

**Kronik etanol tüketiminin ve etanol yoksunluğunun beyin moleküler yapısında tetiklediği değişimlerin incelenmesi ve bu değişimlere karşı vitamin A takviyesinin koruyucu etkilerinin araştırılması**

**Proje No: 110S083**

Doç. Dr. Ewa (Havva) Doğru

MART 2012

ANKARA

## Önsöz

Alkolizm, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, hala insan sağlığı ve ülke ekonomisi üzerinde negatif etkilere sahip olan ciddi bir problemdir. Bu nedenle, etanolün biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini, bu etkilere karşı geliştirilen potansiyel korunma stratejilerini ve terapötik metodları konu edinen birçok araştırma gerçekleştirilmektedir. Bu ve benzeri çalışmaların etil alkol alımına ve alkol yoksunluğuna bağlı beyindeki moleküler değişimler hakkında daha detaylı bilgilerin elde edilmesine ve alkol bağımlılığına karşı daha başarılı farmakolojik tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğine inanıyoruz. Kendi çalışmamız dahil (ELİBOL-CAN, 2011) şimdiye kadar yapılan birçok çalışma alkolün beyinde oluşturduğu hasarların önemli ölçüde alkolün yarattığı oksidatif stresin sonucunda meydana geldiğini göstermektedir. Mevcut çalışmanın likit diyetle kronik alkol alımının ve ayrıca bunu takip eden alkol yoksunluğunun hipokampusta oluşturduğu moleküler değişimleri inceleyip antioksidant özelliklere sahip vitamin A takviyesinin hipokampus protein, lipid ve nükleik asit yapısında alkolün yarattığı değişiklikleri ne derece azaltacağı yönünde ek bilgiler sağladığı ve bu konuda çok sınırlı sayıda olan literatüre katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Mevcut çalışmada hipokampus dokusundaki makromolekül profilleri, biyolojik sistem uygulamalarında oldukça yeni, ortamı bozmadan hassas ve süratli bilgi verebilen FT-IR tekniği ile incelendi. Bu çalışmanın bütün aşamalarının yapılabilmesi ve sonuçlarının elde edilebilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) ve her türlü desteği için Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu'na bilim dünyasına katkıları adına teşekkür ederiz.

## İçindekiler

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
ŞEKİL LİSTESİ .....	4
TABLO LİSTESİ .....	5
ÖZET .....	6
ABSTRACT .....	7
BİLİMSEL SONUÇ RAPORU .....	8
1. GİRİŞ.....	8
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	12
2.1. Deney Hayvanları .....	12
2.2. Hayvan bakımı .....	12
2.3. Alkol Diyetinin Uygulanması .....	12
2.4. Kandaki Alkol Konsantrasyonunun Ölçülmesi.....	12
2.5. Dekapitasyon .....	13
2.6. FT-IR Spektroskopik Ölçümler.....	13
2.6.1. FT-IR Spektroskopisi için Örnek Hazırlanması .....	13
2.6.2. FT-IR Spektroskopisi Ölçümlerin Alınması .....	14
2.7. Veri Analizi.....	16
3. BULGULAR .....	18
3.1. Analiz İçin Kullanılan Örnek Sayıları. ....	18
3.2. Hayvanların Ağırlık Değişimleri .....	18
3.3. Alkol ve Vitamin A Tüketimi. ....	19
3.4. Kandaki Alkol Konsantrasyonu .....	20
3.5. FT-IR Spektroskopisi Sonuçları .....	20
4. SONUÇLARIN ÖZETİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ .....	36
KAYNAKLAR.....	40

## Şekil Listesi

Şekil 2.1. Freeze Dry System cihazı .....	13
Şekil 2.2. Disk yapma aparatları .....	14
Şekil 2.3. Perkin-Elmer Spectrum-One FTIR spektrometre. ....	14
Şekil 2.4. Spectrum-One yazılımı arayüzü.....	15
Şekil 2.5. Saf KBr diskinin spektrumu.....	15
Şekil 2.6. Baseline alınması. ....	16
Şekil 3.1. Deney süresince kaydedilen grupların ortalama ağırlığı.....	18
Şekil 3.2. Deney süresince alkol grubu tarafından tüketilen sıvı miktarları.. ....	19
Şekil 3.3. Deney süresince alkol grubunda tarafından tüketilen günlük ve ortalama alkol miktarları .....	20
Şekil 3.4. Deney süresince alkol grubundaki hayvanlar tarafından alınan vitamin A miktarları.....	20
Şekil 3.5. Kontrol grubuna ait örnek 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ bölümünden elde edilmiş ve Amide A'ya göre normalizasyonu yapılmış FT-IR spektrumu .....	21
Şekil 3.6. Her gruba ait örnek 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ bölümünden elde edilmiş ve Amide A'ya göre normalizasyonu yapılmış FT-IR spektrum ortalamaları.....	23
Şekil 3.7. 3800-3030 $\text{cm}^{-1}$ bölgesinde bulunan Amide A ( $3360 \text{ cm}^{-1}$ ) bandına göre normalize edilmiş her bir gruba ait FT-IR spektrumu.....	23
Şekil 3.8. 3030-2800 $\text{cm}^{-1}$ bölgesinde bulunan $\text{CH}_2$ asimetrik gerilme ( $2920 \text{ cm}^{-1}$ ) bandına göre normalize edilmiş her bir gruba ait FT-IR spektrumu .....	24
Şekil 3.9. 1800-400 $\text{cm}^{-1}$ bölgesinde bulunan Amide I ( $1658 \text{ cm}^{-1}$ ) bandına göre normalize edilmiş her bir gruba ait FT-IR spektrumu .....	24
Şekil 3.10. Protein Amide B bant frekansındaki değişimler .....	25
Şekil 3.11. Protein kaynaklı $\text{CH}_3$ simetrik gerilme bant frekansındaki değişimler .....	28
Şekil 3.12. $\text{CH}_2$ asimetrik gerilme bant genişliğindeki değişimler .....	29
Şekil 3.13. Amide I ve Amide II bant frekansındaki değişimler.....	30
Şekil 3.14. Amide I ve Amide II bant genişliğindeki değişimler.....	32
Şekil 3.15. $\text{PO}_2^-$ asimetrik gerilme bant frekansındaki değişimler .....	33
Şekil 3.16. $\text{CO-O-C}$ asimetrik gerilme bant frekansındaki değişimler. ....	33
Şekil 3.17. $\text{C-N-C}$ gerilme bant frekansındaki değişimler. ....	34
Şekil 3.18. Z-tip DNA bant frekansındaki değişimler. ....	34

## Tablo Listesi

<b>Tablo 1.</b> Hipokampus dokusuna ait banlar ve spektral tanımları.....	22
<b>Tablo 2.</b> Bant alan değişimleri.....	26
<b>Tablo 3.</b> Band frekans değişimleri.....	27
<b>Tablo 4.</b> Bant genişlik değişimleri.....	29
<b>Tablo 5.</b> Amid I ikincil yapı değişimleri.....	31
<b>Tablo 6.</b> Bant oran değişimleri.....	35

## Özet

Etanolun davranış, beyin morfolojisi ve beyin fizyolojisi üzerindeki etkileri hakkında çok sayıda sonuç olmasına rağmen, kronik alkol kullanımının ve alkol yoksunluğunun sinir sistemi üzerindeki zararlı etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar hala tam olarak açık değildir. Bu çalışmamızda likit diyetle uzun süre alınan etanol tüketiminin ve ayrıca daha sonra etanolun yoksunluğunun hipokampusun lipid, protein ve nükleik asit yapısında tetiklediği değişiklikler FT-IR spektroskopisi ile incelendi ve bu değişikliklere karşı vitamin A takviyesinin koruyucu etkileri araştırıldı. Sonuç olarak 3 aylık likit diyetle verilen ancak düşük kan seviyelerine ulaşan alkol ve alkol yoksunluğu, kısa süreli ancak yüksek kan alkol seviyeleri sağlayan gavaj ile alkol alımına kıyasla hipokampus moleküler yapısında oksidatif strese bağlanabilecek ciddi değişikliklere (örneğin olefinik bant alanının artmasına) yol açmamaktadır. Mevcut çalışmada, etanol alımı ve etanol yoksunluğu lipidleri etkilemezken, proteinlerde ve özellikle nükleik asit yapısında bir takım değişimlere yol açtı. Tek başına vitamin A takviyesinin hipokampus dokusunun moleküler yapısını kuvvetli bir şekilde etkilediğine dair sonuçlar alındı. Bunlar arasında vitamin A takviyesi, protein bantlarında frekans kaymalarına, ikincil yapıda değişikliklere ve bant genişliğinde artmalara yol açtığından, protein yapısı üzerinde etkili oldu. Bu etkiler arasında protein denaturasyonun işaretlerinden biri olarak kabul edilen “aggregated  $\beta$ -sheet” yapısının artması olumsuz etki olarak görülebilir. Bunun yanı sıra vitamin A takviyesinin lipidler üzerinde olumlu veya olumsuz olabilecek lipid düzensizliğinin, hücre zarı akışkanlığının doymuş/doymamış yağ oranının ve olefinik bant miktarının artması gibi yapısal ve kantitatif etkileri vardı. Vitamin A ile etanol etkileşimi ve yoksunluk döneminde vitamin A takviyesi lipidler üzerinde olumlu bir etki göstermezken, “alpha helix” ve “beta sheet” yapısını arttırıp “aggregated beta sheet” yapısını azaltarak protein stabilizesini arttırmaktadır. Ayrıca, etanol nükleik asit yapısında değişime neden olurken, vitamin A varlığında bu değişim görülmemekte ve nükleik asit yapısı korunmaktadır. Bu sonuçlar gösteriyor ki, A vitamini etanol toksisitesine karşı bazı koruyucu etkilere sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** akut/kronik etanol alımı, etanol yoksunluğu, vitamin A, sıçan, hipokampus, FT-IR spektroskopisi,

## Abstract

The numerous adverse effects of ethanol abuse and ethanol withdrawal on behaviour, brain morphology and physiology are well documented and commonly accepted. In contrast to this, the understanding of the molecular mechanisms underlying these pathological effects is still incomplete. The aim of the present study was to examine the effects of prolonged ethanol intake by liquid diet and subsequent ethanol withdrawal on the molecular profiles of lipids, proteins and nucleic acids of rat hippocampus using FT-IR spectroscopy. A potential protective effect of the concomitant vitamin A administration was also investigated. As a result, compared to “binge-like-drinking”, ethanol exposure through a liquid diet resulting, however, in much lower BACs did not produce molecular changes (i.e. increase in the area of olefinic band) that could be related to ethanol and/or ethanol withdrawal-induced oxidative stress in the hippocampus. In the present study, ethanol consumption and withdrawal produced some changes in proteins’ and especially nucleic acids’ structure having little effect on the lipids. On the other hand, dietary supplementation of vitamin A *per se* had a strong effect on the molecular structure of the hippocampus. Vitamin A when administered alone caused frequency shifts in protein bands, produced increase in bandwidths, and apparently triggered some changes in the protein’s secondary structure including an increase in the “aggregated beta sheet” content. The latter change is accepted as one of the indices of protein denaturation and thus can be considered as a negative side-effect of vitamin A supplementation. Vitamin A *per se* showed both negative and positive effects on lipid content and structure such as an increase in olefinic acids content, an increase in lipid disordering and fluidity, and decrease of the ratio of saturated-to-unsaturated lipids. An interaction of vitamin A with ethanol, and its supplementation during the withdrawal period had little effect on lipids however, increased protein stability by increasing alpha helix and beta sheet and decreasing aggregated beta sheet content. Moreover, concomitant administration of vitamin A removed ethanol effects on nucleic acid structure, and thus manifested some protection against ethanol toxicity.

**Keywords:** acute/chronic ethanol abuse, ethanol withdrawal, vitamin A, rat, hippocampus, FT-IR spectroscopy.

## BİLİMSEL SONUÇ RAPORU

### 1. GİRİŞ

Etil alkol binlerce yıldır en yaygın şekilde kullanılan ve bağımlılık yaratan bir maddedir. Ayrıca etil alkol kan-beyin bariyerini aşan ve beyin dokusuna serbestçe difüze olan nadir moleküllerden biridir. Bu nedenle etanol geniş kullanımı ile birlikte en yaygın nörotoksinlerden biri sayılmaktadır. İnsanlarda ve ayrıca deney hayvanlarında etanol alımının duyu uyarılarına karşı motor tepkilerin yavaşlamasına, motor koordinasyonunun bozulmasına, agresif davranışların tetiklenmesine, hafızanın zayıflamasına ve öğrenme kapasitesinin azalmasına yol açtığı bilinmektedir (FADDA, 1998; MATTHEWS, 2004; MELCHIOR, 1993; SANTIN, 2000; SILVERS, 2003; WALKER, 1981). Kronik alkol kullanımının beyinde, nöron kaybında artış ve bellek bozukları gibi olumsuz morfolojik ve fonksiyonel etkilere neden olduğu bir çok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir (DOUGHERTY, 2000; PERIS, 1997; THINSCHMIDT, 2003). Hem akut hem de kronik alkol alımında meydana gelen hafıza zayıflaması, öğrenme ve bellek için önemli olan beynin hipokampus bölgesi üzerindeki etanolün olumsuz etkilerine bağlanmaktadır (ARENDDT, 1988; GIVENS, 2000; MATTHEWS, 2000; SHIMIZU, 1998; SINCLAIR, 1986; WEINER, 1994; WHITE, 2004). Kronik alkol alımının beyin üzerinde yarattığı zararlı etkilerin yoksunluk döneminde daha da arttığı gözlemlenmiştir (CADETE-LEITE, 2003, FINN, 1997; GLUE, 1990; GONZALES, 1996; PAULA-BARBOSA, 1993, PHILLIPS, 1983). Etil alkolün davranış, beyin morfolojisi ve fonksiyonları üzerindeki etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen bunlara eşlik eden beyin dokusundaki moleküler değişimler yeterli derecede bilinmemektedir. Etanolün, dokularda, moleküler seviyedeki etkilerini araştıran çalışmaların çoğu fetal alkol sendromu ile ilgilidir (GOODLETT, 2005 derleme makalesi ve içindeki referanslar). Yetişkin bireylerin dokularında alkolün kronik kullanımının yarattığını moleküler değişimler hakkında daha az bilgi vardır ve yapılan çalışmaların bir çoğu *in vitro* olup karaciğer ve kan hücrelerinin doku kültürü üzerinde yapılmıştır (CHIN, 1977; ELLINGSON, 1991; GOLDSTEIN, 1984; HARRIS, 1987; HRELIA, 1986; SUN, 1985; WING, 1982; WOOD, 1987). Beyin dokusu üzerinde yapılan bu tür çalışmalar az olup (NIXON, 2006; STEVENSON, 2005) bu konuda yeni ve daha kapsamlı araştırmaların yapılmasına önemli ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, tarafımızca yapılan bir çalışmada (ELIBOL-CAN, 2011) sıçanlara, 15 gün süreyle günlük yüksek etanol dozları gavajla verilmiştir. Son alkolün verilisinden 4 saat sonra bellek oluşumu için önemli ve aynı zamanda etanolün etkilerine duyarlı bir beyin bölgesi olan hipokampusda



protein, lipit ve nükleik asit profillerinde ciddi değişikliklerin oluştuğu Fourier dönüşümlü kızıl-ötesi (FT-IR) spektroskopisi ile gözlemlenmiştir. Alkolün kesilmesinden 24 saat sonra moleküler oranlarda ve lipit yapısındaki değişikliklerin önemli ölçüde azaldığı, ancak 72 saat sonra tekrar ve daha şiddetli olarak meydana geldiği görülmüştür. Bu sonuçlar göstermektedir ki 15 gün süren ve aralıklarla yüksek dozda alkol alımı uzun vadeli moleküler değişimlere yol açmamaktadır, buna karşın güçlü fiziksel bağımlılığın oluşması için yeterlidir. Bu çalışmada alkol yoksunluğu ile hipokampusta moleküler seviyede anlamlı lipit peroksidasyonu, protein ve nükleik asitlerin yapısında konformasyonel değişimler, lipitlerin düzen-düzensizlik ve dinamik parametrelerinde değişiklikler ve ayrıca protein ve nükleik asitlerin toplam miktarında artış gözlenmiştir. Bir önceki çalışmamızın devamı olarak düşünölen bu projenin amacı, etanolun daha uzun süre (3 ay) ve insan alkolizminin daha doğal modeli olan likit diyet yolu ile verilmesi (UZBAY, 1995) ve alkolün kesilmesini takiben hemen, 24 ve 72 saat sonra hipokampus moleküler yapısındaki değişimlerin incelenmesidir. Kendi çalışmamız dahil, şimdiye kadar yapılan, dokularda ve özellikle beyinde alkolün moleküler etkileşimlerini araştıran çalışmalar alkol alımının ve yoksunluğun oluşturduğu olumsuz etkilerin kısmen oksidatif strese bağlı olduğunu göstermektedir (BILLER,2009; CHEN, 2008; CREWS, 2009; ELIBOL-CAN, 2011; JUNG, 2008; SALAZAR, 2008; SHIPOOR, 2009). Etanol ya da onun metabolitleri (alkol dehidrogenaz veya katalaz enzimi ile etanol oksidasyonu sonucu oluşan asetaldehit); CYP450 ve özellikle CYP2E1 enziminin aktivasyonu, hidroksil radikalleri ile bu radikallerin direk reaksiyonu sonucu oluşan hidroksietil radikalleri veya iNOS ve sPLA2 indüklemesi ile sitokin sinyal yolağının uyarılması ve PLA2/COX yolaklarından prostanooidlerin üretilmesi gibi moleküler mekanizmalar sonucunda serbest radikaller oluştururlar (GOODLET, 2005; MONTOLIU, 1994; SUN, 2001; YATIN, 2000). Bunlara ek olarak, alkolün, askorbik asit ve alfa-tokoferol gibi endojen antioksidanların ve serbest radikallerin yıkımını sağlayan süperoksid dismutaz (SOD) enzim düzeyini düşürdüğü de öne sürölmektedir(DEITRICH, 1989; GUERRI, 1998). Alkol yoksunluğunun beyinde oluşturduğu oksidatif stres ise yoksunluğun yarattığı sinir sistemi hiperaktivitesine bağlanmaktadır (HENDRIKSON, 2007; TSAI, 1998, UZBAY, 2001). Beyin, diğer organlarla kıyaslandığında oksidatif strese karşı daha hassastır. Bu hassasiyet, beynin yüksek oranlarda oksijen kullanımını, kolayca oksidasyona uğrayan çoklu doymamış yağ asitlerin hücre zarında yüksek oranlarda bulunması, katalaz veya SOD gibi antioksidan enzimlerin ve aynı zamanda alfa-tokoferol, glutatyon gibi antioksidanların oranlarının daha az olması ve yüksek oranlarda demir barındırmasından kaynaklanmaktadır (COHEN, 1980; SINET, 1988). Diğer taraftan

vitamin A'nın (retinol) antioksidan etkisi gösterdiği bilinmektedir (PAIVA, 1999; WOODALL, 1997; ZAIDI, 2004). Karotenoidlerin antioksidan etkisi, kararsız oksijen moleküllerinin sönmelenmesi ve peroksil radikallerinin temizlenmesine dayanmaktadır. Uyarılmış karotenoid, solventle bir dizi dönme ve titreşim etkileşimleri yaparak yeni kazanılan enerjiyi giderme yeteneğine sahiptir. Böylece orijinal uyarılmamış karotenoid yeniden oluşturulur ve bu döngü oksijen moleküllerinin sönmelenmesi için tekrar ve tekrar kullanılır. Lipit peroksidasyonunun önlenmesi ise karotenoidlerin antioksidan gibi davranıp peroksil radikallerle doymamış asit zincirlerinden daha hızlı bir şekilde etkileşime girmesi ile olmaktadır. Vitamin A uygun dozda kullanıldığında antioksidan gibi davranıp beyinde etanolun zararlı etkilerine karşı koruyucu etkiler sağlayabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda A vitamininin etanole karşı koruyucu etkileri karaciğer ve testis gibi organlarda gösterilmiştir (RAMIREZ-FARIAS, 2008, ROSENBLUM, 1987). Diğer taraftan, doğumdan önceki beyin gelişimini (ROSS, 2000) ve doğumdan sonra normal beyin fonksiyonlarını etkilediği için vitamin A (retinol) ve onun metabolitlerinin (retinal ve all-trans retinoik asit (atRA)) gerekli olduğu daha önce literatürde gösterilmiştir (CHIANG, 1998; CHEN, 2008; LANE, 2005). Doğum öncesi ve sonrası etanol alımının ve vitamin A yoksunluğunun ve/veya anormal metabolizmasının sinir sisteminde ve davranış üzerinde yaptığı bozukluklar birbirine benzediğinden dolayı, etanolun organizma üzerindeki olumsuz etkilerinin retinoid fonksiyonlarının bozulmasından kaynaklanabileceği bazı araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür (DELTOUR, 1996; DUESTER, 1991; FRANK, 1976; GRUMMER, 1993; MOLOTKOV, 2002). Bu hipoteze göre, dokularda yüksek seviyelere ulaşan etanol, retinolün sinyal özelliklerini taşıyan retinoik asite dönüştürülmesini sağlayan dehidrojenaz enzimlerinin aktivitesini kompetitif inhibitorgibi davranarak azaltmaktadır. Bu hipoteze karşın son yıllarda yayınlanmış olan çalışmalar, hem fetüs hem de erişkin organizmaların bazı dokularında (özellikle testisler ve ayrıca hippocampus ve neokorteks gibi bazı beyin bölgelerinde) toksik seviyelere ulaşan etanolun, A vitamininin aktif formu olan atRA konsantrasyonunu düşürmek yerine arttırdığını göstermektedir (KANE, 2010). Aslında daha önceki çalışmalarda alkolün etkisi ile karaciğerde retinol esterler olarak depolanmış A vitamini rezervlerinin hızlı hidrolize uğradığı, bunun sonucu retinol ve onun metaboliti olan atRA seviyelerinin yükseltildiği ve bunu takiben karaciğerden atRA ihracının arttığı tespit edilmiştir (FRIEDMAN, 1989; SATO, 1981). Bu son çalışmalar hipokampus ve kortekste etanolün yarattığı normalüstü atRA seviyelerinin, bazı FAS semptomlarını ve erişkin bireylerde kognitif bozuklukları ortaya çıkarttığını öne sürmektedir. Eğer bu doğru ise etanol intoksikasyonu sırasında alınan A

vitamini takviyesi olumlu sonuçlar doğurma yerine etanolün yarattığı olumsuz koşulların derinleşmesine yol açmaktadır (WOLF, 2010). Bu çelişkili sonuç ve hipotezler doğrultusunda, beyin dokularında etanol ve Vitamin A arasındaki etkileşimin daha fazla incelenmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle, mevcut çalışmada, genç erişkin sıçanlarda 3 ay süresince likit diyetle verilen alkolün ve 24-72 saat süren alkol yoksunluğunun hipokampusun moleküler yapısını tek başına ve A vitamini eşliğinde ne derece değiştirdiğinin FT-IR tekniği kullanılarak tespit edilmesi hedeflendi.

## 2.GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 2.1. Deney Hayvanları

Araştırmalar 3-4 aylık erkek Wistar sıçanlar üzerinde yapıldı. Sıçanlar rasgele 5 gruba ayrıldı: izokalorik kontrol grubu (IK, n=7), etanol grubu (E, n=24), diyetinde vitamin A bulunan izokalorik kontrol grubu (IKA, n=9), etanol artı vitamin A grubu (EA, n=24) ve ayrıca hiçbir işleme maruz kalmayan kontrol (K, n=9) grubu.

### 2.2. Hayvan bakımı

Deneyler sırasında, hayvan bakımı hayvan ünitesinde özel olarak eğitilmiş bir kişi tarafından yapılmaktadır. Her hayvan şeffaf polimerden yapılan ayrı kafeslerde tutulmaktadır. Hayvan ünitesinde bulunan Mitsubishi havalandırma sistemi sürekli hava değişimi ve ayrıca sabit ısı (21-22 °C) sağlamaktadır. Saat 7.00'de başlamak üzere 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngü uygulanmaktadır. Hayvan ünitesi ve hayvan kafesleri düzenli olarak temizlenmektedir.

### 2.3. Alkol Diyetinin Uygulanması

Sıçanlara modifiye edilmiş likit diyet uygulandı (Uzbay ve Kayaalp, 1995).Bu diyet % 2,4 (v/v) etanol içeren solüsyon ilk 3 gün, % 4,8 (v/v) etanol içeren solüsyon daha sonraki 4 gün ve % 7,4 (v/v) etanol içeren solüsyon takip eden 85 gün boyunca sıçanlara verildi. IK grubu ise etanol yerine aynı kalorige sükröz içeren izokalorik likit diyet aldı. EA ve IKA gruplarına verilecek solüsyona vitamin A (5000 IU/L) eklendi. Alkol gruplarındaki her hayvan için hazırlanan likit diyet karışımı aşağıdaki gibiydi.

	Süt (ml)	Sükröz (g)	Etanol (ml)
3 gün	97,6	8,15	2,4
4 gün	95,1	4,85	4,9
Diğer günler	92,6	1,65	7,4

Buna karşın K grubuna pelet şeklinde standart laboratuvar yemi ve su verildi. Likit diyet uygulanan hayvanlara yem ve su verilmedi. Likit diyet günlük olarak hazırlandı ve her hayvana hazırlanan solüsyondan 100 ml verildi. Her sabah bir önceki günden kalan likit diyet miktarı ve hayvanın ağırlığı ölçüldü ve böylece her hayvanın günlük alkol tüketimi belirlendi.

### 2.4. Kandaki Alkol Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Kandaki alkol konsantrasyonu aynı alkol uygulamasına maruz bırakılan ayrı bir grup sıçanda (n=3) yapıldı. Kan örnekleri eter anestezisi altındaki sıçanların kalbinde 3-4 ml olacak şekilde

EDTA'lı tüplere alkol uygulamasının 84. gününde alındı. Kan örnekleri 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen serumdan alkol konsantrasyonu Biolabo alkol kiti ile mg/dl olarak belirlendi.

## 2.5. Dekapitasyon

Etanol gruplarında bulunan sıçanların bir kısmı (E/EA0 grubu) alkol verilmesi kesildikten hemen sonra dekapitasyon yolu ile feda edildi ve etanolün akut/kronik etkilerini araştırmak için kullanıldı. Diğer sıçan alt grubu (E/EA24 grubu) 24 saat sonra yoksunluğun erken safhasında feda edildi. Son alt grup (E/EA72 grubu) ise 72 saat sonra yoksunluğun geç safhasında feda edildi. Kontrol grupları E/EA72 grubunun feda edildiği günde feda edildi.

## 2.6. FT-IR Spektroskopik Ölçümler

### 2.6.1. FT-IR Spektroskopisi için Örnek Hazırlanması

Hayvanlar dekapitasyonla feda edildikten hemen sonra beyinleri çıkarıldı ve hızlı bir şekilde kuru buz ve izotonik solüsyon yardımıyla hipokampusleri ayrıldı. Hipokampusler sıvı azotla ani dondurmadan sonra FT-IR çalışmaları yapılana kadar -80 derecede muhafaza edildi. FT-IR spektroskopisi yapmak amacıyla dondurucudan alınan dokular LABCONCO marka (Labconco FreeZone®, 6 liter Benchtop Freeze Dry System Model 77520) kurutucuda suyu ortamdan uzaklaştırmak amacıyla gece boyunca kurutuldu.



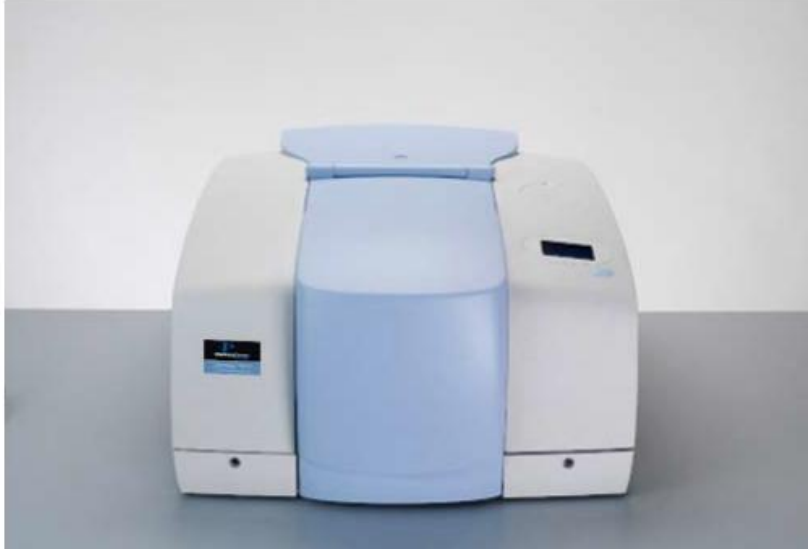
Şekil 2.1. Freeze Dry Sistem cihazı

Kurutulan dokular 2 dakika boyunca sıvı azotla parçalandı ve toz haline getirildi. Daha sonra küçük miktardaki doku örnekleri (1 mg) potasyum bromit (KBr, Merck) ile 1/150 oranında homojen bir karışım elde edecek şekilde karıştırıldı. Hazırlanan bu karışımdan daha sonra birkaç tonluk basınç altında ince şeffaf diskler hazırlandı.



**Şekil 2.2.** Disk yapma aparatları

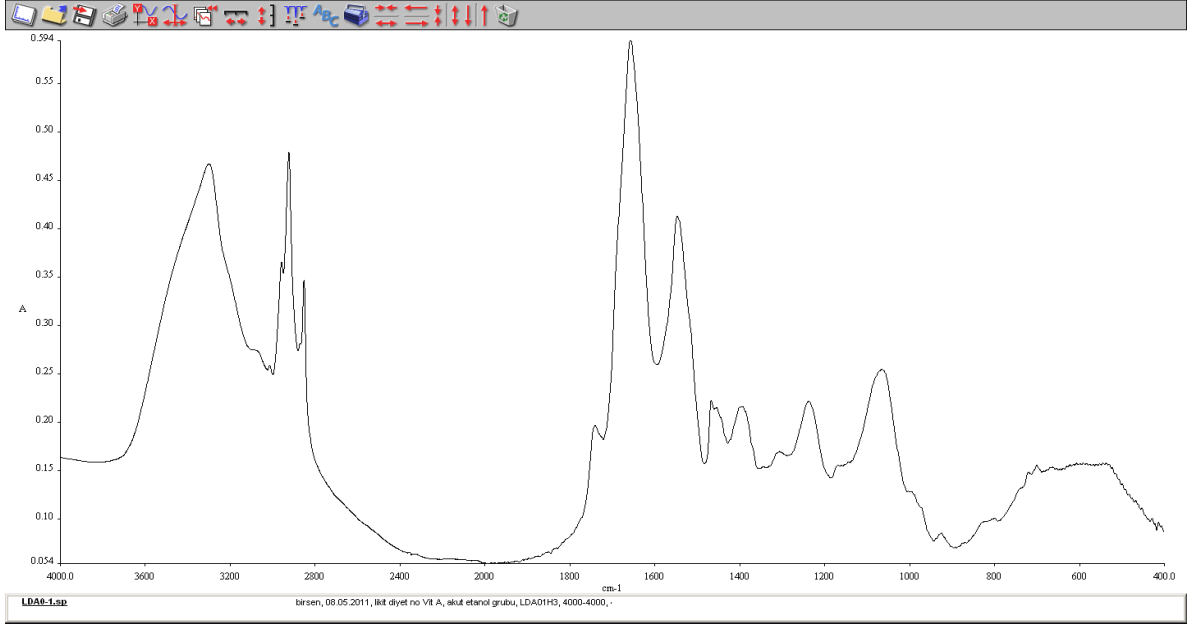
Hazırlanan bu disklerden MIR TGS detektör ile desteklenmiş Perkin-Elmer Spectrum-One FTIR spektrometre (Perkin-Elmer Inc., Norwalk, CT, USA) kullanılarak kızılötesi spektraller elde edildi.



**Şekil 2.3.** Perkin-Elmer Spectrum-One FTIR spektrometre

### **2.6.2. FT-IR Spektroskopisi Ölçümlerin Alınması**

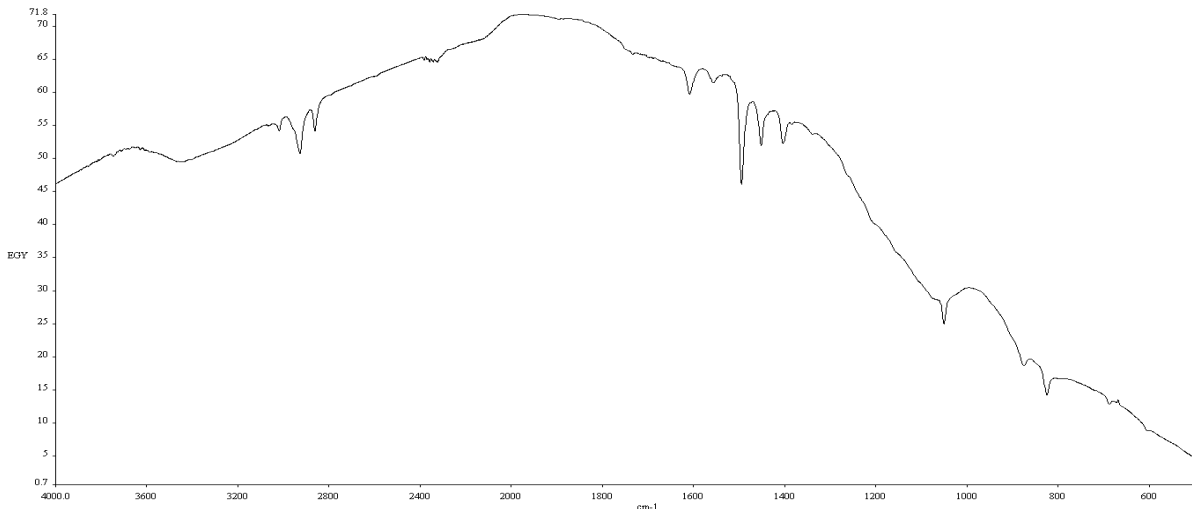
Spektrallerin toplanması ve bant alanı, bant frekansı gibi bazı veri hesaplamaları Spectrum-One yazılımı ile yapıldı. Bu programın arayüzü ve alınan örnek bir spektrum aşağıdaki gibidir.



**Şekil 2.4.** “Spectrum-One” yazılımı arayüzü

FT-IR spektralleri gerekli optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra oda ısısında 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinden elde edildi. Her bir interferogram, her örnek için 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükteki 100 tarama sonucunda toplanan spektrallerden oluşturuldu.

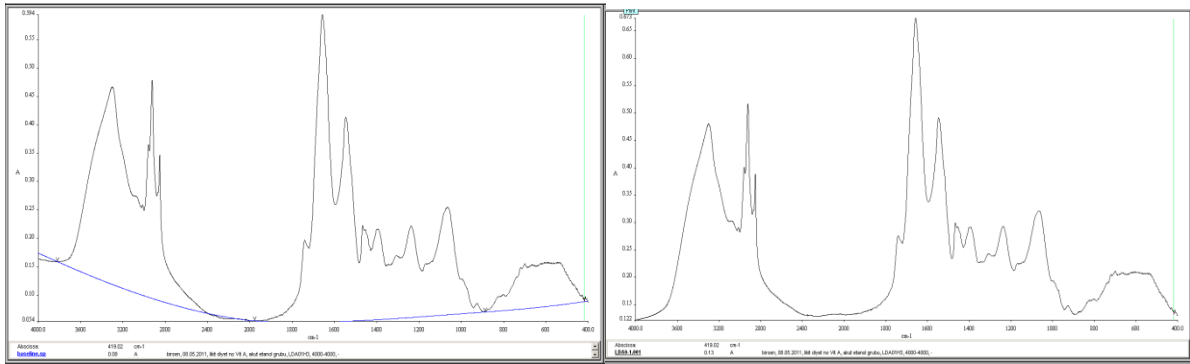
İlk olarak %100 KBr içeren disklerin çekimleri yapıldı ve bu çekimler arka plan olarak kullanıldı. Bu çekimler sonucunda elde edilen spektrum otomatik olarak SpectrumOne programında çıkartıldı ve asıl örneklerde havadan ve KBr'den kaynaklı bantlar elimine edildi. Aşağıdaki grafikte saf KBr çekimi sonucunda elde edilen bir arka plan spektrumu görülmektedir.



**Şekil 2.5.** Saf KBr diskinin spektrumu

Her örnekten 3'er tane replikasyonu yapıp bunların ortalamaları alındı. Data analizlerinde bu üç replikasyonunun ortalaması kullanıldı. Bütün örneklerin çekimleri bittikten sonra ilk olarak her örnekten elde edilen 3 replikasyonun ortalaması programın "spectral calculator" fonksiyonu kullanılarak hesaplandı. Daha sonra gürültüden kaynaklı bantları yok etmek amacıyla her bir spektrum programın "smooth" opsiyonu kullanılarak Savitsky-Golay 9-point oranında düzeltildi.

Band frekans ve genişlik ölçümleri her bandın %80'i baz alınarak yapıldı. Daha sonra spektrumların aynı seviyede görünmeleri amacıyla "baseline" düzeltilmesi yapıldı.



**Şekil 2.6.** "Baseline" alınması

"Baseline" düzeltilmesi yapılan spektrumlar SpectrumOne yazılımı ile alan hesaplamalarında kullanıldı ve böylece moleküllerin konsantrasyonları belirlendi.

Daha sonra genel bir bakış yapmak amacıyla grupların ortalama spektrumları alındı ve normalize edildi. Normalizasyon işlemi 1. Bölgeye göre yani Amide A bölgesine göre yapıldı. Normalizasyon işlemi bant yüksekliklerini dengeleyerek görsel amaçlar için kullanılmaktadır. Böylece spektrumlar arasında noktasal karşılaştırmalar yapılabilmektedir (SMITH, 1999). Asıl analizler, bant frekans değişimleri veya genişlik değişimleri gibi hiçbir işlem görmemiş yani "baseline" ve normalize işlemlerine uğramamış spektrumlar üzerinde yapıldı

## 2.7. Veri Analizi

Bütün ölçümlerde grup ortalamaları  $\pm$  standart hataları hesaplandı. Veri hesaplamalarında gruplar bağımsız faktör olarak ve her günkü alkol tüketimi ve ağırlık ölçümleri tekrarlanan ölçüm olarak hesaplandı. Bu verilerin istatistiksel değerlendirme için tekrarlanan ölçüm varyans analizi kullanıldı. Ortalama tüketim ve FT-IR analizleri için ise tek faktörlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Verilerin Post Hoc analizi için Tukey testi, LSD ve Bonferroni



yapıldı. SPSS istatistik programları kullanıldı.  $p < 0.05$  olan değerler anlamlı olarak farklı kabul edildi.

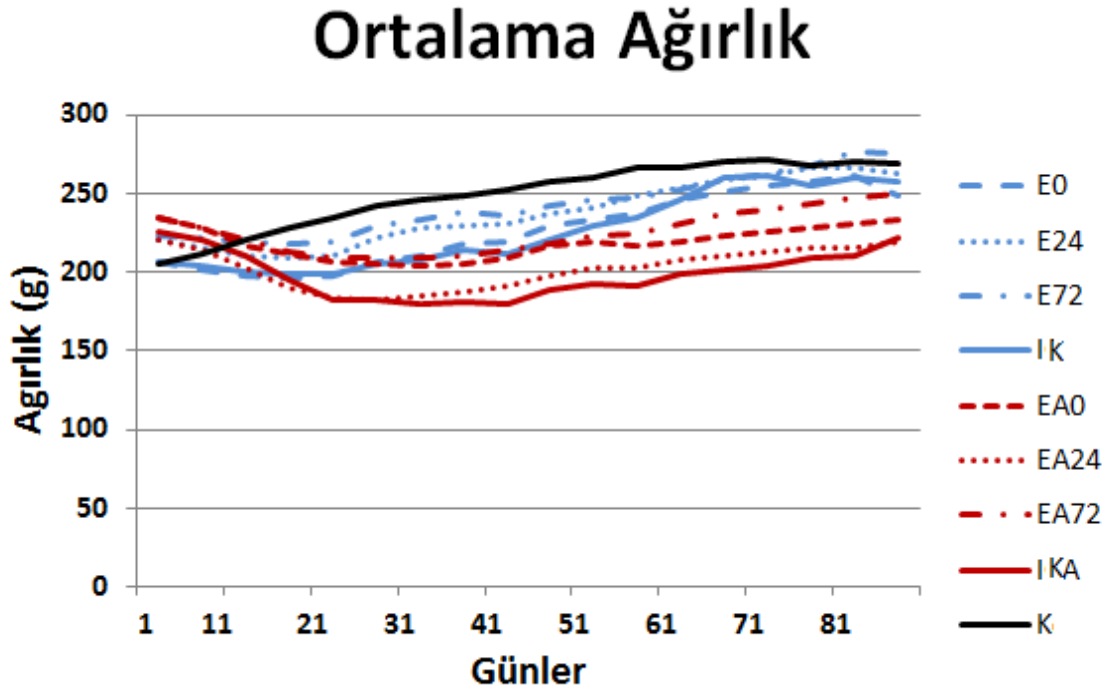
Bu çalışmada uygulanan tüm prosedürler hayvanların ıştıraplarını minimum seviyede tutmak için tasarlanmıştır. Tüm deneyler bilimsel amaçlar için kullanılan deney hayvanlarının korunması ile ilgili ve 16.05.2004 tarihinde Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından Resmi Gazetede (Say.: 25464) yayınlanan yönetmenliklere göre yapılmıştır ve mevcut çalışma için ODTU HDYEK 2009/15no'lu izin belgesi alınmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Analiz İçin Kullanılan Örnek Sayıları

Likit diyet uygulaması süresince alkol yüzünden oluşan semptomlar nedeniyle ölen hayvanlar deneyden çıkarıldı. Deneyler süresince 8 hayvan öldü. Bu nedenle FT-IR spektroskopisinde kullanılan hayvan sayılarında bazı değişiklikler oldu. Ayrıca örnek hazırlama veya saklama koşulları sırasında oluşan hatalardan kaynaklandığını düşündüğümüz bazı örneklerin kötü spektralar vermesi nedeniyle bazı hayvanların spektrumları analiz dışı bırakıldı. Bu değişikliklere göre gruptaki örnek sayıları; E0=6, E24=6, E72=6, IK=7, EA0=7, EA24=7, EA72=8, IKA=9, ve K=7 olarak belirlendi.

#### 3.2. Hayvanların Ağırlık Değişimleri



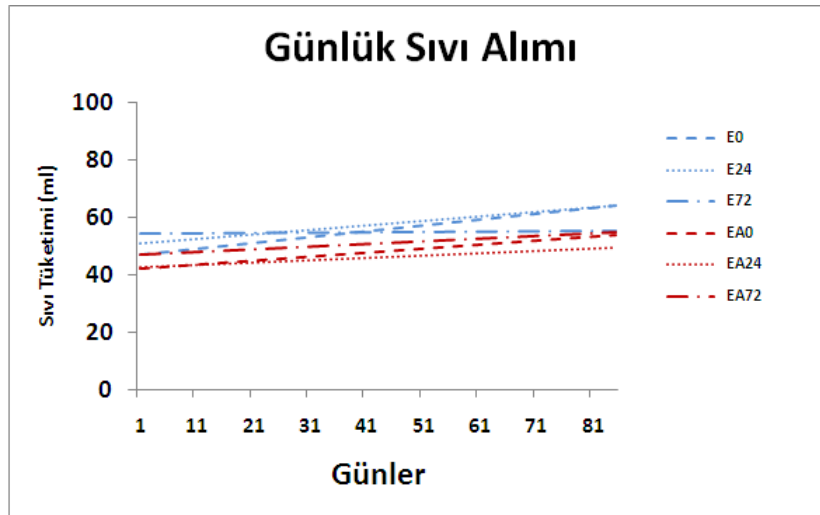
Şekil 3.1. Deney süresince kaydedilen grupların ortalama ağırlığı

Yukarıdaki grafikte grupların alkol alımı süresince ortalama vücut ağırlıklarındaki değişim görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi hayvanların başlangıç vücut ağırlığı 200-250 g arasında değişiyordu. Likit diyet uygulanmasına başlandıktan sonra tüm hayvanların vücut ağırlığında geçici bir düşüş oldu ancak zaman içinde tüm hayvanlar tekrar kilo almaya

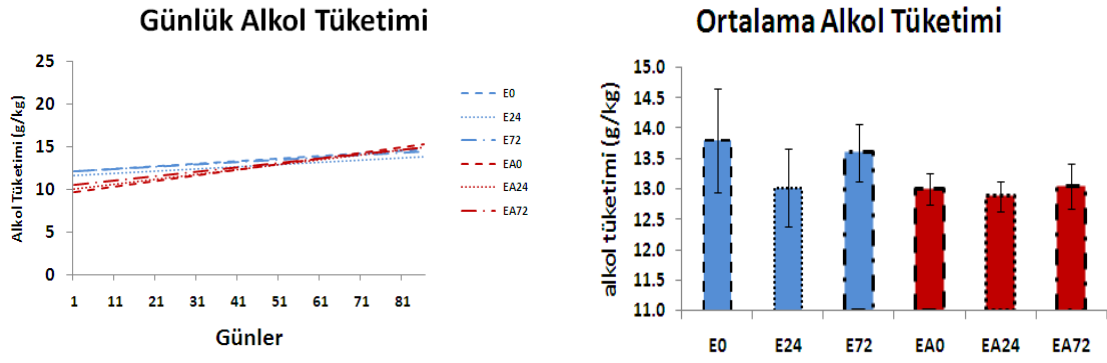
başladılar ve başlangıçtaki vücut ağırlığına tekrar ulaştılar. Tüm grafiklerde yükseliş trendi hakimdir. Tekrarlanan varyans analizi (repeated measure ANOVA) sonucuna göre günler arasında anlamlı bir fark bulundu ( $F(17:969)=173,236$   $p<0,000$ ). Bu analize göre gruplar arasında da anlamlı bir fark bulundu ( $F(8:57)=5,781$   $p<0,000$ ). Post Hoc Tukey testi ile gruplar karşılaştırıldığında vitamin A verilen gruplarda kilo alımında yavaşlama görüldü ancak vitaminli grup (IKA, EA0, EA24, EA72) ve vitaminsiz gruplar (IK, E0, E24, E72) kendi içinde karşılaştırıldığında gruplar arasında fark yoktu.

### 3.3. Alkol ve Vitamin A Tüketimi

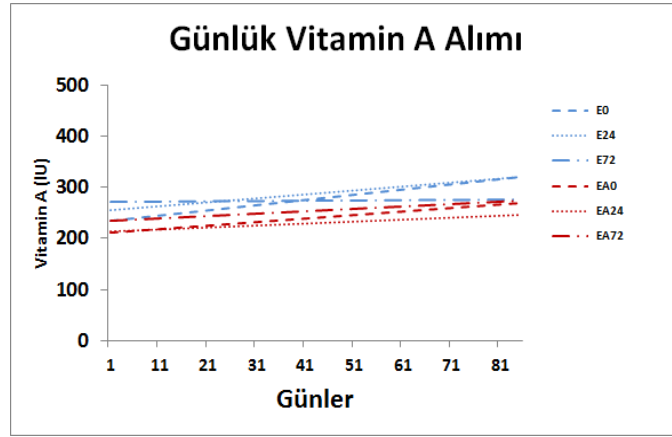
Aşağıda eğilim çizgisiyle çizilen grafikte grupların günlük sıvı tüketimleri görülmektedir. İstatistiksel analiz sonucunda tüm etanol gruplarında günlük sıvı tüketiminde zaman içinde anlamlı bir artış izlenmektedir ( $F(84:2856)=21,472$   $p<0,000$ ) ancak gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamaktadır ( $F(5:34)=0,897$   $p=0,494$ ). Sıçanların günlük etanol ve vitamin alımları günlük sıvı alımları ile doğru orantılıdır. Bu nedenle alınan etanol veya vitamin miktarlarında da anlamlı bir fark olmadığı düşünülmektedir (Şekil 3.3 ve 3.4). Grupların deney süresince ortalama alkol tüketimine tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile bakıldığında yine gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ( $F(5:40)=0,310$   $p=0,940$ ).



Şekil 3.2. Deney süresince alkol grubu tarafından tüketilen sıvı miktarları



**Şekil 3.3.** Deney süresince alkol grubu tarafından tüketilen günlük ve ortalama alkol miktarları



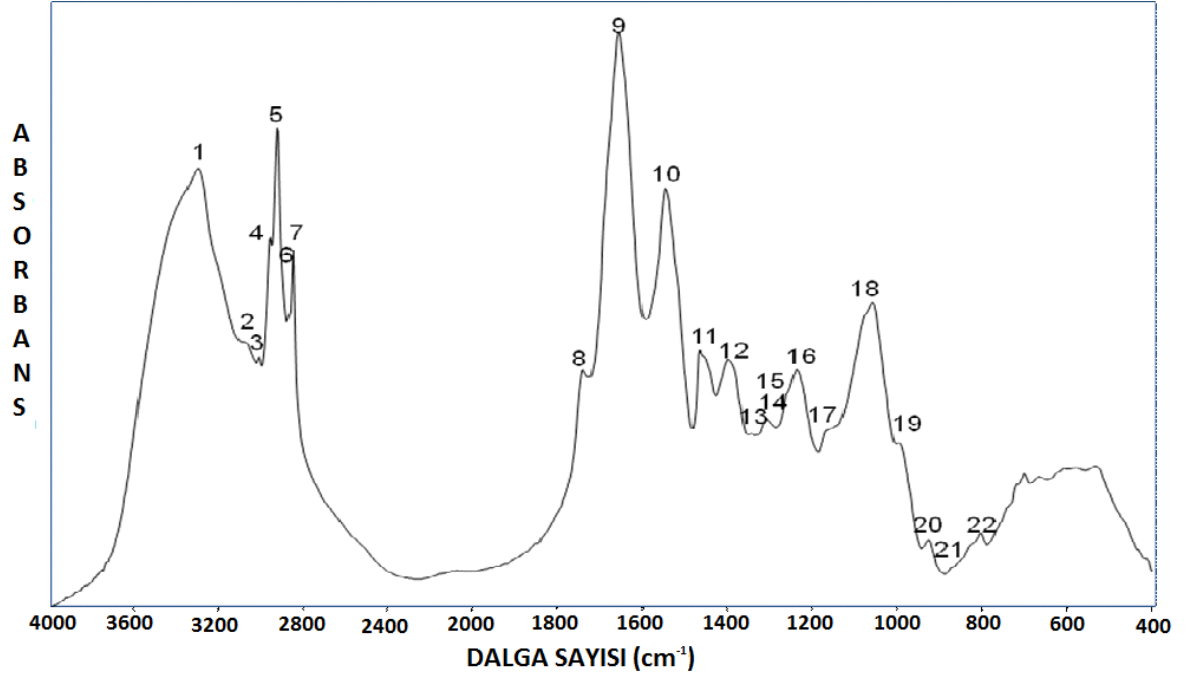
**Şekil 3.4.** Deney süresince alkol grubundaki hayvanlar tarafından alınan vitamin A miktarları

### 3.4. Kandaki Alkol Konsantrasyonu

Alkol alımının 84. gününde alınan kan örneklerinde ortalama alkol yoğunluğu  $92.27 \pm 61.18$  mg/dl olarak bulundu.

### 3.5. FT-IR Spektroskopisi Sonuçları

İlk olarak bantların genel bir taraması ve gözden geçirilmesi yapıp incelenecek bantlar belirlenmiştir (Şekil 3.5). Bu belirleme daha önce tarafımızdan gerçekleştirilen diğer bir çalışma (ELIBOL-CAN, 2011) baz alınarak yapılmıştır. Bu amaçla tabloda ve grafikte verilen bantlar bu çalışmada analizlerinde kullanılacak olan bantlardır (BANYAY, 2003; ÇAKMAK, 2006; JACKSON, 1998; JAMIN, 1998; LYMAN, 1999; MELIN, 2000; RIGAS, 1990; TAKAHASHI, 1991; TOYRAN, 2004; WONG, 1991).

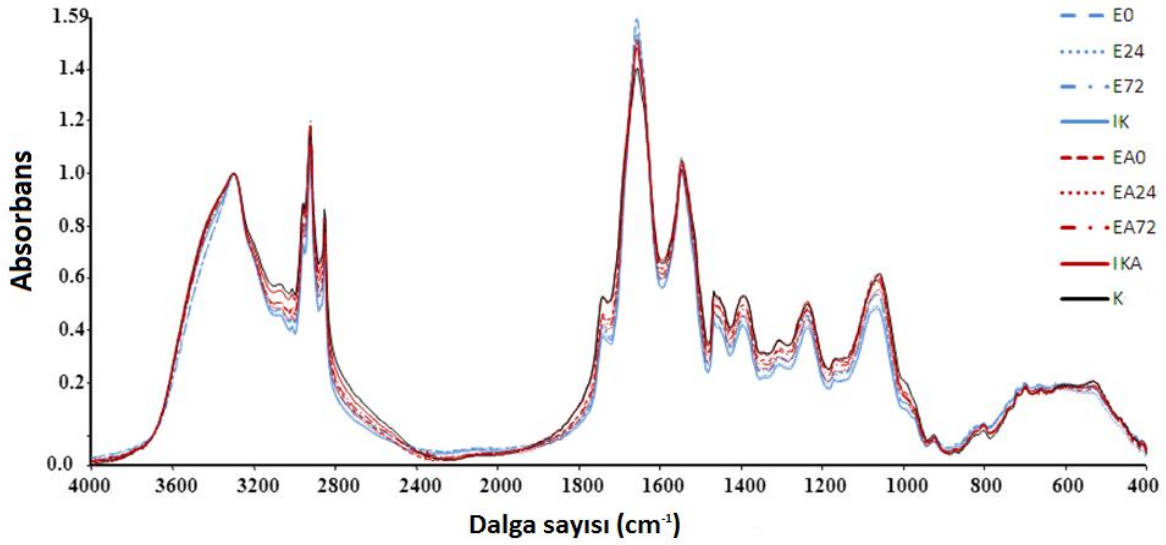


Şekil 3.5. Kontrol grubuna ait örnek 4000-400 cm<sup>-1</sup> bölümünden elde edilmiş ve Amid A'ya göre normalizasyonu yapılmış FT-IR spektrumu

**Tablo 1.** Hipokampus dokusuna ait banlar ve spektral tanımları

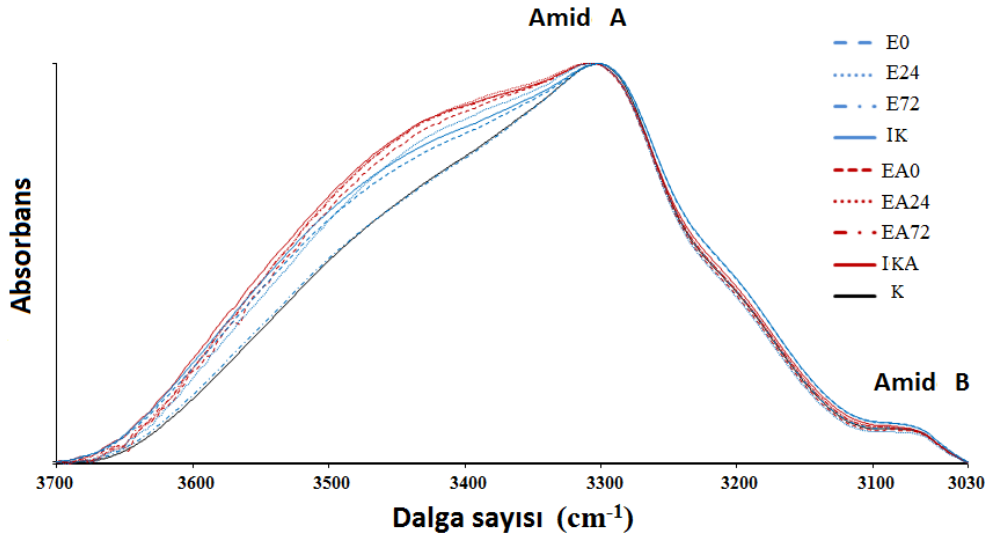
Bant No	Dalga sayısı (cm <sup>-1</sup> )	Spektral Tanım
1	3304	O-H gerilme (Amide A), protein ve glikojenden kaynaklı hidrojen-bağlı intermoleküler OH grupları
2	3066	C-H ve N-H gerilmesi (Amide B) (protein kaynaklı)
3	3014	Olefinik=CHgerilmesi: unsature lipidler, kolesterol esterleri
4	2961	CH <sub>3</sub> asimetrik gerilme: çoğunlukla lipid kaynaklı ama az miktarlarda protein karbohidrat ve nükleik asit kaynaklı
5	2921	CH <sub>2</sub> asimetrik gerilme: çoğunlukla lipid kaynaklı ama az miktarlarda protein karbohidrat ve nükleik asit kaynaklı
6	2872	CH <sub>3</sub> simetrik gerilme: çoğunlukla protein kaynaklı ama az miktarlarda lipid, karbohidrat ve nükleik asit kaynaklı
7	2851	CH <sub>2</sub> simetrik gerilme: çoğunlukla lipid kaynaklı ama az miktarlarda protein karbohidrat ve nükleik asit kaynaklı
8	1745	(ester) Carbonil C=O gerilme: lipidler
9	1658	Amide I (protein C=O gerilme)
10	1549	Amide II (protein N-H bükülmesi, C-N gerilmesi)
11	1468	CH <sub>2</sub> bükülmesi: çoğunlukla lipid kaynaklı ama az miktarlarda protein kaynaklı
12	1402	COO <sup>-</sup> simetrik gerilme: fat asitleri
13	1344	Amide III :kollajen
14	1311	CH <sub>2</sub> bükülmesi (protein, lipid), nükleik asit
15	1262	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asimetrik gerilme, hidrojen bağı bulunmayan: çoğunlukla nükleik asit kaynaklı ama az miktarda fosfolipid kaynaklı
16	1236	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asimetrik gerilme, tamamen hidrojen bağı: çoğunlukla nükleik asit kaynaklı ama az miktarda fosfolipid kaynaklı
17	1172	CO-O-C asimetrik gerilme: glikojen ve nükleik asit
18	1083	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> simetrik gerilme: nükleik asit ve fosfolipid kaynaklı C-O gerilme: glikojen, polisakkaritler ve glikolipidler
19	970-995	C-N <sup>+</sup> -C gerilme: nükleik asit, RNA'nın ana zincirindeki riboz-pentoz kaynaklı
20	925	z-tip DNA
21	876	Nükleik asitlerin ana yapısında bulunan N-tip şeker titretilmesi
22	801	Nükleik asitlerin ana yapısında bulunan N-tip şeker titretilmesi

Grup ortalamaları alınan, baseline düzeltilmesi ve normalizasyonu yapılan spektrumlar aşağıda verilmiştir.

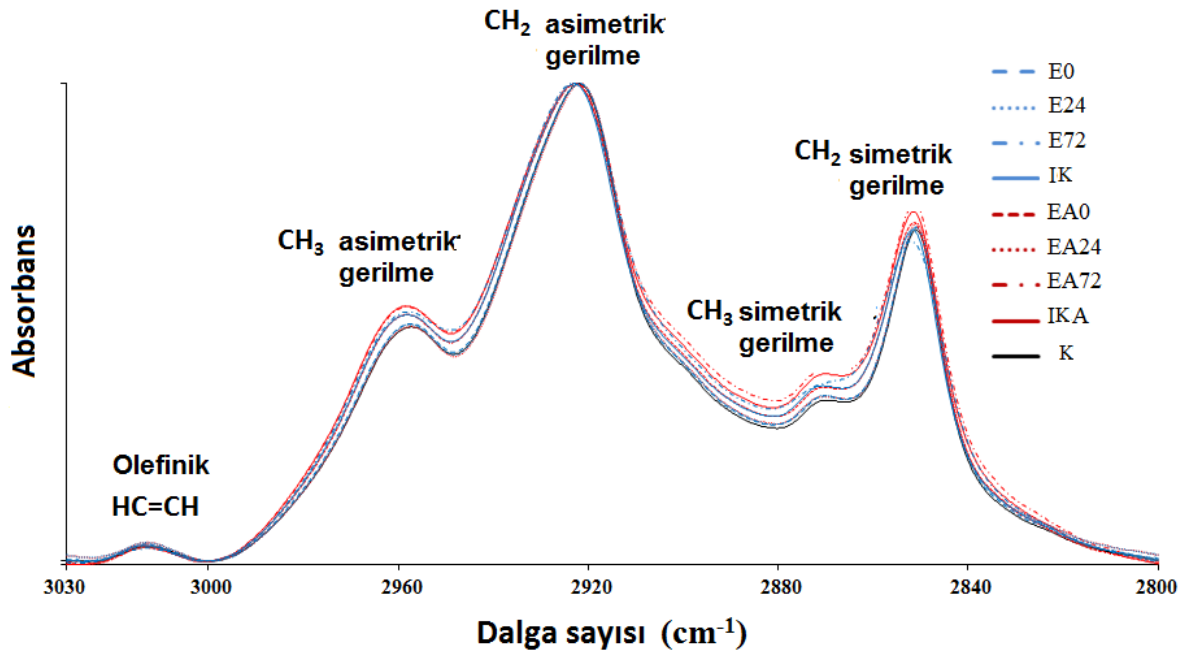


**Şekil 3.6.** Her gruba ait örnek 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  bölümünden elde edilmiş ve Amide A'ya göre normalizasyonu yapılmış FT-IR spektrum ortalamaları

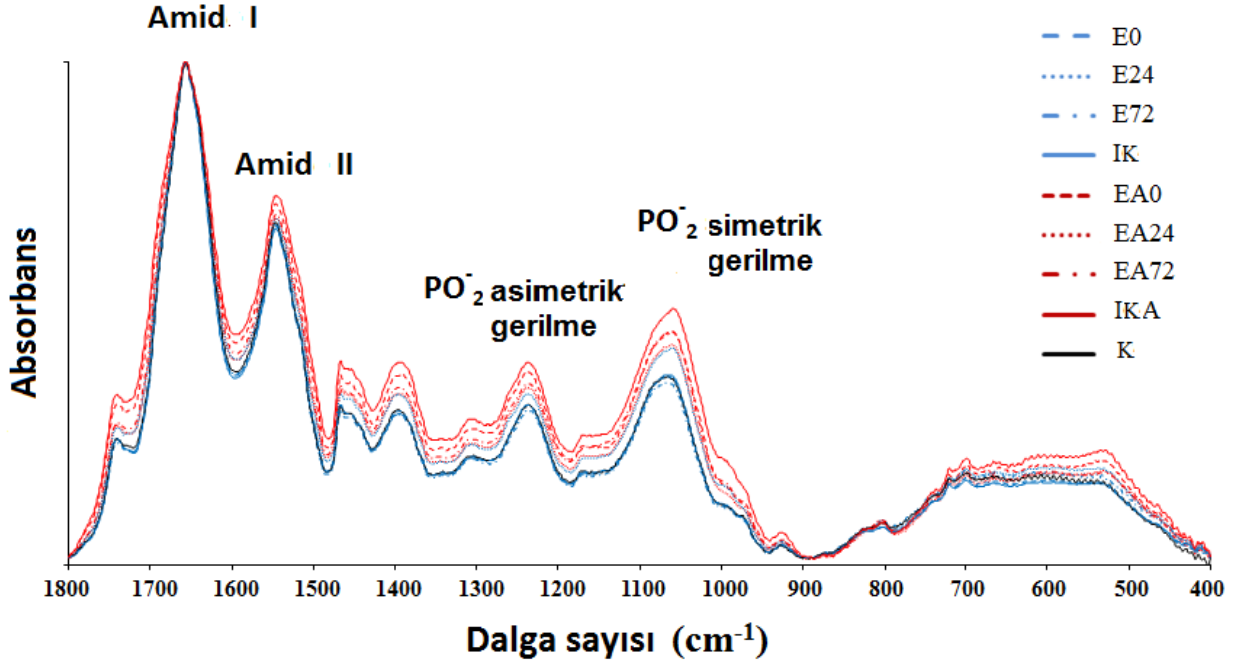
Şekil 3.6 ve Tablo 1'de görüldüğü üzere, FT-IR çekimleri sonucunda lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere ait bantları içeren kompleks bir spektrum elde edilmiştir. Bu nedenle detaylı analizlere 3 farklı bölgede değinilmiştir. İlk bölge 3800-3030  $\text{cm}^{-1}$ , ikinci bölge 3030-2800  $\text{cm}^{-1}$ , ve son olarak üçüncü bölge 1800-400  $\text{cm}^{-1}$  olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.7.** 3800-3030  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde bulunan Amid A (3360  $\text{cm}^{-1}$ ) bandına göre normalize edilmiş her bir gruba ait FT-IR spektrumu.



Şekil 3.8. 3030-2800  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde bulunan  $\text{CH}_2$  asimetric gerilme ( $2920 \text{ cm}^{-1}$ ) bandına göre normalize edilmiş her bir gruba ait FT-IR spektrumu.

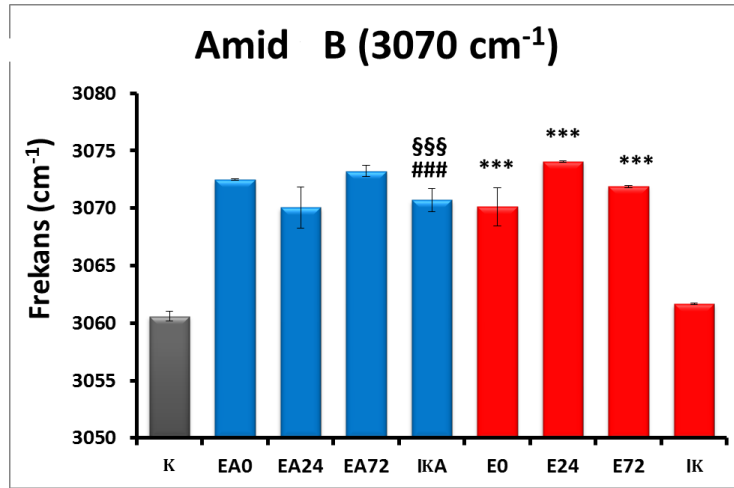


Şekil 3.9. 1800-400  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde bulunan Amid I ( $1658 \text{ cm}^{-1}$ ) bandına göre normalize edilmiş her bir gruba ait FT-IR spektrumu.



Sayısal analizleri yapılan spektrum sonuçları tablolarda gösterilmektedir (Tablo2-6). Etil alkolün hipokampus moleküler yapısı üzerindeki etkilerini incelemek için ilk önce alkol grupları kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldı (E grupları IK grubu ile ve EA grupları IKA grubu ile). A vitamininin tek başına gösterdiği etkileri değerlendirmek için üç kontrol grubu (K, IK ve IKA) birbirleriyle karşılaştırıldı.

3304  $\text{cm}^{-1}$  (Amid A) ve 3066  $\text{cm}^{-1}$  (Amid B) merkezli bantları OH ya da NH gerilmesi ve NH ya da CH vibrasyonuna karşılık gelmektedir. Amid A bantı protein ve polisakkaritlerin OH gerilmelerinden kaynaklı güçlü absorpsiyonları içermektedir (CAKMAK, 2004; MELIN, 2000). Amid A bant frekans değişiminde anlamlı fark sadece IK ve K arasında görülürken, Amid B bantında E0, E24, E72 gruplarında IK grubuna kıyasla ve IKA grubu IK ve K grubuna kıyasla anlamlı frekans kaymaları (frekans artışı) görülmektedir (Şekil 3.10, Tablo 3).



**Şekil 3.10** Protein Amid B bant frekansındaki değişimler. Hata çubukları standart sapmayı (SEM) göstermektedir. Farklılık derecesi alkol gruplarının kendi kontrol grubuna kıyasla  $p < 0.001$ \*\*\* ile, IKA grubunun K kontrol grubuna kıyasla  $p < 0.001$ ### ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise  $p < 0.001$ §§§ ile simgelenmiştir.

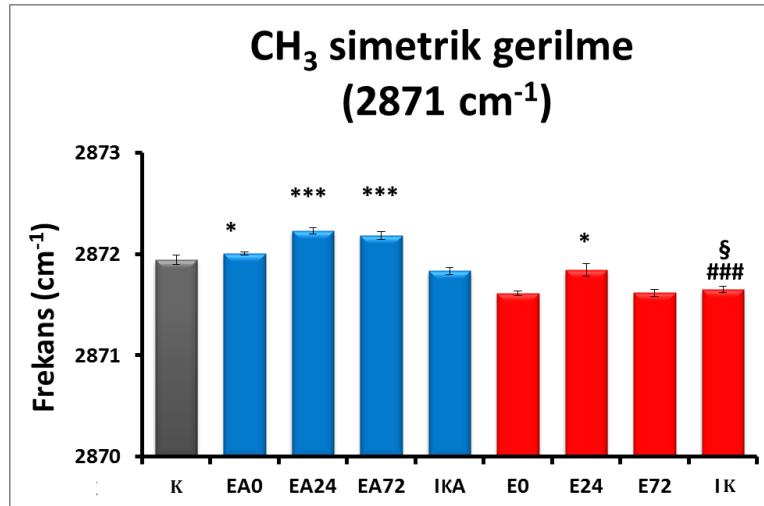
**Tablo 2.** Band alan değişimleri. Değerler her bir grup ortalamalarını ve standart sapmalarını göstermektedir. Farklılık derecesi alkol ve kendi kontrol gruplarına kıyasla  $p<0.05^*$ ,  $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.001^{***}$  ile, IK ve IKA gruplarının K kontrol grubuna kıyasla  $p<0.05^{\#}$ ,  $p<0.01^{\#\#}$ ,  $p<0.001^{\#\#\#}$  ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise  $p<0.05^{\$}$ ,  $p<0.01^{\$\$}$ ,  $p<0.001^{\$\$\$\$}$  ile simgelenmiştir.

BAND ALANI		(+ Vitamin A				(-) Vitamin A			
Band Adı	K(n=7)	IKA (n=9)	EA0 (n=7)	EA24 (n=7)	EA72 (n=8)	IK (n=7)	E0 (n=6)	E24 (n=6)	E72 (n=6)
Amid A	68,50 ± 6,37	72,17 ± 3,76	69,98 ± 2,24	87,91 ± 4,97	64,77 ± 4,39	68,62 ± 2,53	56,80 ± 1,60	63,18 ± 4,81	58,81 ± 0,80
Amid B	7,52 ± 0,13	7,70 ± 0,38	6,96 ± 0,21	8,35 ± 0,33	6,54 ± 0,45	6,22 ± 0,19	5,65 ± 0,13	5,76 ± 0,39	5,83 ± 0,08
Olefinik	2,68 ± 0,23	2,74 ± 0,13	2,45 ± 0,07	2,90 ± 0,11	2,32 ± 0,16	2,10 ± 0,06 §	1,96 ± 0,04	1,95 ± 0,13	2,03 ± 0,03
CH3 asimetrik	6,58 ± 0,56	6,83 ± 0,35	6,20 ± 0,20	7,43 ± 0,29	6,03 ± 0,40	5,41 ± 0,17	5,10 ± 0,12	5,01 ± 0,37	5,34 ± 0,06
CH2 asimetrik	11,25 ± 0,96	11,71 ± 0,63	10,82 ± 0,37	13,01 ± 0,52	10,74 ± 0,68	9,81 ± 0,37	9,25 ± 0,23	9,10 ± 0,74	9,82 ± 0,09
CH3 simetrik	1,54 ± 0,13	1,57 ± 0,08	1,41 ± 0,04	1,67 ± 0,06	1,37 ± 0,09	1,20 ± 0,04 §	1,14 ± 0,03	1,12 ± 0,08	1,20 ± 0,01
CH2 simetrik	3,41 ± 0,29	3,54 ± 0,18	3,22 ± 0,10	3,80 ± 0,14	3,16 ± 0,20	2,82 ± 0,10	2,62 ± 0,06	2,61 ± 0,19	2 84 ± 0,02
Ester	3,39 ± 0,32	3,45 ± 0,19	3,03 ± 0,09	3,62 ± 0,18	2,79 ± 0,20	2,58 ± 0,04 §	2,40 ± 0,05	2,43 ± 0,13	2,46 ± 0,04
Amid I	20,72 ± 1,94	23,01 ± 1,41	21,73 ± 0,94	26,93 ± 1,56	21,09 ± 1,56	21,90 ± 0,78	19,65 ± 0,56	19,81 ± 1,72	20,30 ± 0,42
Amid II	13,92 ± 1,27	15,20 ± 0,89	14,20 ± 0,61	17,34 ± 0,94	13,71 ± 1,03	13,86 ± 0,45	12,51 ± 0,34	12,57 ± 1,04	12,88 ± 0,25
CH2 Bükülme	4,45 ± 0,39	4,63 ± 0,26	4,29 ± 0,14	5,17 ± 0,23	4,12 ± 0,26	3,83 ± 0,13	3,55 ± 0,08	3,54 ± 0,26	3,67 ± 0,04
COO simetrik	5,69 ± 0,48	5,95 ± 0,32	5,45 ± 0,17	6,57 ± 0,30	5,16 ± 0,3	4,81 ± 0,15	4,43 ± 0,11	4,45 ± 0,32	4 54 ± 0,06
Amid III	1,00 ± 0,09	1,04 ± 0,06	0,94 ± 0,03	1,13 ± 0,05	0,87 ± 0,06	0,81 ± 0,03	0,75 ± 0,02	0,76 ± 0,05	0,77 ± 0,01
CH2 Bükülme	2,91 ± 0,26	3,03 ± 0,18	2,77 ± 0,09	3,32 ± 0,15	2,58 ± 0,18	2,45 ± 0,07	2,25 ± 0,05	2,27 ± 0,16	2,32 ± 0,03
PO2 asimetrik	6,77 ± 0,64	7,17 ± 0,42	6,73 ± 0,23	7,91 ± 0,38	6,29 ± 0,43	5,90 ± 0,17	5,48 ± 0,13	5,51 ± 0,38	5,69 ± 0,07
COOC asimetrik	1,97 ± 0,19	2,04 ± 0,11	1,99 ± 0,06	2,27 ± 0,10	1,78 ± 0,11	1,60 ± 0,05	1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,10	1,54 ± 0,01
PO2 simetrik	11,54 ± 1,13	11,87 ± 0,74	11,60 ± 0,39	13,50 ± 0,50	10,58 ± 0,53	9,44 ± 0,35	8,78 ± 0,26	8,74 ± 0,58	9,16 ± 0,09
CNC gerilme	1,62 ± 0,19	1,48 ± 0,12	1,38 ± 0,07	1,66 ± 0,08	1,23 ± 0,05	1,04 ± 0,06 ##	0,98 ± 0,06	0,97 ± 0,06	1,01 ± 0,02
Z-DNA	0,34 ± 0,05	0,29 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,02 ##	0,18 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,01
N-şeker	0,012±0,006	0,015±0,004	0,024±0,007	0,054±0,008 ***	0,036±0,004	0,066±0,004 ###, \$\$\$	0,039±0,004	0,044±0,009	0,046±0,003
N-şeker	0,28 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,45 ± 0,03 *	0,32 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,01

**Tablo 3.** Band frekans değişimleri. Değerler her bir grup ortalamalarını ve standart sapmalarını göstermektedir. Farklılık derecesi alkol ve kendi kontrol gruplarına kıyasla  $p<0.05^*$ ,  $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.001^{***}$  ile, IK ve IKA gruplarının K kontrol grubuna kıyasla  $p<0.05^{\#}$ ,  $p<0.01^{\#\#}$ ,  $p<0.001^{\#\#\#}$  ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise  $p<0.05^{\$}$ ,  $p<0.01^{\$\$}$ ,  $p<0.001^{\$\$\$}$  ile simgelenmiştir.

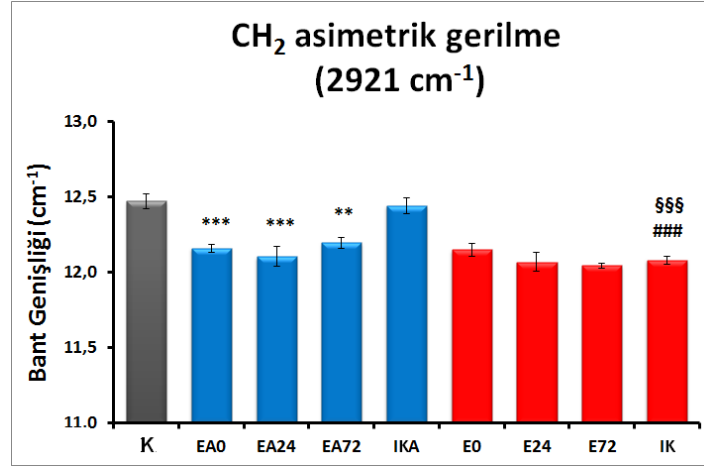
BAND FREKANSI		(+ Vitamin A				(- Vitamin A			
Band Adı	K(n=7)	IKA (n=9)	EA0 (n=7)	EA24 (n=7)	EA72 (n=8)	IK (n=7)	E0 (n=6)	E24 (n=6)	E72 (n=6)
Amid A	3335,37±3,76	3348,58±3,30	3351,08±2,69	3350,93±4,02	3342,62±1,98	3338,83±1,79 #	3324,84±1,15	3342,92±4,33	3326,28±1,17
Amid B	3060,60±1,13	3070,71±1,02 ###	3072,48±0,08	3070,07±1,78	3073,21±0,49	3061,66±0,06 \$\$\$	3070,11±1,63 ***	3074,06±0,06 ***	3071,88±0,08 ***
Olefinik	3014,30±0,13	3014,24±0,17	3014,12±0,11	3014,18±0,13	3013,98±0,08	3013,85±0,06	3013,61±0,08	3013,74±0,03	3013,47±0,08
CH3 asimetrik	2960,82±0,09	2960,77±0,05	2960,67±0,09	2960,77±0,06	2960,68±0,03	2959,62±0,05 ###, \$\$\$	2959,65±0,02	2959,72±0,15	2959,67±0,03
CH2 asimetrik	2924,16±0,08	2924,42±0,07	2924,32±0,10	2924,48±0,07	2924,35±0,06	2923,42±0,03 ###, \$\$\$	2923,50±0,03	2923,30±0,05	2923,50±0,04
CH3 simetrik	2871,94±0,05	2871,83±0,04	2872,01±0,02 *	2872,23±0,03 ***	2872,19±0,04 ***	2871,65±0,03 ###, \$	2871,61±0,02	2871,84±0,06 *	2871,62±0,03
CH2 simetrik	2852,10±0,04	2852,28±0,04 #	2852,31±0,04	2852,43±0,05	2852,29±0,04	2851,63±0,02 ###, \$\$\$	2851,65±0,02	2851,55±0,01	2851,63±0,03
Ester	1745,58±0,33	1744,89±0,30	1744,71±0,34	1744,84±0,20	1744,69±0,26	1744,08±0,06 #	1743,86±0,34	1744,31±0,34	1744,05±0,06
Amid I	1655,06±0,18	1655,04±0,17	1654,11±0,16 ***	1654,22±0,14 ***	1654,52±0,07 **	1654,06±0,04 ###, \$\$\$	1654,73±0,08 **	1654,00±0,06	1654,83±0,05 ***
Amid II	1543,99±0,13	1544,01±0,07	1544,22±0,08	1544,36±0,15	1544,02±0,06	1545,27±0,10 ###, \$\$\$	1544,50±0,06 ***	1544,94±0,10	1544,59±0,08 ***
CH2 Bükülme	1459,04±0,23	1459,42±0,26	1458,97±0,30	1458,96±0,31	1459,62±0,27	1459,69±0,11	1460,01±0,26	1459,68±0,13	1460,42±0,14
COO simetrik	1394,48±0,48	1394,38±0,28	1394,79±0,34	1394,86±0,32	1394,30±0,18	1395,83±0,14 \$	1394,60±0,18	1395,73±0,16	1394,51±0,18
Amid III	1343,49±0,49	1343,68±0,68	1345,69±0,29	1342,90±0,55	1343,86±0,12	1342,13±0,09	1343,26±0,47	1341,89±0,17	1342,92±0,55
CH2 Bükülme	1305,36±0,64	1305,04±0,43	1304,28±0,25	1304,32±0,75	1304,08±0,22	1303,92±0,09	1303,59±0,51	1304,11±0,27	1303,25±0,50
PO2 asimetrik	1262,18±0,25	1262,32±0,71	1263,74±0,36	1262,74±0,68	1262,29±0,21	1263,41±0,08	1262,50±0,61	1260,47±0,38 **	1260,01±0,07 ***
PO2 asimetrik	1237,48±0,11	1237,68±0,21	1236,45±0,27 ***	1237,17±0,07	1237,44±0,14	1236,81±0,08 \$\$	1237,31±0,06	1236,54±0,11	1237,21 ± 0,08
COOC asimetrik	1170,91±0,46	1172,43±0,31 ##	1171,34±0,30	1171,34±0,34	1171,62±0,18	1170,32±0,07 \$\$\$	1171,12±0,28	1173,48±0,15 ***	1171,28 ± 0,32
PO2 simetrik	1065,18±0,61	1066,58±0,64	1067,09±0,55	1067,05±0,44	1067,32±0,74	1070,01±0,52 ###, \$\$\$	1069,43±0,78	1069,91±0,42	1068,96±0,31
CNC gerilme	992,21 ± 0,58	995,10 ± 0,23	996,74 ± 0,40	995,66 ± 1,08	995,56 ± 0,55	989,77 ± 0,08 \$\$\$	995,32 ± 0,63 ***	995,31 ± 0,95 ***	990,81 ± 1,43
Z-DNA	926,68 ± 0,36	926,06 ± 0,20	925,40 ± 0,15	925,99 ± 0,13	925,69 ± 0,08	927,04 ± 0,07	925,56 ± 0,47 **	926,16 ± 0,41	925,86 ± 0,23 **
N-şeker	874,91 ± 0,43	874,28 ± 0,24	874,96 ± 0,15	873,11 ± 0,72	872,18 ± 0,63	873,08 ± 0,06	874,31 ± 0,89	874,48 ± 0,34	873,20 ± 0,61
N-şeker	802,41 ± 0,69	802,52 ± 0,25	802,44 ± 0,22	802,50 ± 0,42	801,96 ± 0,39	802,46 ± 0,12	801,61 ± 0,18	801,76 ± 0,16	801,48 ± 0,42

İkinci olarak belirlenen 3030-2800  $\text{cm}^{-1}$  frekans aralığı C-H bölgesi olarak bilinmektedir. Bu alanda bulunan ve 3014  $\text{cm}^{-1}$  merkezlenen olefinik bant H-C=C-H vibrasyonundan kaynaklanan gerilmeyi simgelemektedir ve bu bant fosfolipitlerin asit zincirlerinin doymamışlığının bir ölçütü olarak kullanılmaktadır (LIU, 2002; MELIN, 2000; SEVERCAN, 2005; TAKAHASKI, 1991). Bu alanda bulunan diğer bantlar ise sırasıyla lipidlerden kaynaklanan  $\text{CH}_3$  asimetrik gerilme (2961  $\text{cm}^{-1}$ ) ve  $\text{CH}_2$  asimetrik gerilme (2921  $\text{cm}^{-1}$ ), proteinlerden kaynaklanan  $\text{CH}_3$  simetrik gerilme (2972  $\text{cm}^{-1}$ ) ve yine lipidlerden kaynaklanan  $\text{CH}_2$  simetrik gerilme (2851  $\text{cm}^{-1}$ ) bantlarıdır (CAKMAK, 2004; MELIN, 2000; SEVERCAN, 2000). Bu bölgede anlamlı alan artışı, IKA grubunda IK grubuna kıyasla doymamış yağ asitlerinden kaynaklanan olefinik ve proteinlerden kaynaklanan  $\text{CH}_3$  simetrik gerilme bantlarında görülmüştür (Tablo 2). Alkol gruplarının frekans değişimindeki tek anlamlı fark ise  $\text{CH}_3$  simetrik gerilme bantında elde edilmiştir.  $\text{CH}_3$  simetrik gerilme bantında E24 grubunda IK'ye göre ve EA0, EA24, ve EA72 gruplarında ise IKA grubuna göre anlamlı bir frekans artışı kaydedilmiştir (Şekil 3.11). IKA ve IK kontrol grupları kıyaslanınca da IKA grubunda bant frekasında anlamlı bir artış gözlemlendi. K ve IKA kontrol grupları arasında fark izlenmedi.



**Şekil 3.11.** Protein kaynaklı  $\text{CH}_3$  simetrik gerilme bant frekansındaki değişimler. Hata çubukları standart sapmayı (SEM) göstermektedir. Farklılık derecesi E ve EA alkol gruplarının kendi kontrol gruplarına kıyasla  $p < 0.05^*$  ve  $p < 0.001^{***}$  ile, IK ve IKA gruplarının K kontrol grubuna kıyasla  $p < 0.001^{###}$  ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise  $p < 0.05\text{§}$  ile simgelenmiştir.

CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme bant genişliğinde EA0, EA24 ve EA72 gruplarında IKA grubuna göre anlamlı bir düşüş ve IKA grubunda IK kontrol grubuna karşı anlamlı bir artış kaydedildi. K ve IKA kontrol grupları arasında fark izlenmedi (Şekil 3.12, Tablo 4).



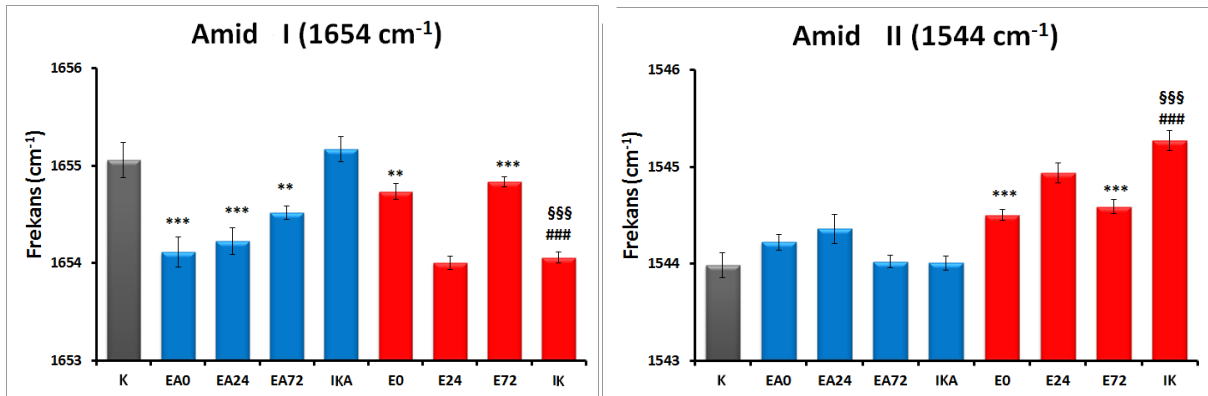
**Şekil 3.12** CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme bant genişliğindeki değişimler. Hata çubukları standart sapmayı (SEM) göstermektedir. Farklılık derecesi alkol gruplarının kendi kontrol gruplarına kıyasla p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\* ile, IK ve IKA gruplarının K kontrol grubuna kıyasla p<0.001### ile ve ayrıca IK ve IKA grupları arasındaki fark p<0.001\$\$\$ ile simgelenmiştir.

**Tablo 4.** Band genişlik değişimleri. Değerler her bir grup ortalamalarını ve standart sapmalarını göstermektedir. Farklılık derecesi alkol ve kendi kontrol gruplarına kıyasla p<0.05\*, p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\* ile, IK ve IKA gruplarının K kontrol grubuna kıyasla p<0.05#, p<0.01##, p<0.001### ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise p<0.05\$, p<0.01\$\$, p<0.001\$\$\$ ile simgelenmiştir.

Band Genişliği		(+ Vitamin A				(- Vitamin A			
Band Adı	K(n=7)	IKA (n=9)	EA0 (n=7)	EA24 (n=7)	EA72 (n=8)	IK (n=7)	E0 (n=6)	E24 (n=6)	E72 (n=6)
CH <sub>2</sub> asimetrik	12,47 ± 0,05	12,44 ± 0,05	12,16±0,03 ***	12,10 ± 0,07 ***	12,19 ± 0,03 **	12,08 ± 0,03 ###, \$\$\$	12,15 ± 0,04	12,07 ± 0,07	12,04 ± 0,02
CH <sub>2</sub> simetrik	5,89 ± 0,03	5,90 ± 0,02	5,95 ± 0,02	5,86 ± 0,03	5,95 ± 0,01	5,74 ± 0,02 ###, \$\$\$	5,77 ± 0,02	5,76 ± 0,02	5,78 ± 0,02
Amid I	35,71 ± 0,29	35,18 ± 0,45	34,32 ± 0,19	33,67 ± 0,19 *	33,26±0,28 ***	32,84 ± 0,28 ###, \$\$\$	32,39 ± 0,11	33,35 ± 0,55	32,00 ± 0,14
Amid II	20,94 ± 0,19	20,29 ± 0,13	20,15 ± 0,15	19,87 ± 0,14	20,44 ± 0,10	18,66 ± 0,08 ###, \$\$\$	19,69 ± 0,07 **	19,68 ± 0,36 **	19,63 ± 0,10 *

1800-400  $\text{cm}^{-1}$  bant alanı farklı dokular için parmak izi alanı olarak değerlendirilir. Bunun nedeni buradaki bantların protein, nükleik asit ve hücre zarında bulunan lipitlerin baş gruplarındaki ve ara yüzlerindeki vibrasyonel hareketlerinden kaynaklanmasındandır. (MENDELSON, 1986). Spektrumda 1745  $\text{cm}^{-1}$ 'de merkezlenen bant genellikle fosfolipidlerin C=O ester gerilme vibrasyonundan kaynaklanmaktadır (MELIN,2000). Bu çalışmada, hiç bir alkol grubunda bu bantta frekans ve alan değişimi görülmemiştir (Tablo 2, Tablo 3).

Yapısal proteinlerden kaynaklanan Amid I ve Amid II vibrasyonları sırasıyla 1658 and 1549  $\text{cm}^{-1}$ 'de bulunmaktadır. Amid I bantı çoğunlukla polipeptitlerdeki ve protein omurgasındaki C=O gerilme ve C-N gerilme (60 %) vibrasyonlarından ve zayıf olarakta N-H bükülme (40%) vibrasyonundan kaynaklanmaktadır. Amid II bantı ise proteinlerdeki N-H bükülme (60%) ve C-N gerilme (40%) vibrasyonlarından kaynaklanmaktadır (HARIS, 1999; MELIN, 2000; WONG, 1991).



**Şekil 3.13.** Amid I ve Amid II bant frekansındaki değişimler. Hata çubukları standart sapmayı (SEM) göstermektedir. Farklılık derecesi alkol gruplarının kendi kontrol gruplarına kıyasla  $p < 0.01$ \*\*,  $p < 0.001$ \*\*\* ile, IK grubunun K kontrol grubuna kıyasla  $p < 0.001$ ### ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise  $p < 0.001$ \$\$\$ ile simgelenmiştir.

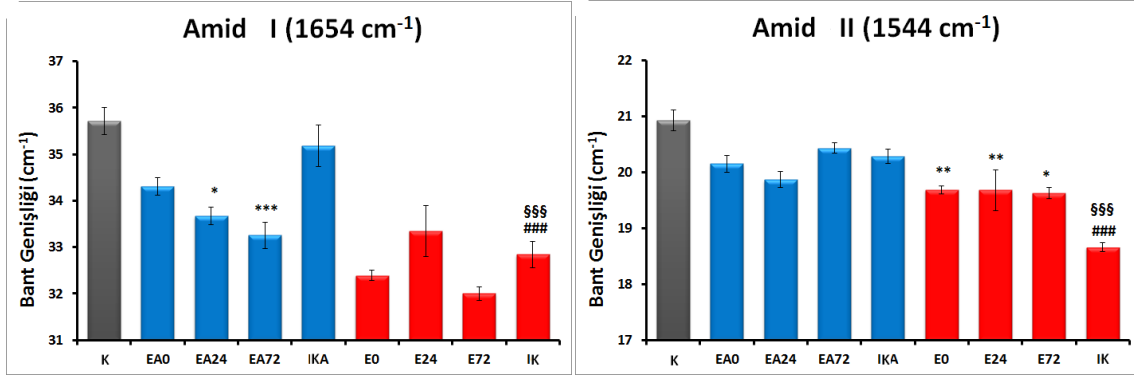
Şekil 3.13'te görüldüğü üzere Amide I bantında IKA grubunda IK grubuna karşı frekansta anlamlı artış, EA0, EA24 ve EA72 grupları IKA grubuyla karşılaştırıldığında frekansta anlamlı düşüş, E0 ve E72 grupları IK grubuyla karşılaştırıldığında ise frekansta anlamlı artış, kaydedilmiştir. Diğer taraftan, IKA grubunda IK grubuna karşı ve tüm EA gruplarında E gruplarına karşı Amid II bant frekasında anlamlı düşüş görülmüştür. Ayrıca E0 ve E72 grupları IK grubuyla karşılaştırıldığında Amid II frekansında anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

K ve IKA kontrol grupları arasında fark izlenmemiştir. Amid I ikincil yapısı vektör normalizasyonu ile incelendiğinde IKA ile karşılaştırıldığında EA0 grubunda “turn” yapısında anlamlı azalma ve “beta sheet” yapısında anlamlı artma, EA24 grubunda “alfa heliks” ve “beta sheet” yapısında anlamlı artma ve “aggregated beta sheet” yapısında anlamlı azalma ve EA72 grubunda “turn” ve “aggregated beta sheet” yapısında anlamlı azalma görülmüştür. Ancak IKA grubu IK grubu ile karşılaştırıldığında “aggregated beta sheet” yapısında anlamlı artmanın olduğu izlenmiştir (Tablo 5).

**Tablo 5.** Amid I ikincil yapı değişimleri. Değerler her bir grup ortalamalarını ve standart sapmalarını göstermektedir. Farklılık derecesi alkol ve kendi kontrol gruplarına kıyasla  $p<0.05^*$ ,  $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.001^{***}$  ile, IK ve IKA gruplarının K kontrol grubuna kıyasla  $p<0.05^{\#}$ ,  $p<0.01^{\#\#}$ ,  $p<0.001^{\#\#\#}$  ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise  $p<0.05^{\S}$ ,  $p<0.01^{\S\S}$ ,  $p<0.001^{\S\S\S}$  ile simgelenmiştir.

Band Adı	(+ Vitamin A					(-) Vitamin A			
	K (n=7)	IKA (n=9)	EA0 (n=7)	EA24 (n=7)	EA72 (n=8)	IK (n=7)	E0 (n=6)	E24 (n=6)	E72 (n=6)
Antiparallel $\beta$ sheet (1690 $\text{cm}^{-1}$ )	0,096 $\pm$ 0,028	0,093 $\pm$ 0,016	0,098 $\pm$ 0,014	0,073 $\pm$ 0,005	0,111 $\pm$ 0,016	0,066 $\pm$ 0,008	0,110 $\pm$ 0,009	0,112 $\pm$ 0,009	0,091 $\pm$ 0,006
Turns (1680 $\text{cm}^{-1}$ )	0,038 $\pm$ 0,009	0,100 $\pm$ 0,023 ###	0,044 $\pm$ 0,006 *	0,058 $\pm$ 0,005	0,051 $\pm$ 0,006 *	0,066 $\pm$ 0,005	0,047 $\pm$ 0,005	0,095 $\pm$ 0,012	0,048 $\pm$ 0,005
$\alpha$ helix (1656 $\text{cm}^{-1}$ )	0,214 $\pm$ 0,008	0,216 $\pm$ 0,013	0,234 $\pm$ 0,011	0,270 $\pm$ 0,010 *	0,235 $\pm$ 0,012	0,262 $\pm$ 0,013	0,271 $\pm$ 0,008	0,287 $\pm$ 0,006	0,277 $\pm$ 0,005
Random coil (1648 $\text{cm}^{-1}$ )	0,098 $\pm$ 0,019	0,125 $\pm$ 0,012	0,109 $\pm$ 0,010	0,118 $\pm$ 0,015	0,092 $\pm$ 0,008	0,100 $\pm$ 0,008	0,110 $\pm$ 0,009	0,151 $\pm$ 0,019	0,115 $\pm$ 0,004
$\beta$ sheet (1638 $\text{cm}^{-1}$ )	0,192 $\pm$ 0,006	0,159 $\pm$ 0,007 #	0,202 $\pm$ 0,010 **	0,201 $\pm$ 0,006 **	0,168 $\pm$ 0,008	0,134 $\pm$ 0,006 ###	0,138 $\pm$ 0,003	0,124 $\pm$ 0,009	0,129 $\pm$ 0,003
Aggregated $\beta$ sheet (1628 $\text{cm}^{-1}$ )	0,149 $\pm$ 0,006	0,165 $\pm$ 0,008	0,152 $\pm$ 0,009	0,127 $\pm$ 0,012 *	0,110 $\pm$ 0,005 ***	0,119 $\pm$ 0,005 §§	0,092 $\pm$ 0,006	0,094 $\pm$ 0,007	0,094 $\pm$ 0,008

Aynı zamanda Amid I bant genişliğinde IKA grubunda IK grubuna kıyasla anlamlı artış ve EA24 ve EA72 gruplarında IKA grubuna kıyasla anlamlı bir daralma gözlenmiştir. K ve IKA kontrol grupları arasında fark izlenmemiştir. Amid II bant genişliğinde de IKA grubunda IK grubuna kıyasla ve ayrıca E0, E24, ve E72 gruplarında IK grubuna kıyasla anlamlı bir artış kaydedilmiştir (Şekil 3.14 ve Tablo 4). K ve IKA kontrol grupları arasında fark izlenmemiştir.



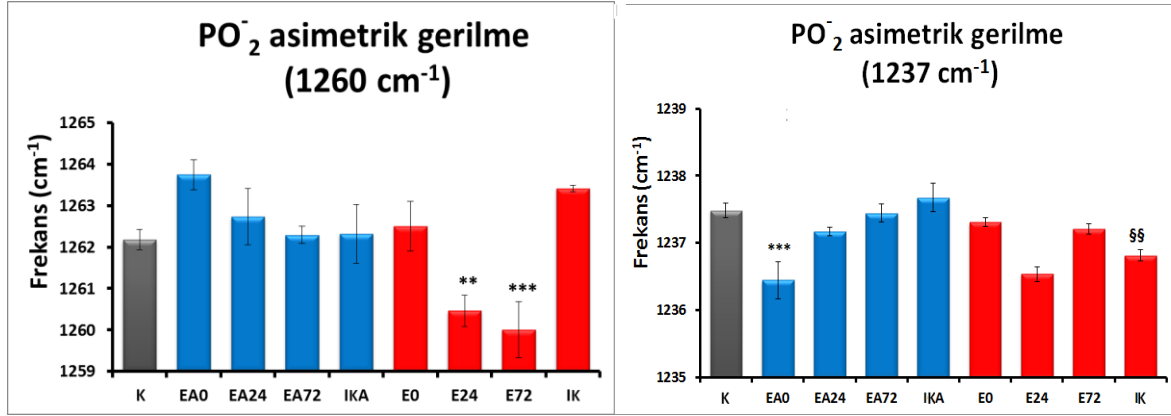
**Şekil 3.14** Amid I ve Amid II bant genişliğindeki değişimler. Hata çubukları standart sapmayı (SEM) göstermektedir. Farklılık derecesi alkol gruplarının kendi kontrol gruplarına kıyasla  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$  ile, IK ve IKA gruplarının K kontrol grubuna kıyasla  $p < 0.001^{###}$  ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise  $p < 0.001^{§§§}$  ile simgelenmiştir.

Protein ve lipitlerden kaynaklanan  $\text{CH}_2$  bükülme bantı  $1468 \text{ cm}^{-1}$  de bulunmaktadır (MANOHARAN, 1993). Bu bantta hiçbir grupta alan değişimi ve frekans kayması kaydedilmemiştir (Tablo 2-3).  $1344 \text{ cm}^{-1}$  de bulunan Amide III bantı ise kollajenlerin C-N ve C-C gerilme ve N-H bükülme vibrasyonlarından oluşmaktadır (CAMACHO,2001; GOUGH, 2003). Bu bantta da anlamlı alan ve frekans değişimi görülmemiştir (Tablo 2-3).

$1402 \text{ cm}^{-1}$  band frekasında bulunan ve amino asit zincirlerinden ve yağ asitlerinden kaynaklanan  $\text{COO}^-$  simetrik gerilme vibrasyonunda (CAKMAK,2004; JACKSON,1998) ne alanda ne de frekansta hiçbir anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 2-3).

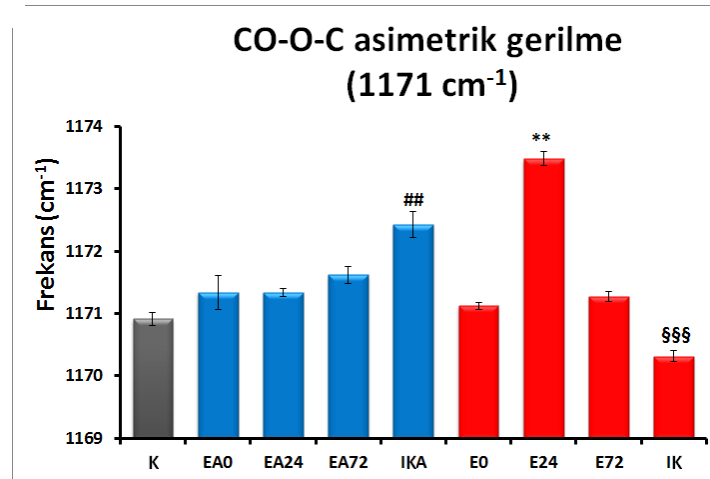
$1280-900 \text{ cm}^{-1}$  frekans aralığı fosfolipid ve nükleik asit gibi fosfat taşıyan makromolekülleri içermektedir (MELIN,2000). Buradaki güçlü bantlar  $1262$ ,  $1236$  and  $1083 \text{ cm}^{-1}$  frekanslarında bulunan fosfodiester gruplarından ve nükleik asit omurgası ve fosfolipidlerde bulunan fosfat gruplarının  $\text{P}=\text{O}$  bağından kaynaklanan asimetric ve simetrik gerilme modlarını temsil etmektedir (WONG, 1991). Şekil 3.15,  $\text{PO}_2$  asimetric gerilme bantlarındaki frekans değişimlerini göstermektedir.  $1262 \text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan bantta E24 ve E72 gruplarında IK grubuna kıyasla frekansta anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.  $1237 \text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan bantta ise IKA grubunda IK gruba kıyasla frekansta artış ve EA0 grubunun IKA grubuna kıyasla frekansta anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 3.15). K ve IKA kontrol grupları arasında fark izlenmemiştir.  $1083 \text{ cm}^{-1}$  frekansında bulunan  $\text{PO}_2$  simetrik gerilme vibrasyonunda ise frekans değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 2-3).





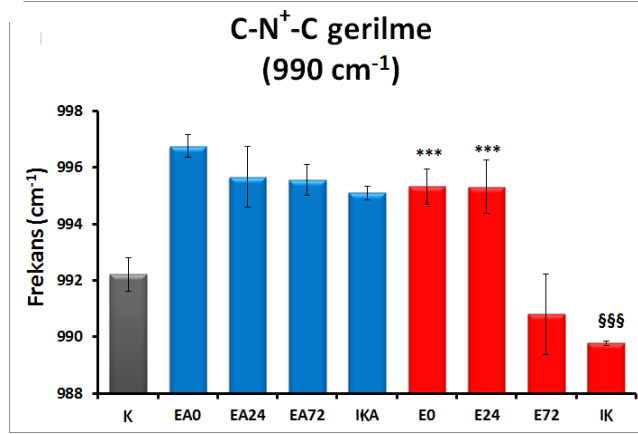
**Şekil 3.15.** PO<sub>2</sub><sup>-</sup> asimetrik gerilme bant frekansındaki değişimler. Hata çubukları standart sapmayı (SEM) göstermektedir. Farklılık derecesi alkol gruplarının kendi kontrol gruplarına kıyasla p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\* ile, IK ve IKA grupları arasındaki fark ise p<0.01§§ ile simgelenmiştir.

1172 cm<sup>-1</sup>'de bulunan zayıf bant glikojen ve nükleik asitlerin yapısındaki CO-O-K grubundan kaynaklanan asimetrik gerilme modundan oluşmaktadır (CAKMAK, 2004). Bu bant frekansında IKA grubunda hem K hem de IK grubuna kıyasla ve ayrıca E24 grubunda IK grubuna kıyasla anlamlı bir frekans artışı kaydedilmiştir (Şekil 3.16).



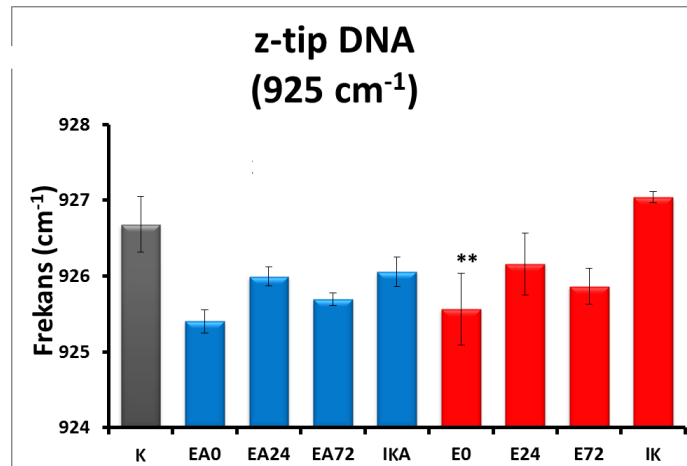
**Şekil 3.16.** CO-O-C asimetrik gerilme bant frekansındaki değişimler. Hata çubukları standart sapmayı (SEM) göstermektedir. Farklılık derecesi E24 alkol grubunda kendi kontrol grubuna kıyasla p<0.01\*\* ile, IKA grubunda K kontrol grubuna kıyasla p<0.01## ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise p<0.001§§§ ile simgelenmiştir.

995-970  $\text{cm}^{-1}$ 'yi içeren spektral alan RNA yapısındaki riboz-fosfat ana zincirinde bulunan C-N-C gerilme vibrasyonunu içermektedir (BANYAY, 2003). Bu bantta IKA grubunda IK grubuna kıyasla ve ayrıca E0 ve E24 gruplarında IK grubuna kıyasla frekans değerlerinde anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 3.17).



**Şekil 3.17.** C-N-C gerilme bant frekansındaki değişimler. Hata çubukları standart sapmayı (SEM) göstermektedir. Farklılık derecesi alkol gruplarının kendi kontrol gruplarına kıyasla  $p < 0.001$ \*\*\* ile, IK ve IKA grupları arasındaki fark ise  $p < 0.001$ \$\$\$ ile simgelenmiştir.

925  $\text{cm}^{-1}$ 'de bulunan bant genellikle z-tip DNA olarak adlandırılmaktadır. Bu bant frekansında E0 grubunda IK grubuna kıyasla anlamlı bir frekans kayması kaydedilmiştir (Şekil 3.18).



**Şekil 3.18.** Z-tip DNA bant frekansındaki değişimler. Hata çubukları standart sapmayı (SEM) göstermektedir. Farklılık derecesi E0 alkol grubunun kendi kontrol grubuna kıyasla  $p < 0.01$ \*\* ile simgelenmiştir.

874 cm<sup>-1</sup> ve 802cm<sup>-1</sup>'de bulunan bantlar nükleik asitlerin omurgasında bulunan şeker-fosfatın N-tip şekerlerinin vibrasyonundan oluşmaktadır (BANYAY, 2003; TAILLANDER, 1992). Anlamli alan değişimleri her iki frekansta bulunan n-tip şekerde EA24 grubunda IKA grubuna kıyasla görülmüştür (Tablo 2).

Hücre zarında bulunan protein ve lipitlerin miktarlarındaki değişim zar yapısı ve dinamiği için önem arz etmektedir (SZALONTAI, 2000). Lipit/protein oranı lipid bantları olan CH<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub> asimetrik gerilme ve CH<sub>2</sub> simetrik gerilme bantlarının alanlarının protein bandı olan Amid I bantının alanına oranından hesaplanmıştır ve bu oranda anlamli azalma sadece IKA grubuna kıyasla EA24 grubunda görülmüştür. Lipit ester/protein oranına bakıldığında ise EA0, EA24 ve EA72 gruplarında anlamli azalmaların olduğu görülmüştür. Doymuş yağ/Doymamış yağ oranında (lipid bantlarının toplam alanlarının olefinik bant alanına oranı) EA72 grubunda anlamli bir artma ve kolesterol/fosfolipit oranına bakıldığında ise bu grupta anlamli bir azalma görülmüştür. Nükleik asit/protein oranında (925 cm<sup>-1</sup>, 874 cm<sup>-1</sup> ve 802cm<sup>-1</sup> bantlarının alanlarının Amid I bant alanına oranı) ve CH<sub>2</sub> simetrik/CH<sub>3</sub> asimetrik oranında hiçbir grupta anlamli bir değişim görülmemiştir ( Tablo 6).

**Tablo 6.** Band oran değişimleri. Değerler her bir grup ortalamalarını ve standart sapmalarını göstermektedir. Farklılık derecesi alkol ve kendi kontrol gruplarına kıyasla p<0.05\*, p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\* ile, IK ve IKA gruplarının K kontrol grubuna kıyasla p<0.05#, p<0.01##, p<0.001### ile ve IK ve IKA grupları arasındaki fark ise p<0.05\$, p<0.01\$\$, p<0.001\$\$\$ ile simgelenmiştir.

Oranlar		(+ Vitamin A				(-) Vitamin A			
Band Adı	K (n=7)	IKA (n=9)	EA0 (n=7)	EA24 (n=7)	EA72 (n=8)	IK (n=7)	E0 (n=6)	E24 (n=6)	E72 (n=6)
Lipid / protein	1,030 ± 0,010	0,966 ± 0,020	0,934 ± 0,016	0,891 ± 0,017 *	0,951 ± 0,015	0,824 ± 0,005 ###, \$\$\$	0,864 ± 0,007	0,850 ± 0,014	0,888 ± 0,012
Lipid ester / protein	0,163 ± 0,002	0,156 ± 0,004	0,138 ± 0,002 *	0,135 ± 0,002 ***	0,132 ± 0,002 ***	0,118 ± 0,003 ###, \$\$\$	0,122 ± 0,002	0,125 ± 0,007	0,121 ± 0,002
Sature lipid / unsature lipid	7,922 ± 0,078	8,043 ± 0,082	8,269 ± 0,057	8,347 ± 0,085	8,619 ± 0,080 ***	8,573 ± 0,074 ###, \$\$\$	8,668 ± 0,051	8,514 ± 0,140	8,879 ± 0,042
Nükleik asit / Protein	0,030 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,029 ± 0,003	0,030 ± 0,001	0,028 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,026 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,027 ± 0,000
Kolesterol / fosfolipid	0,230 ± 0,003	0,226 ± 0,003	0,216 ± 0,003	0,215 ± 0,004	0,200 ± 0,003 ***	0,205 ± 0,005 ##, \$	0,203 ± 0,002	0,211 ± 0,009	0,194 ± 0,002
CH2 simetrik/ CH3 asimetrik	0,519 ± 0,002	0,517 ± 0,003	0,519 ± 0,002	0,512 ± 0,005	0,525 ± 0,003	0,520 ± 0,002	0,515 ± 0,002	0,521 ± 0,002	0,532 ± 0,003

#### 4. SONUÇLARIN ÖZETİ VE DEĞERLENDİRMESİ

Sonuç olarak mevcut çalışmada, vitamin alan grupların vitamin almayan gruplara kıyasla ortalama vücut ağırlığında anlamlı bir düşüş görüldü. Diğer taraftan sıvı alımında ve buna bağlı olarak alkol ve kalori tüketiminde anlamlı farklılıklar bulunmadı. Ancak antioksidant özellikleri taşıyan vitaminlerin vücut dokularında oksidatif stresin belirtilerini azalttığı ve bazal metabolizmayı arttırdığı öne sürülmüştür. Alkol tüketimi 13-14 g/kg vücut ağırlığı /gün civarındaydı. Bu çalışmada uygulanan alkol diyeti daha önceki çalışmamızda (ELIBOL-CAN, 2011) uygulanan “binge-like drinking” protokolü ile kıyaslandığında bu çalışmada daha yüksek günlük alkol tüketimi olmasına rağmen çok daha düşük kan alkol yoğunluğu elde edildiği görüldü (sırası ile 606 mg/dl ve 92.27 mg/dl). Daha önce yapılan birçok çalışmada alkolün organizma üzerindeki etkilerinin en belirleyici faktörünün kandaki alkol konsantrasyonu olduğu gösterilmiştir (WEST, 1989; PIERCE, 1986). Bu son iddia ile uyumlu olarak mevcut çalışmamızda uzun süre verilen ancak kanda düşük seviyelere ulaşan alkol, sadece protein ve nükleik asit yapısında bazı değişimlere yol açarken, diğer çalışmamızda bu değişimlerin yanı sıra lipitlerde de düzen/düzensizlik, hücre zarı akışkanlığı ve doymamış yağ oranında değişimler gibi fonksiyonel ve yapısal farklılıklar da ortaya çıktı.

Mevcut çalışmada A vitamininin tek başına etkilerini araştırmak amacıyla üç kontrol grubu kıyaslandı. Hipokampus dokusunda yapılan detaylı analiz vitamin A takviyeli IKA grubu spektrumunun standart laboratuvar besini ile beslenen K kontrol grubu spektrumuna IK kontrol grubuna nazaran daha yakın olduğu görüldü. Bu beklenen bir sonuçtur çünkü standart laboratuvar yemi sağlık için gerekli A vitamini miktarını içermektedir. Bu sonuçlar mevcut çalışmada spektral çekim ve analizlerin doğru yapıldığına dair bir kanıttır. IKA ve IK kontrol grupları karşılaştırıldığında, vitamin A takviyesinin protein ana bantlarında frekans kaymalarına, Amid I ve II bant genişliğinin artmasına ve böylece proteinlerin hidrojen bağı yapma oranının artması gibi proteinlerde bazı fonksiyonel değişimlere yol açtığı görüldü. Alınan bazı sonuçlar, protein ikincil yapısında protein denaturasyonunu simgeleyen “aggregated beta sheet” gibi, A vitamininin indüklediği bazı moleküler değişimlerin olumsuz olabileceği konusunda şüphe uyandırmaktadır. Aynı zamanda PO<sub>2</sub> asimetrik gerilme bantındaki frekans kayması (artması) vitamin A takviyesinin hidrojen bağlanmasını azalttığını ve PO<sub>2</sub> simetrik gerilme bantındaki frekans azalması ise A vitamini takviyesinin DNA ve RNA yapısında değişimlere neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca vitamin A takviyesinin tetiklediği CH<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub> asimetrik ve CH<sub>2</sub> simetrik bant frekanslarındaki artma hücre zarında

bulunan lipitlerin lipit zincirlerinde düzenliliğin azalmasına işaret etmektedir (SEVERCAN, 2000; MENDELSON, 1986; SEVERCAN, 1997). Bunun yanı sıra A vitamini takviyesi ile  $CH_2$  gerilme (hem simetrik hem de asimetric) bant genişliğinin artması hücre zarı dinamiğinin yani membran akışkanlığının artmasına işaret etmektedir (SEVERCAN, 2003). Ayrıca IKA grubunda IK grubuna kıyasla lipit peroksidasyonu işareti olarak gösterilen olefinik bant alanının anlamlı derecede artması ve bununla birlikte doymuş/doymamış lipit oranının azalması, kolesterol/fosfolipid ve lipid/protein oranlarının artması sinir fonksiyonları için son derece önemli olan hücre zarı üzerinde vitamin A takviyesinin kuvvetli etkileri olarak görülebilmektedir.

Bu çalışmada etil alkol etkilerini incelemek için ilk önce alkol grupları kendi kontrolleriyle karşılaştırıldı ve bu karşılaştırma sonucunda daha önce bahsedildiği gibi üç ay boyunca verilen alkolün ve takiben gelen alkol yoksunluğunun protein ve nükleik asitlerde bazı anlamlı fonksiyonel değişikliklere yol açtığı tespit edildi. Etanole maruz kalan ve vitamin almayan tüm üç alkol grubunda (E0, E24 ve E72) kendi izokalorik kontrol grubuna nazaran Amid B bantında, E0 ve E72 gruplarında Amide I bantında ve ayrıca E24 grubunda  $CH_3$  simetrik gerilme bantında anlamlı bir frekans artışı izlendi. Buna karşın E0 ve E72 gruplarında Amid II bantında anlamlı bir frekans düşüşü görüldü. Ayrıca etanol gruplarında Amid II bant genişliğinde anlamlı bir artış izlendi ancak protein ikincil yapısında anlamlı bir fark görülmedi. Bununla paralel etanol gruplarında  $PO_2$  ve  $COOH$  asimetric gerilme, CNC gerilme ve z-DNA bantı gibi nükleik asitlerden kaynaklanan bantlarda frekans kaymaları mevcuttu. Daha önceki çalışmamızda (ELIBOL-CAN, 2011) gösterildiği gibi protein ve nükleik asitlerde değişimlerin kanda hala alkolün bulunduğu saatlerde (E0) ve geç yoksunluk safhasında (E72) ortaya çıktığı görüldü. Hipokampus lipitleri açısından bakıldığında 3 ay süresince likit diyetle alınan alkolün hipokampus dokusundaki lipit bantlarında vitaminsiz diyetle beslenen kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı yapısal veya kantitatif değişimlerin olmadığı görüldü. Olefinik bantındaki ve doymuş/doymamış yağ oranlarındaki değişimlere bakılınca “binge-like-drinking” modelinin tersine daha yüksek dozda ancak daha düşük kan alkol konsantrasyonu oluşturan likit diyetle alkol alımının ve arkadan gelen alkol yoksunluğunun şiddetli oksidatif stres belirtilerini ortaya çıkartmadığı gözlemlendi.

Vitamin A varlığında etanol ve etanol yoksunluğunun etkileri araştırıldığında ise, tüm EA gruplarında protein yapısında anlamlı değişimlerin olması ( $CH_3$  simetrik gerilme bantında

anlamli frekans artmasi ve Amid I bantinda anlamli frekans azalmasi) ve membran akiskanliginin azalmasi (CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme bant genisliginde azalma) goruldu. Bu sonuclarin ıstığında kronik/akut etanol ve takiben yoksunluk durumlarında Vitamin A takviyesinin olumlu etkiler gösterdigini soyleyemeyiz. Diğer taraftan, tek başına A vitamini takviyesi ile Amid I ve Amid II protein bant genisliginin arttigi ve bu artisin EA0 grubunda devam ettigi. ancak yoksunluk safhalarında A vitamini alan kontrol grubuna kiyasla tekrar anlamli derecede dustugü goruldu. Amide I bant genisligi proteine bagli su miktarini isaret etmektedir. Amid I vibrasyonu büyük oranda C=O gerilme vibrasyonundan olusmaktadır ve bu grubun hidrojen bagı yapma oranı arttikça Amid I bant genisliginde bir artma gorulur (JAKOBSEN,1985). Eğer bu dogru ise, alınan sonuclar A vitamininin tek başına veya alkolle birlikte verildiginde hidrojen bagı yapma oranını arttırdigina isaret etmektedir. Ayrıca “alfa helix” yapısı ile bant genisligi arasında da bir iliski oldugu daha önce yapılan calısmalarda öne sürülmüstür (CHIRGADZE, 1976). Söz konusu calısmalarda Amid I bant genisliginin artmasının “alpha helix” yapısının stabilizesini bozduğu gösterilmiştir. Ancak bizim calısmamızda öyle bir etkileşim gorulmedi çünkü tek başına verilen A vitamininin Amid I bant genisligini anlamli derecede arttırdigi halde “alfa helix” yapısını anlamli derecede degistirmedigi goruldu. Ayrıca mevcut calısmada “alfa helix” yapısının artması (EA24 grubu), aynı zamanda kaydedilen “β-sheet” yapısının artması (EA0 ve EA24 grubu) ve ayrıca “aggregated β-sheet” yapısının azalması (EA24 ve EA72) etanol ile birlikte verilen ve sonra yoksunluk döneminde verilmesine devam edilen A vitamininin protein yapısındaki stabilizeyi arttırdigina isaret etmektedir. Bunun yanı sıra doymuş/doymamış lipidlerin oranı A vitamini takviyesi almayan kontrol (IK) ve alkol gruplarının genelinde daha yüksekti. Alınan sonuclar vitamin A takviyesinin olefinik bantın alanını arttırdigidan bu oranı geç yoksunluk safhası hariç düşürdüğünü göstermektedir.

Bu calısmada elde edilen sonuclar gösteriyor ki, 3 aylık likit diyetle verilen ancak düşük kan seviyelerine ulaşan alkol kısa süreli ancak yüksek kan alkol seviyeleri sağlayan gavajla alkol alımı (“binge-like-drinking” modeli, ELIBOL–CAN, 2011) ile kıyaslanınca ciddi bir fiziksel bağımlılığa ve hipokampus lipid, protein ve nükleik asit yapısında oksidatif strese bağlanabilecek ciddi bozukluklara yol açmamaktadır. Mevcut calısmada, etanol alımı ve etanol yoksunluğu lipidleri etkilemezken, proteinlerde ve özellikle nükleik asit yapısında bir takım degişimlere yol açtı. Çok daha yüksek kan seviyelerine ulaşan gavajla verilen etanol ve takibinde gelen etanol yoksunluğu protein ve nükleik asitlerin yanı sıra lipidlerde de yapısal

değişimlere yol açmıştır. İki çalışmamızın da sonuçlarına bakıldığında görülüyor ki; proteinler ve nükleik asitler lipitlere nazaran alkolün indüklenen değişimlerine daha düşük kan alkol seviyelerinde uğramakta ve böylece etanolün toksik etkilerine daha hassas olabilmektedir. Mevcut çalışmada vitamin A takviyesinin tek başına hipokampus dokusunun moleküler yapısını kuvvetli bir şekilde etkilediğine ve etanol ile bir takım etkileşimlere girdiğine dair sonuçlar alındı. Bunlar arasında vitamin A takviyesi, protein bantlarında frekans kaymalarına, ikincil yapıda değişikliklere ve bant genişliğinde artmalara yol açtığından, protein yapısı üzerinde etkili olmuştur. Ayrıca protein denaturasyonun işaretlerinden biri olarak kabul edilen “aggregated  $\beta$ -sheet” yapısının artması olumsuz etki olarak görülebilir. Bunun yanı sıra vitamin A takviyesinin lipitler üzerinde çeşitli etkileri vardı. Bu etkilerin arasında lipit düzensizliğinin, doymamış yağ oranının ve buna paralel olarak hücre zarı akışkanlığının artması sinir fonksiyonları için olumlu olabilecek etkilerdir. Etanol varlığında vitamin A takviyesi ise hücre zarı akışkanlığı ve protein yapısındaki değişim üzerinde olumlu bir etki göstermezken, protein ikincil yapısında stabilizeyi arttırmaktadır. Ayrıca, etanol nükleik asit yapısında değişime neden olurken, vitamin A varlığında bu değişim görülmemekte ve nükleik asit yapısı korunmaktadır. Son yıllarda çıkan bazı hipotezlere (WOLF, 2010) karşın bu çalışmada A vitamini etanol ile birlikte ve ayrıca takiben gelen yoksunluk döneminde verildiğinde bazı olumlu etkiler gösterdiğine dair sonuçlar alındı.

## KAYNAKLAR

1. ARENDT T., Henning D., Gray J. A., Marchbanks R., Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic projection system after prolonged intake of ethanol, *Brain Research Bulletin*, 21(4), 563-9, (1988).
2. BANYAY, M., Sarkar, M., Graslund, A., A library of IR bands of nucleic acids in solution, *Biophysical Chemistry*, 104(2):477-88, (2003).
3. BILLER A., Bartsch A.J., Homola G., Solymosi L., Bendszus M., The effect of ethanol on human brain metabolites longitudinally characterized by proton MR spectroscopy, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(5), 891-902, (2009).
4. CADETE-LEITE A., Pereira P. A., Madeira M. D., Paula-Barbosa M. M., Nerve growth factor prevents cell death and induces hypertrophy of basal forebrain cholinergic neurons in rats withdrawn from prolonged ethanol intake, *Neuroscience*, 119(4), 1055-69, (2003).
5. CAKMAK G., Togan I., Severcan F., 17-Estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol, *Aquatic Toxicology*, 77(1), 53-63, (2006).
6. CHEN N., Napoli J.L., All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane associated RAR $\alpha$  *FASEB Journal*. 22:236-45, (2008).
7. CHIANG M.Y., Misner D., Kempermann G., Schikorski T., Giguere V., Sucov H.M., Gage F.H., Stevens C.F., Evans R.M., An essential role for retinoid receptors RAR- $\beta$  and RXR- $\gamma$  in long-term potentiation and depression. *Neuron*. 21:1353-61,(1998).
8. CHIN J. H., Goldstein D. B., Drug tolerance in biomembranes: A spin label study of the effects of ethanol, *Science*, 196(4290), 684-5, (1977).
9. COHEN G., Sinet P.M., Heikkila R., Ethanol oxidation by rat brain in vivo, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 4(4), 366-70, (1980).
10. CREWS F.T., Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism, *Alcohol and Alcoholism*, 44(2), 115-27, (2009).
11. DEITRICH R. A., Dunwiddie T. V., Harris R. A., Erwin V. G., Mechanism of action of ethanol: Initial central nervous system actions, *Pharmacological Reviews*, 41(4), 489-537, (1989).
12. DELTOUR L., Ang H.L., Duester G., Ethanol inhibition of retinoic acid synthesis as a potential mechanism for fetal alcohol syndrome. *FASEB Journal*. 10:1050-7, (1996).
13. DOUGHERTY D. M., Marsh D. M., Moeller F. G., Chokshi R. V., Rosen V. C., Effects on moderate and high doses of alcohol on attention, impulsivity, discriminability, and response bias in immediate and delayed memory task performance, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 24(11), 1702-11, (2000).
14. DUESTER G., A hypothetical mechanism for fetal alcohol syndrome involving ethanol inhibition of retinoic acid synthesis at the alcohol dehydrogenase step. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*. 15(3):568-72. (1991).
15. ELİBOL-CAN B., Jakubowska-Doğru E., Severcan M., Severcan F., The Effects of Short-Term Chronic Ethanol Intoxication and Ethanol Withdrawal on the Molecular Composition of the Rat Hippocampus by FT-IR Spectroscopy, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 35(11), 2050-62, (2011).
16. ELLINGSON J. S., Janes N., Taraschi T. F., Rubin E. The effect of chronic ethanol consumption on the fatty acid composition of phosphatidylinositol in rat liver microsomes



- as determined by gas chromatography and  $^1\text{H-NMR}$ , *Biochimica et Biophysica Acta*, 1062(2),199-205, (1991).
17. FADDA F., Rossetti Z. L., Chronic ethanol consumption: From neuroadaptation to neurogeneration, *Progress in Neurobiology*, 56(4), 385-431, (1998).
  18. FINN D. A., Crabbe J. C., Exploring alcohol withdrawal syndrome, *Alcohol Health & Research World*, 21(2), 149-156, (1997).
  19. FRANK O., Luisada-Opper A., Sorrell M.F., Zetterman R., Baker H., Effects of a single intoxicating dose of ethanol on the vitamin profile of organelles in rat liver and brain. *Journal of Nutrition*. 106:606–14, (1976).
  20. FRIEDMAN H., Mobarhan S., Hupert J., Lucchesi D., Henderson C., Langenberg P., Layden T.J., In vitro stimulation of rat liver retinyl ester hydrolase by ethanol. *Archives of Biochemistry, Biophysic*. 269:69–74, (1989).
  21. GIVENS B., Williams J.M., Gill T.M., Septohippocampal pathway as a site for the memory-impairing effects of ethanol, *Hippocampus*, 10(1), 111-21, (2000).
  22. GLUE P., Nutt D., Overexcitement and disinhibition: Dynamic neurotransmitter interactions in alcohol withdrawal, *British Journal of Psychiatry*, 157, 491-9, (1990).
  23. GOLDSTEIN D. B., The effects of drugs on membrane fluidity, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 24, 43–64, (1984).
  24. GONZALES R., Bungay P. M., Kilanmaa K., Samson H. H., Rossetti Z. L., In vivo links between neurochemistry and behavioral effects of ethanol, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 20(8 Suppl), 203A-209A, (1996).
  25. GOODLETT, C. R., Horn K. H., Zhou F. C., Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention, *Experimental Biology and Medicine*, 230(6), 394-406, (2005).
  26. GRUMMER M.A., Langhough R.E., Zachman R.D., Maternal ethanol ingestion effects on fetal rat brain vitamin A as a model for fetal alcohol syndrome. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 17:592–7, (1993).
  27. GUERRI C., Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 22(2), 304-12, (1998).
  28. HARRIS, P. I., Severcan F., FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7:207-21, (1999).
  29. HARRIS R.A., Burnett R., McQuilkin S., McClard A., Simon F.R., Effects of ethanol on membrane order: fluorescence studies, *Annals of New York Academy of Science*, 492, 125-35, (1987).
  30. HENDRIKSON A.W., Maldve R.E., Salinas A.G., Theile J.W., Zhang T.A., Diaz L.M., Morrisett R.A. Aberrant synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors underlies ethanol withdrawal hyperexcitability, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(1), 60-72, (2007).
  31. HRELIA S., Lercker G., Biagi P.L., Bordoni A., Stefanini F., Zunarelli P., Rossi C.A., Effect of ethanol intake on human erythrocyte membrane fluidity and lipid composition, *Biochemistry International*, 12(5),741-50, (1986).
  32. JAKOBSEN R.J, Wasacz F.M., Brasch J.W., Smith K.B., The Relationship of Bound Water to the IR Amide I Bandwidth of Albumin, *Biopolymer*, 25, 639-54, (1986).
  33. JACKSON, M., Ramjiawan, B., Hewko, M., and Mantsch, H. H., Infrared microscopic functional group mapping and spectral clustering analysis of hypercholesterolemia rabbit liver, *Cellular and Molecular Biology*, 44(1):89-98, (1998).

34. JAMIN, N., Dumas, P., Moncuit, J., Fridman, W., Teillaud, J., Carr, L. G., Williams, G. P., Highly resolved chemical imaging of living cells by using synchrotron infrared microspectroscopy, *Applied Biological Sciences*, 95(9):4837-40, (1998).
35. JUNG M.E., Simpkins J.W., Wilson A.M., Downey H.F., Mallet R.T., Intermittent hypoxia conditioning prevents behavioral deficit and brain oxidative stress in ethanol-withdrawn rats, *Journal of Applied Physiology*, 105(2), 510-7, (2008).
36. KANE M.A., Folias A.E., Wang C., Napoli J.L., Ethanol elevates physiological all-trans-retinoic acid levels in select loci through altering retinoid metabolism in multiple loci: a potential mechanism of ethanol toxicity. *FASEB Journal*. 24(3):823-32, (2010).
37. LANE M.A., Bailey S.J., Role of retinoids signaling in the adult brain, *Progressive Neurobiology*, 75, 275-93, (2005).
38. LIU, K.Z., Bose, R., Mantsch, H.H., Infrared spectroscopic study of diabetic platelets, *Vibrational Spectroscopy*, 28(1):131-6, (2002).
39. LYMAN, D.J., and Murray-Wijelath, J., Vascular graft healing: IFTIR analysis of a implant model for studying the healing of a vascular graft. *Journal of Biomedical Material Research (Applied Biomaterials)*, 48(2):172-86, (1999).
40. MANOHARAN, R., Baraga, J. J., Rava, R. P., Dasari, R. R., Fitzmaurice, M., Feld, M. S., Biochemical analysis and mapping of atherosclerotic human artery using FTIR microspectroscopy". *Atherosclerosis*, 103(2):181-93, (1993).
41. MATTHEWS D.B., Morrow A.L., Effects of acute and chronic ethanol exposure on spatial cognitive processing and hippocampal function in the rat, *Hippocampus*, 10(1), 122-30, (2000).
42. MATTHEWS D.B., Silvers J.R., The use of acute ethanol administration as a tool to investigate multiple memory systems, *Neurobiology Learning and Memory*, 82(3), 299-308, (2004).
43. MELCHIOR C. L., Glasky A. J., Ritzmann R. F., "A low dose of ethanol impairs working Memory In Mice In A Win-Shift Foraging Paradigm, *Alcohol*, 10(6), 491-3, (1993).
44. MELIN, A., Perromat, A., Deleris, G., Pharmacologic application of fourier transform IR spectroscopy: In vivo toxicity of carbontetrachloride on rat liver, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 57(3):160-8, (2000).
45. MOLOTKOV A., Duester G., Retinol/ethanol drug interaction during acute ethanol intoxication in mice involves inhibition of retinol metabolism to retinoic acid by alcohol dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 277:22553-7) (2002).
46. MONTOLIU C., Vallés S., Renau-Piqueras J., Guerri C., Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: Effect of chronic alcohol consumption, *Journal of Neurochemistry*, 63(5), 1855-62, (1994).
47. NIXON K., Alcohol and adult neurogenesis: roles in neurodegeneration and recovery in chronic alcoholism, *Hippocampus*. 16(3), 287-95, (2006).
48. PAIVA S.A., Russell R.M., b-Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants, *Review Journal of American Collodial Nutrition*. 18(5):426-33, (1999).
49. PAULA-BARBOSA M. M., Brandao F., Madeira M. D., Cadete-Leite A., Structural changes in the hippocampal formation after long-term alcohol consumption and withdrawal in the rat, *Addiction*, 88(2), 237-47, (1993).
50. PERIS J., Eppler B., Hu M., Walker D. W., Hunter B. E., Mason K., Anderson K. J., Effects of chronic ethanol exposure on GABA receptors and GABAB receptor modulation of 3H-GABA release in the hippocampus, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 21(6), 1047-52, (1997).

51. PHILLIPS S.C., Cragg B.G., Chronic consumption of alcohol by adult mice: effect on hippocampal cells and synapses, *Experimental Neurology*, 80(1), 218-26, (1983).
52. RAMÍREZ-FARÍAS C, Madrigal-Santillán E, Gutiérrez-Salinas J, Rodríguez-Sánchez N, Martínez-Cruz M, Valle-Jones I, Gramlich-Martínez I, Hernández-Ceruelos A, Morales-González JA. Protective effect of some vitamins against the toxic action of ethanol on liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *World Journal of Gastroenterology*. 14(6), 899-907, (2008).
53. RIGAS, B., Morgellot, S., Goldman, I.S., Wong, P.T.T., Human colorectal cancers display abnormal fourier-transform infrared spectra, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, 87(20):8140-4, (1990).
54. ROSENBLUM ER, Gavaler JS, Van Thiel DH., Vitamin A at pharmacologic doses ameliorates the membrane lipid peroxidation injury and testicular atrophy that occurs with chronic alcohol feeding in rats. *Alcohol and Alcoholism*. 22(3), 241-9, (1987).
55. ROSS S.A., McCaferry P.J., Drager U.C., De Luca L.M., Retinoids in embryonal development, *Physiological Reviews*, 80,1021–54, (2000).
56. SALAZAR M., Pariente J.A., Salido G.M., González A., Ethanol induces glutamate secretion by Ca<sup>2+</sup> mobilization and ROS generation in rat hippocampal astrocytes, *Neurochemistry International*, 52(6), 1061-7, (2008).
57. SANTÍN L. J., Rubio S., Begega A., Arias J. L., Effects of chronic alcohol consumption on spatial reference and working memory tasks, *Alcohol*, 20(2),149-59, (2000).
58. SATO M., Lieber C.S., HepatIK vitamin A depletion after chronic ethanol consumption in baboons and rats. *Journal of Nutrition*. 111:2015–23, (1981).
59. SEVERCAN F., Toyran N., Kaptan N., Turan B., Fourier transform infrared study of diabetes on rat liver and heart tissues in the C-H region, *Talanta*, 53, 55-9, (2000).
60. SEVERCAN, F., Kaptan, N., Turan, B., “Fourier transform infrared spectroscopic studies of diabetic rat heart crude membranes”, *Spectroscopy*, 17:569–577. (2003).
61. SHIMIZU K., Matsubara K., Uezono T., Kimura K., Shiono H., Reduced dorsal hippocampal glutamate release significantly correlates with the spatial memory deficits produced by benzodiazepines and ethanol, *Neuroscience*, 83(3), 701-6, (1998).
62. SILVERS J.M., Tokunaga S., Berry R.B., White A.M., Matthews D.B., Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus, *Brain Research Brain Research Reviews*, 43(3), 275-84, (2003).
63. SINCLAIR J.G., Lo G.F., Morphine, but not atropine, blocks nociceptor-driven activity in rat dorsal hippocampal neurones, *Neuroscience Letters*, 68(1), 47-50, (1986).
64. SINET P.M., Heikkila R.E., Cohen G., Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo, *Journal of Neurochemistry*, 34(6), 1421-8, (1988).
65. SMITH, G.C. M., Jackson, S.P., The DNA dependent protein kinase, *Genes & Development*, 13(8):916-34,(1999).
66. STEVENSON JS., Alcohol use, misuse, abuse, and dependence in later adulthood, *Annual Review of Nursing Research*. 23, 245-80, (2005)
67. SUN G. Y., Sun A. Y., Ethanol and membrane lipids, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 9(2), 164-80, (1985).
68. SUN G. Y., Sun A. Y., Ethanol and oxidative mechanisms in the brain, *Journal of Biomedical Science*, 8(1), 37-43, (2001).
69. THINSCHMIDT J. S., Walker D. W., King M. A., Chronic ethanol treatment reduces the magnitude of hippocampal LTD in the adult rat, *Synapse*, 48(4), 189-97, (2003).
70. TAKAHASHI, H., French, S. M., and Wong, P. T. T., Alterations in hepatic lipids and proteins by chronic ethanol intake: A high pressure fourier transform Infrared

- spectroscopic study on alcoholic liver disease in the rat alcohol”, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 15(2):219-23, (1991).
71. TOYRAN N., Zorlu F., Dönmez G., Öge K., Severcan F., Chronic hypoperfusion alters the content and structure of proteins and lipids of rat brain homogenates: A fourier transform infrared spectroscopy study, *European Biophysics Journal*, 33(6), 549–54, (2004).
  72. TSAI G., Coyle J.T., The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism, *Annual review of Medicine*, 49, 173-84, (1998).
  73. UZBAY I. T., Oglesby M. W., Nitric oxide and substance dependence, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(1), 43-52, (2001).
  74. UZBAY I. T., Kayaalp S. O., A modified liquid diet of chronic ethanol administration: Validation by ethanol withdrawal syndrome in rats, *Pharmacological Research*, 31(1), 37-42, (1995).
  75. WALKER D.W., Hunter B.E., Abraham W.C., Neuroanatomical and functional deficits subsequent to chronic ethanol administration in animals, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 5(2), 267-82, (1981).
  76. WEINER J.L., Zhang L., Carlen P.L., Potentiation of GABAA-mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C, *Journal of Pharmacology and Experimental Theratology*, 268(3), 1388-95, (1994).
  77. WHITE A.M., Swartzwelder H.S., Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects, *Annals of New York Academy of Science*, 1021, 206-20, (2004).
  78. WING D.R., Harvey D.J., Hughes J., Dunbar P.G., McPherson K.A., Paton W.D., Effects of chronic ethanol administration on the composition of membrane lipids in the mouse, *Biochemical Pharmacology*, 31(21), 3431-9, (1982).
  79. WOLF G., Tissue-specific increases in endogenous all-trans retinoic acid: possible contributing factor in ethanol toxicity. *Nutrition Reviews*. 68(11):689-92, (2010).
  80. WONG, P.T.T., Wong, R.K., Caputo, T.A., Godwin, T.A., Rigas, B., “Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: Evidence of extensive structural changes during carcinogenesis”, *Proceedings in the National Academy of Science*, 88(24):10988-92, (1991).
  81. WOOD W.G., Lahiri S., Gorka C., Armbrecht H.J., Strong R., In vitro effects of ethanol on erythrocyte membrane fluidity of alcoholic patients: an electron spin resonance study, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 11(4), 332-5, (1987).
  82. WOODALL A.A., Britton G., Jackson M.J., Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica, Biophysica Acta* 1336:575–86, (1997)
  83. YATIN S.M., Varadarajan S., Butterfield, D.A., Vitamin E Prevents Alzheimer's Amyloid beta-Peptide (1-42)-Induced Neuronal Protein Oxidation and Reactive Oxygen Species Production, *Journal of Alzheimers Disease*, 2(2), 123-31, (2000).
  84. ZAIDI S.M.K.R., Banu N., Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain, *Clinica Chimica Acta*, 340, 229–33, (2004).



**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 110S083
<b>Proje Başlığı:</b> Kronik etanol tüketiminin ve etanol yoksunluğunun beyin moleküler yapısında tetiklediği değişimlerin incelenmesi ve bu değişimlere karşı vitamin A takviyesinin koruyucu etkilerinin araştırılması
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Doç. Dr. Havva (Ewa) DOĞRU
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü 06531 Ankara
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/01/2011 – 01/01/2012
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> <p>Mevcut çalışmada etanol tüketiminin ve yoksunluğunun hipokampusun lipid, protein ve nükleik asit yapısında tetiklediği değişiklikler ve bu değişikliklere karşı vitamin A takviyesinin koruyucu etkileri araştırıldı. Üç aylık likit diyetle verilen ancak düşük kan seviyelerine ulaşan etanol alımı ve yoksunluğu lipitleri etkilemezken, proteinlerde ve özellikle nükleik asit yapısında değişimlere yol açtı. Tek başına vitamin A takviyesi hem protein ve nükleik asitleri hem de lipitleri etkiledi. Etanol alımı sırasında ve yoksunluk döneminde verilen vitamin A protein stabilizesini arttırdı ve nükleik asit yapısını korudu.</p>
<b>Anahtar Kelimeler:</b> akut/kronik etanol alımı, etanol yoksunluğu, vitamin A, sıçan, hipokampus,FT-IR spektroskopisi
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> <small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small>
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> Bu projeden henüz yayın yapılmadı.