken olmayan hücrelerdir. Nöroglialar nöronlardan yaklaşık 10 kat daha fazladır. Nöronların sınırlı bölünme yeteneği bulunurken, nöroglia hücrelerinin çoğalması mitoz ile gerçekleşir (12, 13). MSS; oligodendrositler, astrositler, mikrogliya hücreleri ve ependim hücreleri olmak üzere 4 tip glia hücresinden oluşmaktadır (Şekil 2.1). PSS de ise Schwann hücreleri, satellit hücreleri ve enterik nöroglia hücreleri destekleyici hücreler olarak görev yapmaktadır. MSS ve PSS’de bulunan nöroglia hücreleri morfolojik ve fonksiyonel yapıdan benzerlik gösterirler.

Nöroglialar; nöronlar için fiziksel destek sağlamanın yanı sıra birçok göreve sahiptir. Nöron gövdeleri ve uzantılarının yalıtımı yani miyelin yapımı sayesinde hızlı iletimi sağlaması bu görevlerden biridir. Ayrıca nöronal hasarın onarımı, beyin omurilik sıvısı (BOS) ile MSS’nin iç sıvı ortamının düzenlenmesi, nörotransmitterlerin sinaptik aralıklardan temizlenmesi, kan beyin bariyerinin (KBB) oluşumuna katkı sağlaması da bu görevlerden bazılarıdır (12, 13).

2.1.2. Merkezi Sinir Sistemi

MSS; beyin, beyincik ve omurilikten oluşur. PSS ise; ganglionlar, periferik sinirler ve sinir sonlanmalarından meydana gelir (13). MSS’ nin en önemli yapılarından olan beyin; dışta

korteks (gri cevher) ite medulla (beyaz cevher) den meydana gelerek kranial kavite içerisinde yer almaktadır. Medulla spinalis ise vertebral kanal içerisinde olup, beyindeki sıralamanın tersine dışta beyaz cevher ve ite gri cevherden meydana gelmektedir. Bu karmaşık sinirsel yapıda her bir nöron, en az bin farklı bağlantı aracılığıyla diğer nöronlarla etkileşim halindedir (14). Beyin, vücut ve zihinle ilişkili birçok temel işlevin düzenlenmesinden sorumlu merkezi bir yapıdır. Düşünme, hafıza ve çevresel uyarıların algılanıp değerlendirilmesi gibi bilişsel süreçlerin yanısıra; motor hareketlerin kontrolü, endokrin ve somatik sistemlerin yönetimi ile iç organların uyumlu çalışmasını ve kontrolünü sağlamak gibi çok sayıda yaşamsal görevi yerine getirir (15).

Beyin ve ona bağlı yapılar kranial boşlukta olup kafatası kemikleri ile, medulla spinalis vertebral kanalda bulunup omurga tarafından korunmaktadır. Bu iki ana yapı' meninks' denilen üç katlı bağ dokusu zar sistemiyle çevrelenmiştir. BOS, bu zar katmanların arasında yer alan subaraknoid boşluğu doldurarak MSS' yi hem korur hem de besler (13). MSS'de yer alan yapılar, temel olarak beyaz madde ve gri madde olmak üzere iki farklı dokusal bileşen içerir. Beyaz madde, çoğunlukla miyelinli sinir liflerinden oluşmakta; bunun yanında bir miktar miyelinsiz lifler ile destek hücreleri olan nroglialar da yer almaktadır. Bu bölgeye beyaz madde denmesinin nedeni, miyelin kılıfın parlak ve açık tonlu görünümüdür. Gri madde ise, nöronların gövde kısımlarını, dendritleri, miyelinsiz akson segmentlerini ve çeşitli glial hücreleri barındırır. Bu alandaki miyelinin yokluğu ve hücre çekirdeği yoğunluğu, gri tonlu görünümün ortaya çıkmasına neden olur. Nöronal uzantılar (akson ve dendritler) ile glial çıkıntılar birlikte 'nropil' olarak bilinen karmaşık bir sinir ağı meydana getirir (13).

Beyin sapının distalinde konumlanan onunla sürekli olarak arz eden omurilik, 31 farklı bölüme ayrılmıştır: 8 servikal, 12 torasik, 5 lomber, 5 sakral ve 1 koksigeal. Her bir segment, bir çift spinal sinirle bağlantı kurar. Bu sinirler, ilgili segmentlerine, dorsal (arka) ya da ventral (n) kökler aracılığıyla bağlanır (13, 15). Omurilik, enine kesiti incelendiğinde beyin ve beyincikten farklı bir morfolojiye sahiptir. Ortada santral kanal yer alır; bu kanal kelebek ya da H şeklini andıran gri madde ile çevrilidir. Gri madde nöron gövdeleri, bazı aksonlar ve glia hücrelerden oluşur. Dış kısımda ise beyaz madde bulunur; bu bölge, MSS'nin yukarı ve aşağı bağlantılarını sağlayan miyelinli ve miyelinsiz aksonları ve onların arasında yer alan glia hücrelerini içerir (13, 15).

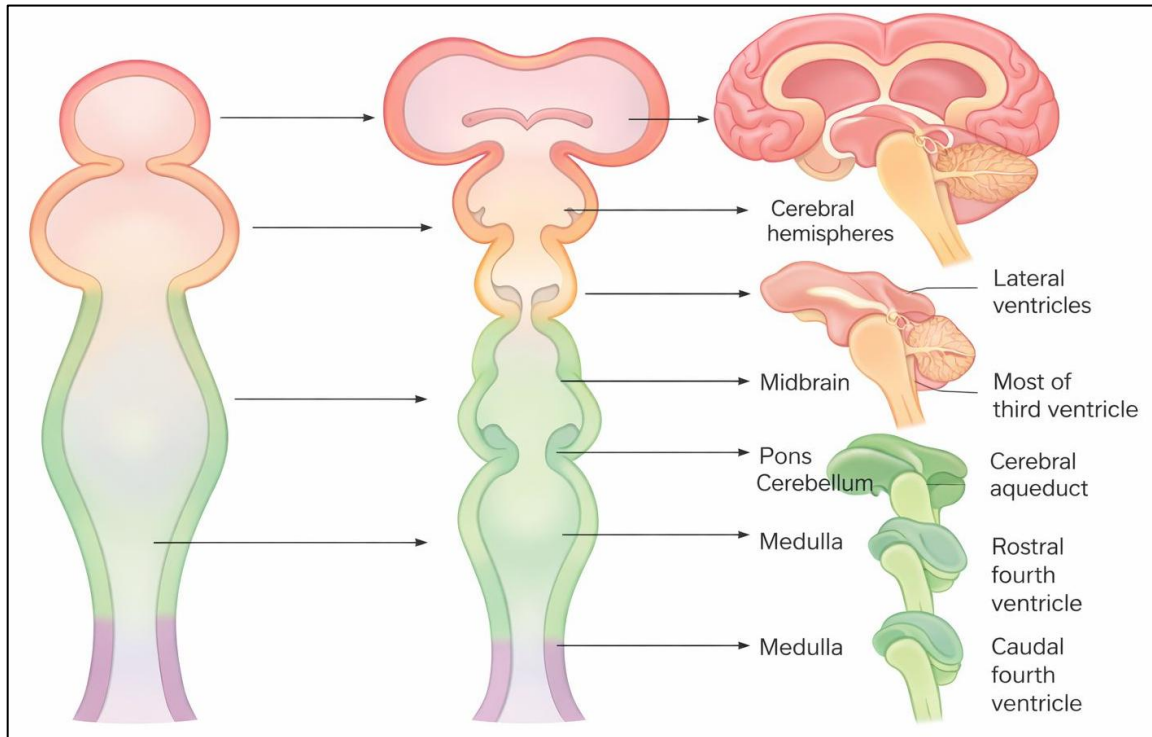
İskelet kaslarına sinyal gönderen yani inerve eden efferent motor nöronların hücre gövdeleri, omurilikteki ventral gri madde boynuzunda bulunur. Bu hücreler klasik histolojik kesitlerde geniş sitoplazmaları, yoğun bazofili özellikleri ve multipolar yapıları ile teşhis edilir (12, 13).

Afferent özellik gösteren duyu nöronlarının hücre gövdeleri, spinal sinirlerin dorsal kök ganglionları içerisinde bulunur. Psödounipolar yapıda olan bu nöronlar, çevresel uyarıları alan periferik bir uzantı ile bu impulsları omuriliğin gri maddesine ileten santral bir uzantıya sahiptir (12, 13).

2.2. Beyin Gelişimi

Embriyonik gelişimin erken döneminde MSS, ektoderm tabakasından köken alır ve bu süreç ‘nöral plak’ olarak tanımlanan ektodermal bir kalınlaşmanın oluşumuyla başlar (16). Nöral plak, ilerleyen gelişimle birlikte nöral katlantılara dönüşür ve zamanla nöral tüp ile nöral krista yapıları oluşur. Oluşan nöral tüp, MSS’nin temel yapısını oluştururken; nöral kristadan köken alan hücreler periferik ve otonom sinir sistemlerinin büyük bir bölümünü meydana getirir (17). Nörulasyon dönemi, embriyonik yaşamın dördüncü haftasında, yaklaşık 22-23. günlerde başlar. Üçüncü haftanın sonunda, nöral plağın kenarlarındaki yükselmeler nöral katlantıların oluşuma neden olur. Bu katlantılar zamanla orta kısma yaklaşarak birleşir ve böylece nöral tüpün şekillenmesi sağlanır. Kaynaşma, servikal bölgeden itibaren hem yukarı doğru (kraniyal) hem de aşağı (kaudal) yönlere doğru ilerler. Bu sırada, embriyonun uç kısımlarında kapanmanın geç gerçekleşmesi, amniyon boşluğu ile nöral tüp arasında kısa süreli bir bağlantının oluşmasına neden olur. Kapanma işlemi çift yönlü ilerler. Kraniyal nöropor, ön beyinden başlayarak her iki yöne doğru kapanırken, ilk kapanma noktası servikal bölgede görülür. Kraniyal nöropor 25. günde, kaudal nöropor 27. günde tamamen kapanır (17). Nöral tüpün hem ön hem arka açıklıkları kapanırken bu sürece eşlik eden damar ağı oluşumu da tamamlanma evresine ulaşır. Kapanmayı takip eden aşamalarda, nöral tüpün duvarları kalınlaşarak beyin ve omurilik yapılarını meydana getirir. Tüpün iç kısmında kalan boşluk ise, zamanla beynin ventriküler sistemi ile omuriliğin santral kanalına dönüşür. Genişliği nedeniyle diğer bölgelerden ayırt edilebilen ve dördüncü somit çiftinin üzerine konumlanan nöral tüp bölgesi, gelişmekte olan beynin temelini oluşturur. Bu bölgedeki ilk yapısal ayrışma sonucunda, embriyonik gelişimin erken evrelerinde üç ana beyin vezikülü şekillenir; prosensefalon (ön beyin), mesensefalon (orta beyin) ve rombensefalon (arka beyin) (18). Embriyonal gelişimin beşinci haftasında, ön beyin yapısı olan prosensefalon

tam olarak ayrışmamış iki vezikül haline dönüşür. Bu yapılardan biri, ortada yer alan bir alan ile her iki yanında bulunan çıkıntılardan oluşan ve ilkel serebral hemisferleri içeren telensefalondur. Diğer ise, dışa doğru uzayan optik veziküllerin gelişimiyle birlikte özgünleşen diensefalondur. Diensefalon bölgesinden zamanla talamus, hipotalamus, epifiz bezi, hipofiz bezi ve retina gibi MSS'ne ait önemli yapılar oluşur. Orta beyin yani mesensefalonda bu süreçte herhangi bir yapısal ayrışma gözlenmezken, arka beyin anlamına gelen rombensefalon iki alt bölgeye ayrılır. Bu ayrışmanın sonucunda, rombensefalonun ön kısmı metensefalon olarak adlandırılır ve serebellum ile ponsun gelişimini sağlar; arka kısmı ise medulla oblongata'yı oluşturan myelensefalona dönüşür. Aynı dönem içinde, telensefalonun gelişimine eşlik eden bir diğer önemli olay ise serebral korteksin katmanlı yapısının oluşmaya başlamasıdır (18).



Şekil 2.3: Beyin gelişimini gösteren şematik çizim (19).

2.3. Beyin Anatomisi

İnsan beyni, vücut kütlelerinin yaklaşık %2'sini teşkil eder. Erişkinlerde 1400-1500 gr arasında değişen bir ağırlığa sahiptir. Anatomik olarak, omurilikten başlayarak yukarı doğru üç ana bölüm halinde sıralanır. Bu bölümler; arka beyin (rombensefalon), orta beyin (mesensefalon) ve ön beyin (prosensefalon) olarak bilinir (15).

2.3.1. Rombensefalon

Rombensefalon, MSS'nin arka kısmını oluşturan ve serebellum (beyincik), medulla oblongata (omurilik soğanı) ile pons (köprü) yapılarından meydana gelen bir beyin bölgesidir. Gelişimsel olarak beyin sapı ve beyinciğin temel yapılarını içeren bu bölge, motor koordinasyon, denge, solunum ve kardiyovasküler işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (15).

2.3.1.1. Serebellum (Beyincik)

Serebellum, rombensefalonun metensefalon isimli alt bölgesinden gelişir. Toplam beyin kütesinin yaklaşık %10'nunu oluşturmaya rağmen beyindeki nöronların yarısından fazlasını barındırmasıyla dikkat çeker (14). Yapısal olarak iki lateral lob (hemisferium cerebelli) ve bu lobları medyan düzlemde birleştiren vermis cerebelli'den meydana gelmiştir. Fonksiyonel olarak motor hareketlerin koordinasyonu ve denge kontrolü başta olmak üzere istemli kas aktivitelerinin düzgün ve uyumlu bir biçimde gerçekleştirilmesini sağlar (15).

2.3.1.2. Medulla Oblongata (Omurilik Soğanı)

Medulla oblongata, beyin sapının kaudal (alt) bölümünü oluşturan ve medulla spinalis ile pons arasında konumlanan koni şeklindeki bir yapıdır. Anatomik olarak serebellumun da yakın komşuluğunda yer alır (15). Yaşamsal öneme sahip olan bu yapı; solunum ritmi, kalp atım hızı ve kan basıncının düzenlenmesi gibi yaşamsal fonksiyonların kontrol merkezlerini içerir.

2.3.1.3. Pons (Köprü)

Yaklaşık 2,5 cm uzunluğunda olan pons, medulla oblongata ile mesensefalon arasında serebellumun ön yüzeyinde yer alır. Anatomik olarak, arka yüzü medulla oblongata ile doğrudan devamlılık gösterirken, ön ve lateral yüzeylerinde sulcus bulbopontinus adı verilen oluk aracılığıyla medulla oblongata'dan ayrılır (12). Pons, serebelluma gelen ve giden sinyallerin iletiminde köprü görevi görmekte olup, duyu ve motor yollarının önemli bir kavşağını oluşturur.

2.3.2. Mesensefalon (Orta Beyin)

Mesensefalon, embriyonik dönemde nöroektodermden gelişen orta beyin vezikülüne ait bir yapıdır. MSS'nin en küçük ancak fonksiyonel açıdan kritik bileşenlerinden biridir. Gelişim

sürecinde diğer beyin bölgelerine kıyasla nispeten daha az morfolojik değişikliğe uğramıştır. Bu nedenle beyin vezikülleri arsında yapısal açıdan en ilkel olanıdır. Yaklaşık 2 cm uzunluğunda olan bu yapı, anatomik olarak pons ile diensefalon arasında yer almaktadır. Mesensefalonun ortasında üçüncü ve dördüncü ventrikülleri birbirine bağlayan aqueductus cerebri (serebral akvedük, beyin kanalı) geçmektedir. Bu bölge çok sayıda nöronal çekirdek (nükleus) ile birlikte, yukarı ve aşağı yönlü sinir lifi demetlerini (traktusları) içermektedir (14).

2.3.3. Truncus serebri (Beyin Sapı)

Truncus serebri, yani beyin sapı; medulla oblongata, pons ve mesensefalonun biraraya gelmesiyle oluşur. Prosensefalonun kaudal (arka-alt) ucundan başlayarak inferiör yönde uzanır. Yaşamsal fonksiyonların kontrolüyle doğrudan ilişkili olan bu yapı, kraniyal sinirler açısından da merkezi bir kavşak niteliğindedir. Birinci (N.olfactorius) ve ikinci (N.opticus) kafa sinir çiftleri hariç tutulduğunda, kalan tüm kafa sinirlerinin beyin sapından köken aldığı görülmektedir (20).

2.3.4. Prosensefalon (Ön Beyin)

Embriyonik dönemde ön beyin vezikülünden farklılaşarak gelişen prosensefalon, morfolojik ve fonksiyonel olarak, iki ana yapısal bölgeye evrilmektedir: telensefalon ve diensefalon.

2.3.4.1. Telensefalon

Telensefalon, beynin en geniş ve karmaşık yapısal bölgesidir. Sağ ve sol olmak üzere iki serebral hemisferden oluşur. Bu hemisferler ortada yer alan fissura longitudinalis cerebri ile birbirinden ayrılırken, alt kısımdaki fissura transversa cerebri aracılığıyla beyincikten (serebellum) ayrılmaktadır. İki hemisfer arasında bağlantıyı sağlayan ana yapı korpus kallosumdur (21). Her bir hemisferin içerisinde, BOS ile dolu lateral ventriküller (ventriculus lateralis) yer alır.

Telensefalonun fonksiyonel yapısını oluşturan beyin dokusu; nöron gövdeleri, akson ve dendrit uzantıları, glia hücreleri ile kan damarlarının bir araya gelmesiyle karmaşık bir bütünlük oluşturur. Bu yapının dış yüzeyini çevreleyen gri madde korteks serebri (beyin korteksi) olarak adlandırılır. Burada nöron gövdeleri yoğunlaşmıştır. Korteks üzerinde yer alan yüzey kıvrımları gyrus olarak adlandırılırken, bu çıkıntılar arasındaki derin oluklar sulcus şeklinde tanımlanır. Bazı sulkuslar belirgin derinliğe sahip olup, korteksin anatomik

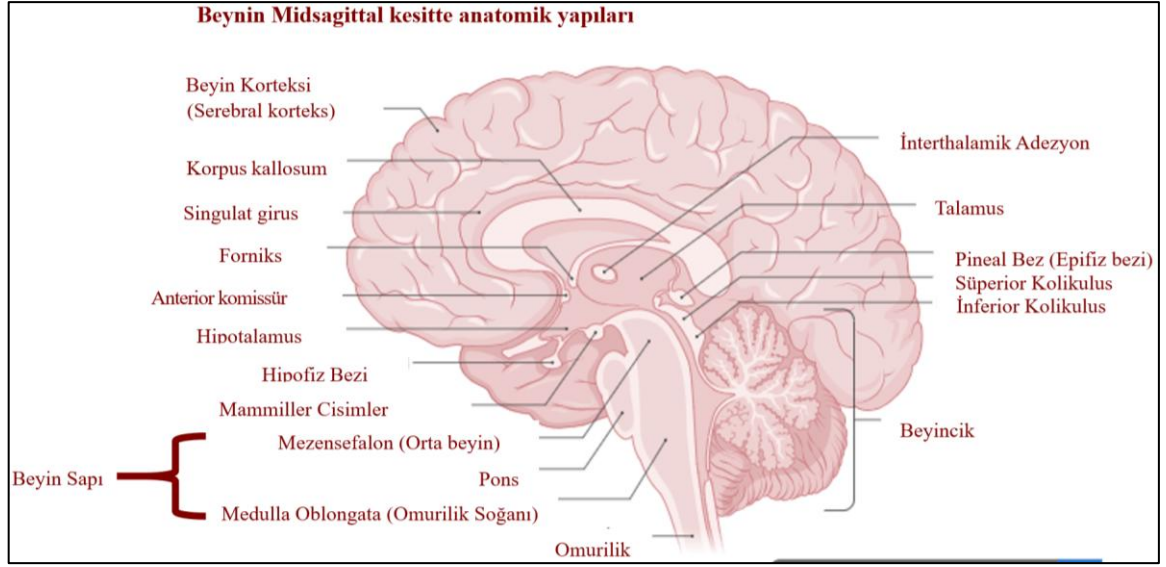
olarak loblara ayrılmasını sağlar. Bu loblar frontal, parietal, temporal, oksipital ve insular loblar olarak isimlendirilirler. Ayrıca, anatomik olarak ayrı lob şeklinde tanımlanmasa da limbik sistemin kortikal yapılarını içermesi sebebiyle işlevsel bir bütün olarak kabul edilen limbik lob da bu sınıflamaya dahil edilmektedir (21).

2.3.4.2. Diensefalon

Diensefalon serebral hemisferler ile beyin sapı arasında konumlanan merkezi bir beyin bölgesidir. Sağ ve sol yarım küreleri arasında BOS ile dolu olan üçüncü ventrikül (ventriculus tertius) yer alır. Bu ventrikül, foramen interventrikulare (monro deliği) aracılığıyla lateral ventriküllerle; kaudalde ise aqueductus cerebri aracılığıyla dördüncü ventrikülle bağlantı kurar (22). Diensefalon gelişimsel ve anatomik olarak beş alt birimden oluşur. Bu birimler talamus, hipotalamus, epitalamus, metatalamus ve subtalamusdur (21). Bu alt yapılar; duyuusal bilgi aktarma, otonomik sistemin düzenlenmesi, hormonal denetim ve emosyonel yanıtların koordnasyonu gibi çok çeşitli nörofizyolojik işlevleri yerine getirir.

2.4. Beyin Histolojisi

MSS organları histolojik olarak incelendiğinde, gri madde ve beyaz madde şeklinde iki temel yapı gözlenmektedir. Bu ayrım sadece hücresel bileşenlerden değil aynı zamanda miyelinizasyon düzeylerindeki farklılıklardan da kaynaklanmaktadır. Beyaz madde başlıca miyelinli aksonlar ile bu miyelini sentezleyen oligodendrositlerden oluşmaktadır. Bu bölgede nöron gövdeleri (perikaryonlar) bulunmaz. Gri madde içerisinde de nöron perikaryonlarının yanı sıra dendritler aksonların başlangıç bölümleri ve glial hücrelerin uzantıları yer alır. Gri madde, nöronlar arasındaki bağlantıların (sinapsların) yoğunlaştığı bir bölge olduğundan bilgi işleme sürecinde merkezi öneme sahiptir (23). Histolojik yapı olarak beyin ve beyincikte gri madde, korteksin dış tabakasında konumlanırken, beyaz madde daha derin ve santral bölgede yer almaktadır. Medulla spinalis'te ise bu konumlanma tam tersinedir. Beyaz madde dış kısımda iken gri madde merkezi kısımda, karakteristik 'H' harfine benzer şekilde gerçekleşmiştir (24).



Şekil 2.4: Beyin anatomik şekli (25).

2.4.1. Beyin Korteksi

2.4.1.1. Beyin Korteksinin Nöron Tipleri

Nöronlar sinir sisteminin yapı ve işlev açısından en temel hücreleridir. Dış çevreden ya da diğer hücrelerden gelen uyarıları algılamak, bu sinyalleri iletmek, bilgiyi işleyip depolamak ve gerektiğinde ilgili hücrelerin hücresel tepkilerini başlatmak gibi yaşamsal görevleri üstlenirler (22). Ayrıca hücrelerarası iletişimi sağlayan kimyasal iletiler olarak bilinen nörotransmitterlerin salgılanmasında önemli rol oynarlar. Hücresel büyüklükleri değişkendir. Çapları 5 mikrometreden başlayıp 150 mikrometreye kadar ulaşabilir (24). Nöronlar yapısal olarak, perikaryon, dendrit ve akson olmak üzere üç kısımda incelenir. Perikaryon terimi Yunanca “peri” (çevre) ve “karyon” (çekirdek) kelimelerinin bütünleşmesiyle türetilmiştir. Hücre gövdesi merkezi bir çekirdek ve etrafındaki sitoplazmasından oluşmuştur. Çekirdek genellikle yuvarlak veya oval şekillenmiş olup merkezdedir. Yoğun önkromatin çekirdek yapısı yüksek metabolik faaliyete işaret eder. Nöronlardaki nükleoluslar (çekirdekçikler) da kolayca tespit edilir. Elektron mikroskopuyla yapılan detaylı incelemede, çekirdek çevresi sitoplazmada yoğun granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve dağınık ribozomlara rastlanmıştır. Bu yapılar, ışık mikroskopunda koyu renkle boyanan ve tiyoninle metakromatik özelliğe sahip Nissl cisimciklerini meydana getirir. Sitoplazmada ayrıca mitokondriler, Golgi kompleksi, lizozomlar, mikrotübüller, nörofilamentler, veziküller ve çeşitli hücre içi birikintiler de gözlenir (24).

Nöronlar, hücre gövdesinden çıkan tek bir aksone sahiptir. Bu yapı, sinirsel uyarıyı diğer hücrelere iletmekle görevlidir ve nöronlar arası iletişimin temel yoludur. Akson, genellikle

“akson tepeciği” denilen özel bir bölgeden başlar. MSS ve PSS içerisinde yer alan bazı glial hücreler, belirli aksonların çevresinde miyelin kılıf sararak bu iletimin hızını arttırmırlar. Ancak her akson miyenli değildir. Miyelinsiz aksonlarda iletim yavaştır. Miyelinli bir aksonda, akson tepeciğinden miyelinleşmenin başladığı noktaya kadar uzanan kısım “inisiyal segment” olarak adlandırılır. Bu bölge, nörona gelen uyarıların analiz edildiği ve bir aksiyon potansiyelin oluşup oluşmayacağını belirlediği yerdir (12). Bu segmentte ve devamındaki aksonal sitoplazmada GER ve ribozom mevcut değildir. Bunun nedeni, protein sentezinin yalnızca perikaryonda gerçekleşmesidir. Aksonda ihtiyaç duyulan proteinler perikaryonda üretilerek mikrotübüller ve nörofilamentler aracılığıyla aksonal taşıma sistemi yoluyla ilgili bölgelere ulaştırılır. Bu mikrotübüllerin ve nörofilamentlerin akson çapını düzenlenmesi görevleri sebebiyle miyelinli aksonların iletim hızını belirledikleri tahmin edilmektedir. Aksonun uç kısmı, telodendron isimli çoklu dallara ayrılır. Her bir dalın sonunda bulunan genişlemiş yapılar “sinaptik düğme” olarak tanımlanır (26). Bu sinaptik düğmeler, diğer nöronlarla ya da hedef hücrelerle temas kurarak sinapsları oluşturur. Sinapslar son ilgili hedefe bilgiyi iletirler (15).

Nöronların çevreden gelen mesajları almasını sağlayan kısa dallı yapılar olan dendritler, perikaryondan dışa doğru adeta bir ağ gibi çevreye yayılır. Bu kısa uzantıların yüzeyinde yer alan “denrit diken” adı verilen küçük çıkıntılar, komşu nöronların akson uçlarıyla temas ederek sinaptik iletimin gerçekleşmesini sağlar (15, 26). Dendritler yapısal özellikleri ile aksonlardan ayrılır. Daha geniş çaplıdır. Sitoplazmalarında Nissl cisimcikleri, mitokondriler, nörofibriller ile mikrotübüller bulunurken, genellikle golgi aygıtı yer almaz (24, 26). Nöronların işlevsel etkinliğini sürdürebilmesi için çevrelerinde yer alan nöroglia hücreleri tarafında desteklenmeleri gerekir. Nöroglia hücreleri sinir doku bütünlüğünü korurken aynı zamanda iyon dengesi, besin taşınması ve hasarlı bölgelerin onarımı gibi birçok yaşamsal faaliyeti de üstlenir (15). Bu hücrelerin MSS’de nöronlara kıyasla neredeyse 10 kat daha fazla sayıda olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca küçük boyutlarına rağmen sinir dokunun yarısını oluşturdukları yönünde görüşler de bulunmaktadır (23). Nöroglia hücreleri mitozla çoğalabilen hücrelerdir. Bulundukları sisteme göre “periferik” ya da “merkezi” olarak sınıflandırılırlar. MSS’de görev alan dört merkezi nöroglia tipi mevcuttur. Bunlar astrositler, oligodendrositler, mikrogliyal ve ependim hücreleridir (24).

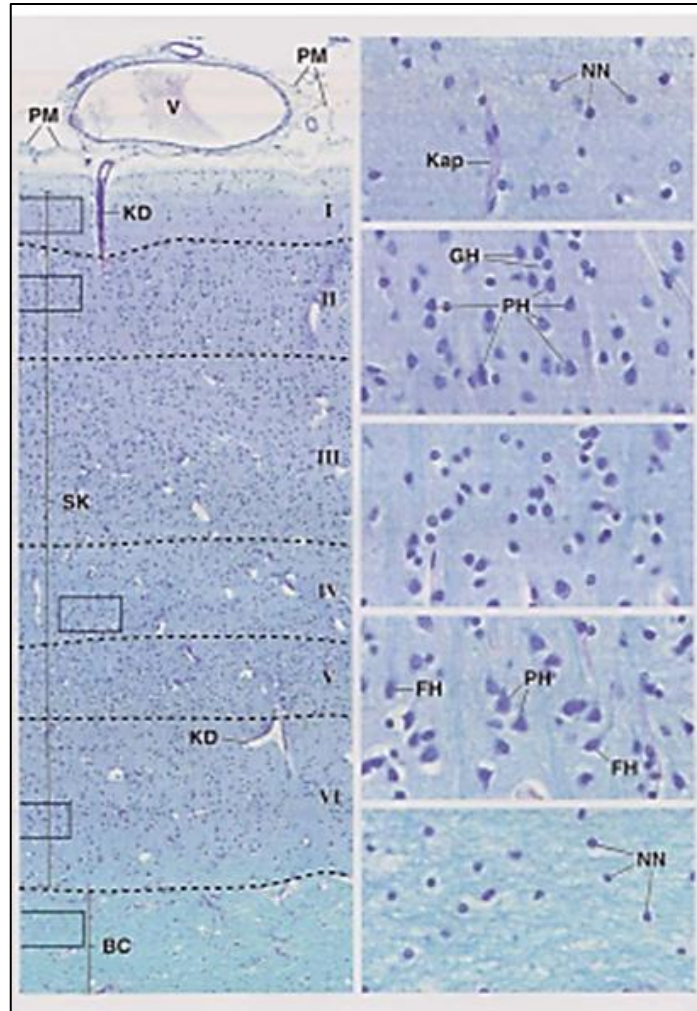
2.4.1.2. Beyin Korteksinin Sinir Lifleri

Serebral kortekste sinir lifleri iki temel düzende yapılırlar. Işınsal (radial) lifler; piramidal, stellat ve fuziform nöronların korteksten çıkan aksonlarını içerir. Korteks yüzeyine dik doğrultuda

uzanırlar. Buna karşın tanjensiyal (horizontal) lifler ise, yatay yerleşimli stellat hücrelerin aksonlarını ve piramidal ile fuziform hücrelerin kolletaral uzantılarını kapsar. Bu lifler daha çok 4. ve 5. katmanlarda yoğunlaşır ve bu tabakalar literatürde “Baillarger’in iç ve dış tabakaları” olarak adlandırılır (22). Serebral kortekste nöronlar, belirgin bir tabakalı yapı içerisinde dizilmiştir. Hücrelerin bu katmanlardaki dağılım biçimi sitoarkitektür olarak adlandırılırken, sinir liflerinin düzenlenişi ise miyeloarkitektür ismini alır. Bu iki yapısal özellik birlikte incelendiğinde korteksin farklı morfolojik özellikler gösteren nöron gruplarına göre altı temel tabakaya ayrıldığı görülür (24, 26). Bu tabakaların dıştan içe doğru sıralanmasıyla:

1. *Lamina molekularis (Zonal tabaka)*: Beyin korteksinin en dış katmanı olan bu tabaka, sinir liflerinden oluşan yoğun bir ağ yapısına sahiptir. Liflerin çoğu korteks yüzeyine paralel, yani tanjensiyel yönde yerleşmiştir. Bu yapı, özellikle piramidal ve fuziform hücrelerin apikal dendritleri ile Martinotti ve stellat hücrelerin aksonlarından kaynaklanan uzantılarından oluşur. Sinir lifleri arasında zaman zaman Cajal’a özgü yatay düzlemde uzanan özel nöronlara da rastlanır. Moleküler katman, çok sayıda farklı nöron tipinin sinaptik bağlantılar kurduğu bir iletişimin yoğunlaştığı bir bölgedir.
2. *Lamina granularis eksterna (Dış tanecikli tabaka)*: Bu katmanda bol miktarda küçük boyutlu piramidal nöronlar ile stellat hücreler bulunur. Dendritik uzantıları daha yüzeyde yer alan moleküler tabakaya yönelirken, aksonları derin kortikal katmanlara doğru ilerleyip beyaz cevhere kadar ulaşır. Hücresel yoğunluğun büyük kısmını granüler nöronların oluşturması nedeniyle bu tabaka adını da bu özellikten almıştır. Miyeloarkitektürel olarak, sinir lifi bakımından zayıf bir yapıya sahiptir; bu özelliği nedeniyle bazı kaynaklarda “lamina disfibroza” olarak anılır.
3. *Lamina pyramidalis eksterna (Dış piramidal tabaka)*: Bu katman, boyutları yüzeyden derinlere doğru giderek artan piramidal nöronların gövdelerinden oluşur. Hücrelerin apikal dendritleri korteksin en dış tabakası olan moleküler tabakaya kadar uzanırken, aksonları derine inerek beyaz cevhere yönelir. Bu düzenleme, hem dikey hem de yatay bağlantıların kurulmasına katkıda bulunarak kortikal iletişimi destekler.
4. *Lamina granularis interna (İç granüler tabaka)*: Bu katman, sıkıca paketlenmiş stellat nöronların yoğun olarak bulunduğu bir yapıdır. Aralarına seyrek olarak küçük piramidal hücreler de dağılmıştır. Hücrelerin bu yoğun dizilimiyle birlikte, yatay doğrultuda uzanan sinir liflerinin belirginleştiği bir fibriller bölge gelişir. Bu yapı, histolojik olarak “Baillarger’in dış bandı” şeklinde anılır.

5. *Lamina pyramidalis interna (İç piramidal tabaka)*: Bu katman literatürde sıklıkla ganglionik tabaka olarak da adlandırılır. Bu katmanda, büyük boyutlu piramidal hücreler (özellikle Betz'in dev hücreleri) ile orta büyüklükte piramidal hücreler bulunur. Aralarına dağılmış halde Martinotti ve stellat hücrelere de rastlanır. Yatay yönde seyreden sinir lifleri, bu bölgeyi lif açısından zenginleştirir ve Baillarger'in iç bandı, olarak adlandırılan lifsel yapıyı oluşturur.
6. *Lamina multiformis (Çok biçimli hücre tabakası)*: Beyin korteksinin en derin katmanı olan bu bölüm, farklı şekil ve büyüklükteki nöronlarla zenginleşmiştir. Bu sebeple polimorfik tabaka olarak da adlandırılır. Fuziform hücrelerin yoğunlukta olduğu bu bölge, üçgen ya da oval soma yapısına sahip nöronlar da gözlemlenebilir. Martinotti hücreleri bu alanda baskındır. Ayrıca beyaz cevhere ulaşan ve oradan çıkan çok sayıda sinir lifi yer almaktadır (22, 26).



Şekil 2.5: Luxol fast blue ile boyanan beyin korteksinin 6 tabakadan oluştuğu görülüyor. Sırasıyla; PM: pia mater, V: ven, KD: kan damarı, SK: Serebral korteks, BC: beyaz cevher, NN: nöroglial nükleusları, GH: glial hücreler, PH: piramidal hücreler, FH: fusiform hücreler (27).

2.4.2. Beyin Medullası (Beyin Beyaz Cevheri)

Beyin korteksinin altında konumlanan beyaz cevher, miyelinli sinir liflerinin oluşturduğu demetler ile nöroglia hücrelerinin bir araya gelmesinden meydana gelir. Bu alan, miyelinizasyon düzeyi yüksek lifler sayesinde sinirsel iletimin hızlı ve koordineli gerçekleşmesini sağlar. Beyaz cevherdeki sinir lifleri işlevlerine göre üç temel grupta toplanır:

Assosiyasyon (bağlantı) lifleri: Aynı serebral hemisferin içinde yer alan farklı kortikal bölgeleri birbirine bağlayan bu lifler, kısa ve uzun olmak üzere ikiye ayrılır. Kısa assosiyasyon lifleri komşu gyrusları birbirine bağlarken, uzun assosiyasyon lifleri aynı yarımküredeki farklı lobları birbirine bağlar.

Komissural lifler: Bir yarımküredeki korteksi, karşı yarımküredeki homolog kortikal alanlarla ilişkilendiren bu lifler, iki beyin yarımküresi arasında bilgi aktarımını sağlar.

Projeksiyon lifleri: Korteksi MSS'nin daha alt bölgeleriyle iletişim kurduran bu lifler, iki farklı grupta sınıflandırılır. Kortikofugal lifler, beyaz cevherden çıkarak bazal çekirdekler, beyin sapı ve omurilik gibi derin merkezlerde sonlanır. Kortikopedal lifler ise talamustan başlayıp kortikal alanda biter (28).

2.4.3. Meninksler

MSS'de beyin ve beyincik kafatası içinde; medulla spinalis ise omurga içerisinde yer alır. MSS organları, bağ dokusundan yoksun yumuşak ve jel kıvamında olan organlardır. Bu nedenle kafatası ve omurga tarafından koruma altına alınmıştır. Ek olarak bu yaşamsal organlar üç katmanlı bağ dokusu zarlarıyla çevrelenmiştir. Bu koruyucu zarlar, dıştan içe doğru dura mater (sert zar), araknoid mater (örümceksi zar) ve pia mater (ince zar) olarak adlandırılır. Bu üç zarın tümüne birden “meninks” denir. Dura mater’e “paşimeninks”, araknoid mater ve pia mater’e ise “leptomininks” denir (23).

2.4.3.1. Dura Mater (Sert zar)

Kafatasının periosteumuna sıkıca bağlı, yoğun bağ dokusundan oluşan dış zar katmanıdır. Kafatasında dura mater ile periosteum arasındaki ilişki doğrudan iken, omurga bölgesinde dura mater ile periosteum arasında epidural aralık (spatium epidurale) bulunur. Bu alanda ince duvarlı venler, gevşek bağ dokusu ve yağ dokusu yer alır (15). Dura mater iki tabakadan meydana gelir. Kafatasına yakın olan periosteal dura mater (endosteal tabaka), fibroblastlar,

osteoprogenitör hücreler, kollajen lif demetleri, zengin damar ağı ve sinirler içerir. Kollajen lifleri arasında elastik lifler de bulunur. İç tabaka olan meningeal dura mater ise daha yoğun fakat daha az damarlı bir yapıya sahiptir. Çoğunlukla fibroblastlardan, kollajen liflerden ve küçük kan damarlarından oluşur. Beyin bölgesinde kafatası kemiği ile dura mater sıkıca birleştiğinden epidural aralık yoktur. Bu alanda dura yüzeyini saran mezotel hücre bulunmaz. Damarlar, dura materi delerek periosteuma ulaşır. Dura mater, tübüler bir kılıf içerisinde kafatasından çıkan sinirlerin etrafını sarar ve sinirin dış kılıfı olan epineurium ile birleşir (21, 23). Dura materin iç tabakası, belirli bölgede içe doğru septumlar oluşturarak, kraniyal boşluğu falks cerebri, tentorium cerebelli, diafragma sella bölümlerine ayırır (26).

2.4.3.2. Araknoid Mater

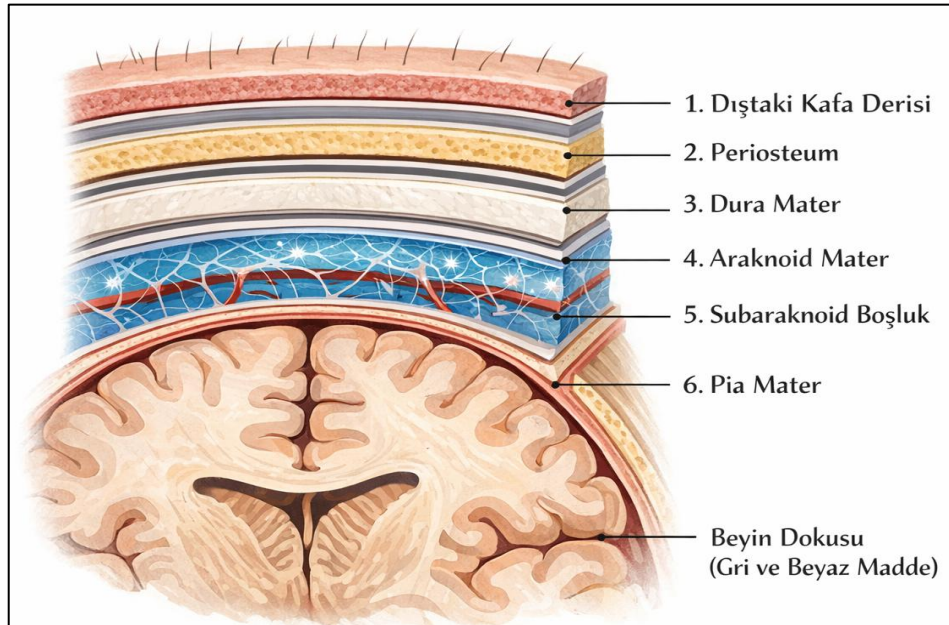
Araknoid mater, dura materin hemen altında yer alır. Örümcek ağına benzer bir yapı gösterir. Bu zar, iki ayrı bileşenden oluşur: biri doğrudan dura mater ile temas halinde bulunan yüzey tabakası diğeri ise pia mater ile araknoidi birbirine bağlayan ince trabeküler ağ sistemidir. Damar içermeyen bu ince yapı, beyin yüzeyindeki girusları örter; fakat sulkuslara doğru derinleşmez. Araknoid zar, omuriliği de çevreler ve kranial araknoidin yapısal bütünlüğünü sürdürür. Dura mater ile araknoid arasındaki boşluk subdural aralık, seröz sıvı içeren dar bir boşluktur. Araknoid ile pia mater arasında yer alan subaraknoid aralık ise BOS dolaşımına olanak sağlar (24). Subaraknoid boşluk, BOS içermesi sayesinde MSS'ni darbelere karşı koruyan sıvı dolu bir tampon görevi görür. Araknoid mater ile pia materin birbirine bakan yüzeyleri ile araknoidin dış yüzeyi, tek katlı mezotel hücreleriyle örtülüdür. Bu boşluk, bazı bölgelerde belirgin şekilde genişleyerek sisternalar adı verilen yapıları oluşturur.

Araknoid zar, belirli alanlarda dura materin içine doğru parmak benzeri çıkıntılar uzatır ve bu yapılar doğrudan venöz sinüslerle bağlantı kurar. Genişleyen uç kısımlarıyla dikkat çeken bu oluşumlar “araknoid villuslar“ olarak adlandırılır. Bu villuslar, subaraknoid boşlukta bulunan BOS'un venöz sistem içerisinde tek yönlü geçişini sağlayan valf benzeri yapılardır. BOS villusların tepe noktasından venöz sinüs içine aktarılır. Villusların uç kısmında dura mater oldukça incedir. Bu bölgede BOS ile venöz arasında yalnızca venöz endotelden oluşan bir bariyer yer alır. Bu bölgede bulunan damarların geçirgenliği, sistemik dolaşımdaki damarlara göre daha sınırlıdır (26, 28).

2.4.3.3. Pia Mater

Pia mater, MSS yapılarını doğrudan saran, ince yapılı ve yoğun damar ağına sahip bir bağ dokusu tabakasıdır. Beyin ve medulla spinalis ile yakın konumda olmasına rağmen, bu zar sinir hücreleri ya da aksonlarla doğrudan temas kurmaz. Bunun yerine buradaki damarlar pia mater aracılığıyla perivasküler bağ dokusu kılıfıyla bağlantı içerisindedir (26). Pia mater ile nöral yapılar arasında, bu zarın sıkıca tutunmasını sağlayan ve sinir sistemiyle BOS arasında bir sınır oluşturan nöroglial uzantıların meydana getirdiği bir fiziksel bariyer yer alır. Pia mater mikroskopik incelemede iki farklı katman görülür (15).

İntimal pia tabakası, beyin dokusuna en yakın yerleşimi olan, ince zar yapısındaki katmandır. Bu katmanda retiküler lifler bulunur ve bu lifler fibröz uzantılar oluşturarak sinir dokusu içine doğru ilerler. Epipial tabaka ise pia materin dış kısmında yer alır. Bu katman, yoğunlukla kollajen lifler ve içinde sınırlı sayıda fibroblast barındırır. Dış yüzeyi, tek katlı yassı mezotel hücreleriyle kaplanmıştır. Beyin dokusuna giren arterler, beraberlerinde pia materi de yanında taşır. Bu nedenle zar, prekapiller arteriollere kadar damarların etrafını sarmaya devam eder. Pia mater ile damarlar arasında boşluğa Wirchow-Robin aralığı ya da perivasküler aralık adı verilir. Bu boşluk, damar ilerledikçe daralır ve kortikal düzeyde tamamen kaybolur. Embriyonik gelişim açısından araknoid ve pia mater aynı mezodermal kökene sahip oldukları için sıklıkla pia-araknoid olarak birlikte anılır. Bu iki zarın ortak kökenine olan kanıt, erişkin meninkslerinde araknoid ile pia mater arasındaki gözlenen çok sayıda bağ dokusu köprüsüdür (26).



Şekil 2.6: Beyin zarlarını gösteren şematik çizim (29).

2.5. Kan Beyin Bariyeri (KBB)

MSS, insan organizmasında işlevsel bütünlüğü en kolay bozulabilen sistemlerdendir. Nöronal aktivitenin sürdürülebilmesi için iyon konsantrasyonunun sabit kalması ve sinir dokusunun metabolik gereksinimlerinin etkin biçimde karşılanması büyük önem taşır. Günlük yaşamda yer alan birçok madde, sistemik dolaşımda zararsız olarak metabolize edilmesine rağmen, nörotoksik etkiler oluşturabilmektedir. Bundan dolayı MSS ile dolaşım sistemi arasında seçici geçirgen özelliğe sahip bir arayüzün bulunması yaşamsal önemlidir. Bu arayüz; iyon dengesini dinamik bir biçimde düzenlemek, gerekli besinleri taşınmasını sağlamak ve zararlı moleküllerin geçişini sınırlandırmak gibi pek çok görev üstlenir. Kan-beyin bariyeri (KBB) olarak adlandırılan bu yapı beyin mikrovaskülatüründe homeostatik dengenin korunmasında temel rol oynar ve MSS'nin iç ortamını kararlı tutarak nörolojik fonksiyonlarını sağlıklı biçimde sürdürmesine katkı sunar (30).

2.6. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucu kimyasallar, vücudun hormonal sistemine dışarıdan etki eden ve endokrin dengeyi bozan kimyasal bileşiklerdir. Bu maddeler hormonların sentezlenmesi, salgılanması, taşınması, metabolize edilmesi, reseptörlere bağlanması ya da parçalanarak vücuttan uzaklaştırılması gibi fizyolojik süreçlerle doğrudan ilgilidir. Etkilerini hormon metabolizmasını uyararak ya da baskılayarak gösterirler. Bu durum da dolaşımdaki hormon düzeylerinde değişikliklere yol açabilir. Yapısal olarak birçok doğal hormona benzeyen bu maddeler, oldukça düşük konsantrasyonlarda bile biyolojik aktivite gösterebilir. Hücresel düzeyde, endojen hormonları taklit ederek benzer etkilere neden olabilir veya reseptörleri işgal ederek gerçek hormonların etkisini engelleyebilirler (31-34).

2.6.1. Endokrin Bozucu Kimyasalların Sınıflandırılması

Endokrin bozucu kimyasallar, yapısal çeşitlilik açısından oldukça geniş bir grubu temsil eder. Heterojen özellikleri nedeniyle bu maddeler, kaynaklarına ve kimyasal yapılarına göre temel olarak iki ana grupta incelenebilir:

2.6.1.1. Doğal Kökenli Endokrin Bozucular

Bazı bitkisel kaynaklı maddeler, özellikle insan ve hayvan besinlerinde bulunan fitoöstrojenler bu gruba girer. Örnek olarak genistein, mirisetin ve kumestrol gibi bileşikler

verilebilir. Bu maddeler bitkisel hormonlara benzer yapılar taşıyarak endokrin sistem üzerinde östrojenik etki gösterebilir (35) .

2.6.1.2. Sentetik Endokrin Bozucular

Endüstriyel üretim süreçlerinde ortaya çıkan ya da doğrudan kullanılan kimyasal maddeler bu gruba dahildir. Bu bileşikler hem yaygın kullanım alanlarına hem de toksikolojik etkilere göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmada sanayi kimyasalları ve yan ürünleri grubunda, poliklorlu bifeniller (PCB), polibromlu bifeniller ve dioksinler mevcuttur. Plastik türevleri sınıfına örnek olarak Bisfenol A (BPA) verilmektedir. Bu maddeler, özellikle içecek kapları ve gıda ambalajlarında yer alır. Plastikleştiriciler sınıfında yer alan ftalatlar, yumuşak plastik üretiminde yaygın biçimde kullanılır. Zirai kimyasallara verilen örneklerin başında pestisitler (ör. DDT) ve fungusitler (ör. Vinclozolin) gelmekte olup tarımsal alanlarda yoğun kullanıma sahiptirler. Bazı içerikli farmasötik ajanlardan özellikle dietilstilbestrol (DES) gibi sentetik östrojenler, bu gruba örnek teşkil eder (35).

2.6.2. Endokrin Bozucuların Biyolojik Etkileri

Endokrin bozucu kimyasallar çoğunlukla lipofilik özellik gösterir, yani yağda çözünürler. Yağ dokularında kolayca tutundukları için metabolizmadan yavaş atılırlar ve durum biyolojik yarı ömürlerini uzatır (36). Hem insanlarda hem de hayvan modellerinde endokrin sistemin fizyolojik işleyişini bozarak çeşitli olumsuz sonuçlara yol açmaktadır (37). Bu maddelerin etkileri yalnızca hormonal sistemi sınırlı tutmayıp, başta üreme olmak üzere bağışıklık ve sinir sistemleri üzerinde de belirgin hasarlara neden olabilmektedir. Ayrıca insanlarda bazı tümör tiplerinin gelişimi, doğumsal anomaliler ve büyüme-gelişme bozuklukları gibi ciddi sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmiştir (38). Endokrin bozucuların dikkat çeken etkilerinden biri de reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırmalarıdır. Oluşan bu serbest radikaller, hücresel yapıları hedef alarak özellikle proteinlere, DNA'ya ve membran lipidlerine zarar verir. Bu etkileşimler sonucunda oksidatif stres artar ve dokularda kalıcı hasar meydana gelebilir (39).

2.6.3. Endokrin Bozuculara Maruziyet Yolları

Endokrin bozucu kimyasallara maruziyet çeşitli yollarla gerçekleşebilir. Bu kimyasallar kontamine içme suyunun tüketilmesi, kirli havanın solunması veya cilt yoluyla emilmesi gibi farklı yollarla vücuda girebilmektedir (31, 32).

Endokrin bozucu bileşiklerin büyük bir kısmı su kaynaklarına karışma potansiyeline sahiptir. Bu şekilde yüzey ve yer altı suları bileşikler için bir taşıyıcı ortam haline gelebilir. Özellikle atık su arıtma süreçlerinin bazı basamaklarında (flokülasyon, çöktürme, filtrasyon, klorlama gibi) bu kirleticilerin tamamen uzaklaştırılamaması, suyu potansiyel bir kontaminasyon kaynağı haline getirmektedir. Ayrıca yüzeysel akışlar yoluyla tarım alanlarından veya kirli topraktan kanalizasyon sistemlerine karışan maddeler de bu duruma katkıda bulunur (37).

Yapılan bazı araştırmalarda, hayvansal kaynaklı gıdalarla belirli düzeyde endokrin bozucu kimyasalların (EBK) varlığı rapor edilmiştir. Özellikle balık, sığırtı, yumurta ve peynir gibi yağ içeriği yüksek besinlerde, 1-2 mg/kg düzeyinde poliklorlu bifenil (PCB) tespit edilmiştir. İnsanların yüksek miktarda balık tüketmeleri ve kontamine anne sütüyle bebeklerini beslemeleri, bu tür kimyasallara maruziyeti artmaktadır (40).

Fitalatlar, yüksek üretim hacmine sahip plastikleştiriciler olup, hem evsel hem de endüstriyel ürünlerde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Gıda kapları, içecek şişeleri, plastik tabaklar, ambalaj malzemeleri ve oyuncaklar gibi günlük tüketim ürünlerinde sıklıkla yer alırlar. Bu maddeler, çocuk ürünleri ve biberonlarda bulunabildiğinden, bebekler açısından önemli bir maruziyet kaynağıdır. Bu nedenle, Amerika Birleşik Devletlerinde 2008 yılında yürürlüğe giren Tüketici Ürünleri Güvenliğini İyileştirme Yasası (CPSIA), çocuk ürünlerinde altı fitalat türevinin kullanımını yasaklamıştır (37).

2.6.4. Nonilfenolün Genel Özellikleri

Nonilfenol (NP), DES, BFA, DDT, polibrominat difenil eter (PBDE) ve PCB gibi maddelerle birlikte en yaygın bilinen endokrin bozucular arasında olan alkilfenol polietoksilat (AFEO) grubunda yer almaktadır (41). AFEO bileşikleri, çevrede kalıcı olup ve dokularda birikerek toksik etkilere yol açmaktadır. AFEO bileşikleri, ortam sıcaklığı 20°C'nin üzerine çıktığında çözünme sürecine girer. Bu süreçte, etoksilat grupları hidrolizle uzaklaştırılır ve bunun sonucunda oktilfenol, bütülfenol ve NP gibi bileşikler oluşur (41). NP; tekstil sanayi, tarımsal ilaçlama, temizlik ürünleri, leke çıkarıcılar, gıda paketlenme sistemleri, kozmetik üretimi ile boya ve kaplama sanayilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (42). Ayrıca yapay reçine üretiminde ise katalizör işlevi gören seyreltici olarak rol almaktadır. Plastik gıda ambalajlarında yaygın biçimde kullanılan bir antioksidan olan tris (4-nonil-fenil) fosfit (TNPP), NP içeren bir bileşiktir ve bu bileşik NP'nin kullanımıyla sentezlenmektedir. TNPP, genel olarak güvenli olarak değerlendirilse de, lipofilik özellikleri nedeniyle özellikle yağ içeriği yüksek besinlerle temasında insan vücuduna geçme potansiyeline sahiptir (42). NP,

yüksek lipofilik yapısı sebebiyle akümülayon eğilimindedir (43). NP nehirde yaşayan balıklara geçtikten sonra çoğunlukla böbrek ve karaciğerde depolanmaktadır (44). NP' ün biyobirikim faktörü araştırıldığında bu kimyasalın tatlı sularda yaşayan organizmalarda ve kuşlarda biyolojik olarak birikme potansiyelinin yüksek olduğu bildirilmiştir (45). İnsanlar, NP gibi toksik maddelere biyolojik birikim yoluyla en çok maruz kalan canlılardır. NP'ün atık sular yoluyla yayılması dışında plastik kaplardan besin ve içme sularına da geçtiği gösterilmiştir (46, 47). Bu bileşiğin Avrupa ülkelerinde kullanımı ve üretimi 2003'ten beri yasaktır (48). Bu nedenle Japonya ve Kanada'da yasak olan nonilfenol hakkında yeterli risk değerlendirme çalışması bulunmamaktadır. Tolere edilen günlük alınımların miktarı (TDI), Danimarka Çevre Ajansı (Danish Environmental Agency) tarafından 5 µg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiştir (48).

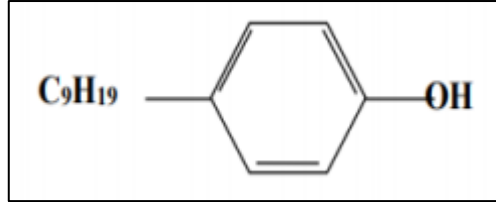
2.6.4.1. Nonilfenolün Tarihçesi

NP, ilk kez 1940 yılında sentezlenmiş ve kimyasal endüstride kullanımı 1960'lı yıllardan itibaren hızlı bir şekilde yaygınlaşmıştır (49). Sucul ekosistemler üzerindeki NP'nin toksik etkileri, 1980-1985 yılları arasında gerçekleştirilen çeşitli bilimsel çalışmalarla saptanmıştır (46, 47). Bu dönemde yapılan çevresel analizlerde, NP'nin atık su arıtım tesislerinden elde edilen çamurlarda ve doğal tortularda 50 ile 200 mg/g arasında değişen konsantrasyonlarda biriktiği tespit edilmiştir (2). 1990'lı yıllarda elde edilen bulgular ise, NP' nin endokrin sistemi olumsuz etkileyebilen özelliklere sahip olduğunu ve özellikle balık türlerinde östrojen benzeri fizyolojik tepkilere neden olduğunu göstermiştir (46, 47). Bunun yanı sıra, çeşitli araştırmalar NP kalıntılarının gıda maddelerinde de tespit edildiğini ortaya koymuş ve böylece insan sağlığı açısından taşıdığı risklere dikkat çekilmiştir (50, 51). Bu bilimsel veriler doğrultusunda, birçok ülkede NP' nin üretimi ve kullanımına yönelik sınırlayıcı düzenlemeler yürürlüğe girmiştir. Örneğin, içme suyunda NP konsantrasyonunun 28 µg/L'yi geçmesinin sağlık açısından olumsuz sonuçlar doğurabileceği belirtilmiştir. Ancak, Hindistan ve Çin gibi bazı ülkelerde söz konusu düzenlemelere rağmen NP üretimi halen geniş ölçekte sürdürülmektedir.

2.6.4.2. Nonilfenolün Kimyasal Yapısı

Nonilfenol etoksilatlar (NPE) suda ve anaerobik koşullarda, parçalanarak NP'ye dönüşür (48). NP yapısındaki benzen halkası sayesinde canlılarda birikebilen bir kimyasaldır (52). Diğer AFE'lere göre organizmada daha fazla birikir ve daha toksiktir (52). Şekil 6' de NP' ün kimyasal yapısı gösterilmiştir. NP, açık sarı renkli ve kıvamlı bir sıvıdır. Hafif fenol benzeri

bir kokusu bulunur. Saflık oranı genellikle %90 civarındadır. Erime noktası, farklı zincir yapılarından dolayı tam olarak belirli değildir ve -10°C ile 20°C arasında değişen değerler bildirilmiştir. Kaynama noktası yaklaşık 290-310°C arasındadır; ancak bu sıcaklıklara ulaşmadan parçalanmaya başlayabilir. 20°C sıcaklıkta yoğunluğu 0.95 g/mL civarındadır.



Şekil 2.7: Nonylphenol'ün kimyasal yapısı (42).

2.6.4.3. Nonilfenolün Genel Toksisitesi

Erkeklerin NP'ye maruziyet oranının aynı yaş grubundaki kadınlar ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu ve günlük NP alımının yaşa bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Okul öncesi dönemde çocukların NP'ye maruziyetinin çok daha yüksek olduğu ve buna bağlı olarak günlük alınan dozun vücut ağırlığı ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (53). Ayrıca 2008'de İtalya'da yapılan bir çalışmaya göre anne sütünde NP tespit edilmiş ve bu durum yağ doku ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmaya göre NP seviyesi 13–56 µg/L'dir. Bu da anne sütü ile beslenen çocuklar için risk oluşturmaktadır (54). Östrojenle ilişkili reseptörlerin düzenlenmesi ve sentezi sirkadiyen ritim ile kontrol edilen ve yürütülen bir süreçtir. Fareler ile yapılan bir çalışmada, NP'nin ve diğer endokrin bozucuların bu reseptörlerin sentezini etkilediği ortaya koyulmuştur (55). Sıçanlarda NP'nin oral yolla alınmasının testislerde patolojik sonuçlara neden olduğu, epifiz bezinden salgılanan melatonin hormonunun ise bu hasar için koruyucu özellik gösterdiği belirtilmiştir (56). Yapılan çalışmalarda genel olarak NP'nin, insanlarda steroid hormonları taklit edebildiği tespit edilmiştir (47). NP ile yapılan çalışmalar sonucunda oral gavaj yolu ile verilen NP'nin 10 dakika sonra kanda tespit edildiği ve intravenöz uygulamalar sonucunda da yarılanma ömrünün 310 dakika olduğu belirtilmiştir. Yarılanma ömrü, vücuttaki plazma konsantrasyonunu veya kimyasal miktarını %50 azaltmak için geçen süre olup bu nedenle önemlidir. Ayrıca NP'nin laboratuvar hayvanlarında cilt ve gözde tahriş edici ve aşındırıcı olduğu gözlemlenmiştir (57). NP üreme sistemi dahil birçok sistem için toksik bir bileşiktir. Yapılan çalışmalar sonucu etkilenen gebe bireylerin fetal kordon kanında, maternal dolaşımda, plasenta da NP'ye rastlanmıştır. Buna göre NP, plasentadan geçebilen bir kimyasaldır. Maternal dolaşımdaki NP ile amniyotik sıvı arasında bir ilişki olduğu ortaya koyulmuştur (53). Türkiye'de Mersin

bölgesinde 103 idrar örneği 3-51 yaş aralığındaki kadın, erkek ve çocuklardan toplanmış olup yapılan analizler sonucunda toplanan idrar örneklerinde BPA ve NP' ye rastlanmıştır (58). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, NP' nin oral yolla maruziyetinin testislerde patolojik bulgulara neden olduğu tespit edilmiştir (56). İnsanlarda ise NP'nin östrojen hormon seviyelerini etkileyerek endokrin bozucu özellik gösterdiği belirtilmiştir (59).

2.6.4.4. Nonilfenolün MSS Üzerindeki Toksik Etkileri

Bu bileşik karaciğer, böbrek, tiroid, göz, pankreas ve solunum sistemlerinin yanı sıra MSS üzerinde de ciddi toksik etkiler gösterebilen bir kimyasaldır (60-63). Xu ve arkadaşlarının bir çalışmasında gebeliğin 9-15. günleri arasında 50, 100 ve 200 mg/kg/gün dozlarında NP' ye maruz kalan sıçanların erkek yavrularında, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında belirgin azalma görülmüştür (64). Bu etkilerin, NP' nin hipokampusta yapısal bozulmalara yol açması ve nöronal toksisiteye neden olması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda NP'nin kan-testis bariyerini geçerek hormon düzeylerini etkilemesi, hem sinirsel gelişimi hem de davranışsal işlevleri bozabilmektedir. Erken yaşam döneminde NP veya benzeri endokrin bozuculara maruz kalmak, beyin gelişimi ve davranış üzerinde kalıcı etkiler bırakabilmektedir. Ishido ve arkadaşları yeni doğan sıçanlara uygulanan 87 nmol dozundaki NP'nin, dopaminerjik sistemin gelişimini bozduğunu ve bu durumun 4-5 haftalık dönemde hiperaktiviteye yol açtığını belirtmiştir (65). Bu etki, özellikle orta beyindeki dopamin üreten çekirdeklerde tirozin hidroksilaz (TH-ir) düzeyinin azalması ile ilişkilendirilmiştir. NP bileşiklerinin merkezi sinir sistemine zarar verdiği spesifik beyin bölgelerinin çalışmasını etkilediği öne sürülmüştür. In vivo ve in vitro çalışmalarla NP'nin merkezi sinir sistemi hücrelerinde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (66).

Yapılan bir çalışmada NP uygulamasında sıçan beyinde glutatyon (GSH) seviyesinin azaldığı, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehitin (MDA), kontrol grubuna kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu tespit edilmiş. Bu çalışma ile NP'nin beyin dokusunda oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (67). MSS üzerine etkileri; bilişsel fonksiyonların zayıflaması, öğrenme ve hafıza süreçlerinde bozulma, nörogenezde aksaklıklar gibi çeşitli alanlarda kendini göstermektedir (68). Lipofilik özelliği sayesinde NP, yutulmasının ardından kan dolaşımına geçer ve kan-beyin bariyerini kolayca aşarak sinir dokularına ulaşır (69). Nörotoksisite mekanizmaları arasında inflamasyon (70), oksidatif stres (71), gliosis ve nöron kaybı (67) gibi süreçler de yer alır. Matsunaga ve arkadaşları, NP'nin hipokampal nöronlarda dendritik büyümeyi engellediğini ve bu durumun çocukluk

döneminde psikolojik bozukluk riskini artırabileceğini rapor etmiştir (72). COX-2 ve iNOS gibi iltihapla ilişkili genlerin aşırı aktivasyonu, özellikle hipokampus ve korteks bölgelerinde gözlemlenmiş, bu da NP'nin beyin dokusunda kronik inflamasyona yol açtığını göstermektedir (73). Mao ve arkadaşları tarafından yürütülen başka bir deneyde, 90 gün boyunca 0–200 mg/kg/gün dozlarında NP verilen farelerde; SOD, CAT, GPx ve GR gibi antioksidan enzimlerin aktivitesi azalmış, MDA düzeyleri ise artmıştır (74). Bu sonuçlar, NP'nin beyinde oksidatif stres ve apoptoz oluşturarak bilişsel yetilerde bozulmaya neden olduğunu göstermektedir.

2.7. Alfa Lipoik Asit

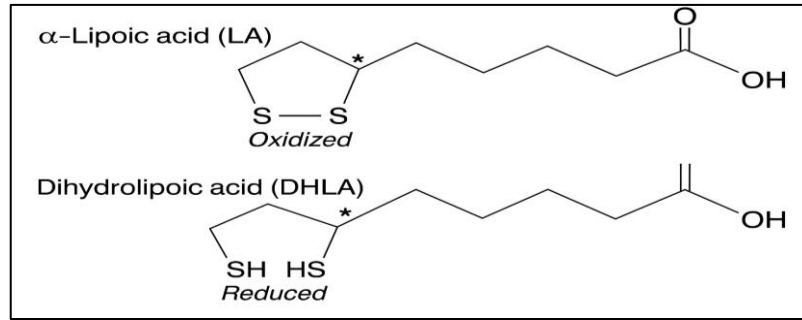
2.7.1. Alfa Lipoik Asitin Tarihçesi

Lipoik Asit (LA) insan vücudunda sentezlenebilmesine rağmen, keşfi 1937 yıllarına dayanmaktadır. Bu dönemde yapılan çeşitli çalışmalarda, laktik asit bakterilerinin büyümesini stimüle eden asetatin yerini alabilecek kristal yapıda bir bileşik, karaciğerden elde edilmiş ve bu bileşiğin laktik asit bakterileri tarafından piruvatın oksidatif dekarboksilasyonu için gerekli olduğu bulunmuştur. Daha sonra 1950'lerde asetatin mevcut olmadığı ortamlarda, apo-piruvat dehidrojenazın bir aktivatörü olarak *Streptococcus lactis*'in büyümesi için oldukça aktif olan kalıntılar tespit edilmiş ve bu kalıntılara 'lipoik asit' adı verilmiştir. Bu isim ise bileşiğin yağ çözücülerinde oldukça çözünür olması, asidik olması ve piruvatın oksidatif dekarboksilasyonu yoluyla yağ asitlerinin bir öncüsü olan asetat oluşumunda yer alması gerçeğinden türetilmiştir (75). Daha sonra moleküler yapının tespiti ile 1,2-ditiolan-3-pentanoik asit olarak adlandırılmıştır. 1994 yılında, yapılan bir çalışmada ise lipoik asit; '*Escherichia coli*'nin piruvat dehidrojenaz, α -ketoglutarat dehidrojenaz ve glisin parçalayıcı enzim komplekslerinin işlevi için gerekli olan, kovalent olarak bağlı disülfür içeren bir kofaktördür' şeklinde tanımlanmıştır (76).

2.7.2. Alfa Lipoik Asitin Kimyasal Yapısı

Alfa lipoik asit (ALA) doğal olarak oluşan ve iki sülfür molekülü içeren sekiz karbonlu kısa zincirli bir yağ asitidir (77). ALA içerisinde 2 adet sülfür marifetiyle, organizmaların enerji metabolizmaları sırasında gerçekleşen reaksiyonlarda kofaktör olarak rol alan ve antioksidan işlevi belirgin olan, mitokondriyal membranlarda destek görevi gören bir moleküldür (78). Düşük redoks potansiyeli ve benzersiz redüksiyon kapasitesi sayesinde ROS'un

yakalanmasında ve diğer antioksidanların okside formlarının redüksiyonunda görev alan ALA' ya bu yüzden 'antioksidanların antioksidanı' denilmektedir (79). ALA'nın iki formu bulunmaktadır. Bunlar redükte form ve redükte olmayan formlardır (Şekil 2.8). Vücutta gerekli durumlarda bu formların birbirine dönüşmesi mümkündür. ALA'nın redükte formuna ayrıca dihidrolipoik asit (DHHLA) ismi de verilmektedir. DHHLA hücre içi reaksiyonlarda daha aktif olan formdur (80). ALA vücutta DHHLA'ya indirgenir ve vücutta doğal olarak redükte formda bulunur. DHHLA antioksidan ve prooksidan etki göstermektedir. Prooksidan etkiyi özellikle demir varlığında göstermektedir (81).



Şekil 2.8: α-lipoik asitin okside formu ile dihidrolipoik asit (DHHLA)'ın indirgenmiş formunun kimyasal yapılarının şematik gösterimi (81).

2.7.3. Alfa Lipoik Asitin Metabolizması

ALA, özellikle enzim yapısı fazla olan hayvanlarda ve bitkilerde yoğun miktarda bulunur (100). Bitkiler içerisinde en fazla ıspanak, bezelye, domates, pirinç kepeği, Brüksel lahanası, brokoli de bulunurken, hayvan dokuları içerisinde ise en fazla karaciğer, kalp ve böbrekte yer alır (82). ALA, pek çok prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalardan da sentezlenebilen bir moleküldür (83, 84). Ökaryotik mikroorganizmalarda sentez yeri mitokondrilerdir. Mitokondride oktanoik asit ve bir sülfür kaynağı kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yapısındaki karbon iskeleti oktanoik asitten sağlanırken, sülfürlenme reaksiyonu sonucunda ALA oluşur. Bu biyosentez süreci, mitokondride bulunan lipoik asit sentezaz enzimi aracılığıyla yürütülür. Bu süreçte oktanoik asit ve sülfür kaynağı olan sistein, substrat olarak kullanılır (10). İnsanlardaki sentez yeri özellikle karaciğer olup, diğer dokularda da sentezi yapılmaktadır. ALA, oral veya intravenöz yollarla vücuda alındığında hızla absorbe edilir ve burada aktif form olan DHHLA'ya indirgenir. Vücut içerisinde taşıma yolları ile ilgili iki mekanizma bildirilmiştir. 75 µm'den daha küçük moleküller, taşıyıcılı olarak reuptake (taşıyıcı aracılı geri alım) mekanizmasıyla taşınırken; yüksek konsantrasyondan daha düşük konsantrasyona geçişte ise pasif difüzyon yolu ile taşınması

gerçekleşmektedir (85). ALA'nın oral alımlarda %93'den fazlası bağırsaklardan emilir. ALA emilimini takiben 1,2 ditiyolen halkasının indirgenmesiyle DHLA formuna dönüşür (86). Vücuttan eliminasyonu %80 oranında böbrekler yardımıyla sağlanır (79).

2.7.4. Alfa Lipoik Asitin Antioksidan Etkisi

ALA'nın, antioksidan etkinliği yüksek olan E vitamini ve C vitaminini rejenere ettiği son yıllarda gösterilmiştir. E vitamini antioksidan döngüsünün en önemli bileşenlerindendir. Özellikle membran ve yağ dokusundaki serbest radikal aktivasyonunu durdurmak için çalışır (87). Hem ALA'nın hem de DHLA'nın serbest radikallerden olan hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipoklorik asit gibi serbest radikalleri detoksifiye ettiği bildirilmiştir (88, 89). Aynı zamanda ubikinol gibi antioksidanların oluşumuna destek olarak hücrenin antioksidan kapasitesini desteklemektedir (89). ALA'nın lipofilik yönü sebebiyle KBB'yi geçme potansiyeli vardır. Bu özellik sayesinde potansiyel bir beyin antioksidanı ve terapötik ajan olarak kullanılabilir (11).

2.8. İnterlökin-1 Beta

İnterlökin-1 beta (IL-1 β), MSS'de meydana gelen inflamatuvar süreçlerin başlatılmasında ve sürdürülmesinde kritik rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir. Mikroglialar tarafından üretilen IL-1 β , hücrel stres, patojen varlığı ya da travma gibi uyarıcılarla aktive edilir ve çeşitli sinyal yollarını etkileyerek nöroinflamasyonun şekillenmesine katkı sağlar (90, 91). IL-1 β , nöronal uyarılabilirliği ve glial hücre aktivasyonunu artırarak, sitokin üretimini teşvik eder. Bununla birlikte, KBB geçirgenliğini değiştirme kapasitesine sahip olması, periferik immün bileşenlerin MSS'ye olan erişimini kolaylaştırarak inflamatuvar yanıtı derinleştirir (92, 93). Özellikle Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında IL-1 β düzeylerinin artmış olması, bu sitokinin nörodejeneratif süreçlerdeki patojenik rolünü desteklemektedir (94, 95). Uzun IL-1 β aktivitesi, fizyolojik inflamatuvar yanıtın ötesine geçerek hücre hasarına, sinaptik disfonksiyona ve nöronal ölümle sonuçlanan kronik nöroinflamatuvar ortamın oluşmasına neden olabilir. Bu nedenle, IL-1 β hedefli tedavi stratejileri, birçok nörodejeneratif hastalıkta potansiyel terapötik yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (96, 97).

2.9. IBA-1: Mikroglia Aktivasyonunun Spesifik Bir Belirteci

İyonize Kalsiyum Bağlayıcı Adaptör Molekölü 1 (IBA-1), yalnızca mikroglia eksprese edilen, mikroglia aktivasyonunu değerlendirmede kullanılan spesifik bir hücresel markerdir. Normal koşullarda dinlenim halinde bulunan mikroglialar, sinir sistemi hasarı, toksik ajanlar veya enfeksiyon gibi uyarılarla aktive olur. Bu aktivasyon sonrasında morfolojik, fonksiyonel değişiklikler gösterirler. Aktivasyon sürecinde IBA-1'in ekspresyonu belirgin şekilde artar (90, 98, 99).

IBA-1, aktin iskeleti düzenleyici proteinlerle etkileşerek mikrogliaların fagositoz yeteneklerini artırır. Bu sayede, hücre dışı enkazın temizlenmesi, hasarlı nöronların ortadan kaldırılması ve patojenlere karşı savunma gibi önemli görevler üstlenilir (96, 100). Ancak kronikleşen aktivasyon durumlarında mikroglialar, proinflamatuvar fenotipe (M1) geçerek IL-1 β , TNF- α gibi mediatörleri salgılar ve bu durum nörodejeneratif süreci hızlandırabilir (101, 102). IBA-1'in immünohistokimyasal olarak kolaylıkla saptanabilir olması sayesinde deneysel modellerde ve insan doku örneklerinde mikroglial yanıtı izlemede sıkça tercih edilen bir biyobelirteçtir. Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda artmış IBA-1 düzeyleri, hastalık progresyonu ile mikroglial aktivasyon arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (48).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Nonilfenol ile Oluşturulan Nörotoksisitede Alfa Lipoik Asitin Etkilerinin Araştırılması isimli bu tez çalışmasının tüm deneysel protokolleri, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Bkz. EK 1); TIP.A4.25.003 no'lu proje olarak Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

3.2. Hayvan Deney ve Çalışma Düzeni

Çalışmada, 220±20 gr ağırlığında Wistar Albino cinsi 30 adet erkek rat kullanılacaktır. Deney öncesi ve deney sırasında tüm hayvanlar 12 saat ışık 12 saat karanlık foto periyodunda ve 22-24 derece sabit ısıdaki odalarda barındırıldı. Hayvanların beslenmesinde, pellet yem ve çeşme suyu kullanıldı. Yem ve su tüketiminde kısıtlama yapılmadı. Çalışmada ratlar, her birinde 6'şar rat olacak şekilde rastgele dağıtıldı. Deney protokolünde kullanılacak sıçanlar 5 gruba ayrıldı. Deney toplam 28 gün sürmüş olup, hayvanların vücut ağırlıkları deney başlangıcında (Gün 0), deneyin 21. Gününde (Gün 21) ve deney sonunda (Gün 28) ölçülerek takip edildi.

Kontrol grubu: Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir işlem yapılmadı. Çalışmanın sonunda bu gruptaki sıçanlar, ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidroklorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) genel anestezisi altında doku örnekleri toplanarak servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

Sham grubu: Çalışma boyunca NP ve ALA' yı çözen mısır yağı bu gruptaki sıçanlara oral gavaj yolu ile verildi. İşlem sonunda sıçanlar, ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidroklorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) genel anestezisi altında doku örnekleri toplanarak servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

NP grubu: Bu gruba 21 gün boyunca mısır yağında çözdürülen 100 mg/kg dozda NP oral gavaj yoluyla verildi. Çalışmanın sonunda (4. hafta sonunda) bu gruptaki sıçanlar, ksilazin

(10 mg/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidroklorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) genel anestezisi altında doku örnekleri toplanarak servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

NP + ALA grubu: Bu gruba 21 gün boyunca mısır yağında çözdürülen 100 mg/kg NP verilmiştir. Ardından 7 gün boyunca 100 mg/kg ALA, yine mısır yağında çözdürülerek oral gavaj yoluyla uygulandı. Çalışmanın sonunda bu gruptaki sıçanlar, ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidroklorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) genel anestezisi altında doku örnekleri toplanarak servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

ALA grubu: Bu gruba 7 gün boyunca 100 mg/kg ALA, mısır yağında çözdürülerek oral gavaj yoluyla verildi. Çalışmanın sonunda bu gruptaki sıçanlar, ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidroklorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) genel anestezisi altında doku örnekleri toplanarak servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

Tablo 3.1: Deney grupları.

Kontrol	Hayvanlara herhangi bir işlem yapılmadı.
Sham	Çalışma süresince NP ve ALA'nın çözücüsü kadar hacimde mısır yağı oral gavaj yoluyla verildi.
NP	21 gün boyunca mısır yağında çözdürülen 100 mg/kg dozda NP oral gavaj yoluyla verildi.
NP+ALA	21 gün boyunca mısır yağında çözdürülen 100 mg/kg dozda NP uygulanıp, ardından 7 gün boyunca 100 mg/kg dozda ALA, yine mısır yağında çözdürülerek oral gavaj yoluyla verildi.
ALA	7 gün boyunca 100 mg/kg ALA, mısır yağında çözdürülerek oral gavaj yoluyla verildi.

3.3. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan NP (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) ve ALA (Sigma-Aldrich, CAS: 1077-28-7, St. Louis, MO, USA) ticari olarak temin edilmiştir. İmmünohistokimyasal boyama, Lab Vision™ UltraVision™ Large Volume Detection System (anti-polyvalent, HRP, TA-125-HL) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4. Histopatolojik Analizler

Her bir deney grubuna ait beyin dokularının histolojik olarak değerlendirilebilmesi için, deney sonunda alınan doku örnekleri %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edilmiştir. 72 saat formaldehitte bekleyen dokular akan musluk suyunda yıkanarak artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek ksilol ile şeffaflandırıldıktan sonra parafine gömülmüş ve parafin bloklar hazırlanmıştır (Tablo 3.2). Sıçanlara ait dokuları içeren parafin bloklardan alınan 5 µm'luk kesitler histopatolojik değerlendirme amacıyla rodajlı lamlara alınmıştır. Ayrıca

immünohistokimyasal boyamalar için de polilizin kaplı lamalar kullanılmıştır. Hazırlanan lamalar standart histolojik boyama yöntemi kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırılmış ve dereceli alkol (%100, %96, %80, %70, %50) serilerinden geçirilip suda yıkanmıştır. Genel histolojik yapının belirlenmesi amacıyla kesitler Hematoksilen&Eozin (H&E) (Tablo 3.3) ve ayrıca nöronal hasarın (nissl granüllerinin) belirlenmesi açısından Toluidin Blue (Tablo 3.4) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilolden geçirilip entellan damlatılarak lamel yardımıyla kapatılacak ve ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

Tablo 3.2: Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği.

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Musluk suyu	2 saat	7	Absolü Alkol	3-5 dk
2	%50 Alkol	10 dk	8	Absolü Alkol	1 dk
3	%70 Alkol	10 dk	9	Ksilen	1 dk
4	%80 Alkol	10 dk	10	Ksilen	1 dk
5	%96 Alkol	5 dk	11	Ksilen	1 dk
6	Absolü Alkol	5 dk	12	Eriyik parafin (60 °C)	1 dk

Tablo 3.3: Hematoksilen&eozin boyama tekniği.

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etiv (60 °C)	2 saat	14	Eozin	3-5 dk
2	Ksilen I	10 dk	15	Akarsu	1 dk
3	Ksilen II	10 dk	16	%50 Alkol	1 dk
4	Ksilen III	10 dk	17	%70 Alkol	1 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	18	%80 Alkol	1 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	19	%96 Alkol	1 dk
7	%96 Alkol	5 dk	20	Absolu Alkol I	1 dk
8	%80 Alkol	5 dk	21	Absolu Alkol II	2 dk
9	%70 Alkol	5 dk	22	Absolu Alkol III	2 dk
10	%50 Alkol	5 dk	23	Ksilen I	20 dk
11	Akarsu	2 dk	24	Ksilen II	20 dk
12	Hematoksilen	5-8 dk	25	Ksilen III	20 dk
13	Akarsu	5 dk	26	Kapatma	

Tablo 3.4: Toluidin Blue boyama tekniği.

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etiv (60 °C)	2 saat	10	Distile su	2 dk
2	Ksilen I	10 dk	11	Toluidin Blue %0,1	8 dk
3	Ksilen II	10 dk	12	Distile su	10 dk
4	Ksilen III	10 dk	13	%50 Alkol	1 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	14	%70 Alkol	1 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	15	%96 Alkol	1 dk
7	%96 Alkol	5 dk	16	Absolu Alkol	1 dk
8	%80 Alkol	5 dk	17	Ksilen	10 dk
9	%70 Alkol	5 dk	18	Kapatma	

3.4.1. Beyin Histopatolojik Skorlama Yöntemi

Hematoksilen-Eozin ile boyanan kesitlerde beyin korteksinde eozinofilik nöron, perivasküler ödem, nöropilde vakuolizasyon, koyu nöronlar (dark neurons) ve vasküler konjesyon semikantitatif olarak değerlendirildi. Her beyin kesitinde 10 farklı alanda her bir hasar parametresi skorlanarak, grup içindeki ortalama yüzdelik değerler hesaplandı. Histopatolojik değişimler, beyin hücrelerinin %33'ünden azında gözlemlendiğinde 1 (hafif), %33-66 arasında olduğunda 2 (orta) ve %66'dan fazla olduğunda 3 (şiddetli) olarak derecelendirildi (yok=0, hafif=1, orta=2, şiddetli=3) (Tablo 3.5). Ayrıca Toluidin Blue boyama yapılan beyin korteks bölgesinde dejeneratif nöronları belirlemek amacıyla her beyin kesitinde rastgele 10 farklı alan seçildi ve değerlendirmesi yapıldı.

Tablo 3.5: Beyin dokusunda histopatolojik skorlama tablosu.

SKORLAMA TABLOSU				
	YOK	HAFİF	ORTA	ŞİDDETLİ
Eozinofilik nöron	0	1	2	3
Perivasküler ödem	0	1	2	3
Nöropilde vakuolizasyon	0	1	2	3
Koyu nöron	0	1	2	3
Vasküler konjesyon	0	1	2	3

3.5. İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimya boyama yöntemi, özgül antijenik saptama özelliğine sahip belirleyicinin, hücre yüzeyine bağlanması temeline dayanmaktadır. Nonilfenol ile oluşturulan nörotoksisite modelinde, beyin dokusunda inflamasyon belirteci olan IL-1 β (Proteintech, Cat no:26048-1-AP-1:200) ve mikrogial aktivasyonu belirleyen IBA-1 (MedChemExpress, Cat no: HY-P80501-1:500) ekspresyonu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Belirlenen bu marker için primer antikolar kullanılmıştır. İmmünohistokimyasal boyama metodu için streptavidin-biotin kiti (UltravisionPolyvalent (Rabbit-Mouse) HorseradishPeroxidase (HRP) Kit, 125 ml fromThermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) kullanılarak avidin-biotin peroksidaz yöntemi uygulanmıştır. İmmünohistokimyasal boyama için %10'luk formalin fiksasyonu sonrası rutin takip ile hazırlanmış parafine gömülü bloklardan 5 μ m'luk kesitler dokuların dökülmemesi için polilizinli lamlara alınmıştır. Kesitler 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra 15 dakika ksilolde deparafinize edilip ardından %99, %96 ve %70'lik azalan alkol serilerinin her birinde tutularak dehidrate edilecek ve distile suda bekletilecektir. Daha sonra antijen geri kazanımı için %5'lik sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W'de kaynatılan kesitler PBS ile tekrar yıkanarak endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilecektir. Kalan işlemler dokuların kurumasını önleyen chamber içerisinde gerçekleştirilecektir. Kullanılan

her bir solüsyon dokunun üzerini tamamen kapatacak şekilde uygulanacaktır. PBS ile yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 10 dakika Blok serum uygulanacaktır. Preparatlardaki dokuların üzerine hazırlanan primer antikör damlatılarak bir gece +4°C’de inkübe edilecektir. Negatif kontrol olarak, primer antikör yerine PBS kullanılacaktır. Yıkama işleminden sonra kesitler biotinli-sekonder antikör ile inkübe edilecek ve ardından yıkama işlemi tekrarlanacaktır. Daha sonra streptavidin-peroksidaz ile muamele edilen kesitler yıkandı ve immünreaktiviteilerinin görünür hale getirilmesi amacıyla 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) kromojen ve substrat sistemi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ile inkübe edildi. Kromojen uygulamasının ardından kesitler 5 dakika deiyonize H₂O ile yıkandı. AEC kromojeni alkolde çözünebilir özellikte olduğundan, preparatlar alkol serilerinden ve ksilolden geçirilmedi. Kesitler doğrudan su bazlı kapatma medyumunu kullanılarak hava kabarcığı oluşmayacak şekilde kapatıldı.

İmmünohistokimyasal boyama uygulanan kesitler ışık mikroskobu altında incelendi ve her preparattan 10 farklı alandan mikroskobik görüntüler elde edildi. Elde edilen görüntülerde AEC ile boyanmış kesitlerde pozitif alanlar ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edildi. “Color Threshold” fonksiyonu aracılığıyla HSB renk uzayında eşikleme yapılarak kırmızı kromojen seçildi. Belirlenen eşik değerleri aynı boyama serisine ait tüm kesitlere uygulanarak AEC pozitif alanlar ölçüldü. Sonuçlar toplam pozitif alan (piksel) olarak kaydedildi.

Tablo 3.6: İmmünohistokimya boyama metodu.

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	18	Sekonder Anikör	10 dk
2	Ksilen I	10 dk	19	PBS	3x5 dk
3	Ksilen II	10 dk	20	Streptavidin Peroksidaz	10 dk
4	Ksilen III	10 dk	21	PBS	3x5 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	22	AEC kromojen	2-6 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	23	Distile su	2x3 dk
7	%96 Alkol	5 dk	24	Hematoksilen	1 dk
8	%80 Alkol	5 dk	25	Musluk suyu	2 dk
9	%70 Alkol	5 dk	26	Distile su	5 dk
10	Distile su	2x5 dk	27	Kapama	
11	%10 Sitrat Buffer	3x5 dk			
12	PBS	3x5 dk			
13	%3 H ₂ O ₂	12 dk			
14	PBS	3x5 dk			
15	Ultra V block	5 dk			
16	Primer Antikör	5 dk			
17	PBS	3x5 dk			

3.6. Davranış Deneyi Analizleri

3.6.1. Açık Alan Testi (Open Field Test)

Açık Alan Testi, genel lokomotor aktiviteyi ve anksiyete ile ilişkili davranışları değerlendirmek amacıyla kullanılan klasik bir deneysel yöntemdir. İlk olarak 1934 yılında Hall tarafından tanımlanır ve hayvanın açık ve yeni bir çevreye maruz kaldığında gösterdiği davranışsal yanıtları temel alır. Açık alan ve yeni çevre, kemirgenlerde anksiyete benzeri davranışları ortaya çıkaran uyarıcılar olarak kabul edilir.

Test düzeneği, 50 cm yüksekliğinde duvarlarla çevrili, 60×60 cm boyutlarında pleksiglas kare bir alandan oluşur. Ortam 100-110 lux şiddetinde aydınlatılır. Testler aydınlık faz sırasında gerçekleştirilir ve tüm deney grupları aynı zaman diliminde değerlendirilir. Hayvanlar test günü deney odasına alınır ve ortam koşullarına uyum sağlamaları amacıyla test öncesinde kendi kafeslerinde en az 1 saat bekletilir.

Her hayvan açık alanın merkez bölgesine yerleştirilerek teste başlanır ve 5 dakika boyunca serbestçe keşfetmesine izin verilir. Davranışlar üstten kayıt yapan video kamera sistemi ile kaydedilir ve analiz edilir. Tüm hayvanlar teste yalnızca bir kez tabi tutulur.

Her denekten sonra düzenek %70 etanol ile temizlenir. Daha düşük konsantrasyonlardaki solüsyonlar önceki hayvanlardan kalan idrar, dışkı ve tüy kaynaklı kokuları yeterince uzaklaştıramaz. Alkolün tamamen kuruması beklenir; aksi halde kalan koku hayvanın yönelim davranışını etkileyebilir. Temizleme solüsyonu günlük olarak hazırlanır.

Davranış analizinde merkez bölgede geçen süre, merkez bölgeyi ilk terk etme süresi ve merkez bölgeye giriş sayısı anksiyete düzeyinin değerlendirilmesinde temel parametreler olarak kabul edilir. Periferik bölgede geçirilen süre ve duvarlara yakın hareket etme eğilimi (thigmotaksis) artmış anksiyete göstergesi olarak değerlendirilir. Toplam kat edilen mesafe ve kareler arası geçiş sayısı horizontal lokomotor aktiviteyi yansıtırken, desteksiz ve destekli iki ayağı üzerine kalkma davranışları ile toplam rearing sayısı vertikal lokomotor aktivitenin göstergeleri olarak analiz edilir. Donma davranışı, diş gıcırdatma, aşırı kaşınma, tüy yolma ve köşelere sinme gibi davranışlar ise artmış anksiyete belirtileri olarak kaydedilir. Merkez bölgede geçirilen sürenin ve merkeze giriş sayısının artması ile rearing davranışındaki artış azalmış anksiyete ile ilişkilendirilirken, periferik bölgede geçirilen sürenin artışı ve kaçınma davranışları anksiyete artışı ile ilişkilendirilir.

3.6.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (Elevated Plus Maze, EPM)

Yükseltilmiş Artı Labirent (YAL) testi, kemirgenlerde anksiyete benzeri davranışların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan, valide edilmiş bir davranış testidir. Test, kemirgenlerin doğal olarak açık ve yüksek alanlardan kaçınma eğilimi ile yeni ortamı keşfetme motivasyonu arasındaki çatışmaya dayanır. Açık kollara yönelim anksiyete düzeyinin azalması ile, kapalı kollara yönelim ise artmış anksiyete ile ilişkilendirilir. Düzenek yerden 50 cm yükseklikte konumlandırılmış olup iki açık kol (50×10 cm), iki kapalı kol (50×10×40 cm) ve bu kolların birleşim noktasında bulunan 10×10 cm boyutlarında merkezi bir platformdan oluşur. Açık kollarda yan duvar bulunmazken kapalı kollar üç tarafı 40 cm yüksekliğinde duvarlarla çevrilidir. Test ortamı sabit ışık şiddeti altında tutulur ve dış uyaranların minimuma indirilmesine özen gösterilir. Hayvanlar test öncesinde deney odasına alınarak yaklaşık 30 dakika süreyle ortama adaptasyonları sağlanır. Her bir sıçan teste merkezi platform üzerine yerleştirilerek başlatılır; hayvanın başı açık kola bakacak şekilde konumlandırılır. Test süresi 5 dakika olup bu süre boyunca hayvanın labirent içinde serbestçe hareket etmesine izin verilir. Tüm denemeler üstten yerleştirilmiş bir video kamera sistemi ile kaydedilir ve analizler kayıtlar üzerinden gerçekleştirilir. Her hayvandan önce düzenek %70 etanol ile temizlenir ve alkolün tamamen kuruması beklenir; böylece önceki denekten kaynaklanabilecek koku ipuçlarının davranışsal yanıtları etkilemesi önlenir. Davranış analizinde açık kollarda geçirilen süre ve açık kollara giriş sayısı temel anksiyete göstergeleri olarak değerlendirilir. Açık kollarda geçirilen sürenin artması ve açık kola giriş sayısının yükselmesi azalmış anksiyete düzeyi ile ilişkilendirilirken, kapalı kollarda daha fazla zaman geçirilmesi artmış anksiyete göstergesi olarak kabul edilir. Kola giriş, hayvanın dört patasının tamamının ilgili kola geçmesi kriteri ile tanımlanır. Ayrıca yüksekte aşağı bakma davranışı (head dipping), özellikle açık kol kenarlarından aşağı doğru yapılan baş ve boyun uzatma hareketleri şeklinde tanımlanır ve risk değerlendirme davranışı olarak kabul edilir. Head dipping sayısındaki artış genellikle azalmış anksiyete ile ilişkilendirilir. Buna karşılık açık kollarda hareketsiz kalma, geri çekilme ve kapalı kollara hızlı yönelim artmış anksiyete göstergeleri arasında değerlendirilir. Test süresince elde edilen veriler anksiyete benzeri davranışların nicel değerlendirilmesini sağlar ve keşif davranışı ile kaçınma davranışı arasındaki dengeyi ortaya koyar.

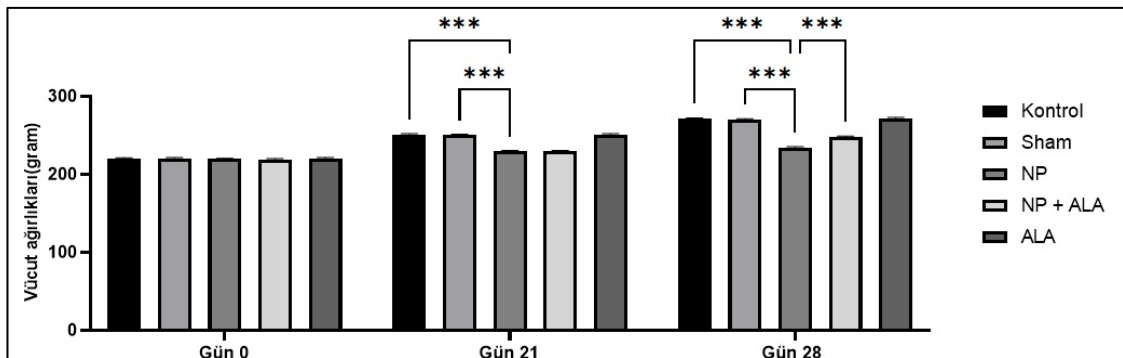
3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama, ortalamanın standart hatası (SEM) ve quartiller olarak hesaplanmıştır. Tüm istatistiksel analizler Graphpad 9.1 versiyon programında değerlendirildi. Verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile analiz edildi. Normal dağılıma sahip değişkenlerde gruplar arası karşılaştırmalar Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile post hoc Tukey testi kullanılarak yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde Kruskal-Wallis Analizi ile gruplar arası karşılaştırmalar, farklılıklar varsa Mann Whitney U testi ile çoklu karşılaştırmalar gerçekleştirildi. Değerler ortalama $\pm$ SEM ve medyan (Q1-Q3) olarak ifade edilerek, $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıklarına İlişkin Bulgular

Deney süresince grupların vücut ağırlıkları Gün 0, Gün 21 ve Gün 28’de ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. Başlangıçta (Gün 0) gruplar arasında vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Tüm grupların başlangıç ağırlıkları birbirine benzer düzeydedir. Gün 21 ölçümlerinde, kontrol grubuna kıyasla bazı deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gözlenmiştir ($p<0,001$). Özellikle NP grubunda vücut ağırlığında azalma eğilimi dikkat çekerken, NP+ALA ve ALA gruplarında bu azalmanın daha sınırlı olduğu görülmüştür. ALA uygulamasının, NP kaynaklı ağırlık değişimini kısmen dengelediği gözlenmiştir. Gün 28 verileri değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkların daha belirgin hale geldiği görülmektedir. NP grubunda vücut ağırlığı diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Buna karşılık NP+ALA grubunda vücut ağırlığının NP grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). ALA grubunun ise kontrol grubuna benzer hatta hafif artış eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Genel olarak sonuçlar, NP uygulamasının vücut ağırlığında azalmaya neden olduğunu; ALA uygulamasının ise bu etkiyi kısmen önleyici veya iyileştirici yönde etkilediğini göstermektedir. Bulgular, ALA’nın NP’ye bağlı oluşan kilo kaybı üzerindeki potansiyel törapatik etkisini desteklemektedir.



Şekil 4.1: Deney gruplarının gün 0, gün 21 ve gün 28’deki vücut ağırlıkları (gram). Gruplar: Kontrol, Sham, NP, NP + ALA ve ALA. *, $p<0,05$, **, $p<0,01$, ***, $p<0,001$. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizde ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmış; post-hoc analizler sırasıyla Bonferroni ve Dunn testleri ile yapılmıştır.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Hematoksilen-Eozin boyaması ile incelenen Kontrol, Sham ve ALA uygulanan gruplarda beyin korteksinin normal histolojik organizasyonunu koruduğu gözlemlendi. Korteksin tabakalı yapısının belirgin olduğu saptandı. Nöronların sağlıklı morfolojide olduğu, sitoplazmalarının homojen ve hafif eozinofilik özellik sergilediği görüldü. Nükleusların veziküler yapıda, açık kromatin dağılımına sahip ve belirgin nükleollü olduğu dikkati çekti. Nöropil alanının yoğun, fibriller ve bütünlüğünü kaybetmeyen yapıda olduğu; hücreler arası mesafenin doğal yapısını koruduğu belirlendi. Glial hücreler de normal dağılım ve yoğunluk göstermekteydi. Genel olarak kortikal hücresel mimari düzenli, simetrik ve fizyolojik sınırlar içindeydi. NP grubunda ise beyin korteksinde belirgin histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Nöronlarda dejenerasyona işaret eden belirgin sitoplazmik eozinofili artışı, hücresel büzüşme ve piknotik çekirdek görünümünü izlenirken, çok sayıda eozinofilik nöron varlığı mevcuttu. Ayrıca hiperkromatik görünümlü koyu nöronlar (dark neuron) dikkat çekiciydi. Nöropil alanında belirgin vakuolizasyon, hücreler arası mesafede artış ve doku bütünlüğünde bozulma vardı. Vasküler yapılarda konjesyon bulguları mevcut olup damar lümenlerinde eritrosit birikimi dikkati çekti. Bununla birlikte bazı alanlarda perivasküler ödem oluşumu izlenerek damar çevresinde genişleme saptandı (Şekil 4.2, Şekil 4.3).

Pervasküler ödem NP grubunda 3,000 (1,000-3,000) Kontrol 0,000 (0,000-1,000) ve Sham 0,000 (0,000-1,000) grubuna kıyasla anlamlı derecede artış gösterdi ($p<0,001$). NP+ALA grubunda 2,000 (1,000-3,000) bu artış azaldı fakat istatistiksel bir anlam taşımamaktaydı ($p>0,05$). ALA 0,000 (0,000-1,000) grubunda ise ödem düzeylerinin kontrol grubuna benzer olduğu ve NP grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ($p<0,01$) (Şekil 4.5).

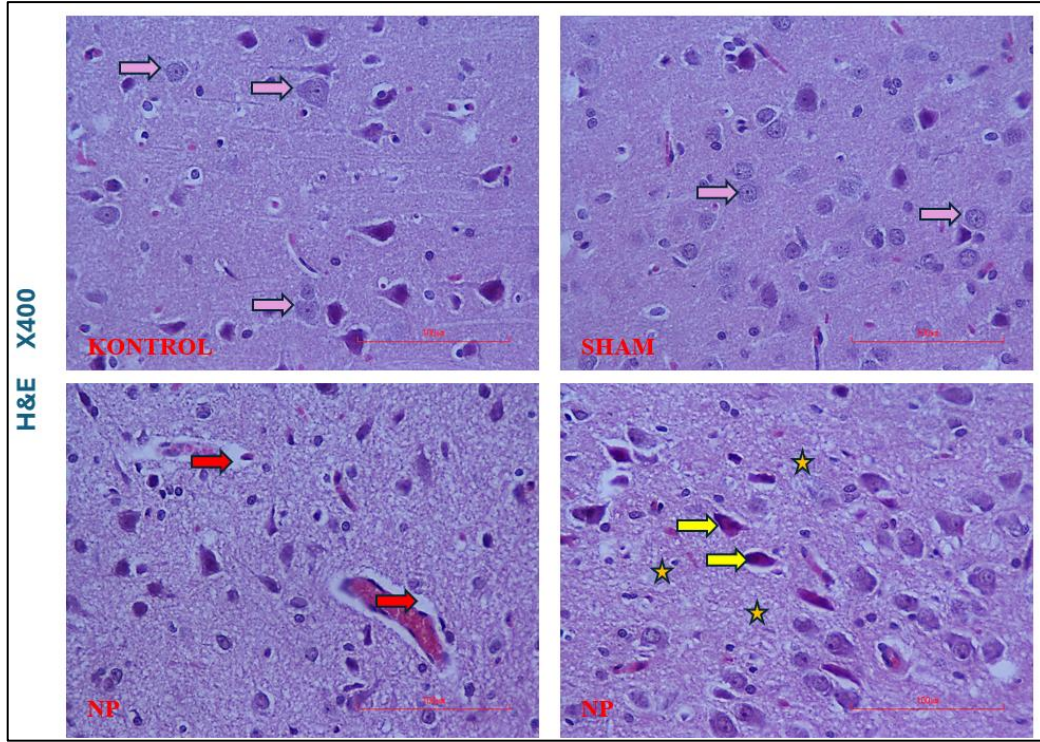
Eozinofilik nöron görünümü NP grubunda 3,000 (1,000-3,000) Kontrol 0,000 (0,000-2,000), Sham 1,000 (0,000-2,000) ve ALA 0,000 (0,000-2,000) grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdi ($p<0,001$). NP+ALA grubunda 2,000 (1,000-3,000) bu artışın gerilediği görüldü fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 4.5).

NP grubunda 3,000 (1,000-3,000) nöropilde vakuolizasyon düzeyleri Kontrol 0,000(0,000-1,000), Sham 0,000 (0,000-1,000) ve ALA 0,000 (0,000-1,000) grubuna göre anlamlı şekilde yükseldi ($p<0,001$). NP+ALA grubunda 0,000 (0,000-2,000) ise ALA tedavisi ile bu değerde anlamlı bir azalma görülmüş ($p<0,001$) (Şekil 4.5).

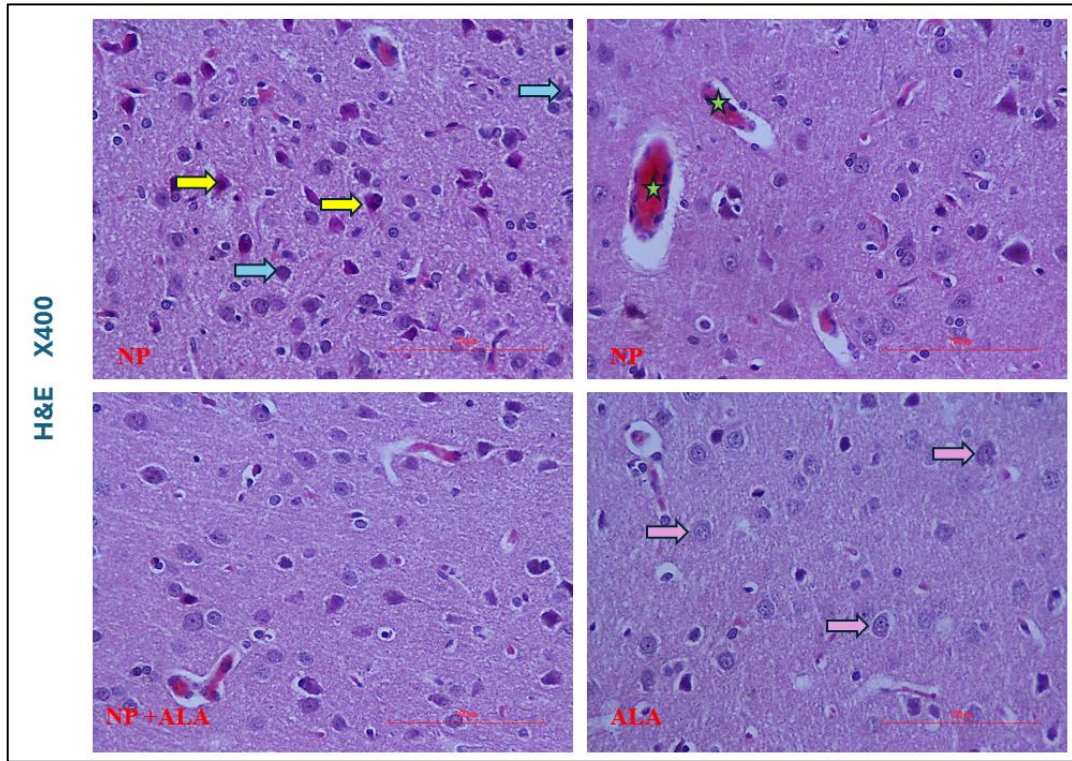
Koyu görünümlü nöron (dark neuron) NP grubunda 2,000 (1,000-3,000) Kontrol 0,000 (0,000-1,000), Sham 0,000 (0,000-1,000) ve ALA 1,000 (0,000-2,000) grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdi. NP+ALA grubunda 1,000(0,000-3,000) ise ALA tedavisi ile bu değerde anlamlı bir azalma görülmüş ($p<0,01$) (Şekil 4.6).

Vasküler konjesyon seviyesi NP grubunda 3,000 (2,000-3,000) Kontrol 0,000 (0,000-1,000), Sham 0,000 (0,000-1,000) ve ALA 0,000 (0,000-2,000) grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdi ($p<0,001$). NP+ALA grubunda 2,000 (1,000-3,000) bu artışın gerilediği görüldü fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 4.6).

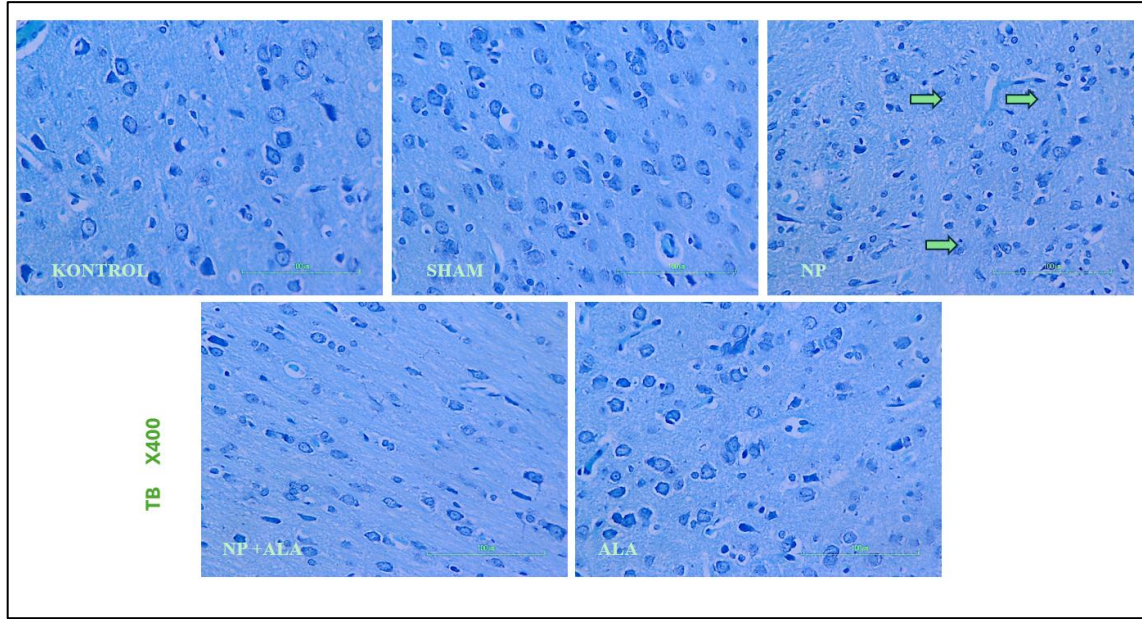
Toluidin Blue boyaması serebral korteksteki nöronların Nissl granüllerini değerlendirmek için kullanıldı. Bu boyama ile gruplar arasındaki farkı belirlemek amacıyla dejeneratif nöronlar tanımlandı. Kontrol ve Sham gruplarında nöronların normal morfolojide olduğu, hücre gövdelerinin belirgin, Nissl granüllerinin düzenli ve yoğun şekilde boyandığı gözlemlendi. Dejeneratif değişikliğe rastlanmadı. NP grubunda ise bazı nöronlarda dejeneratif değişiklikler dikkati çekti. Bu hücrelerde Nissl granüllerinde azalma, sitoplazmik soluklaşma, hücre gövdesinde büzüşme ve piknotik çekirdek görünümü izlendi (Şekil 4.4). Ayrıca istatistiksel açıdan gruplar arası karşılaştırma yapıldığında Kontrol 1,000 (0,000-3,000), Sham 0,500 (0,000-3,000) ve ALA 1,500 (0,000-6,000) grubuna kıyasla NP grubunda 8,000 (4,000-15,000) dejeneratif nöron sayısında anlamlı bir artış mevcuttu. NP+ALA grubunda 4,000 (1,000-9,000) ALA tedavisi bu artışı azalttı fakat anlamlı bir azalma söz konusu değildi ($p>0,05$) (Şekil 4.6).



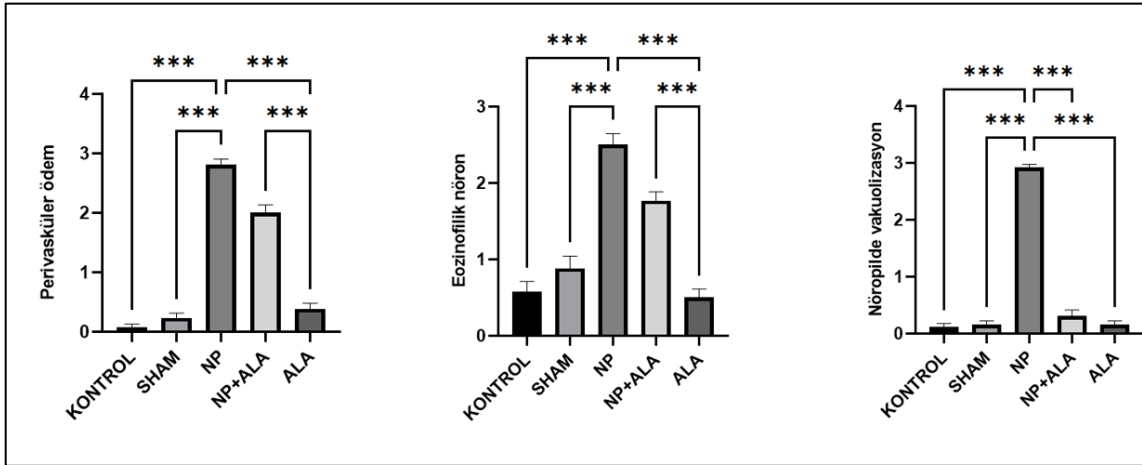
Şekil 4.2: Beyin kesitleri H&E, x400 büyütme (Nikon Eclipse Si, Tokyo, Japan) kontrol ve Sham grubu normal histolojik görünüm sergilemektedir. Pembe ok; sağlıklı morfolojiye sahip nöronları belirtmektedir. NP grubunda kırmızı ok; perivasküler ödem, sarı ok; eozinofilik nöron, sarı yıldız; nöropilde vakuolizasyonu ifade etmektedir.



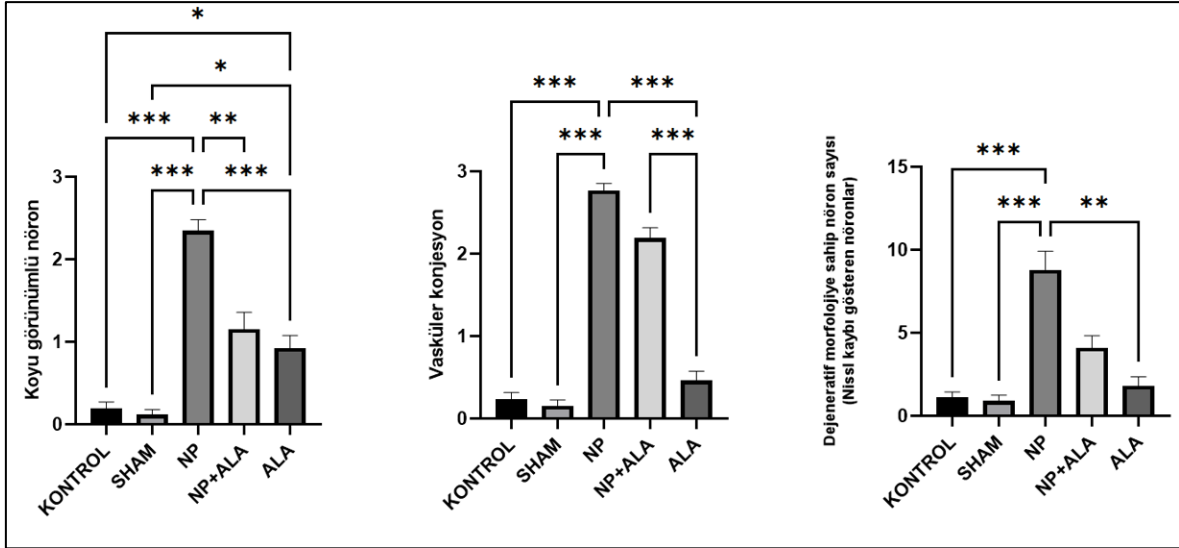
Şekil 4.3: Beyin kesitleri H&E, x400 büyütme (Nikon Eclipse Si, Tokyo, Japan) ALA grubu normal histolojik görünüm sergilemektedir. Pembe ok; sağlıklı morfolojiye sahip nöronları belirtmektedir. NP grubunda sarı ok; eozinofilik nöron, mavi ok; koyu görünümlü nöron; yeşil yıldız; vasküler konjesyonu ifade etmektedir.



Şekil 4.4: Beyin kesitleri Toluidin Blue (TB), x400 büyütme (Nikon Eclipse Si, Tokyo, Japan) kontrol, Sham ve ALA grupları normal histolojik görünüm sergilemektedir. NP grubunda yeşil ok; Nissl kaybı gösteren piknotik çekirdekli dejeneratif nöronları ifade etmektedir.



Şekil 4.5: Beyin dokusunda perivasküler ödem, eozinofilik nöron ve nöropilde vakuolizasyon bulgularının gruplar arası karşılaştırılması verilmektedir. Grafiklerde kontrol, sham, NP, NP+ALA ve ALA gruplarına ait ortalama skor değerleri gösterilmektedir. *, $p<0,05$, **, $p<0,01$, ***, $p<0,001$. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizde ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmış; post-hoc analizler sırasıyla Bonferroni ve Dunn testleri ile yapılmıştır.

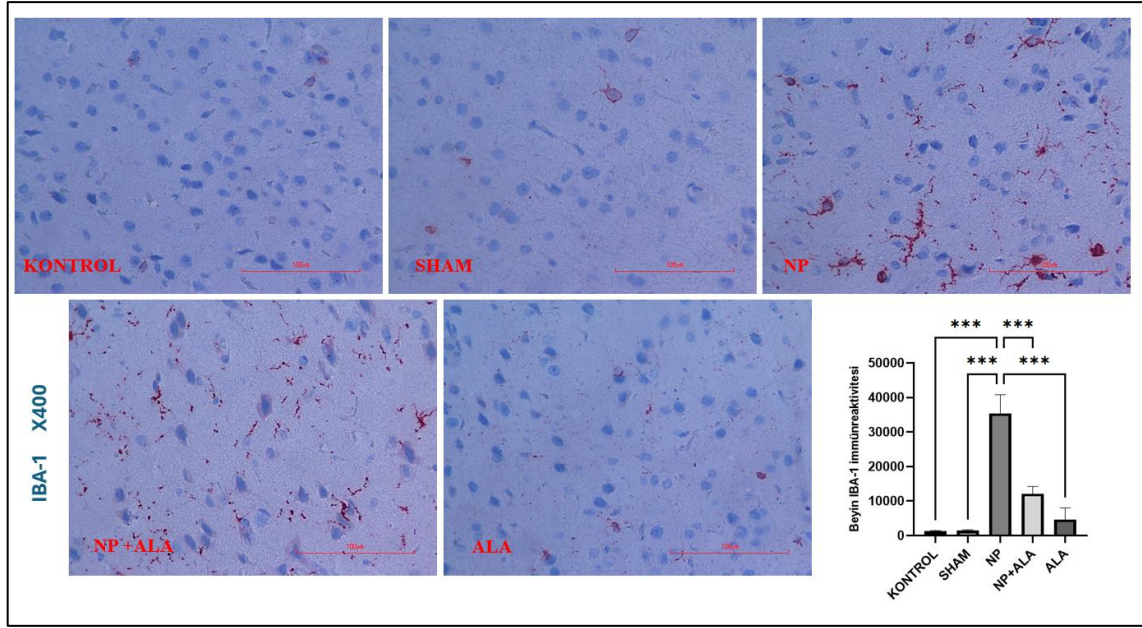


Şekil 4.6: Beyin dokusunda koyu görünümlü nöron, vasküler konjesyon ve dejeneratif morfolojiye sahip nöron sayısı bulgularının gruplar arası karşılaştırılması verilmektedir. Grafiklerde kontrol, sham, NP, NP+ALA ve ALA gruplarına ait ortalama skor değerleri gösterilmektedir. *, $p<0,05$, **, $p<0,01$, ***, $p<0,001$. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizde ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmış; post-hoc analizler sırasıyla Bonferroni ve Dunn testleri ile yapılmıştır.

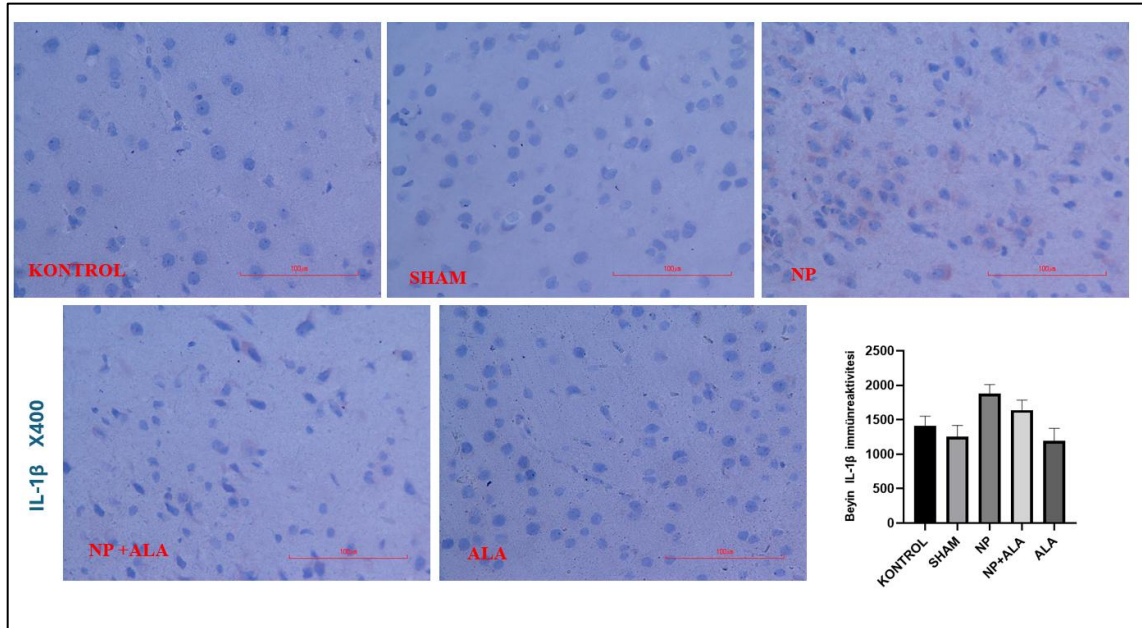
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Deney gruplarında nöroinflamatuvar yanıt ve mikrogial aktivasyonu değerlendirmek amacıyla mikrogial belirteç olan IBA-1 primer antikoru kullanılarak immünohistokimyasal inceleme yapıldı. Değerlendirme sonucunda Kontrol ($1348 \pm 145,9$), Sham ($1423 \pm 249,9$) ve ALA (4625 ± 3412) grubuna kıyasla NP grubunda (35385 ± 5415) IBA-1 pozitif hücre sayısında belirgin bir artış gözlemlendi ($p<0,001$). Özellikle parankimal alanda yerleşim gösteren hücrelerde yoğun immünreaktivite ve aktive mikrogial morfoloji dikkati çekmektedir. NP grubuna kıyasla NP+ALA (12118 ± 2115) grubunda ALA tedavisi ile IBA-1 pozitif hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0,001$) (Şekil 4.7).

Nöroinflamatuvar yanıtın değerlendirilmesi amacıyla IL-1 β ekspresyonu immünohistokimyasal olarak incelendi. Kontrol 1237 ($1184-1900$), Sham 1184 ($946-1880$) ve ALA 1240 ($740-1730$) gruplarında minimal düzeyde boyanma izlenirken, NP grubunda 2025 ($1350-2073$) IL-1 β immünreaktivitesinde hafif ve soluk karakterde bir artış gözlemlendi ($p>0,05$). Boyanma sınırlı sayıda hücrede ve düşük yoğunlukta olup belirgin bir yaygınlık göstermemektedir. NP+ALA grubunda 1545 ($1290-2100$) ise IL-1 β immünreaktivitesinin NP grubuna kıyasla azalma eğiliminde olduğu saptandı ($p>0,05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.7: Beyin dokusunda IBA-1 immünohistokimyasal boyanmasına ait ışık mikroskopik görüntüler ve gruplar arası karşılaştırma grafikleri verilmiştir. NP grubunda belirgin karakterde IBA-1 immünreaktivitesi gözlenmiştir. NP+ALA grubunda ise NP grubuna kıyasla immünreaktivitede azalma eğilimi saptanmıştır. Grafiklerde gruplara ait ortalama IBA-1 immünreaktivite skor değerleri gösterilmektedir. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizde ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmış; post-hoc analizler Bonferroni ve Dunn testleri ile yapılmıştır.

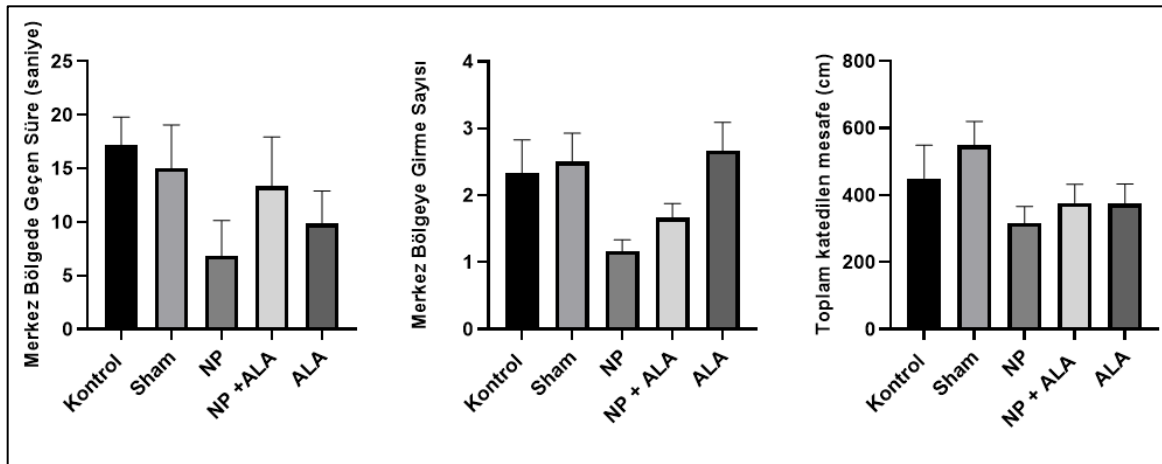


Şekil 4.8: Beyin dokusunda IL-1 β immünohistokimyasal boyanmasına ait ışık mikroskopik görüntüler ve gruplar arası karşılaştırma grafikleri verilmiştir. NP grubunda hafif ve soluk karakterde IL-1 β pozitif boyanma gözlenmiştir. NP+ALA grubunda ise NP grubuna kıyasla immünreaktivitede hafif düzeyde azalma eğilimi saptanmıştır. Grafiklerde gruplara ait ortalama IL-1 β immünreaktivite skor değerleri gösterilmektedir. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizde ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmış; post-hoc analizler Bonferroni ve Dunn testleri ile yapılmıştır.

4.4. Açık Alan Testi Analiz Bulguları

4.4.1. Merkez Bölgede Geçen Süre, Merkez Bölgeye Giriş Sayısı ve Toplam Kat Edilen Mesafe

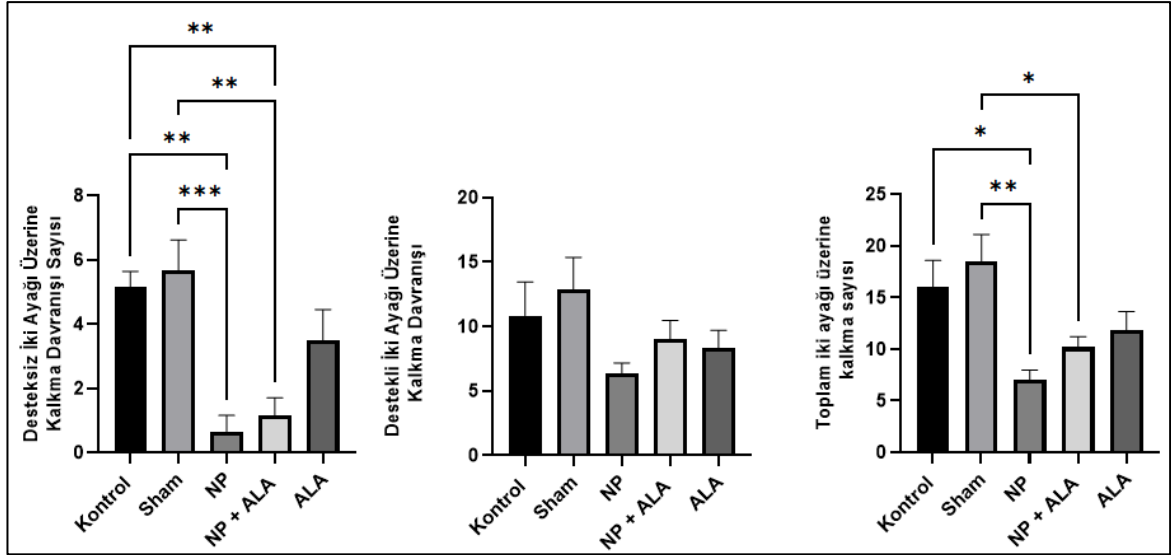
Açık alan testinde merkez bölgede geçen süre açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Merkez bölgede geçirilen süre ortalamaları sırasıyla; Kontrol grubunda ($17,17\pm2,62$) sn, Sham grubunda ($15,00\pm4,08$) sn, ALA grubunda ($9,83\pm3,07$) sn, NP grubunda ($6,83\pm3,30$) sn ve NP+ALA grubunda ($13,33\pm4,61$) sn olarak belirlenmiştir. Merkez bölgeye giriş sayısına bakıldığında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Merkez bölgeye giriş sayısı ortalamaları sırasıyla; Kontrol grubunda ($2,33\pm0,49$), Sham grubunda ($2,50\pm0,42$), ALA grubunda ($2,66\pm0,42$), NP grubunda ($1,16\pm0,16$) sn ve NP+ALA grubunda ($1,66\pm0,21$) sn olarak belirlenmiştir. Toplam kat edilen mesafe değerlerine bakıldığında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Toplam kat edilen mesafe ortalamaları sırasıyla; Kontrol grubunda ($450,0\pm98,89$) cm, Sham grubunda ($548,3\pm71,95$) cm, ALA grubunda ($373,3\pm60,15$) cm, NP grubunda ($316,7\pm49,91$) cm ve NP+ALA grubunda ($376,7\pm55,96$) cm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Deney gruplarının (Kontrol, Sham, NP, NP + ALA ve ALA) açık alan testi parametrelerinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Merkez bölgede geçirilen süre (saniye), merkez bölgeye girme sayısı ve toplam kat edilen mesafe (cm) değerlendirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık grafikte gösterilmiştir * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. İstatistiksel analizde ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmış; post-hoc analizler Bonferroni ve Dunn testleri ile yapılmıştır.

4.4.2. Desteksiz İki Ayağa Kalkma, Destekli İki Ayağa Kalkma ve Toplam İki Ayağı Üzerine Kalkma

Desteksiz iki ayağa kalkma (unsupported rearing) sayıları gruplar arası karşılaştırıldığında NP grubunda ($0,66 \pm 0,49$) Kontrol grubuna ($5,16 \pm 0,47$) göre anlamlı olarak azalma gözlemlenmiştir ($p=0,001$). NP+ALA grubunda ($1,16 \pm 0,54$) desteksiz ayağa kalkma sayısı Kontrol grubuna göre azalmıştır ($p=0,005$). NP grubunda Sham grubuna ($5,66 \pm 0,95$) göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p<0,001$). NP+ALA grubunda da Sham grubuna göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p=0,001$). Destekli iki ayağa kalkma sayıları gruplar arası karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Destekli iki ayağa kalkma sayıları ortalamaları sırasıyla; Kontrol grubunda ($10,83 \pm 2,62$), Sham grubunda ($12,83 \pm 2,52$), ALA grubunda ($8,33 \pm 1,38$), NP grubunda ($6,33 \pm 0,84$) ve NP+ALA grubunda ($9,00 \pm 1,46$) olarak belirlenmiştir. Toplam iki ayağa kalkma sayısı gruplar arası karşılaştırıldığında, NP grubunda ($7,00 \pm 0,96$) Kontrol grubuna ($16,00 \pm 2,59$) göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p=0,023$). NP grubunda Sham grubuna ($18,50 \pm 2,60$) göre de anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p=0,003$). NP+ALA grubunda ($10,17 \pm 1,04$) Sham grubuna göre anlamlı azalma gözlemlenmektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, NP uygulamasının özellikle desteksiz iki ayağa kalkma ve toplam iki ayağa kalkma davranışları üzerinde belirgin bir baskılayıcı etki oluşturduğu görülmektedir. Desteksiz rearing davranışındaki anlamlı azalma, NP'nin hayvanların keşif motivasyonu ve dikey aktivitesi üzerinde olumsuz bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Toplam iki ayağa kalkma sayısındaki azalmanın da bu bulguyu destekler nitelikte olduğu söylenebilir. Destekli iki ayağa kalkma sayılarında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmaması ise, NP'nin özellikle desteksiz (daha yüksek keşif ve spontan aktivite gerektiren) dikey davranışları etkilediğini, ancak destekli rearing davranışı üzerinde belirgin bir değişiklik oluşturmadığını düşündürmektedir. Sonuç olarak, Açık Alan Testi bulguları NP uygulamasının dikey keşif davranışı ve genel aktivite düzeyi üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğunu, ALA uygulamasının ise bu etkiyi kısmen iyileştirme eğilimi gösterse de tam anlamıyla geri çeviremediğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.10).

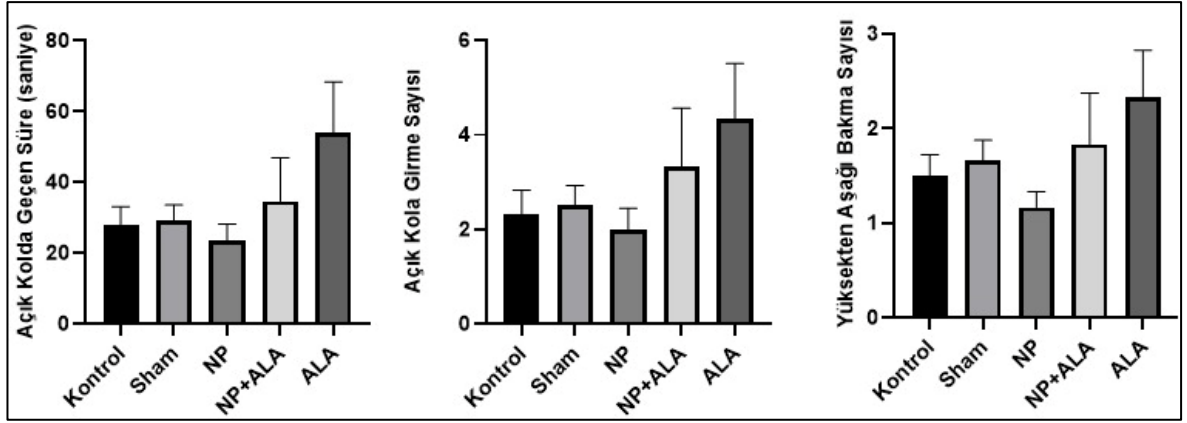


Şekil 4.10: Deney gruplarının (Kontrol, Sham, NP, NP + ALA ve ALA) destekli ve desteksiz iki ayak üzerine kalkma davranışları ile toplam iki ayak üzerine kalkma sayılarının karşılaştırılmasını göstermektedir. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık grafikte gösterilmektedir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. İstatistiksel analizde ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmış; post-hoc analizler Bonferroni ve Dunn testleri ile yapılmıştır.

4.5. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Analiz Bulguları

4.5.1. Açık Kolda Geçen Süre, Açık Kola Giriş Sayısı ve Yüksekten Aşağı Bakma (Head-Dipping)

Yükseltilmiş Artı Labirent testinde açık kolda geçen süre açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$). Açık kolda geçirilen süre ortalamaları sırasıyla; Kontrol grubunda ($28,00 \pm 5,13$) sn, Sham grubunda ($29,17 \pm 4,45$) sn, ALA grubunda ($54,17 \pm 14,25$) sn, NP grubunda ($23,67 \pm 4,56$) sn ve NP+ALA grubunda $34,67 \pm 12,27$ sn olarak belirlenmiştir. Açık kola giriş sayısına bakıldığında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$). Açık kola giriş sayısı ortalamaları sırasıyla; Kontrol grubunda ($2,33 \pm 0,49$), Sham grubunda ($2,50 \pm 0,42$), ALA grubunda ($4,33 \pm 1,17$), NP grubunda ($2,00 \pm 0,44$) ve NP+ALA grubunda ($3,33 \pm 1,22$) olarak belirlenmiştir. Yüksekten aşağı bakma (head-dipping) sayısı gruplar arası kıyaslandığında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$). Yüksekten aşağı bakma sayıları ortalamaları sırasıyla; Kontrol grubunda ($1,50 \pm 0,22$), Sham grubunda ($1,66 \pm 0,21$), ALA grubunda ($2,33 \pm 0,49$), NP grubunda ($1,16 \pm 0,16$) ve NP+ALA grubunda ($1,83 \pm 0,54$) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Deney gruplarının (Kontrol, Sham, NP, NP + ALA ve ALA) açık alan testi kapsamında değerlendirilen davranış parametrelerinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Açık kolda geçen süre, açık kola girme sayısı ve yüksekten aşağı bakma sayısı analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık grafikte gösterilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. İstatistiksel analizde ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmış; post-hoc analizler Bonferroni ve Dunn testleri ile yapılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, nonilfenol (NP) ile oluşturulan deneysel nörotoksisite modelinde alfa lipoik asidin (ALA) terapötik etkileri histopatolojik, immünohistokimyasal ve davranışsal parametreler üzerinden değerlendirildi. Elde edilen bulgular, NP uygulamasının beyin korteksinde belirgin nörodejeneratif değişikliklere yol açtığını; eozinofilik nöron artışı, koyu görünümlü nöron (dark neuron) oluşumu, nöropilde vakuolizasyon, perivasküler ödem ve vasküler konjesyon hasar göstergelerinde anlamlı yükselmeye neden olduğunu ortaya koymuştur. TB boyama ile yapılan değerlendirmede ise NP grubunda Nissl içeriği azalmış, ve dejeneratif özellik gösteren nöronların arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte NP grubunda mikrogial aktivasyon belirteci olan IBA-1 ekspresyonundaki belirgin artış, NP'nin nöroinflamatuvar yanıtı tetiklediğini desteklemektedir. Davranış testlerinde özellikle desteksiz iki ayağa kalkma ve toplam rearing sayısındaki azalma, NP maruziyetinin keşif davranışı ve dikey lokomotor aktivite üzerinde baskılayıcı etkiler oluşturduğunu düşündürmektedir. NP uygulamasını takiben verilen ALA tedavisi, özellikle nöropilde vakuolizasyon ve koyu nöron sayısında anlamlı azalma sağlarken, mikrogial aktivasyonu da belirgin düzeyde geriletmiş; davranışsal parametrelerde ise kısmi iyileşme eğilimi göstermiştir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, ALA'nın NP'ye bağlı gelişen beyin hasarında terapötik potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir.

NP, endüstride yaygın biçimde kullanılan ve çevrede uzun süre kalabilen bir bileşik olup, lipofilik özellikleri nedeniyle canlı dokularda birikim gösterebilmektedir. Endokrin sistemi etkileyebilen bu kimyasalın, oksidatif stres mekanizmalarını tetikleyerek, hormonal dengeyi bozarak ve inflamatuvar süreçleri aktive ederek çeşitli organlarda toksisite oluşturduğu bildirilmektedir (103). Karaciğer, böbrek ve üreme organları üzerindeki zararlı etkileri iyi tanımlanmış olmakla birlikte, NP'nin MSS üzerinde de belirgin toksik etkiler oluşturduğu; davranışsal bozukluklar, nörotransmitter dengesizlikler ve inflamatuvar hücre ölümü ile karakterize bir nörotoksisite tablosuna yol açtığı ortaya konulmuştur (104).

Literatürde NP'nin vücut ağırlığı üzerindeki etkilerinin değişken olduğu bildirilmektedir. Düşük doz ve uzun süreli maruziyet çalışmalarında NP'nin yağ dokusu artışı ve kilo kazanımı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (105). Buna karşılık yüksek doz ve tekrarlayan maruziyet protokollerinde vücut ağırlığı artışının baskılandığı veya kilo kazanımının

azaldığı gösterilmiştir (106). Mevcut çalışmamızda da NP uygulanan grupta hayvan ağırlıklarında azalma saptanmış olup, bu bulgu yüksek doz toksisiteye bağlı metabolik baskılanma ile uyumlu görünmektedir. Bu veriler, NP'nin vücut ağırlığı üzerindeki etkilerinin doz ve maruziyet süresine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Deneysel rat modellerinde NP uygulamasının beyin dokusunda belirgin histopatolojik değişikliklere yol açtığı bildirilmektedir. Aydoğan ve arkadaşları NP maruziyeti sonrası serebral kortekste hiperkromatik hücre artışı, nöronal eozinofili ve doku organizasyonunda bozulma saptamıştır (39). Suna ve ark. (107) çalışmasında gebeliğin 5-20. günleri arasında 50 µl/kg/gün dozunda oral olarak uygulanan nonilfenolün fetal rat beyin dokusunda belirgin histopatolojik değişikliklere yol açtığı bildirmiştir. NP grubunda özellikle vasküler konjesyon, hiperkromatik hücre artışı, nöronal eozinofili ve nükleer piknoz gibi dejeneratif bulgular görülmüştür. Yapılan bir başka çalışmada ratlara 21 gün süreyle 100 mg/kg dozda NP verilmiş, çalışmada H&E incelemesinde NP grubunda serebral kortekste dark nöron oluşumu ve sitoplazmik büzüşme gibi dejeneratif değişiklikler gösterilmiştir (67). Gelişimsel maruziyet modelinde NP ile hipokampal bölgede nöronal organizasyonun bozulduğu, akson uzunluğu ve yoğunluğunda azalma meydana geldiği ve sinir liflerinin yapısal bütünlüğünün etkilendiğini bildirilmiştir (66). Çalışmamızda NP grubunda gözlenen eozinofilik nöron artışı, koyu nöron oluşumu ve vasküler konjesyon bulguları, literatürde NP maruziyeti sonrası bildirilen nörodejeneratif değişikliklerle uyumludur. Bu durum, NP'nin beyin dokusunda dejeneratif ve vasküler hasar oluşturabildiğini doğrulamaktadır. İlaveten literatürde NP'nin beyin dokusundaki histopatolojik etkileri çoğunlukla H&E yöntemlerle değerlendirilmiş olup, nöronal Nissl granülleri üzerinden yapılan bir incelemeye rastlanmamaktadır. Buna karşın, başka bir endokrin bozucu olan BPA ile yapılan çalışmalarda hipokampal bölgede Nissl içeriği Cresyl violet boyaması ile değerlendirilmiş ve Nissl granüllerinde azalma rapor edilmiştir (108). Bu bağlamda, çalışmamızda TB ile saptanan Nissl granülü içeriği azalan dejeneratif nöron bulguları, endokrin bozucuların nöronal protein sentezi ve hücresel bütünlük üzerinde olumsuz etkiler oluşturabileceğini gösteren bu literatür verileriyle uyumlu ve destekler niteliktedir.

Endokrin bozucuların santral sinir sisteminde oluşturduğu hasarın temel bileşenlerinden biri nöroinflamasyondur. Çevresel endokrin bozucuların bağırsak-beyin eksenini, kan-beyin bariyeri bütünlüğü ve mikrogliyal aktivasyon üzerinden beyinde inflamatuvar süreçleri tetiklediği bildirilmiştir. Bu süreçte özellikle IL-1 β , TNF- α ve oksidatif stres yollarının merkezi rol oynadığı vurgulanmaktadır (109). Yapılan bir başka çalışmada, NP maruziyeti

sonrası prefrontal kortekste özellikle IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokin düzeylerinde artış olduğu ve nöroinflamatuvar yanıtın tetiklendiği bildirilmiştir (110). Yapılan çalışmalarda NP uygulaması sonrası astrosit aktivasyonunu gösteren glial fibriler asidik protein (GFAP) ekspresyonunda artış, tau proteininde hiperfosforilasyon ve nörotrofik faktör düzeylerinde değişiklikler saptanmış olup, bu bulgular NP'nin nöroinflamatuvar ve nörodejeneratif süreçleri tetikleyebildiğini göstermektedir (67, 107). Çalışmamızda ise NP grubunda mikrogial belirteç olan IBA-1 pozitif hücre sayısındaki belirgin artış, bu nöroinflamatuvar sürecin mikrogial aktivasyon düzeyinde de gerçekleştiğini göstermektedir. Buna karşın IL-1 β immünreaktivitesindeki sınırlı artış, inflamatuvar yanıtın sitokin düzeyinde daha hafif seyretmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Literatür incelendiğinde, yapılan bir çalışmada düşük dozda oral yolla NP uygulaması erkek sıçanlarda open field testte toplam geçiş sayısı ve merkezi alana geçiş sayısı ve iki ayağa kalkma sayısını değiştirmemiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinde ise açık kola giriş sayısı ve açık kolda kalma süresi değiştirmemiştir. Erkek sıçanlarda her iki testte de etki gözlemlenmemiştir (111). Yine yapılan bir başka çalışmada oral yolla uygulanan NP erkek sıçanlarda doz arttıkça kapalı kola giriş süresi ve kapalı kola giriş sayısını artırmıştır. Bu durumda NP'nin yüksek dozda anksiyojenik etkisi olduğu ileri sürülmüştür (112). Başka bir çalışmada ise 42 günlük NP maruziyeti sonrası açık alan testinde toplam hareket mesafesi azalmış, toplam hareket süresi azalmış, merkez karede kalma süresi azalmış ve NP dozu arttıkça bu değişiklikler belirginleşmiştir (113). Bu bulgular çalışmamızın aksine doza bağımlı olarak lokomotor aktiviteyi ve merkez alan keşfini azalttığını göstermektedir. NP'nin kronik maruziyette depresyon-benzeri davranış oluşturabileceğini ve bu etkinin dozla negatif korelasyon gösterdiğini düşündürmektedir (113). Yapılan bir çalışmada yükseltilmiş artı labirent bulguları, NP'nin kronik maruziyet koşullarında doza ve süreye bağlı olarak anksiyete benzeri davranışı artırdığını göstermektedir. Özellikle 3 aylık yüksek doz maruziyet belirgin anksiyojenik etki oluştururken, 6 aylık maruziyette orta doz da etkili hale gelmiştir (114). 3 ay boyunca 40 mg/kg NP uygulanan başka bir modelde erkek sıçanlarda anksiyete belirtileri açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testinde gözlemlenmiştir (115). Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, çalışmamızda NP uygulamasının özellikle desteksiz iki ayağa kalkma ve toplam iki ayağa kalkma davranışları üzerinde baskılayıcı etki oluşturduğu görülmektedir. Desteksiz iki ayağa kalkma davranışındaki anlamlı azalma, NP'nin hayvanların keşif motivasyonu ve dikey aktivitesi üzerinde olumsuz bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Toplam iki ayağa kalkma sayısındaki azalmanın da bu

bulguyu destekler nitelikte olduğu söylenebilir. Destekli iki ayağa kalkma sayılarında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmaması ise, NP'nin özellikle desteksiz (daha yüksek keşif ve spontan aktivite gerektiren) dikey davranışları etkilediğini, ancak destekli iki ayağa kalkma davranışı üzerinde belirgin bir değişiklik oluşturmadığını düşündürmektedir. Çalışmamızda yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçen süre, açık kola giriş sayısı ve yüksekte aşağı bakma (head-dipping) sayısı arasında gruplar arası anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir. Açık alan testine bakıldığında ise destekli iki ayağa kalkma sayısında farklılık gözlemlenmeyip, desteksiz ve toplam iki ayağa kalkma sayısı gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlenmiştir. Desteksiz iki ayağa kalkma sayısına bakıldığında NP grubunda Sham grubuna göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir.

ALA'nın, güçlü antioksidan kapasitesi, metal şelatör özelliği ve mitokondriyal fonksiyonları destekleyici etkileri nedeniyle çeşitli toksisite modellerinde potansiyel bir koruyucu ajan olarak değerlendirilmektedir. ALA'nın hem lipid hem sulu fazda etkili olabilmesi, onu santral sinir sistemi için özellikle önemli bir antioksidan haline getirmektedir (116). Bir çalışmada, scopolaminin neden olduğu prefrontal korteks hasarını ALA belirgin şekilde düzeltmiştir. Nöronal kaybı azaltmış, piknotik ve dejeneratif piramidal hücre sayısını düşürmüş ve nöronal morfolojinin yeniden normale yaklaşmasını sağlamıştır. Kromatolizisi baskılayarak Nissl cisimciklerinin korunmasını sağlamış ve böylece nöronal protein sentez kapasitesini desteklemiştir. Artmış GFAP ekspresyonunu azaltarak reaktif astroglia baskılamış ve nöroinflamatuvar yanıtı hafifletmiştir (117). STZ-ile oluşturulan diyabet modelinde Nissl yapılar TB boyaması ile değerlendirilmiştir. Bu yöntemde nöron sitoplazmasındaki Nissl granülleri bazofilik olarak boyanmış ve nöronal bütünlük incelenmiştir. Diyabet grubunda kromatolizis, sitoplazmik soluklaşma ve heterokromatik/piknotik çekirdekler görülürken, ALA uygulanan grupta Nissl granüllerinin daha iyi korunduğu ve nöronal yapının büyük ölçüde düzeldiği gösterilmiştir (118). Literatürde ALA'nın nöroinflamasyonu baskılayıcı etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir deneysel çalışmada ALA, prefrontal korteks ve hipokampusta pro-inflamatuar sitokin IL-1 β seviyelerini anlamlı şekilde azalttığı, mikrogliyal aktivasyonu modüle ettiği ve astroglial reaktiviteyi düşürdüğü bildirilmiştir; bu çalışmada ayrıca ALA'nın oksidatif stres belirteçlerini de azaltarak nöroinflamatuvar yanıtı baskıladığı gösterilmiştir (119). Ayrıca ALA'nın anti-inflamatuar özelliklerinin bir kısmı, NF- κ B gibi inflamasyon sinyal yollarını modüle etmesi ve bunun sonucunda IL-1 β ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu düşürmesi üzerine yapılan moleküler çalışmalarda da desteklenmiştir (120).

Ayrıca in vitro ve in vivo modellerde ALA'nın mikroglia hücre hatlarında inflamasyonla ilişkili IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin üretimini azaltarak hücre düzeyde anti-inflamatuar etki gösterdiği raporlanmıştır (121). Literatürde ALA'nın IL-1 β düzeylerini azaltabildiği, özellikle deneysel nöroinflamasyon ve oksidatif stres modellerinde pro-inflamatuar sitokin ekspresyonunu baskıladığı bildirilen çalışmalarla desteklenmektedir. Ancak bu etkinin deneysel modele, doz ve uygulama süresine bağlı olarak değişebileceği belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda ALA grubunda IL-1 β seviyesinde hafif bir azalma gözlenmiş olmakla birlikte bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, ALA'nın inflamasyonu tamamen baskılamaktan ziyade inflamatuvar yanıtı modüle edici bir eğilim gösterdiğini düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada IBA-1 floresan immünohistokimya yöntemiyle gösterilmiş ve iskemik inme grubunda Iba-1 pozitif mikroglia sayısının ile ameboid aktif morfolojinin arttığı saptanmıştır. ALA uygulaması ise IBA-1/TNF- α pozitif mikrogliyal hücre oranını anlamlı ve doz-bağımlı şekilde azaltarak mikrogliyal aktivasyonu baskılamıştır (122). Bizim çalışmamızda da ALA grubunda IBA-1 immünreaktivitesinin azalması, literatürde bildirilen bu mikroglia baskılayıcı etkiyle uyumludur. Bu bulgu, ALA'nın yalnızca histopatolojik bulguları hafifletmekte kalmayıp aynı zamanda mikrogliyal aktivasyonu modüle ederek nöroinflamatuvar yanıtı hafiflettiğini düşündürmektedir. ALA'nın nöroprotektif etkisi literatürde incelenmektedir. Çeşitli kemirgen modellerinde, açık alan testi (OFT) ve yükseltilmiş artı labirent (EPM) kullanılarak, genellikle toksik, stres veya ilaç kaynaklı koşullar altında anksiyete benzeri davranışlar ve lokomotor aktivite üzerindeki etkileri gösterilmiştir TiO₂ nanoparçacıklarına maruz bırakılan sıçanlarda, ALA (50 mg/kg) anksiyete benzeri davranışı azaltmıştır: EPM'de açık kollara giriş sayısını ve açık kollarda geçirilen süreyi artırmış ve kapalı kollardaki artmış keşif davranışını kontrol düzeylerine getirmiştir (123) Metamfetamin, OFT'de anksiyete benzeri davranışı artırmıştır; ALA (10, 40 mg/kg) ile yapılan tedavi ise anksiyeteyi azaltmış ve keşif davranışını yeniden düzeltmiştir (124). 6-OHDA ile oluşturulan Parkinson modelinde, ALA (100-200 mg/kg) açık alan testinde lokomotor aktiviteyi artırmış ve bunun artmış anksiyeteden ziyade motor/keşif davranışının iyileşmesini gösterdiği bildirilmiştir (125). Sonuç olarak, Açık Alan Testi ve Yükseltilmiş artı labirent bulguları NP uygulamasının dikey keşif davranışı ve genel aktivite düzeyi üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğunu, ALA uygulamasının ise bu etkiyi kısmen iyileştirme eğilimi gösterse de tam anlamıyla geri çeviremediğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda NP uygulamasının üç hafta her gün tez doz uygulanması NP gibi endokrin bozucuların doz-zaman etkileşiminin non-monotonik zaman etkisi altında ve reseptör

desentitizasyonunu geliştirebileceğini düşündürmektedir (126). Desteksiz iki ayağa kalkma sayısında NP+ALA grubunda kontrol ve sham grubuna göre anlamlı azalma gözlenlenmiş olup, toplam ayağa kalkma sayısında sadece sham grubuna göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda, NP ile oluşturulan deneysel nörotoksisite modelinde NP uygulamasının histopatolojik olarak hücresel organizasyon bozukluğu, nöronal dejeneratif değişiklikler ve doku bütünlüğünde bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte NP'nin mikrogliyal aktivasyonu belirgin şekilde artırdığı, IBA-1 pozitif hücre sayısında anlamlı yükselmeye neden olduğu ve nöroinflamatuvar süreci tetiklediği; IL-1 β immünreaktivitesinde ise hafif ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış oluşturduğu saptanmıştır. Davranışsal değerlendirmelerde NP'nin özellikle desteksiz iki ayağa kalkma sayısını azaltarak dikey keşif davranışını baskıladığı, ancak anksiyete parametrelerinde belirgin değişiklik oluşturmadığı belirlenmiştir. ALA uygulaması, histopatolojik düzeyde gözlenen dejeneratif değişikliklerde iyileşme sağlarken, NP'ye bağlı artmış IBA-1 pozitif hücre sayısını da anlamlı düzeyde azaltarak mikrogliyal aktivasyonu baskılamış; IL-1 β düzeylerinde ise azalma eğilimi oluşturmakla birlikte istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Davranışsal olarak ALA'nın NP'ye bağlı bazı motor/keşif değişikliklerini kısmen iyileştirme eğilimi gösterdiği ancak tamamen geri çevirmediği görülmüştür. Sonuç olarak elde edilen bulgular, ALA'nın NP ile indüklenen histopatolojik ve nöroinflamatuvar süreç üzerinde özellikle mikrogliyal aktivasyon düzeyinde terapötik etki gösterdiğini, ancak sitokin yanıtı ve davranışsal parametreler üzerindeki etkisinin daha sınırlı kaldığını ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2015;40(1):241–258.
2. Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea A, Viana MT. Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2005;4(1):1–25.
3. Ijaz MU, Tahir A, Samad A, Anwar H. Nobiletin ameliorates nonylphenol-induced testicular damage by improving biochemical, steroidogenic, hormonal, spermatogenic, apoptotic and histological profile. *Human & Experimental Toxicology*. 2021;40(3):403–416.
4. Aydoğan M, Korkmaz A, Barlas N, Kolankaya D. The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. *Toxicology*. 2008;249(1):35–39.
5. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*. 2016;139:136–153.
6. Zhang Y-Q, Mao Z, Zheng Y-L, Han B-P, Chen L-T, Li J, et al. Elevation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in the mouse brain after chronic nonylphenol exposure. *International journal of molecular sciences*. 2008;9(10):1977–1988.
7. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular brain research*. 1998;57(1):1–9.
8. Gorąca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid–biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*. 2011;63(4):849–858.
9. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free radical biology and medicine*. 1995;19(2):227–250.
10. Toklu HZ, Hakan T, Celik H, Biber N, Erzik C, Ogunc AV, et al. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury in rats. *The journal of spinal cord medicine*. 2010;33(4):401–409.
11. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2009;1790(10):1149–1160.
12. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology* E-Book: Elsevier Health Sciences; 2015.

13. Pawlina W, Ross MH. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
14. Cumhur M, Sargon MF, Sürücü HS, İlgi S, Sancak B, Taner D, et al. Fonksiyonel nöroanatomi: ODTÜ Geliştirme Vakfı; 2007.
15. Özkan O. Anatomiye Güncel Bakış II: Akademisyen Kitabevi; 2024.
16. Jenkins JR. Atlas of neuroradiologic embryology, anatomy, and variants: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
17. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The developing human: clinically oriented embryology: Elsevier Brasil; 2008.
18. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The developing Human-E-Book: the developing human-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2018.
19. Sadler TW. Langman's medical embryology: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
20. Dere F. Nöroanatomi: fonksiyonel nöroloji atlası ve ders kitabı c. 3: Nobel Tıp Kitabevi; 2000.
21. Gökmen FG. Sistematik anatomi. İzmir: Güven Kitabevi. 2003;97(8):147.
22. Snell RS. Snell's Clinical Anatomy: Wolters Kluwer India Pvt Ltd; 2018.
23. Hadley G. Basic histology. Journal of Anatomy. 2007;211(3):412.
24. Ross MH, Pawlina W. Histoloji konu anlatımı ve atlas. Palme yayıncılık. 2014:784–984.
25. Netter FH. Netter Atlas of Human Anatomy: A Systems Approach-E-Book: Netter Atlas of Human Anatomy: A Systems Approach-E-Book: Elsevier health sciences; 2022.
26. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology e-book: Elsevier Health Sciences; 2006.
27. Pawlina W. Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology: Alexander books; 1979.
28. Lavenex P. Functional anatomy, development, and pathology of the hippocampus. The Clinical Neurobiology of the Hippocampus: an integrative view. 2012:10–38.
29. Drake RL, Vogl AW, Mitchell AW. Gray's Anatomy for Students Flash Cards E-Book: Gray's Anatomy for Students Flash Cards E-Book: Elsevier Health Sciences; 2023.
30. Rolfe D, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. Physiological reviews. 1997;77(3):731–758.
31. Mao Z, Zheng X-F, Zhang Y-Q, Tao X-X, Li Y, Wang W. Occurrence and biodegradation of nonylphenol in the environment. International journal of molecular sciences. 2012;13(1):491–505.

32. Noorimotlagh Z, Mirzaee SA, Ahmadi M, Jaafarzadeh N, Rahim F. The possible DNA damage induced by environmental organic compounds: The case of Nonylphenol. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2018;158:171–181.
33. Karabulut G, Barlas N. Endocrine adverse effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate and monobutyl phthalate in male pubertal rats. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2022;73(4):285–296.
34. Inkaya EN, Barlas N. Investigation of combined effects of propyl paraben and methyl paraben on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats. *Toxicology and Industrial Health*. 2022;38(10):687–701.
35. Sargis RM. Metabolic disruption in context: Clinical avenues for synergistic perturbations in energy homeostasis by endocrine disrupting chemicals. *Endocr Disruptors (Austin)*. 2015;3(1):e1080788.
36. Heindel JJ, Newbold R, Schug TT. Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015;11(11):653–661.
37. Monneret C. What is an endocrine disruptor? *C R Biol*. 2017;340(9-10):403–405.
38. Klopčič I, Kolšek K, Dolenc MS. Glucocorticoid-like activity of propylparaben, butylparaben, diethylhexyl phthalate and tetramethrin mixtures studied in the MDA-kb2 cell line. *Toxicol Lett*. 2015;232(2):376–383.
39. Aydoğan M, Korkmaz A, Barlas N, Kolankaya D. Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. *Drug Chem Toxicol*. 2010;33(2):193–203.
40. Yang M, Park MS, Lee HS. Endocrine disrupting chemicals: human exposure and health risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2006;24(2):183–224.
41. Nimrod AC, Benson WH. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit Rev Toxicol*. 1996;26(3):335–364.
42. Ying GG. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ Int*. 2006;32(3):417–431.
43. Saricayir S, Alpay T, Pashayeva B, Ezdesir A, Ozdemir G. Microbial degradation of phenol and derivatives using environmental isolates from industrial waste sources. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2026;119(3):49.
44. Giger W, Brunner PH, Schaffner C. 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*. 1984;225(4662):623–625.
45. Rivera J, Caixach J, Figueras A, Fraisse D, Ventura F. Application of fast atom bombardment and tandem mass spectrometry to the identification of organic micropollutants in water. *Biomed Environ Mass Spectrom*. 1988;16(1-12):403–408.
46. Lee PC, Lee W. In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1996;57(3):341–348.

47. Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect.* 1991;92:167–173.
48. Hao C, Croley TR, March RE, Koenig BG, Metcalfe CD. Mass spectrometric study of persistent acid metabolites of nonylphenol ethoxylate surfactants. *J Mass Spectrom.* 2000;35(7):818–830.
49. Barann M, Linden I, Witten S, Urban BW. Molecular actions of propofol on human 5-HT3A receptors: enhancement as well as inhibition by closely related phenol derivatives. *Anesth Analg.* 2008;106(3):846–57, table of contents.
50. Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prast H, Raecker T. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol.* 2002;36(8):1676–1680.
51. Lu YY, Chen ML, Sung FC, Wang PS, Mao IF. Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese. *Environ Int.* 2007;33(7):903–910.
52. White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology.* 1994;135(1):175–182.
53. Lin HC, Li HY, Wu YT, Tsai YL, Chuang CY, Lin CH, et al. Bayesian inference of nonylphenol exposure for assessing human dietary risk. *Sci Total Environ.* 2020;713:136710.
54. Ademollo N, Ferrara F, Delise M, Fabietti F, Funari E. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environ Int.* 2008;34(7):984–987.
55. Crevet L, Vanacker JM. Regulation of the expression of the estrogen related receptors (ERRs). *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(22):4573–4579.
56. Tabassum H, Parvez S, Raisuddin S. Melatonin abrogates nonylphenol-induced testicular dysfunction in Wistar rats. *Andrologia.* 2017;49(5).
57. Araujo FG, Bauerfeldt GF, Cid YP. Nonylphenol: Properties, legislation, toxicity and determination. *An Acad Bras Cienc.* 2018;90(2 suppl 1):1903–1918.
58. Battal D, Cok I, Unlusayin I, Aktas A, Tunctan B. Determination of urinary levels of Bisphenol A in a Turkish population. *Environ Monit Assess.* 2014;186(12):8443–8452.
59. Saravanan M, Nam SE, Eom HJ, Lee DH, Rhee JS. Long-term exposure to waterborne nonylphenol alters reproductive physiological parameters in economically important marine fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2019;216:10–18.
60. Monteiro-Riviere NA, Van Miller JP, Simon G, Joiner RL, Brooks JD, Riviere JE. Comparative in vitro percutaneous absorption of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates (NPE-4 and NPE-9) through human, porcine and rat skin. *Toxicol Ind Health.* 2000;16(2):49–57.
61. Sciarrillo R, Di Lorenzo M, Valiante S, Rosati L, De Falco M. OctylPhenol (OP) Alone and in Combination with NonylPhenol (NP) Alters the Structure and the Function of Thyroid Gland of the Lizard *Podarcis siculus*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2021;80(3):567–578.

62. Geens T, Neels H, Covaci A. Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere*. 2012;87(7):796–802.
63. Vivacqua A, Recchia AG, Fasanella G, Gabriele S, Carpino A, Rago V, et al. The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine*. 2003;22(3):275–284.
64. Jie X, Yang W, Jie Y, Hashim JH, Liu XY, Fan QY, et al. Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on F1 male rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2010;89(5):418–428.
65. Ishido M, Morita M, Oka S, Masuo Y. Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. *Regul Pept*. 2005;126(1-2):145–153.
66. Li S, You M, Chai W, Xu Y, Wang Y. Developmental exposure to nonylphenol induced rat axonal injury in vivo and in vitro. *Arch Toxicol*. 2019;93(9):2673–2687.
67. Ceylan T, Akin AT, Karabulut D, Tan FC, Taşkiran M, Yakan B. Therapeutic effect of thymoquinone on brain damage caused by nonylphenol exposure in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2023;37(11):e23471.
68. Jie X, Jianmei L, Zheng F, Lei G, Biao Z, Jie Y. Neurotoxic effects of nonylphenol: a review. *Wien Klin Wochenschr*. 2013;125(3-4):61–70.
69. Arukwe A, Thibaut R, Ingebrigtsen K, Celius T, Goksøyr A, Cravedi J. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol*. 2000;49(4):289–304.
70. Gu W, Wang Y, Qiu Z, Dong J, Wang Y, Chen J. Maternal exposure to nonylphenol during pregnancy and lactation induces microglial cell activation and pro-inflammatory cytokine production in offspring hippocampus. *Sci Total Environ*. 2018;634:525–533.
71. Korkmaz A, Ahabab MA, Kolankaya D, Barlas N. Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(10):2865–2871.
72. Matsunaga H, Mizota K, Uchida H, Uchida T, Ueda H. Endocrine disrupting chemicals bind to a novel receptor, microtubule-associated protein 2, and positively and negatively regulate dendritic outgrowth in hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2010;114(5):1333–1343.
73. Zhang YQ, Mao Z, Zheng YL, Han BP, Chen LT, Li J, et al. Elevation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in the mouse brain after chronic nonylphenol exposure. *Int J Mol Sci*. 2008;9(10):1977–1988.
74. Mao Z, Zheng YL, Zhang YQ. Behavioral impairment and oxidative damage induced by chronic application of nonylphenol. *Int J Mol Sci*. 2010;12(1):114–127.
75. Reed LJ, De BB, Gunsalus IC, Hornberger CS, Jr. Crystalline alpha-lipoic acid; a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*. 1951;114(2952):93–94.

76. Morris TW, Reed KE, Cronan JE, Jr. Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lp1A* and *lp1B* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *J Bacteriol.* 1995;177(1):1–10.
77. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol.* 1997;29(3):315–331.
78. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528–1542.
79. Bilska A, Włodek L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep.* 2005;57(5):570–577.
80. Salehi B, Berkay Yılmaz Y, Antika G, Boyunegmez Tümer T, Fawzi Mahomoodally M, Lobine D, et al. Insights on the Use of α -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules.* 2019;9(8).
81. Moini H, Packer L, Saris NE. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;182(1):84–90.
82. Wollin SD, Jones PJ. Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2003;133(11):3327–3330.
83. Marquet A, Bui BT, Florentin D. Biosynthesis of biotin and lipoic acid. *Vitam Horm.* 2001;61:51–101.
84. Herbert AA, Guest JR. Lipoic acid content of *Escherichia coli* and other microorganisms. *Arch Microbiol.* 1975;106(3):259–266.
85. Peinado J, Sies H, Akerboom TP. Hepatic lipoate uptake. *Arch Biochem Biophys.* 1989;273(2):389–395.
86. Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of alpha-lipoic acid (ALA). *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006;46(1):29–41.
87. Busse E, Zimmer G, Schopohl B, Kornhuber B. Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung.* 1992;42(6):829–831.
88. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, et al. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res.* 1994;20(2):119–133.
89. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition.* 2001;17(10):888–895.
90. Molteni M, Rossetti C. Neurodegenerative diseases: The immunological perspective. *J Neuroimmunol.* 2017;313:109–115.
91. Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep.* 2016;13(4):3391–3396.
92. Xanthos DN, Sandkühler J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(1):43–53.

93. Calabrese V, Santoro A, Monti D, Crupi R, Di Paola R, Latteri S, et al. Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2018;115:80–91.
94. Boyko AA, Troyanova NI, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM. Similarity and Differences in Inflammation-Related Characteristics of the Peripheral Immune System of Patients with Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).
95. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 2009;8(4):382–397.
96. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell*. 2014;158(1):15–24.
97. Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener*. 2015;4:19.
98. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461–553.
99. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*. 2016;37(9):608–620.
100. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445–455.
101. Zhang QS, Heng Y, Yuan YH, Chen NH. Pathological α -synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicol Lett*. 2017;265:30–37.
102. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53(2):1181–1194.
103. Zhang Y, Chen J, Xu J, Yang X, Wang S, Zeng Y, et al. Effects of tea polyphenols and tea polysaccharides on improving nonylphenol-induced depression-like behavior, monoamine neurotransmitter disorder, and neuronal pyroptosis. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2025;295:118166.
104. Desai JK, Trangadia BJ, Patel UD, Patel HB, Kalaria VA, Kathiriya JB. Neurotoxicity of 4-nonylphenol in adult zebrafish: Evaluation of behaviour, oxidative stress parameters and histopathology of brain. *Environ Pollut*. 2023;334:122206.
105. Zhang HY, Xue WY, Li YY, Ma Y, Zhu YS, Huo WQ, et al. Perinatal exposure to 4-nonylphenol affects adipogenesis in first and second generation rats offspring. *Toxicol Lett*. 2014;225(2):325–332.
106. Chapin RE, Delaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, et al. The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicol Sci*. 1999;52(1):80–91.
107. Suna PA, Gergin OO, Baran M, Ulger M, Goc R, Yay A. Curcumin Attenuates Nonylphenol-Induced Toxicity In Brain Development; An Experimental Study. *Acta Neurol Taiwan*. 2023;32(3):100–107.

108. Singh SJ, Tandon A, Phoolmala, Srivastava T, Singh N, Goyal S, et al. Bisphenol-A (BPA) Impairs Hippocampal Neurogenesis via Inhibiting Regulation of the Ubiquitin Proteasomal System. *Mol Neurobiol*. 2023;60(6):3277–3298.
109. Yao H, Yu J, Yang X, Xu J. Mechanisms of disruption of the gut-brain axis by environmental endocrine disruptors. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2025;304:119124.
110. Che X, Fang Y, You M, Xu Y, Wang Y. Exposure to nonylphenol in early life increases pro-inflammatory cytokines in the prefrontal cortex: Involvement of gut-brain communication. *Chem Biol Interact*. 2020;323:109076.
111. Kawaguchi S, Kuwahara R, Kohara Y, Uchida Y, Oku Y, Yamashita K. Oral exposure to low-dose of nonylphenol impairs memory performance in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Sci*. 2015;40(1):43–53.
112. Li S, Xu W, Gong L, Zhang J, Zhang Y, Chen J, et al. Subchronic nonylphenol exposure induced anxiety-like behavior and decreased expressions of regulators of synaptic plasticity in rats. *Chemosphere*. 2021;282:130994.
113. Pan J, Lu D, Yu L, Ye Z, Duan H, Narbad A, et al. Nonylphenol induces depressive behavior in rats and affects gut microbiota: A dose-dependent effect. *Environ Pollut*. 2024;344:123357.
114. Tang L, Li S, Yu J, Zhang Y, Yang L, Tong D, et al. Nonylphenol induces anxiety-like behavior in rats by regulating BDNF/TrkB/CREB signal network. *Food Chem Toxicol*. 2022;166:113197.
115. Yu J, Li S, Li M, Zhang Y, Tong D, Xu Y, et al. Amelioration of nonylphenol-induced anxiety/depression-like behaviors in male rats using green tea and Zn-Se tea interventions. *Toxicol Res (Camb)*. 2024;13(1):tfac003.
116. Vafae F, Derakhshani M, Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H. Alpha-lipoic acid, as an effective agent against toxic elements: a review. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2025;398(4):3345–3372.
117. Memudu AE, Adewumi AE. Alpha lipoic acid ameliorates scopolamine induced memory deficit and neurodegeneration in the cerebello-hippocampal cortex. *Metab Brain Dis*. 2021;36(7):1729–1745.
118. Tanbek K, Ozerol E, Yilmaz U, Yilmaz N, Gul M, Colak C. Alpha lipoic acid decreases neuronal damage on brain tissue of STZ-induced diabetic rats. *Physiol Behav*. 2022;248:113727.
119. Gomes BAQ, Santos SMD, Gato LDS, Espíndola KMM, Silva R, Davis K, et al. Alpha-Lipoic Acid Reduces Neuroinflammation and Oxidative Stress Induced by Dapsone in an Animal Model. *Nutrients*. 2025;17(5).
120. Dinicola S, Proietti S, Cucina A, Bizzarri M, Fuso A. Alpha-Lipoic Acid Downregulates IL-1 β and IL-6 by DNA Hypermethylation in SK-N-BE Neuroblastoma Cells. *Antioxidants (Basel)*. 2017;6(4).
121. Carota G, Distefano A, Spampinato M, Giallongo C, Broggi G, Longhitano L, et al. Neuroprotective Role of α -Lipoic Acid in Iron-Overload-Mediated Toxicity and Inflammation in In Vitro and In Vivo Models. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(8).

122. Wu MH, Huang CC, Chio CC, Tsai KJ, Chang CP, Lin NK, et al. Inhibition of Peripheral TNF- α and Downregulation of Microglial Activation by Alpha-Lipoic Acid and Etanercept Protect Rat Brain Against Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol*. 2016;53(7):4961–4971.
123. Khedr MA, El-Kazaz SE, Rashed RR, Tohamy HG, Shukry M, Goma AA. Neuroprotective Effects of Alpha-Lipoic Acid Against Behavioral Toxicity, Oxidative and Inflammatory Damage Caused by Titanium Dioxide Nanoparticles. *Biol Trace Elem Res*. 2026;204(1):172–188.
124. Kargar HMP, Noshiri H. Protective effects of alpha-lipoic acid on anxiety-like behavior, memory and prevention of hippocampal oxidative stress in methamphetamine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2024;241(2):315–326.
125. de Araújo DP, De Sousa CN, Araújo PV, Menezes CE, Sousa Rodrigues FT, Escudeiro SS, et al. Behavioral and neurochemical effects of alpha-lipoic Acid in the model of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic injection of 6-ohda in rat. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:571378.
126. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Health*. 2015;14:13.

EKLER

EK 1. Etik Kurul İzni



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 68429034/ 43.
Konu: Onay belgesi

20.05.2026

Sayın: Dr. Öğr. Üyesi Kübra Tuğçe KALKAN

Sorumlu yürütücü olarak planladığınız “Nonilfenol ile Oluşturulan Nörotoksisitede Alfa Lipoik Asitin Etkilerinin Araştırılması” başlıklı araştırmanıza ait Etik Kurulu kararı ekte olup;

Gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK
Etik Kurulu Başkanı

Ek: 1 Adet Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

EK 1. (Devamı). Adet Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

 T.C. KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARLARI			
Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Toplantı Saati	Karar Sayısı
20/ 05 / 2026	10	14: 00	11

Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK başkanlığında yapılan Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu toplantısında aşağıdaki karar alınmıştır.

KARAR NO – 11: Araştırma yürütücüsü **Dr. Öğr. Üyesi Kübra Tuğçe KALKAN** Liderliğinde **30 Adet Sıçan (RAT)** üzerinde yapılması planlanan “**Nonilfenol ile Oluşturulan Nörotoksisitede Alfa Lipoik Asitin Etkilerinin Araştırılması**” adlı araştırmanın etik açıdan yapılabilirliğine ve konunun ilgiliye tebliğine oybirliği ile karar verildi.

Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK
(Başkan)

Doç. Dr. Zeynel Abidin ERBESLER

Prof. Dr. Atilla TAŞKIN

Doç. Dr. Ertuğrul KUL
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Cihat ÖZTÜRK

Dr. Öğr. Üyesi Sadık KÜÇÜKGÜNAY

Dt. Hakan AHI

Ecz. Suat YAĞMUR

Veteriner Hekim Demirel ERGÜN

(Form No: FR- 347 ; Revizyon Tarihi: .../.../... ; Revizyon No: ...)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı, Soyadı	Ümran ERSOY
Doğum Yeri -	*****
Doğum Tarihi	*****
Uyruğu	T.C
Telefon	*****
e-Posta Adresi	*****
Yabancı Dili	İngilizce

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	: Hacettepe Üniversitesi
Fakülte	: Eğitim Fakültesi
Bölümü	: Biyoloji Öğretmenliği
Mezuniyet Yılı	: 2001

Yüksek Lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü Adı	Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Anabilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji
Mezuniyet Yılı	

Makale ve Bildiriler	
Ersoy, Ü. (2026/15-18 Nisan). 9. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi. Sözlü Bildiri. Antalya Bilim Üniversitesi, Türkiye.	
Ersoy, Ü. Koçak, S., Çalışkan, H., & Kalkan, K.T. <i>Investigation Of The Effects Of Alpha-Lipoic Acid On Nonylphenol-Induced Brain Toxicity</i> . IHSLC Kongresi.	