



**GEBELİK SÜRESİNCE VE DOĞUM SONRASINDA AKRİLAMİD
UYGULANAN RAT YAVRULARINDA, AKRİLAMİD'İN MİYELİN
SENTEZ VE GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ VE E VİTAMİNİNİN KORUYUCU ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Muhammed Mehdi ÜREMİŞ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

Doktora Tezi – 2022

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEBELİK SÜRESİNCE VE DOĞUM SONRASINDA AKRİLAMİD
UYGULANAN RAT YAVRULARINDA, AKRİLAMİD'İN MİYELİN SENTEZ
VE GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ VE E
VİTAMİNİNİN KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Muhammed Mehdi ÜREMİŞ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
TDK-2019-1948 Proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA
2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Akrilamid'in Yapısı ve Özellikleri.....	3
2.2. Akrilamid'in Metabolizması.....	8
2.2.1. Emilim ve Biyoyararlanım	8
2.2.2. Biyotransformasyon.....	9
2.3. Akrilamid'in Maternal ve Yavrular Üzerindeki Etkileri	12
2.4. Akrilamid ve Nörotoksisite	14
2.4.1. İnsan Nörotoksisitesi Üzerine Kohort Araştırmalar	14
2.4.2. Aksonal Dejenerasyon	14
2.4.3. Nörotoksisitede Oksidatif Stresin Rolü	15
2.5. E Vitamini.....	17
2.5.1. E Vitamininin Yapısı	17
2.5.2. E Vitamininin Antioksidan Aktivitesi	18
2.5.3. Nörodejeneratif Hastalıklarda E Vitamininin Etkileri.....	19
2.6. Miyelin, Miyelinizasyon, Demiyelinizasyon ve Multiple Skleroz.....	21
2.6.1. Miyelinin bileşimi ve yapısı	21
2.6.2. Oligodendrosit Progenitör Hücreleri (OPC) ve Gelişmekte Olan Oligodendrositler	22
2.6.3. Aksonların Miyelinasyonu	27

2.6.4.	Miyelin Yıkımı	29
2.6.5.	Remiyelinizasyon Süreci	30
2.6.6.	Multiple Sclerosis	30
2.6.7.	MS’de Miyelin Patolojisi.....	31
2.6.8.	MS Biyokimyası	32
3.	MATERYAL VE METOT	34
3.1.	Deney Hayvanı Temini.....	34
3.2.	Deney Gruplarının Oluşturulması ve Çalışma Protokolü.....	34
3.3.	Akrilamid ve E Vitamini Uygulama Yöntemi.....	36
3.4.	CRL Mesafesi, Fetus ve Beyin Ağırlıklarının Ölçümü	37
3.5.	Rat Canlı Ağırlıkları, Su ve Yem Tüketimlerinin Takibi	37
3.6.	Water Maze testi	37
3.7.	Numunelerin Alınması, Tartılması ve Analizlere Hazırlık İşlemleri	38
3.8.	mRNA Düzeylerinin qRT-PCR İle Analizi.....	38
3.8.1.	Beyin Dokularından RNA Saflaştırılması	38
3.8.2.	cDNA Sentez Protokolü	38
3.8.3.	cDNA’ların Çoğaltılma Protokolü.....	39
3.9.	Western Blot Analizi	40
3.9.1.	Numunenin Hazırlanışı.....	40
3.9.2.	Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması	40
3.9.3.	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) Jelin Hazırlanması.....	40
3.9.4.	Elektroforetik Yürütme.....	41
3.9.5.	Proteinlerin Membrana Transferi	42
3.9.6.	Bloklama.....	42
3.9.7.	Primer Antikor ile İnkübasyon	42
3.9.8.	Sekonder Antikor ile İnkübasyon	42

3.9.9.	Görüntüleme ve Dansitometrik Analiz.....	42
3.10.	Histopatolojik İnceleme Yöntemi.....	43
3.10.1.	Histolojik Doku Takibi.....	43
3.10.2.	Histomorfometrik ve Histopatolojik Analizler.....	43
3.10.3.	İmmünohistokimyasal Analizler.....	45
3.10.4.	Transmisyon Elektron Mikroskopik İnceleme	46
3.11.	İstatistiksel Analiz	46
4.	BULGULAR	47
4.1.	CRL Mesafesi, Fetus ve Beyin Ağırlıkları	47
4.2.	Ratların Canlı Ağırlıkları, Su ve Yem Tüketimleri	48
4.3.	Water Maze Bilişsel Fonksiyon Testi.....	50
4.4.	qRT-PCR ile mRNA Düzeylerinin Analiz Sonuçları.....	54
4.5.	Beyin Dokusu Western-Blot Analiz Sonuçları.....	57
4.5.1.	Fetus Beyninde Ölçülen Protein Düzeyleri	58
4.5.2.	Dişi Rat Beyninde Ölçülen Protein Düzeyleri.....	59
4.5.3.	Erkek Rat Beyninde Ölçülen Protein Düzeyleri.....	60
4.6.	Histomorfometrik, Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular	62
4.6.1.	Beyin Korteks Hücreleri Nükleus Heterokromazisi.....	62
4.6.2.	Korteks Çapı Ölçümleri.....	64
4.6.3.	MBP İmmünoreaktivitesi	65
4.6.4.	MOG İmmünoreaktivitesi.....	67
4.6.5.	BDNF İmmünoreaktivitesi	69
4.7.	Transmisyon Elektron Mikroskopik (TEM) İnceleme Sonuçları.....	72
4.7.1.	Fetus Beyin Dokusunun TEM İncelemesi.....	72
4.7.2.	Dişi ve Erkek Beyin Dokusunun TEM İncelemesi	76
5.	TARTIŞMA.....	85
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	95

KAYNAKLAR	97
EKLER	131
EK-1. Özgeçmiş.....	131
EK-2. Etik Kurul Onay Belgesi	132



TEŞEKKÜR

Doktora eğitim hayatım boyunca bilgi, tecrübelerini aktaran ve desteğini eksik etmeyen danışman hocam Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e çok teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde çok emeği ve fedakârlığı olan annem, babam ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Kendisini tanıdığım günden bu yana hem çalışma arkadaşı olarak hem de hayat arkadaşı olarak her türlü desteğini gördüğüm ve yanımda hissettiğim kıymetli eşim Nuray ÜREMİŞ'e ve neşe kaynağım, yüzümdeki gülümsemem biricik kızım Zeynep Sena ÜREMİŞ'e teşekkür ederim.

ÖZET

Gebelik Süresince ve Doğum Sonrasında Akrilamid Uygulanan Rat Yavrularında, Akrilamid'in Miyelin Sentez ve Gelişimi Üzerindeki Toksik Etkilerinin İncelenmesi ve E Vitamininin Koruyucu Rolünün Araştırılması

Amaç: Akrilamid (AKR) suda çözünen, renksiz ve kokusuz kristal bir maddedir. AKR, önemli bir endüstriyel materyal olmasının yanı sıra kızartılmış ve fırınlanmış karbonhidrat açısından zengin gıdalarda bulunmaktadır. AKR, nöropatiye neden olan klasik bir aksonal toksik madde olarak bilinmektedir. E-vitamini ise, beyni oksidatif hasardan koruyan, yağda çözünen en önemli antioksidan vitamin olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, AKR'nin beyindeki miyelin gelişimine etkisinin moleküler düzeyde ortaya çıkarılması ve bu toksik etkiye E vitamininin nasıl etki ettiğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmaya 40 gebe rat 4 gruba ayrılarak başlandı ve laktasyon sonrası her gruptan alınan 10 yavru rat ile araştırmaya devam edildi. 40 yavru sıçan, Kontrol, E vitamini, AKR, AKR + E vitamini gruplarına ayrıldı. AKR uygulamasını takiben, bilişsel fonksiyonu değerlendirmek için Water Maze testi uygulandı. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon seviyesini değerlendirmek için MBP, MAG, MOG ve BDNF, pro-BDNF proteinlerinin Western blot analizleri yapıldı. MBP, MAG, MOG ve BDNF'nin mRNA seviyeleri RT-PCR yoluyla belirlendi. Ayrıca MBP, MOG ve BDNF'nin immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik analizleri yapılarak miyelin ve glia hücrelerinin dejenerasyonu incelendi.

Bulgular: Analiz sonuçları, AKR uygulaması miyelinle ilişkili olan MBP, MAG, MOG, BDNF ve pro-BDNF protein ve gen ekspresyonlarını azaltmıştır. Elde edilen bulgular histopatolojik, immünohistokimyasal ve mikroskopik incelemelerle doğrulanmıştır. E vitamini uygulaması ise, AKR'nin bu olumsuz etkisini iyileştirmiştir.

Sonuç: AKR'nin, gestasyon, laktasyon ve laktasyon sonrası dönemde demiyelinizasyona sebep olarak miyelinle ilişkili nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynayabileceği görülmüştür. Ayrıca, E vitamininin ise AKR kaynaklı bu toksisiteye karşı güçlü nöroprotektif bir vitamin olarak miyelinizasyonu desteklediği anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Akrilamid, beyin, nörodejenerasyon, miyelin, E vitamini.

ABSTRACT

Investigation of the Toxic Effects of Acrylamide on Myelination During Pregnancy and Postpartum Period in Rats and The Protective Role of Vitamin E

Aim: Acrylamide (ACR) is a water-soluble, colorless, and odorless crystalline substance. In addition to being an important industrial material, ACR is found in fried and baked carbohydrate-rich foods. ACR is known as a classic axonal toxicant that causes neuropathy. Vitamin E is considered the most important fat-soluble antioxidant vitamin that protects the brain from oxidative damage. In this study, it was aimed to reveal the effect of ACR on the development of myelin in the brain at the molecular level and to examine how vitamin E affects this toxic effect.

Material and Method: The study was started by dividing 40 pregnant rats into 4 groups and after lactation, the study was continued with 10 offspring rat from each group. 40 offspring rats were equally divided into Control, Vitamin E, ACR, ACR + Vitamin E groups. Following the ACR administration, Water Maze test was applied to evaluate cognitive function. To evaluate the level of demyelination and remyelination, Western blot analyzes of MBP, MAG, MOG and BDNF, pro-BDNF proteins were performed. The mRNA levels of MBP, MAG, MOG and BDNF were determined by RT-PCR. In addition, the degeneration of myelin and glial cells was examined by immunohistochemistry and electron microscopic analysis.

Results: Analysis results showed that ACR administration decreased protein and gene expressions of myelin-related proteins MBP, MAG, MOG, BDNF, and pro-BDNF. The findings were confirmed by histopathological, immunohistochemical, and microscopic examinations. The application of vitamin E improved this negative effect of ACR.

Conclusion: It has been observed that ACR may play a role in the pathogenesis of myelin-related neurodegenerative diseases by causing demyelination during gestation, lactation, and post-lactation. In addition, it has been understood that vitamin E supports myelination as a strong neuroprotective vitamin against this toxicity caused by ACR.

Key words: Acrylamide, brain, neurodegeneration, myelin, vitamin E.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKR, ACR	: Akrilamid
MBP	: Myelin basic protein
MAG	: Miyelin ilişkili glikoprotein
MOG	: Miyelin oligodendrosit glikoprotein
BDNF	: Beyin kökenli nörotrofik faktör
pro-BDNF	: pro-Beyin kökenli nörotrofik faktör
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
GLS	: Glisidamid
AAMA	: <i>N</i> -asetil- <i>S</i> -(2-karbamoiletıl)- <i>L</i> -sistein
GAMA	: <i>N</i> -asetil- <i>S</i> -(2-karbamoil-2-hidroksietıl)- <i>L</i> -sistein
Hb	: Hemoglobin
GFAP	: Glial fibril asidik protein
MSS	: Merkezi sinir sistemi
PSS	: Periferik sinir sistemi
MS	: Multiple skleroz
Vit E	: E vitamini
GSH	: Redükte Glutasyon
OPC	: Oligodendrosit progenitör hücre
PLP	: Proteolipid protein
EAE	: Deneysel otoimmün ensefalomiyeli
CRL	: Tepe Oturma Noktası Ölçümü
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon assay tamponu
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
BSA	: Sığır serum albümini

SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
APS	: Amonyum per sülfat
TBS	: Tris-buffered saline
TBST	: Tris-buffered saline with Tween-20
RT-PCR	: Real-time reverse transcription–polymerase chain reaction
mRNA	: Mesajcı RNA
PDGF	: Platelet kökenli büyüme faktörü
PDGFR	: Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Akrilamid oluşumunun mekanizması (32).....	6
Şekil 2. Akrilamidin emilimi ve atılımının şematik bir diyagramı (44).....	9
Şekil 3. Akrilamid'in biyotransformasyonu (60)	10
Şekil 4. Akrilamid kaynaklı nörotoksisitede oksidatif stresin rolü (90).....	17
Şekil 5. E Vitamininin yapıları	18
Şekil 6. E Vitamininin antioksidan etki ağı (110)	19
Şekil 7. NPC'den, miyelinleştirici OL'ye kadar farklı gelişim aşamalarına özgü oligodendroglial belirteçlerinin şematik gösterimi (174)	25
Şekil 8. Miyelinizasyondan remiyelinizasyona oligodendrositler (174)	28
Şekil 9. Demiyelinizasyon sürecinin özellikleri (227)	29
Şekil 10. Multipl skleroz fokal lezyon patolojisi (243).....	32
Şekil 11. Proteinlerin poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü (250).....	33
Şekil 12. Deney hayvanı araştırma grupları	34
Şekil 13. Çalışma dizaynı	36
Şekil 14. Korteks çapı ölçümü.....	44
Şekil 15. Fetus ağırlıkları ve CRL mesafesinin grafiksel gösterimi.....	47
Şekil 16. Ratların beyin ağırlıklarının grafiksel gösterimi	48
Şekil 17. Ratların canlı ağırlıklarının haftalık takip grafikleri	49
Şekil 18. Ratların yem tüketimlerinin haftalık takip grafikleri	49
Şekil 19. Ratların su tüketimlerinin haftalık takip grafikleri.....	50
Şekil 20. Water maze testinde ratların platformu bulma süreleri	50
Şekil 21. Water maze testinde ratların hedef kuadrantta geçirdikleri süreler.....	51
Şekil 22. Water Maze testinde dişi ve erkek ratların ortalama yüzme hızları	52
Şekil 23. Water Maze testinde ratların tüm kuadrantlarda yüzme süreleri	53
Şekil 24. Water Maze testinde ratların 5. gün toplam katettikleri yol.....	53
Şekil 25. Dişi beyin dokularından saflaştırılan RNA'ların elektroforegramı.....	54
Şekil 26. Erkek beyin dokularından saflaştırılan RNA'ların elektroforegramı.....	54
Şekil 27. β -aktin ve MBP, MAG, MOG, BDNF mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların qRT-PCR ile total çoğalım eğrisi.....	55
Şekil 28. Dişi beyin dokusunda β -aktin ve MBP, MAG, MOG, BDNF cDNA'larının RT-PCR'daki çoğalımının elektroforegram görüntüsü.....	55

Şekil 29. Erkek beyin dokusunda β -aktin ve MBP, MAG, MOG, BDNF cDNA'larının RT-PCR'daki çoğalımının elektroforegram görüntüsü	56
Şekil 30. Dişi ve Erkek yavru rat gruplarında hesaplanan mRNA düzeyleri	57
Şekil 31. Fetus beyin dokusunda elde edilen Western Blot band görüntüleri	58
Şekil 32. Dişi rat beyin dokusunda elde edilen Western Blot band görüntüleri	60
Şekil 33. Erkek rat beyin dokusunda elde edilen Western Blot band görüntüleri	61
Şekil 34. Beyin nükleus heterokromazisi skorlama verileri	62
Şekil 35. Fetus beyin korteksi nükleus heterokromazisi	63
Şekil 36. Erkek beyin korteksi nükleus heterokromazisi	63
Şekil 37. Dişi beyin korteksi nükleus heterokromazisi	64
Şekil 38. Beyin korteks çapı ölçümleri	65
Şekil 39. MBP İmmünoaktivite H-skoru	66
Şekil 40. Erkek rat beyin dokusu MBP immünoaktivitesi	66
Şekil 41. Dişi rat beyin dokusu MBP immünoaktivitesi	67
Şekil 42. MOG immünoaktivite H-skoru	68
Şekil 43. Erkek rat beyin dokusu MOG immünoaktivitesi	68
Şekil 44. Dişi rat beyin dokusu MOG immünoaktivitesi	69
Şekil 45. BDNF immünoaktivite H-skoru	70
Şekil 46. Fetus beyin dokusu BDNF immünoaktivitesi	70
Şekil 47. Erkek rat beyin dokusu BDNF immünoaktivitesi	71
Şekil 48. Dişi rat beyin dokusu BDNF immünoaktivitesi	71
Şekil 49. Kontrol grubu fetus beyin dokusu TEM görüntüleri	73
Şekil 50. E vitamini grubu fetus beyin dokusu TEM görüntüleri	74
Şekil 51. AKR grubu fetus beyin dokusu TEM görüntüleri	75
Şekil 52. AKR + E vitamini grubu fetus beyin dokusu TEM görüntüleri	76
Şekil 53. Kontrol grubu dişi beyin dokusu TEM görüntüleri	77
Şekil 54. Kontrol grubu erkek beyin dokusu TEM görüntüleri	78
Şekil 55. E vitamini grubu dişi beyin dokusu TEM görüntüleri	79
Şekil 56. E vitamini grubu erkek beyin dokusu TEM görüntüleri	80
Şekil 57. AKR grubu dişi beyin dokusu TEM görüntüleri	81
Şekil 58. AKR grubu erkek beyin dokusu TEM görüntüleri	82
Şekil 59. AKR + E vitamini grubu dişi beyin dokusu TEM görüntüleri	83
Şekil 60. AKR + E vitamini grubu erkek beyin dokusu TEM görüntüleri	84

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1. Çeşitli gıda ürünlerindeki akrilamid içeriği ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (29)	7
Tablo 2. İnsanlarda 24 saatte atılan idrar metabolitleri (44)	11
Tablo 3. E Vitamini türevlerinin bazı biyolojik özellikleri (125)	21
Tablo 4. MBP, MAG, MOG, BDNF ve β -Aktin Primerlerinin Dizilimleri.....	39
Tablo 5. Ayrırma ve Stoklama Jeli Karışım Kompozisyonu	41
Tablo 6. Histolojik doku takibi prosedürü	43
Tablo 7. Hematoksilen eozin (HE) boyama prosedürü.....	44
Tablo 8. İmmünohistokimya boyama prosedürü	45



1. GİRİŞ

Akrilamid (AKR) suda çözünen, renksiz ve kokusuz kristal bir maddedir. AKR ve yüksek polimeri poliakrilamid, önemli bir endüstriyel materyal olarak 1950'lerden beri çeşitli ticari uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda ambalajlarında, toprak gübrelerinde, tütün ve plastik endüstrisinde, atık su arıtımında ve içme suyu topaklaştırıcılarında olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır (1). İsveçli araştırmacılar ilk kez 2002'de, AKR'nin kızartılmış ve fırınlanmış karbonhidrat açısından zengin gıdalarda varlığını rapor ettiler ve AKR'nin, yüksek sıcaklıkta pişirme işlemi sırasında indirgeyici şekerler ve bazı amino asitler arasında Maillard reaksiyonu ile üretildiğini belirttiler (2). AKR, kızarmış patates, patates cipsi, çikolata, mısır gevreği, ekmek, bisküvi ve kahve ürünleri dahil olmak üzere birçok gıdada bulunmaktadır (2). Batı ülkelerindeki insanların toplam günlük enerji alımının üçte birinden fazlasının AKR açısından zengin gıdalardan sağlandığı rapor edilmiştir (3). Ayrıca, 2015 yılında, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), günlük ortalama diyetle AKR maruziyetini 0.4 ila 1.9 µg/kg vücut ağırlığı arasında tahmin etmiştir. Bu maruz kalma sınırlarının hayvan kanıtlarına dayalı olarak neoplastik etkiler açısından endişe verici olduğu belirtilmiştir. Araştırmaya göre AKR, katı kahve, patates kızartması ürünlerinde en yüksek seviyelerde ve tahıl bazlı gıdalarda ise düşük seviyelerde bulunmuştur. Çalışmaya göre, diyetle AKR alımında en büyük kaynağı genellikle patates kızartması ürünleri oluşturmaktadır (4).

Önceki hayvan araştırmaları, AKR'nin toksik etkilerinin nörotoksisite, hepatotoksisite, üreme toksisitesi, genotoksisite ve karsinogenisiteyi içerdiğini göstermiştir (5–7). Oral olarak uygulanan AKR hızla ve geniş ölçüde emilir. Beyin, vücutta AKR dağılımının en yüksek olduğu organlardan birisidir. İntraperitoneal enjeksiyon veya oral uygulama ile AKR'nin çoğu, karaciğerde sitokrom P450-2E1 tarafından glisidamide metabolize edilir (8). Kanıtlar, glisidamit'in genel olarak AKR için bildirilenlere benzer miktarda nörotoksisite sergileyebileceğini göstermiştir (9). AKR, deney hayvanlarında periferik nöropatiye neden olan klasik bir aksonal toksik madde olarak bilinmektedir. Uzun yıllardır çok sayıda araştırmada, yüksek doz ve kısa süreli AKR maruziyeti kaynaklı periferik motor sinir hasarının mekanizmalarına odaklanılmıştır (10,11).

Miyelin, sinir liflerinin iletim hızını artıran ve hızlı saltatör iletimi (uyarının bir Ranvier düğümünden diğerine atlaması) için temel olan elektriksel bir yalıtıktır (12). Myelin Basic Protein (MBP), miyelin kılıfının, negatif yüklü lipitler içeren kompleksler oluşturarak stabilize edilmesine yardımcı olur. Miyelinle ilişkili proteinler, miyelin membranlarında bulunan hidrofilik proteinlerdir (13). Oligodendroglia ve beyaz maddenin enflamatuvar hasara uğraması Multipl Skleroz gibi demiyelinizan hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır (12). AKR, demiyelinizasyon ile sonuçlanan aksonal membrana zarar verebilmektedir (14). Farklı çalışmalardan elde edilen veriler, AKR'nin MBP içeriğinde azalmaya yol açtığını göstermiştir (15,16).

E-vitamini, beyni oksidatif hasardan koruyan en önemli yağda çözünen antioksidan vitamin olarak kabul edilir. Birçok araştırmada E vitamininin nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (17,18). E vitamini hücre membranına etki eder ve membran stabilitesini bozabilecek bileşikler etkisiz hale getirme yeteneğine sahiptir (19). E vitamini, otofaji ve nöronal ölümü azaltmaktadır (20), sitokrom oksidaz fonksiyon bozukluğunu engellemektedir, nöronal hasar şiddetinin azalmasını sağlayan antiapoptotik Bcl-2 geninin ekspresyon düzeyini artırmaktadır ve bunların yanı sıra yüksek enerjili fosfat bileşiklerini ve beynin farklı bölgelerinde bulunan NO düzeyini azaltmaktadır (21).

AKR, deney hayvanlarında periferik nöropatiye yol açan aksonal toksik bir madde olarak bilindiğinden, araştırmaların çoğu periferik motor sinir hasarına yoğunlaşsada, merkezi sinir sistemi üzerine de çalışmalar yapılmaktadır. Son zamanlarda birçok araştırma AKR kaynaklı bilişsel azalmayı göstermiştir, ancak ilişkili mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır. AKR kaynaklı nörolojik kusurlar kümülatiftir ve nöronal patofizyolojik hasarlar aşamalı olarak gelişmektedir. Bu çalışmada, gebelik boyunca ve doğum sonrasında AKR'ye subkronik maruz kalan anne ratlarla birlikte, aynı anne ratlara ait yavruların laktasyon sırasında ve laktasyon sonrasında da AKR'ye maruziyetinin miyelin sentezini ve gelişimini nasıl etkilediği, miyelinle ilgili protein ve BDNF düzeylerinde nasıl değişikliklere sebep olduğu incelenmiştir. Ayrıca, bu çalışma ile birlikte AKR'ye maruz kalan fetus ve yavru beyinlerinde oluşabilecek demiyelinizasyona karşı E vitamininin nöroprotektif etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akrilamid'in Yapısı ve Özellikleri

Akrilamid (AKR) ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), 71.08 g/mol moleküler ağırlığa sahip, karbon (%50.69), hidrojen (%7.09), nitrojen (%19.71) ve oksijenden (%22.51) oluşan düşük moleküler organik bir bileşiktir. Bu bileşik polardır ve suda, metanolde ve etanolde iyi çözünür. 1950'den beri endüstriyel ölçekte sentezlenmektedir. Poliakrilamid çeşitli endüstrilerde ve tarımda kullanılmaktadır (22). Önceki yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda toksisitesi doğrulanarak kanıtlanmıştır. Hayvan çalışmalarında (fareler ve sıçanlar) AKR'nin kanser hücrelerinin oluşumunu indüklediği gözlenmiştir (23,24). AKR'nin yalnızca monomer formu toksik etki göstermektedir; polimerize formda insan veya hayvan organizmaları üzerinde hiçbir zararlı etkisi gözlenmemiştir. AKR yutulduktan sonra hızla emilir ve hayvanlarda ve insanlarda tüm vücuda dağılır. Timus, karaciğer, kalp, beyin, böbrekler gibi birçok organda ve hatta insan plasentasında ve anne sütünde bulunabilir, bu nedenle fetusa veya yeni doğan bebeklere kolayca aktarılabilir. AKR, DNA ile düşük reaktivite gösterir ancak, genetik mutasyonlara neden olabilen ve kromozomlara zarar verebilen DNA'ya stabil eklentilere yol açan reaktif bir epoksit metaboliti olan glisidamide metabolize edilir (22,23,25). 1994 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı AKR'yi "potansiyel kanserojen" bir bileşik olarak sınıflandırmıştır (Grup 2A). Avrupa Birliği sınıflandırma sisteminde AKR kanserojen ve mutajen olarak ikinci kategoride yer almaktadır. 2010 yılında, Avrupa Kimyasallar Ajansı AKR'yi çok yüksek endişe arz eden maddeler listesine ekledi (26).

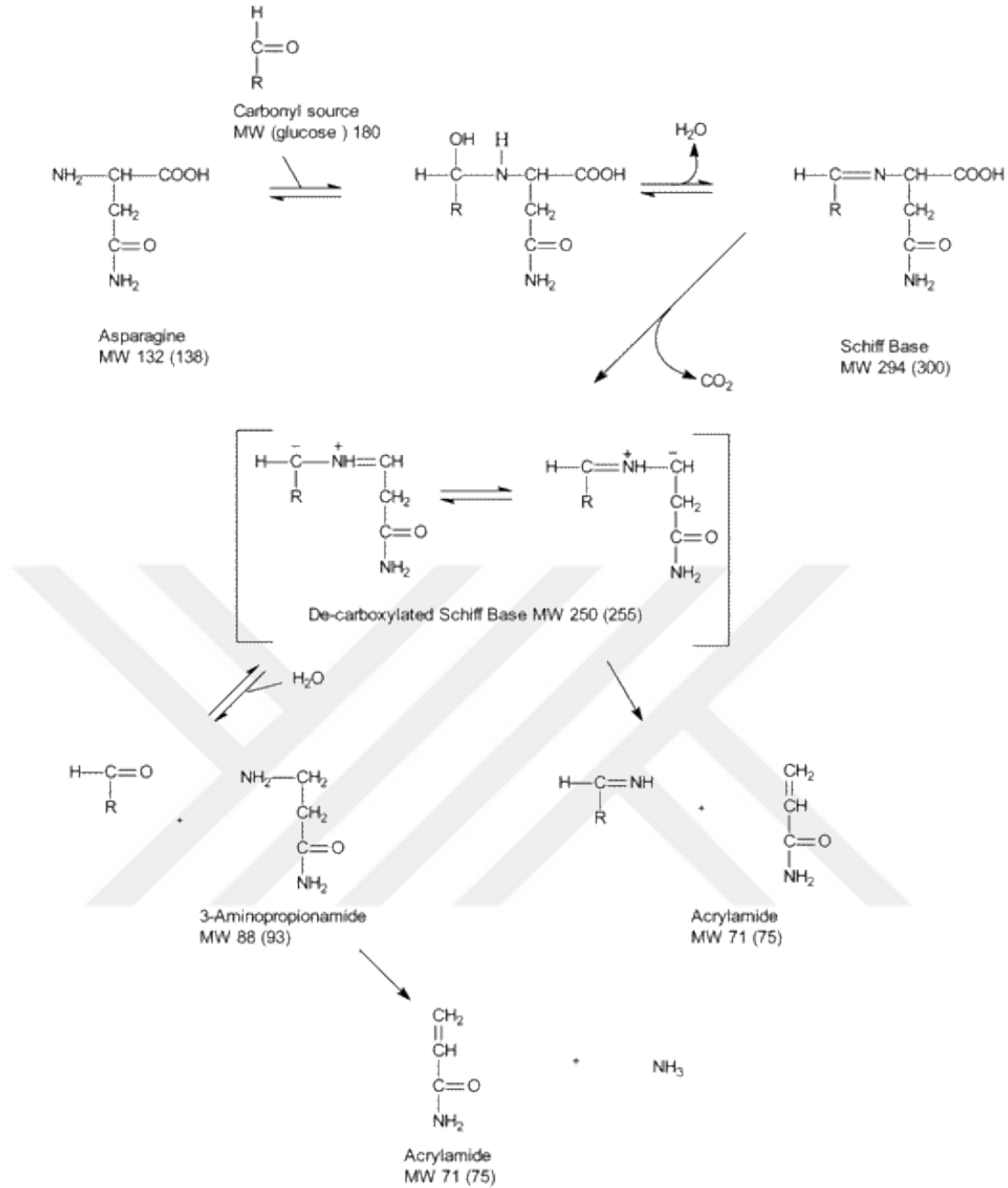
Daha önce AKR'nin sadece kimyasal sentez sonucunda oluştuğu düşünülüyordu. 2002'de, İsveç Devlet Gıda Ajansı ve Stockholm Üniversitesinden araştırmacılar, özellikle yüksek ısı ile işleme tabi tutulan gıdalardaki (30 µg/kg'dan 2300 µg/kg'a kadar) AKR içeriği hakkında şaşırtıcı veriler yayınladılar (26). Aynı yıl, gıdalarda bulunan toksik maddeler listesine AKR de eklendi. Gıdalardaki AKR seviyeleri ve alımları ile ilgili mevcut çalışmalara dayanarak, Dünya Sağlık Örgütü günlük ortalama AKR alımını 0.3–2.0 µg/kg vücut ağırlığı (27), çocuklar için ise bu değerden birkaç kat daha yüksek tahmin etmiştir (28). Bu şaşırtıcı verilerin anlaşılmasından sonra, birçok bilimsel araştırmada, cips, patates cipsi, ekmek, bisküvi, kraker, kurabiye, kahvaltılık tahıllar gibi yüksek sıcaklıkta işlenmiş nişastalı gıdalarda daha yüksek AKR içeriği (yaklaşık 12.000 µg/kg'a kadar) rapor edilmiştir. AKR ayrıca yüksek ısı ile işleme tabi tutulmuş et ve

balıklarda olduğu kadar çeşitli fast food türlerinde ve şekerlemelerde, çikolatada ve tatlı atıştırılmalıklarda, kakao ve bebek yulaf lapalarında da tespit edilmiştir. Kahvede de önemli miktarda AKR içeriği belirlenmiştir (23,29–31).

Gıdalarda AKR oluşumunun ana yolunun Maillard reaksiyonu (32) olduğu kabul edilmektedir (**Şekil 1**). AKR, ısıtılmış gıdalarda, bir amino asidin (asparajin) amino grubu ile şekerin karbonil grubunun kondenzasyonu ile oluşur. Bu reaksiyonun etkisi doğrudan dönüşümle AKR'ye dönüştürülebilir Schiff bazı olan bir ara ürün olabilir veya AKR oluşturabilen bir dizi reaksiyonu içeren aşamaların bir sonucu olabilir (33). Şimdiye kadar yapılan çalışmaların sonuçları AKR oluşum mekanizmasında asparajinin anahtar rolünü doğrulamıştır. AKR'nin karbon iskeletinin asparajinden türetildiğini, işaretli karbon ve nitrojen atomları kullanılarak kütle spektrometrisi ile teyit edilmiştir (34). Ayrıca α -hidroksikarbonil bileşiklerinin, özellikle fruktoz ve glukozun, α -karbonil bileşiklerinden daha reaktif ve asparajini AKR'ye dönüştürmede çok daha etkili olduğu gösterilmiştir. α -Hidroksil grubu, toplam Maillard reaksiyon aktivasyon enerjisinin azalmasının bir sonucu olarak asparajinin parçalanmasında kilit bir rol oynar. İndirgen şeker moleküllerinden türetilen karbon atomları, AKR oluşturmak için değil, sadece asparajinin AKR'ye dönüşümünü desteklemek için kullanılır (35).

Gıdalarda AKR oluşumunun ana belirleyicileri asparajin ve indirgen şekerler veya reaktif karbonlardır. İçerikleri öncelikle gıda ürünlerinin tür ve çeşitlilik özelliklerine, yetiştirme, hasat etme ve depolama yöntemlerine bağlıdır (36,37). Örneğin, buğday ununda AKR oluşumu, kükürt syoksunluğuna ve yüksek miktardaki asparajin seviyesi ile belirlenir. Şeker konsantrasyonunun çok daha düşük olduğu patateslerde AKR ile öncülleri arasındaki ilişkiler daha karmaşıktır. Bununla birlikte, toplam asparajin seviyesinin, Maillard reaksiyonuna katılım için diğer amino asitler ile karşılaştırıldığında AKR oluşumunu belirleyen önemli bir etmen olduğu gösterilmiştir (28,36–38). Ayrıca ürünlerdeki AKR seviyesini etkileyen önemli bir faktör de yüksek sıcaklıktır (özellikle 120°C'nin üzerinde) (38). En yüksek AKR miktarı 160-180°C'nin üzerinde ısıtılan gıdalarda bulunmuştur (29,33). Öte yandan, gıda maddelerinin daha yüksek sıcaklıklarda, özellikle 200 °C'nin üzerinde uzun süreli ısıtılması, AKR'nin bozunmasını sağlayabileceği belirtilmiştir (23). Termal olarak işlenmiş gıdalardaki AKR içeriğini azaltmak için işleme yönteminin dikkatli seçimi, AKR toksisitesinde etkili bir strateji olarak kullanılabilir (33). Ayrıca patates (%10-20) ve tahıl ürünlerinin (%10'dan az) düşük neme sahip olması, bu bileşiğin oluşumunu yoğunlaştırdığı da rapor edilmiştir (39).

Gıdalarda bulunan toplam su miktarı, gıdalardaki AKR içeriğini büyük ölçüde etkiler. AKR'nin su aktivitesi (a_w) 0.4 ile 0.8 arasında olan gıdalarda oluştuğu bilinmektedir. Su aktivitesi <0.4 olduğunda, AKR oluşumu azalmaktadır. Su aktivitesi ve nem içeriği birbirine bağlı iki parametredir, bu nedenle nem içeriği $<5\%$ olan gıdaların Maillard reaksiyonunu takip etmesi ve AKR oluşturması daha olasıdır (40). Ayrıca, gıdalarda en çok pH 6-8 aralığında AKR oluşumu mümkündür (36), bu nedenle işlenmiş gıdaların pH'ındaki bir değişiklik AKR'nin içeriğinde azalmaya veya artmaya yol açabilir. Farklı gıda ürünlerinin besinlere eklenmesinde AKR içeriğinde azalmaya yol açabilir. Örneğin, karabuğday tohumlarından ve filizlerinden elde edilen ekstraktların, ekstrakt türüne bağlı olarak AKR içeriğini %16.7–27.3 oranında azalttığı belirtilmiştir (41). Gıdalarda AKR oluşum mekanizması ve bunu etkileyen faktörler hakkında çok sayıda çalışma ve kapsamlı bilgi bulunmasına rağmen birçok belirsizlik bulunmaktadır (22,23,30,31,37,42).



Şekil 1. Akrlamid oluşumunun mekanizması (32)

Çok sayıda araştırma, gıdalardaki AKR içeriğinin büyük ölçüde farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Gıdalarda AKR'nin genel olarak ortalama 100 µg/kg'dan daha az bulunduğunu ve aşırı yüksek proteinli ürünlerde 10 µg/kg'ın altında, yüksek şeker içeriğine sahip ürünlerde ise 100-4000 g/kg'a kadar değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. AKR'nin en yüksek içeriği patates kızartması ve kavurmasında, kavurulmuş kakao ve kahve ürünlerinde, ekmek ve hamur işlerinde, tahılların ısıl işleme tabi tutulduğu gıdalarda belirlenmiştir (23,29–31,39,43) (**Tablo 1**).

Tablo 1. Çeşitli gıda ürünlerindeki akrilamid içeriği (µg/kg) (29)

Gıda Ürünü (µg/kg)			
Bebek mamaları		Kahve ve kahve bileşenleri (kuru)	
Tahıl bazlı (hazır)	13	Kavrulmuş kahve (kuru)	249
Hızlı tahıl bazlı	345	Hazır kahve (kuru)	710
Şeker çubukları	54	Tahıl bazlı kahve bileşenleri (kuru)	510
Bisküvi	87	Hindiba bazlı kahve bileşenleri (kuru)	2942
Kavanozlu bebek maması	32–47	Patates ürünleri	
Tahıl bazlı yemeye hazır besin	13	Patates kızartması	326–328
Yulaf lapası	29	Patates cipsi	689–693
Yedidoğan karışımları	14	Derin yağda kızartılmış ev yapımı patates ürünleri	234–241
Meyve püresi	22	Fırında pişmiş ev yapımı patates ürünleri	317
Meyve suyu	12	Diğer ürünler	
Ekmek		Kavrulmuş fındık ve çekirdekler	93
Gevrek ekmek	443	Salamura siyah zeytin	454
Yumuşak buğday ekmeği	38	Kuru erik ve hurma	89
Diğer yumuşak ekmekler	57	Toz kırmızı biber	379
Tahıl ürünleri		Balık ve deniz ürünleri	25
Buğday ve çavdar bazlı ürünler	170	Süt ve süt ürünleri	6
Kepekli ve tam tahıllı ürünler	211	Pizza	33
Kraker	231	Yeşil çay, kavrulmuş	306
Bisküvi ve gofret	201	Şeker ve bal	24
Zencefilli çörek	407	Sebzeler	17
Makarna	13	Sebze cipsleri	1846
Bira	14	Kurutulmuş ve işlenmiş meyveler	131
Kakao		Kuru yiyecekler	121
Kakao (% 100 kakao tozu)	347		
Kakao (kakao içeren içecek tozu: şeker ve % 20 kakao tozu)	248		

2.2. Akrilamid'in Metabolizması

AKR, konjuge bir vinil bileşiktir ve bu nedenle biyolojik materyallere karşı oldukça reaktiftir. AKR'deki çift bağ, sisteindeki –SH gruplarına ve proteinlerde/amino asitlerdeki –NH₂ gruplarına karşı güçlü bir ilgiye sahiptir. AKR'nin oksidatif bir metaboliti olan Glisidamid (GLS), DNA'daki amino grupları ve bazlarla daha yüksek oranda olmakla birlikte, epoksit halkası aracılığıyla reaksiyona girer (44).

2.2.1. Emilim ve Biyoyarlanım

Oral biyoyarlanım, oral yoldan verilen dozun sistemik dolaşıma ulaşan kısmı olarak tanımlanabilir. AKR oldukça hidrofilik olduğundan tamamen emilmesi beklenir. Oral olarak uygulanan AKR'nin hem kemirgenlerde hem de insanlarda hızla emildiği bilinmektedir.

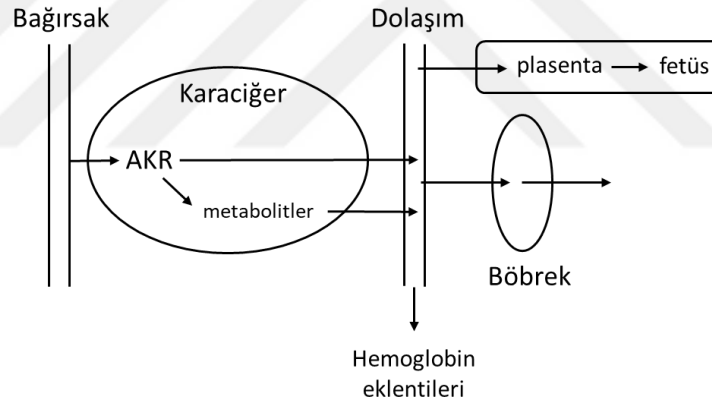
Gavaj ile Fisher-344 ratlara uygulanan 10 mg/kg 2,3-¹⁴C işaretli AKR'nin, yaklaşık %90'ının dokulardan, vücut sıvılarından, idrardan ve dışkıdan geri kazanıldığı gösterilmiştir (45). Başka bir araştırmada, 50 mg/kg 1-¹⁴C işaretli AKR'nin oral yoldan verilmesinden sonra sıçanlarda (Sprague-Dawley) AKR'nin farmakokinetiği araştırılmıştır (46). 5 dakika sonra kanda radyoaktivite tespit edilmiş ve uygulamadan 38 dakika sonra plazma pik konsantrasyonuna ulaşmıştır. Fisher-344 sıçanlarda, AKR'nin gıda ve sulu gavajdaki biyoyarlanımı sırasıyla %32-%44 ve %60-98 olarak tespit edilmiştir (47). B6C3F1 farelerde, AKR biyoyarlanımı diyet ile verildiğinde %23, sulu gavaj ile verildiğinde ise %32-52 olarak bulunmuştur (48). Gıda bileşenlerinde bulunan nükleofilik gruplarla etkileşimi nedeniyle gıdalardan AKR alımı beklendiği gibi daha düşük bulunmuştur. Ek olarak, biyoyarlanımın türler arasında oldukça farklı olduğu belirtilmiştir. Bunun aksine, Bjellaas ve ark. gevrek bisküvi ile beslenen farelerde (C57BL/6JBomTac) AKR biyoyarlanımının yaklaşık olarak tam olduğu bildirmiştir (49). Bu farklılık sadece plazmadaki ana bileşiğin ölçülmesinden ve AKR'nin GLS'ye metabolizmasının hesaba katılmadığından kaynaklandığı öne sürülmüştür (49).

Sorgel ve ark., kraker ve patates ürünleri yiyen insanlarda AKR'nin sindirim sisteminden emildiğini ilk kez göstermiştir (50). Denekler arasında AKR'nin üriner atılımındaki değişkenliğin çok yüksek olduğunu, bunun da oral biyoyarlanımdaki ve/veya hepatik metabolizmadaki farklılıklardan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Boettcher ve ark. erkek bir gönüllüye su içinde 1 mg AKR (13 µg/kg) uygulamışlardır ve iki günde toplam %57 geri kazanım sağlandığını bildirmişlerdir (51). Fennel ve ark. erkek

gönüllülere su içinde 0.5, 1 ve 3 mg/kg dozlarında AKR uygulaması gerçekleştirmişlerdir (52). Geri kazanılan üriner metabolitler, 24 saatte 0.5, 1 ve 3 mg/kg dozlarının sırasıyla yaklaşık %46, %50 ve %40'ını oluşturmuştur. Kopp ve ark. üç erkek ve üç kadın deneye suda 0.5 ve 20 µg/kg ¹³C₃-AKR uygulamışlardır (53). Çalışmaya göre, cinsiyete göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ve 96 saatte her iki dozda da idrar metabolitleri %70'e yakın geri kazanılmıştır. Her iki denek için de serum AKR konsantrasyonunda hızlı bir artış gözlenmiştir.

2.2.2. Biyotransformasyon

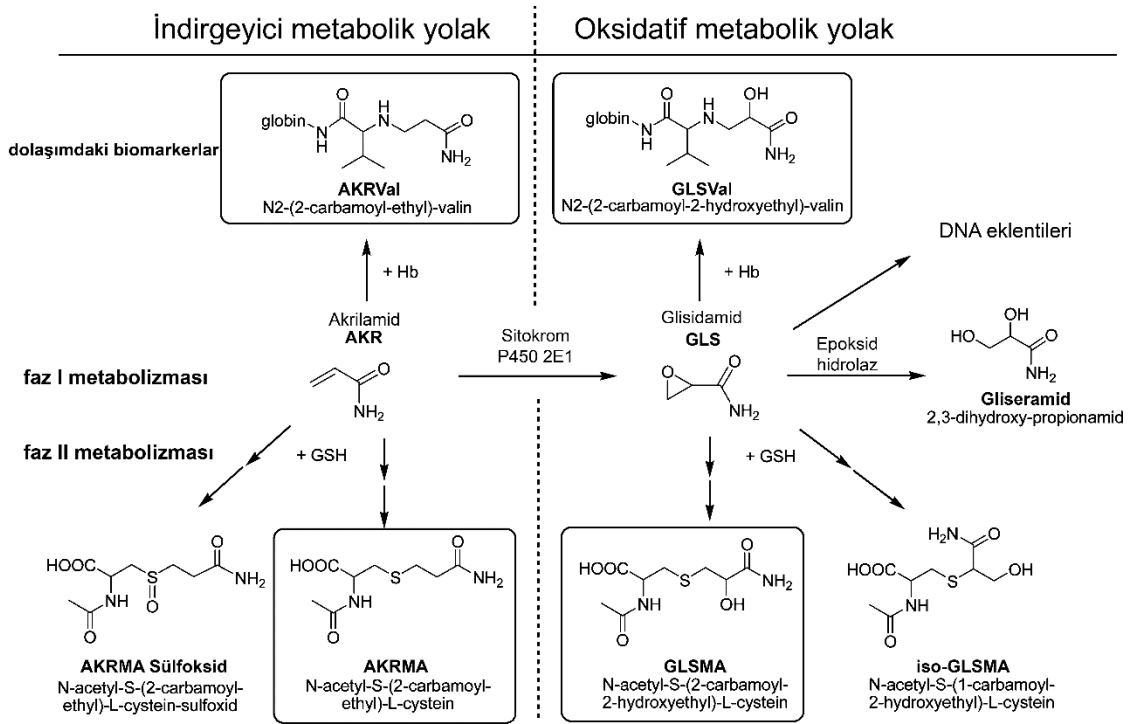
AKR'nin emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımının şematik bir diyagramı **Şekil 2**'de verilmiştir. AKR, tüketildikten sonra hızla emilir ve sistemik dolaşım yoluyla insanlarda tüm dokulara dağılır. İnsan anne sütünde de bulunabilir ve ayrıca insan plasentasına nüfuz eder (50). AKR geniş ölçüde idrarla atılan bir dizi metabolite dönüştürülür. Ayrıca proteinler ve DNA ile etkileşime girerek kovalent eklentili forma dönüşür.



Şekil 2. Akrilamidin emilimi ve atılımının şematik bir diyagramı (44)

AKR biyotransformasyonunun ana yolları **Şekil 3**'te verilmiştir. AKR, kendisini elektrofilik bir bileşik yapan bir amid grubu ile α,β -doymamış bir yapıya sahiptir. Hücresel nükleofiller, AKR'nin çift bağı ile Michael katılma reaksiyonu verir. Bu nükleofiller, sistein, homosistein ve glutatyonun $-SH$ 'ını; serbest amino asitlerin $\alpha-NH_2$ grupları ve proteinlerin N-terminal amino asit rezidülerini, lizinin $\epsilon-NH_2$ 'si ve histidinin halka NH grubunu içermektedir (1). Glutatyon ve proteinlerdeki sülfidril grupları AKR için ana hedeflerdir ve proteinlerde bulunan amino grupları da daha az ölçüde de olsa hedeftirler (28).

AKR, faz I reaksiyonunda sitokrom P450 2E1 tarafından *in vivo* oksidasyon yoluyla, aynı zamanda bir elektrofil olan bir epoksit GLS'ye dönüştürülür (54,55). Bu nedenle, AKR gibi, GLS de sülfhidril ve amino grupları içeren hücresel bileşenlere kovalent olarak bağlanır. Sülfhidril ve amino grupları veya su tarafından saldırı, epoksitin halka açılmasına neden olur. GLS ayrıca bir epoksit hidrolaz tarafından gliseramide (2,3-dihidroksi propionamid) (56,57) hidrolize edilebilir. DNA'daki nükleofilik nitrojenler de özellikle genotoksisiteden sorumlu olduğu düşünülen GLS ile ek ürünler oluşturmaya yatkındır (58,59).



Şekil 3. Akrilamid'in biyotransformasyonu (60)

Kemirgenlerde ve insanlarda ağızdan alınan AKR, faz II reaksiyonunda büyük ölçüde glutatyon ile konjuge olur. Konjugenin bozunması ve asetilasyonundan sonra, elde edilen merkapturik asit *N*-asetil-S-(2-karbamoiletıl)-L-sistein (AKRMA) idrarla atılır. Glutatyon konjugasyonu, hücresel bileşenlere karşı AKR reaktivitesini azaltmak için oldukça önemlidir. İnsanlarda AKRMA, ona karşılık gelen sülfoksite oksitlenebilir (52,53). AKRMA-sülfoksit'in, akroleinden türetilmiş merkaptürik asitler için önerildiği gibi nefrotoksisite veya mesane toksisitesini indükleyebileceği tahmin edilmektedir (53,61).

GLS de glutasyon ile konjuge edilebilir ve merkapturik asitler, *N*-asetil-*S*-(2-karbamoil-2-hidroksietil)-*L*-sistein (GLSMA) ve *N*-asetil-*S*-(1-karbamoil-2-hidroksietil)-*L*-sistein (izo-GLSMA)'ya metabolik dönüşümden sonra idrarla atılır (57). GLS, DNA ve proteinlere karşı AKR'den daha reaktiftir. Ancak AKR'nin GLS'ye dönüşümünün insanlarda kemirgenlere göre daha az önemli olduğu gösterilmiştir (62,63). İdrarla atılan GLSMA miktarı, kemirgenlerde oral dozun yaklaşık %9-29'u kadarını, insanlarda ise %0.7 ile %6 kadarını oluşturduğu belirlenmiştir (**Tablo 2**). GLS'nin hidrolizi, glutasyon konjugasyonunun yanı sıra daha az önemli bir detoksifikasyon yoludur.

Tablo 2. İnsanlarda 24 saatte atılan idrar metabolitleri (44)

Araştırma	AKR	Doz (mg/kg)	İdrarla atılan metabolitler, %						Total %
			AKR	AAMA	AAMA-SO	GLS	GAMA	GAMA /AAM A	
Fennel (62,64)	¹³ C ₃ -AKR	3	TE	22.0 ± 5.30	4.2 ± 1.10	0.79 ± 0.24	TE	–	34.0 ± 5.70
Boettcher (51)	d ₃ -AKR	0.013	TE	45.1	TE	TE	2.8	0.06	47.7
Fennel (52)	¹³ C ₃ -AKR	0.5	4.7 ± 1.34	31.2 ± 6.5	8.3 ± 2.39	0.4 ± 0.20	0.8 ± 0.16	0.03	45.6 ± 8.50
	¹³ C ₃ -AKR	1	5.0 ± 1.65	34.4 ± 5.21	8.7 ± 1.21	0.6 ± 0.33	0.8 ± 0.11	0.03	49.9 ± 6.30
	¹³ C ₃ -AKR	3	3.2 ± 0.49	27.8 ± 7.99	7.3 ± 2.4	0.7 ± 0.33	0.7 ± 0.22	0.03	39.9 ± 9.90
Fuhr (63)	Patates cipsi	0.0124	4.4 ± 1.5	50.0 ± 9.4	TE	TE	5.9 ± 1.2	0.12	60.3 ± 11.2
Kopp (53)	¹³ C ₃ -AKR	0.0005	TE	41.4 ± 3.47	7.2 ± 1.40	TE	3.8 ± 0.78	0.09	52.4 ± 3.59
	¹³ C ₃ -AKR	0.02	TE	37.4 ± 2.92	6.3 ± 1.77	TE	3.2 ± 0.69	0.09	46.9 ± 3.70
Doroshenko (65)	Patates cipsi	0.014	2.9	58	TE	TE	1.4	0.024	63

TE: Tespit edilmedi

Proteinlerdeki birkaç nükleofilik bölge, yukarıda bahsedildiği gibi AKR ve GLS ile eklentiler oluşturur. Albümin ve hemoglobin kandaki en baskın proteinler olduğundan, AKR ve GLS bu proteinlerin reaktif amino asitleri ile kolayca kovalent eklentiler oluşturabilir. Valin, dört globin alt biriminin tümünde hemoglobinin N-terminal amino asit kalıntısıdır. Hemoglobin içindeki N-terminali, özellikle insanlarda birçok elektrofilye için ana reaktif nükleofilik bölge olarak önerilmiştir. Sıçan hemoglobinin aksine, insan hemoglobininde yüksek reaktiviteye sahip sistein yoktur (28). *N*-(2-karbamoiletıl)-valin (AKR-Hb) ve *N*-(2-karbamoil-2-hidroksietıl)-valin (GLS-Hb), hemoglobindeki N-terminal

valin rezidüsüne sırasıyla AKR ve GLS eklenmesiyle oluşturulur (56). AKR ve GLS'nin hemoglobin eklentileri, serbest formlarından ve merkapturik asit türevlerine göre vücutta daha uzun süre kalır. Eritrositlerin ortalama yaşam süresi insanlarda 4 ay iken sıçanlarda sadece 2 aydır. Uzun ömürlü hemoglobin eklentilerinin ölçümleri, zaman ağırlıklı ortalama AKR maruziyetinin bir göstergesidir.

2.3. Akrilamid'in Maternal ve Yavrular Üzerindeki Etkileri

Doğum öncesi gelişim, hücresel düzeyden dokuların, organ sisteminin ve morfolojik yapıların oluşumuna kadar ilerleyen, dikkatle zamanlanmış bir dizi olayla gerçekleşir. Toksik maddelerin erken gelişim döneminde neden olduğu bozukluklar, normal gelişim süreçlerini tamamen değiştirerek fetal organogenezin bozulmasına neden olabilir (66).

Gelişimsel toksikoloji, çevresel toksik maddelerin gelişen organizma üzerinde olumsuz etkiler gösterme yeteneği olarak tanımlanır. Gelişimsel toksisitenin başlıca belirtileri arasında gelişen organizmanın ölümü, malformasyon, büyüme geriliği ve fonksiyonel eksiklik yer almaktadır. Bu olumsuz etkiler, gebe kalmadan önce ebeveynlerden birinin veya her ikisinin, hem doğum öncesi dönemde hem de doğum sonrası süt ile beslenen yavruların olgunlaşma dönemine kadar çeşitli zararlı faktörlere maruziyetinden kaynaklanabilir (66).

Embriyonik gelişimin ilk döneminin, döllenenmeden erken postimplantasyon aşamasına kadar, çevresel ajanların neden olduğu ölümcül etkilere karşı en duyarlı dönem olduğu iyi bilinmektedir. Organogenez dönemi, yoğun hücre çoğalmasını ve doku farklılaşmasını içerir; bu nedenle embriyo, gelişimsel toksik maddelerden kaynaklanan dismorfojeneze çok duyarlıdır ve konjenital malformasyonların çoğu bu dönemde indüklenebilir. Fetal dönemde, çeşitli karmaşık yapısal anormallikler gelişebilir. Bu aşamada indüklenen değişiklikler, büyüme geriliği, gelişimsel gecikme veya işlevsel bozuklukları, özellikle beynin nispeten geç olgunlaştığı nörodavranışsal sorunları kapsayabilir. Gelişimsel bir toksik maddeye maruziyetin dozu veya büyüklüğü, takip eden patogenezi büyük ölçüde etkileyebilir ve çeşitli fetal tepkiler üretmesine sebep olabilir (67).

Maternal hayvan için toksik olmayan bir dozda gelişimsel toksisiteye sebep olan ajanlar özel bir endişe kaynağı olmuştur. Çünkü anne bu dozdan etkilenmezken, gelişmekte olan organizma bu dozdan etkilenmektedir. Ancak, olumsuz gelişimsel

etkilerin yalnızca minimum maternal toksisiteye neden olan dozlarda oluşması daha yaygındır. Bu durumlarda, gelişimsel toksisitenin gelişimsel etkilere sahip olduğu düşünülür (68).

Maternal toksisite, hamile anneler üzerindeki bazı etkilerden dolayı ikincil olarak gelişen organizma üzerinde olumsuz, dolaylı bir etki olarak tanımlanır. Gelişmekte olan bireylerin maruziyeti genellikle plasental transfer veya anne sütü yoluyla ikincildir. Bu nedenle, fetusun veya çocuğun maruziyeti hamile veya emziren bir anne ile aynı olmayabilir ve toksik maddenin anne veya kordon kanındaki ve anne sütündeki düzeyleri, gelişimsel maruziyetin boyutu hakkında iyi bir tahmin sağlayabilir (68).

Fetal malformasyonların, fonksiyonel değişikliklerin ve hatta ölümün, fetus üzerindeki doğrudan etkilerden, dolaylı (maternal aracılı) etkilerden veya ikisinin kombinasyonundan kaynaklanması muhtemeldir. Ayrıca, anne toksisitesi ikincil olsun ya da olmasın, gelişimsel etkiler yavru üzerinde kalıcı olabilirken, annenin bu etkileri tersine çevirmesi mümkündür.

Gebelik öncesi ve utero toksisitesi doğum sonrası yaşamda artabilir. Anne sütünden, yiyeceklerden ve genel çevreden maruziyet, doğum sonrası gelişimsel etkilerle (örneğin, davranışsal ve bilişsel işlevlerdeki değişiklikler veya büyüme) ilişkili olabilir.

AKR, ısıtılmış işlem görmüş gıdalarda oluşması ve yaygın olarak tüketilen gıdalarda yüksek düzeylerinin saptanması nedeniyle son yıllarda medyada ve bilimsel yayınlarda büyük ilgi görmektedir (2,69). Ayrıca, insanlarda ve kemirgenlerde AKR'nin üreme ve gelişimsel toksisitesi rapor edildiğinden, AKR'ye doğum öncesi maruziyet özel bir endişe kaynağıdır (70–72).

AKR'nin nörotoksik, mutajenik ve kanserojen etkilerine ilişkin araştırma çok olmasına rağmen, embriyolojik ve erken doğum sonrası gelişim sırasındaki biyokimyasal ve morfolojik etkilerine ilişkin veriler azdır. Hamile kadınlarda diyetle alınan AKR'nin %10-50'sinin kandan plasenta yoluyla fetusa geçtiğini ve 18.8 µg/L'ye kadarının anne sütünde bulunduğu tespit edilmiştir (50). Suda çözünür AKR ve metaboliti GLS anne sütü yanı sıra plasentadan da geçtiğinden, gebelik ve emzirme döneminde annenin AKR maruziyetinin organogenez ve yavrularda doğum sonrası gelişimi bozduğuna dair artan sayıda kanıt vardır (66).

2.4. Akrilamid ve Nörotoksisite

Deney hayvanlarında yapılan çok sayıda çalışma ve insanlarda yapılan gözlemler, hem periferik hem de merkezi sinir sisteminin AKR toksisitesi için temel hedefler olduğunu göstermektedir.

2.4.1. İnsan Nörotoksisitesi Üzerine Kohort Araştırmalar

AKR maruziyeti, soluma, yutma (diyet) ve cilt emilimi yoluyla gerçekleşikten sonra çeşitli nörolojik semptomlara neden olabilir. Bildirilen nörotoksisite belirtilerinin çeşitliliği, merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS)'nin yanı sıra otonom sinir sistemini kapsamaktadır (73). AKR'nin nörotoksik etkileri hem MSS hem de PSS'de ilerleyicidir ve bu durum hasarın birikim gösterdiğine işaret etmektedir. Bu nedenle, AKR'ye tekrar tekrar maruz kalma, hafif semptomlarla başlayabilir ve geri dönüşü olmayan hasarlarla birlikte ciddi sakatlığa doğru ilerleyebilir (74). Genel popülasyonun aksine, başlıca maruziyet kaynağı diyet iken, işçiler ağırlıklı olarak inhalasyon ve/veya deri yoluyla maruz kalmaktadır.

Literatürde mesleki maruz kalmayı takiben birçok AKR zehirlenme vakası bildirilmiş olmasına rağmen (75), diyetle AKR alımı ve nörolojik semptomlar arasındaki olası ilişki hakkında çok az insan popülasyonu çalışması tanımlanmıştır (76). Bu iki çalışmada bildirilen etkiler, işitme kaybı ve hafif bilişsel gerileme ve olumsuz biliş riskinin artmasını içermektedir.

2.4.2. Aksonal Dejenerasyon

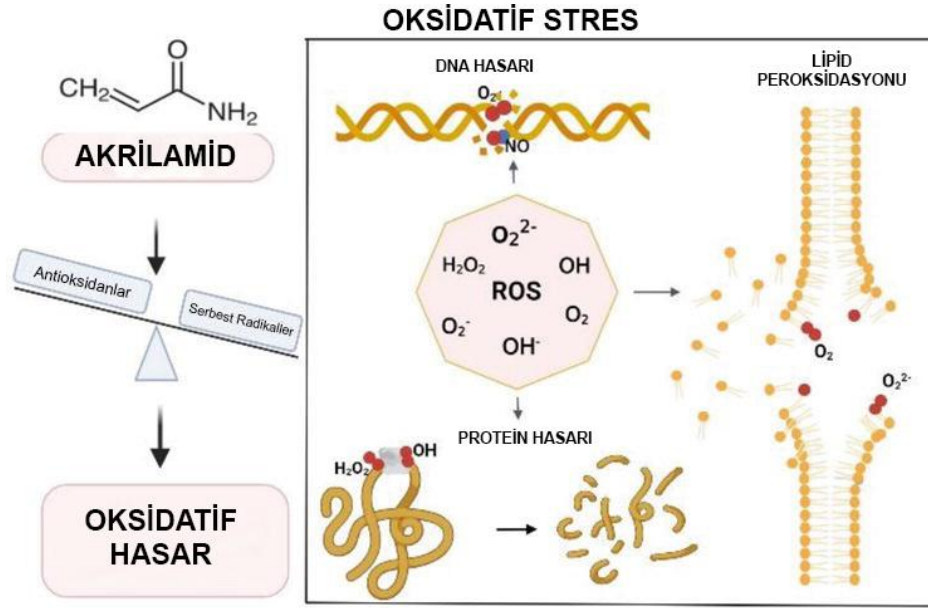
Araştırmalar, AKR kaynaklı nörotoksisitenin, periferik ve merkezi sinir sistemlerinde sinir ucu hasarı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (77). Çalışmalar, AKR'nin β -aktin, β -tubulin ve diğer hücre iskeleti proteinlerini değiştirebildiğini, nöron yapılarını tahrip ederek nörotoksisiteye neden olduğunu göstermiştir. Morfolojik, elektrofizyolojik ve elektrokimyasal araştırmalar, sinir uçlarının AKR toksisitesinin birincil hedefinde yer aldığını göstermektedir (78). Maruz kalma süresi sonrasında, hasar giderek şiddetlenir ve sonunda aksonal dejenerasyona yol açar. Kronik AKR zehirlenmesi, başlangıçta uzun ve büyük sinir liflerinin uçlarında meydana gelen, ardından ilerleyici, sürekli proksimal akson dejenerasyonu olan seçici periferik ve merkezi sinir lifi dejenerasyonuna neden olabilir (79). Daha ileri çalışmalar, AKR'nin aktin, motor proteinler ve diğer nöronal proteinlerin seviyelerini etkileyerek yetersiz ATP temini ile sonuçlanarak aksonal taşıma işlevselliğini bozduğunu göstermektedir (80).

Kütle spektrometrisi ve nükleer manyetik rezonans teknolojisinin gelişmesiyle birlikte araştırmacılar, elektrofilik bir reaktif olarak AKR'nin proteinler üzerindeki sülfidril grubuna hızla saldırabildiğini ve moleküler DNA ile reaksiyona girebildiğini, ek ürün oluşumunun ise nörotoksisitesinin bir nedeni olabileceğini bulmuşlardır (81). Ek olarak, AKR tiyol içeren protein bölgelerine saldırabilir, presinaptik nitrik oksit (NO) sinyal yolunu bozabilir, presinaptik sinir uçlarına zarar verebilir, sinir sinyal iletimini bozabilir ve nörotoksisite üretebilir (82). Ayrıca fosforile Tau aglomerasyonu, hücre iskeleti kararsızlığına ve nöronal işlev bozukluğuna ve hatta ölüme neden olur (83). Araştırmalara göre, AKR, sıçan hipokampusünde Tau tübülün hiperfosforilasyonunu ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) üretimini inhibe ederek sinaptik hasara ve uzamsal bilişsel bozulmaya neden olmaktadır (84). Ayrıca, kronik AKR maruziyeti, dopaminerjik ve asetil kolinerjik nöronlarını önemli ölçüde dejenere ederek motor fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır (85). Kopanska ve ark. kolinerjik anti-inflamatuar yolağın AKR kaynaklı nörotoksisite ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (86). AKR, kolinerjik iletimi ve asetilkolin salgısını azaltarak, kolinerjik anti-inflamatuar yolu inhibe ederek potansiyel bir sistemik inflamatuvar reaksiyona neden olmaktadır (86). Ayrıca, nöron dejenerasyonunun neden olduğu kognitif bozukluğun Alzheimer hastalığının öncüsü olduğu (87), beyindeki dopaminerjik nöronların kaybı ise Parkinson hastalığı ile ilişkili iken, AKR'nin nörodejeneratif hastalıkların patolojik gelişimi için bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir (88).

2.4.3. Nörotoksisitede Oksidatif Stresin Rolü

AKR nörotoksisitesinin temel mekanizması bilinmemektedir, ancak bazı çalışmalar bunu antioksidan kapasitedeki azalma ve inflamatuvar yanıtlarla ilişkilendirmiştir (89). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve antioksidanların üretimi ve uzaklaştırılması arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşan oksidatif stres, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, ataksi, periferik nöropati, amyotrofik lateral skleroz ve multipl skleroz gibi nörolojik bozukluklarda belirgindir (90). Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz (GST), katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler serbest radikallerin etkilerini nötralize eder ancak AKR'nin pro-oksidan etkisi nedeniyle, ROS gibi oksidatif stres belirteçlerini yükselterek ve böylece lipid peroksidasyonunu (LPO) indükleyerek serbest radikallerin üretimi ve uzaklaştırılması arasında bir dengesizliğe neden olacak şekilde bu enzimlerin seviyeleri azalır (91–93) (**Şekil 4**). Diğer birçok ksenobiyotik bileşik gibi, AKR de spesifik kalıntılar

içeren nükleofillerle etkileşime girebilen bir elektrofildir (93). Bisülfid (SH), azanid (NH₂) veya hidroksit (OH) içeren moleküllerle reaksiyona girer. Redükte Glutasyon (GSH), serbest radikal ve ROS süpürücü özelliği ile iyi bilinen bir tiyoldür (89,91,94). Önceki araştırmalar, AKR uygulanan sıçanların beyin dokusunda kontrol grubuna kıyasla önemli bir GSH düşüşüne sahip olduğunu ortaya koymuştur (91,94). GSH seviyelerindeki azalma, biriken ve oksidatif stresi indükleyen ROS seviyelerinde bir artışa neden olur. GSH, peroksit dekompozisyon enzimi GSH-Px için bir koenzim görevi gören enzimatik olmayan bir antioksidandır (89). Çalışmalar ayrıca LPO'da düşük GSH düzeylerinin önemli bir etkisinin olduğunu ileri sürmektedir (95). AKR uygulanan sıçanlarda SOD, CAT ve GSH-Px gibi birinci basamak savunma enzimatik antioksidanları azalmıştır (91,95). GST, serbest radikal dengesini korumak için kullanılan bir antioksidan enzimdir. AKR'nin GST aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir, bu da ACR ve GSH arasındaki S-konjugatlarının sentezinde bir artış olduğunu düşündürmüştür (93). Buna karşılık, bir çalışmada, AKR uygulanan sıçan beyinlerinde GST aktivitesinde bir azalma olduğunu bildirmiştir (95). Çeşitli antioksidan enzim ve moleküllerin düzeylerinde ve aktivitelerinde meydana gelen değişikliklerin bir sonucu olarak, toplam oksidanların ve antioksidanların konsantrasyonu sırasıyla artar ve azalır (90). LPO, protein hasarı ve DNA hasarı, nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stres için biyobelirteçlerdir (96). LPO, lipidlerin serbest radikaller tarafından bozunmasıdır ve onun belirteci olan malondialdehit (MDA) seviyelerinin ölçülmesiyle değerlendirilir. Tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) testi, TBA ile reaksiyona girdiği ve pembe renkli bir kompleks ürettiği MDA'yı ölçmek için kullanılır (97). MDA, LPO'dan üretilen serbest radikaller tarafından oluşturulur ve protein oksidasyonuna neden olur. Bazı deneysel sonuçlar, farelerin AKR'ye maruz bırakılmasının, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında beyinde yüksek MDA içeriğine sahip olduğunu göstermektedir (91,98).



Şekil 4. Akrilamid kaynaklı nörotoksisitede oksidatif stresin rolü (90)

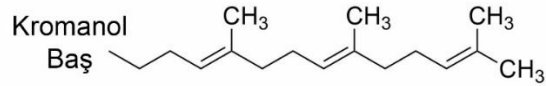
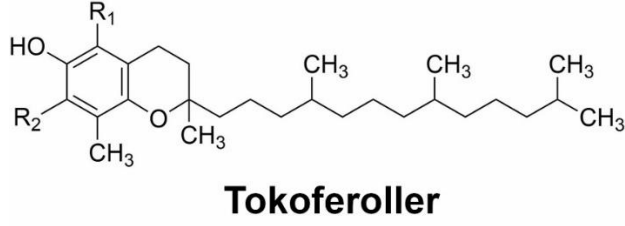
2.5. E Vitamini

E vitamini ilk olarak Amerikalı endokrinolog ve anatomist Herbert M. Evans ve yardımcısı Katherine S. Bishop tarafından keşfedilmiştir (99). E vitamini genellikle antioksidan, antiinflamatuvar ve kolesterol düşürücü gibi sağlık için yararları etkileri ilişkilendirilmektedir. Bu özellikler, uygun bir takviye şeklinde Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda terapötik yaklaşım haline gelmektedir.

2.5.1. E Vitamininin Yapısı

E vitamini ana terimi, bitki kaynaklı, yağda çözünen sekiz bileşiklik (α -, β -, γ -, δ -Tokoferol ve α -, β -, γ -, δ -tokotrienoller) bir aileyi tanımlamak için kullanılır (Şekil 5). Ancak yalnızca α -Tokoferol, eksiklik semptomlarını tersine çevirdiği ve vücut tarafından tercih edilen bir form olduğu esasına dayanır ve insanlar için E vitamini gereksinimlerini karşılamaktadır (100,101). Bununla birlikte, her bir E vitamin formu, kromanol halkası üzerinde 6 pozisyonunda hidrojen atomunu donörü olan bir hidroksil grubuna sahiptir ve böylece yağda çözünen bir antioksidan olarak işlev görmesi sağlanmış olur. E vitamini formları doğada sadece fotosentez yapan organizmalar tarafından sentezlenir; bu nedenle doğal, diyetel E vitamini kaynakları ağırlıklı olarak bitki bazlıdır. İnsan diyetindeki α -Tokoferol'un birincil besin kaynakları, bitkisel yağlar (özellikle kanola ve zeytinyağı), sert kabuklu yemişler (özellikle badem ve fındık),

tohumlar ve yeşil yapraklı sebzeler ile kahvaltı tahılları gibi α -Tokoferol ile güçlendirilmiş besinlerdir (102).



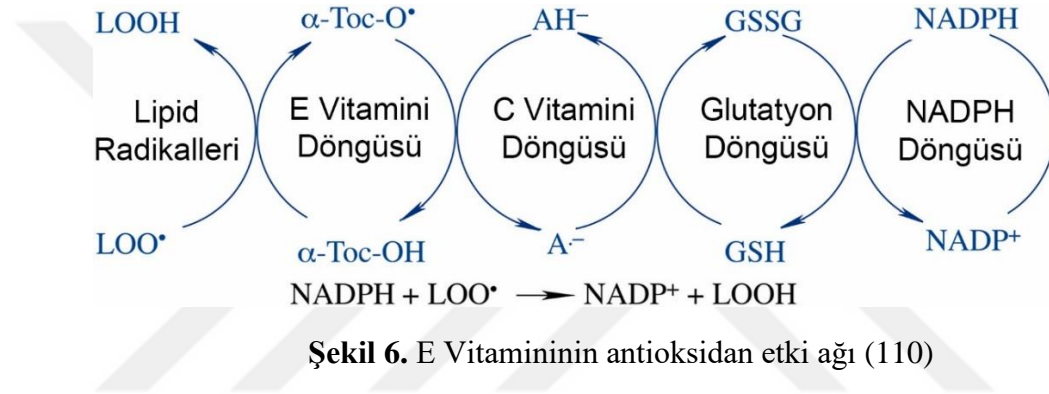
Şekil 5. E Vitamininin yapıları

α -, β -, γ - ve δ -Tokoferoller veya -tokotrienoller, kromanol halkası üzerinde farklı metilasyon modellerine sahiptir. Bu yapılar insanlar veya diğer hayvanlar tarafından birbirine dönüştürülemez (103). Tokoferoller ve tokotrienoller, alifatik yan zincirlerinin 4', 8' ve 12' karbon pozisyonlarındaki doymunluk derecesi ile ayırt edilebilirler; tokotrienollerin tümü doymamıştır. Böylece, Tokoferoller hidrofobik kuyrukta 2, 4' ve 8' konumlarında 3 kiral merkez içerir. α -Tokoferoller kimyasal olarak sentezlendiğinde, kabaca eşmolar konsantrasyonlarda sekiz stereoizomer (*RRR*, *RSR*, *RSS*, *RRS*, *SRR*, *SSR*, *SRS* ve *SSS*) oluşur (104). Doğal olarak meydana gelen Tokoferoller tamamen *RRR*-konformasyonundadır. Önemli olarak, sadece 2 pozisyonundaki R-konformasyonundaki (*2R*- α -Tokoferol, örneğin *RRR*, *RSR*, *RSS*, *RRS*) α -tokoferoller insan vücudu tarafından tercihen tutulur (102).

2.5.2. E Vitamininin Antioksidan Aktivitesi

Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu, karbon merkezli bir radikal ($L\bullet$), moleküler oksijen ile reaksiyona girdiğinde bir peroksil radikali ($LOO\bullet$) oluşturur. Aynı zamanda başka bir karbon merkezli radikal üretilir ($L\bullet$, Şekil 6). Oluşan bu peroksil radikali, membrandaki çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) bir hidrojen (H) çıkarır ve bir lipit hidroperoksit ($LOOH$) oluşturur (105). E Vitamini, lipid hidroperoksit ($LOOH$) ve E Vitamini radikalini ($EVit\bullet$) oluşturmak için hidrojenini $LOO\bullet$ 'ye aktararak

lipidde çözünür, “zincir kırıcı” bir antioksidan görevi görür (106). Böylece E vitamini, $L\bullet$ oluşumunu engelleyerek zincir reaksiyonunun yayılmasını engeller (ancak başlamayı değil), çünkü E Vitamini, $LOO\bullet$ ile PUFA'nın birbirleriyle reaksiyona girmesinden 1000 kat daha hızlı $LOO\bullet$ ile reaksiyona girer (106,107). $EVit\bullet$, askorbik asit (C Vitamini) tarafından indirgenebilir ve askorbik asit serbest radikalini ($A\bullet^-$) oluşturabilir (108). $A\bullet^-$, NADPH'ye bağlı bir reaksiyon olan GSH redüktaz tarafından indirgenebilen GSSG oluşturan glutatyon (GSH) ile indirgenebilir. Ek olarak, glutatyon peroksidaz 4 (GPx4) enzimi, daha kararlı bir lipid alkolü (LOH) oluşturmak için $LOOH$ 'yi indirgemek için GSH kullanır (109). E Vitamininin etkileşimleri **Şekil 6**'da özetlenmiştir (110).



Şekil 6. E Vitamininin antioksidan etki ağı (110)

2.5.3. Nörodejeneratif Hastalıklarda E Vitamininin Etkileri

Yapısal farklılıklar, E vitamini türevleri arasında biyolojik etkinlik açısından değişkenliğe yol açar (**Tablo 3**). Bu farklılıklar, takviyenin hastalıkları iyileştirici ve önleyici etkileri düşünüldüğünde oldukça önemli hale gelmektedir.

α -Tokoferoller, yüksek biyoyararlanımı nedeniyle uzun zamandır bilimsel odakta yer almaktadır (111). Tokoferol'lerin, antioksidan enzimlerin aktivitesini ve serbest radikal süpürücülüğünü artırarak antioksidan etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle serbest radikal zincir reaksiyonlarını kesebilirler. Aromatik halka üzerindeki serbest hidroksil grubu, bu antioksidan özelliklerden sorumludur, çünkü serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptir ve bu da nispeten stabil bir E vitamini radikali ile sonuçlanır. Bu radikal, daha sonra glutatyon tarafından rejenere edilen askorbik asit tarafından indirgenebilir (112).

Antioksidan özellikleri göz önüne alındığında, E vitamini, oksidatif stresin önemli bir patofizyolojik yönlendirici olduğu Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi

nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için dikkat çekici bir terapötik ajan olarak kabul edilmiştir (113,114). Yapısal farklılıklar nedeniyle, Tokotrienler, lipid membranda daha homojen bir şekilde dağıldıkları ve kromanoksil radikallerinden geri dönüşüm daha verimli olduğu için karşılaştırılabilir veya daha belirgin antioksidatif etkiler gösterirler. Böylece membran lipidlerinin daha güçlü düzensizliği nedeniyle daha iyi reaksiyon koşulları sağlarlar (115).

Şimdiye kadar tartışılan E vitamini bileşiklerinin tüm özellikleri, enflamasyonun (116) ve oksidatif stresin (117) nörotoksik potansiyeli nedeniyle dolaylı olarak nöroprotektif olsa da, doğrudan nöroprotektif etkiler de rapor edilmiştir. HT4 hipokampal hücrelerde, glutamat ile indüklenen pp 60 (c-Src) kinaz aktivasyonunu ve dolayısıyla hücre ölümünü α -Tokoferol inhibe edemezken, α -Tokotrien inhibe etmiştir (118). Ayrıca, glutamat ile indüklenen nörodejenerasyona aracılık eden 12-lipoksijenazın α -Tokotrien yoluyla modülasyonu tarif edilmiştir ve α -Tokotrien aracılı nöroproteksiyon için başka bir yol önerilmiştir (119).

65 yaş ve üzeri hastalarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, diyetle yüksek miktarda E vitamini alımının Alzheimer insidansı ile ters orantılı olduğunu bildirmiştir. İlginç bir şekilde, bu etki, tek başına α -Tokoferol'den ziyade E vitamini bileşiklerinin bir kombinasyonu ile daha belirgin olduğu görülmüştür (120). Bununla birlikte, hafif bilişsel bozukluk (MCI) veya Alzheimer olan hastalarda, α -Tokoferol takviyesi ne demansın ilerlemesini azaltmadı ne de bilişsel işlevi iyileştirmediği tespit edilmiştir (121). Parkinson hastalığında, diyetle yüksek miktarda E Vitamini alımı, yaş veya cinsiyetten bağımsız olarak Parkinson hastalığı oluşumu ile ters orantılı olduğu görülmüştür (122). 60 Parkinson hastasıyla yapılan çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, diyetle 1000 mg omega-3-yağ asidi ve 400 IU E Vitamini alımı, Parkinson hastalığı derecelendirmesinde, toplam antioksidan kapasitesinde ve glutatyon konsantrasyonunda bir iyileşmeye yol açmıştır (123). Huntington hastalığı veya amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi diğer nörodejeneratif bozukluklar için E Vitamininin araştırıldığı az sayıda çalışma vardır. Glutamat kapılı iyon kanallarının aşırı aktivasyonunun ardından oksidatif stres yoluyla hücre ölümünün Huntington hastalığı patogenezinin nedeni olduğuna dair kanıtlar vardır (124). Bu nedenle, α -Tokoferoller'in antioksidan özellikleri Huntington hastaları için faydalı olabilir.

Tablo 3. E Vitamini türevlerinin bazı biyolojik özellikleri (125)

E Vitamini	Biyolojik Özelliği
Tokoferoller	Antioksidasyon Kolesterol düşürücü
α -Tokoferol	Anti-enflamasyon
γ -Tokoferol	Anti-enflamasyon Anti-neoplastik
δ -Tokoferol	Anti-neoplastik
Tokotrienoller	Antioksidasyon Kolesterol düşürücü Anti-enflamasyon Anti-neoplastik
α -Tokotrienol	İmmünostimülan Nörokoruyucu
β -Tokotrienol	Nörokoruyucu
γ -Tokotrienol	Nörokoruyucu
δ -Tokotrienol	İmmünostimülan

2.6. Miyelin, Miyelinizasyon, Demiyelinizasyon ve Multiple Skleroz

2.6.1. Miyelinin bileşimi ve yapısı

Miyelin, Merkezi Sinir Sisteminde (MSS) oligodendrositler tarafından üretilen bir membran kılıftır. Aksonu çevreler ve impulsların iletilmesine sağlar (126). Ayrıca miyelin kılıfı aksonu korur ve iç ortam dengesini korumaya yardımcı olur (127). Miyelini yalıtın sinir liflerinin kaybı olarak ifade edilen demiyelinizasyon, iletimi bozar ve aksonun hayatta kalmasını tehlikeye atar (128). Multipl skleroz (MS) ve nöromiyelitis optika tipik demiyelinizan hastalıklardır. Remiyelinizasyonda, yeni miyelin kılıfları oluşturmak için, oligodendrosit öncü hücrelerin (OPC'ler) çoğalması, lezyonlara taşınması ve oligodendrositlere farklılaşması gerekir (129). Ancak bu hastalıklar ilerledikçe remiyelinizasyon süreci genellikle başarısız olur. Bu nedenle, miyelin rejenerasyonunu kolaylaştırmak için yeni yöntemlerin bulunması gerekmektedir.

Miyelinizasyon, lipid ve protein'lerin bileşiminden oluşan oligodendrosit hücreleri ile miyelin kılıfının oluşturulduğu temel bir MSS gelişim sürecidir. Aksonları çevreleyen çok katmanlı MSS miyelin membran kılıfları, yük, lipid içeriği, hidrofiliğe ve bağlı moleküller ağırlığa göre dağılım gösteren lipidler ve proteinlerden oluşur (130). Miyelini diğer biyolojik membranlardan ayıran biyokimyasal özelliklerden biri, yüksek lipid/protein oranıdır. Lipidler, miyeline özgü membran proteinleri ile bir araya gelir. Bunlardan en çok olanları intrinsik (integral) membran proteinleri olan miyelin proteolipid protein (PLP) ve ekstrinsik (periferik) olan miyelin basic proteindir (MBP). En az olanları ise miyelin-ilişkili glikoprotein (MAG), miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ve 2'3'-siklik-nükleotit 3'-fosfodiesterazdır (CNP). MSS miyelinini, üç ana lipid sınıfı olan kolesterol, glikosfingolipidler (galaktosilseramidlerin (GalCer) ve glukozilseramidlerin (GlcCer) türevleri) ve fosfolipidlerden (PL) oluşur. Bu miyelin lipid sınıflarının 2:1:2'lik sabit molar orana sahip olduğu uzun zamandır bilinmektedir (131).

Ana miyelin lipidleri kolesterol ve fosfatidiletanolamindir. Fosfatidiletanolaminin çoğu, bir alifatik uzun zincirli alkenileter ile değiştirilen gliserol 2'-OH yağ asidi içeren plazmalojenlerdir. Fosfatidilkolin (lesitin) önemli bir miyelin bileşenidir ve sfingomiyelin daha az bulunmaktadır. Sfingomiyelin ve kolesterol, sinyal iletimi gibi önemli işlevlerin bölgeleri olan "lipid raftları" (132) olarak adlandırılan zar alanlarını oluşturur. MSS lipid bileşimi, MS'de birincil lipid defektini anlayabilmek için yoğun bir şekilde incelenmiştir (133). Bununla birlikte, MS'de anti-lipid antikollarının tespiti odak noktası olmuştur (134).

2.6.2. Oligodendrosit Progenitör Hücreleri (OPC) ve Gelişmekte Olan Oligodendrositler

OPC ve Embriyonik Gelişim sırasında Oligodendrositler

Oligodendrositler, mikroglia ve astroglia dışında merkezi sinir sistemindeki başlıca glial hücre türlerinden biridir. Oligodendrositler ilk olarak 19. yüzyılda tanımlanmıştır. Nöronlar o dönemde iyi karakterize edilmişken, "nöroglia" adı verilen çok sayıda bilinmeyen hücre türü ilgi odağı haline gelmişti. Beynin ince yapısını analiz eden Virchow, hücreler sinirler arasında görüldüğü için "Nervenkit" (Almanca: sinir tutkalı) terimini kullanıma soktu. Nöronlardan farklı olarak, bu hücreler aksonları büyütemediler ve doğum sonrası bile çoğalabildiler. Başlangıçta bağ dokusu dışında bir role sahip oldukları düşünülüyordu. Pio del Rio-Hortega, gümüş karbonat da dahil

olmak üzere daha gelişmiş boyama tekniklerini kullanarak nöroglia'yı mikrogliya ve dört tip oligodendrogliya şeklinde farklılaştırmıştır (135).

Glial popülasyonlar arasında, bipolar hücrelerin yüksek oranda proliferatif ve göç etme eğilimli olduğu görülürken, filamentöz miyelin üreten glia esas olarak beyaz maddede bulunmuştur ve daha sonra oligodendrosit progenitör hücre (OPC) olarak adlandırılan ve müstakil, farklılaşmış hücre tipi olan bipolar öncü hücre tipi olan oligodendrositi düşündürmüştür (136).

MSS'de nöronların kökeni iyi karakterize edilmiştir, ancak oligodendrositlerin ve mikrogliaların kökeni hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır (137,138). Mikrogliya, yolk kesesinden oluşurken (139), oligodendrositler, anterior omurilikte radyal glial hücreler, ventral ventriküler bölge ve dorsal omurilikten olmak üzere beyinin çeşitli kökenlerinden gelişmektedir (140–143). Embriyonik gelişim sırasında nöral tüpte ortaya çıkan nöral progenitör hücreler (NPC), oligodendrositler, astrositler ve nöronlar için ortak öncülerdir (144,145).

Sıçan OPC'si ilk olarak E14 civarında (141), insan OPC'si E45'te ortaya çıkmıştır ve buda 6.5 gebelik haftasına denk gelmektedir (146). Türler arasında, birkaç OPC oluşum dalgası tanımlanmıştır. Ön beyindeki OPC oluşumu ilk dalgayı, ardından dorsal ventriküler bölgede daha küçük bir ikinci dalga ve bunu üçüncü olarak korteksten temel alan postnatal dalga izler (147). Omurilikte ventral kaynaklı OPC'yi, toplam OPC'nin %20'sini oluşturan (143,148) dorsal kökenli OPC dalgası izler (148,149).

Bu dalgalar daha sonra astrositler ve aksonlar tarafından sağlanan bazı faktörler için rekabet eden progenitör hücrelerin aşırı üretimine yol açar (147,150–152). İlk kortikal dalgadaki çoğu OPC'nin öldüğü tespit edilmiştir (147,150). Ancak Orduz ve ark., birinci dalga kortikal OPC'nin bir alt popülasyonunun hayatta kaldığı ve çeşitli fonksiyonlara sahip olduğunu göstermiştir (153).

Normal yetişkin MSS'de, çoğalan hücrelerin çoğu oligodendrogliyal soy kökenlidir ve olgun oligodendrositler üretmektedirler fakat, nöronların erişkinlik döneminde çoğalabildiğine dair çok az kanıt bulunmaktadır (154,155).

Son zamanlarda, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi sıkı bir şekilde düzenlenmiş epigenetik mekanizmalar, farklı gelişim aşamalarında ve miyelin

rejenerasyonunda belirgin olan OPC farklılaşmasının düzenlenmesinde keşfedilmiştir (156).

Yakın zamanlarda, aktive edilmiş nöronların OPC'nin oluşumu, çoğalması ve oligodendrositlerin miyeline dönüşmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (157–159).

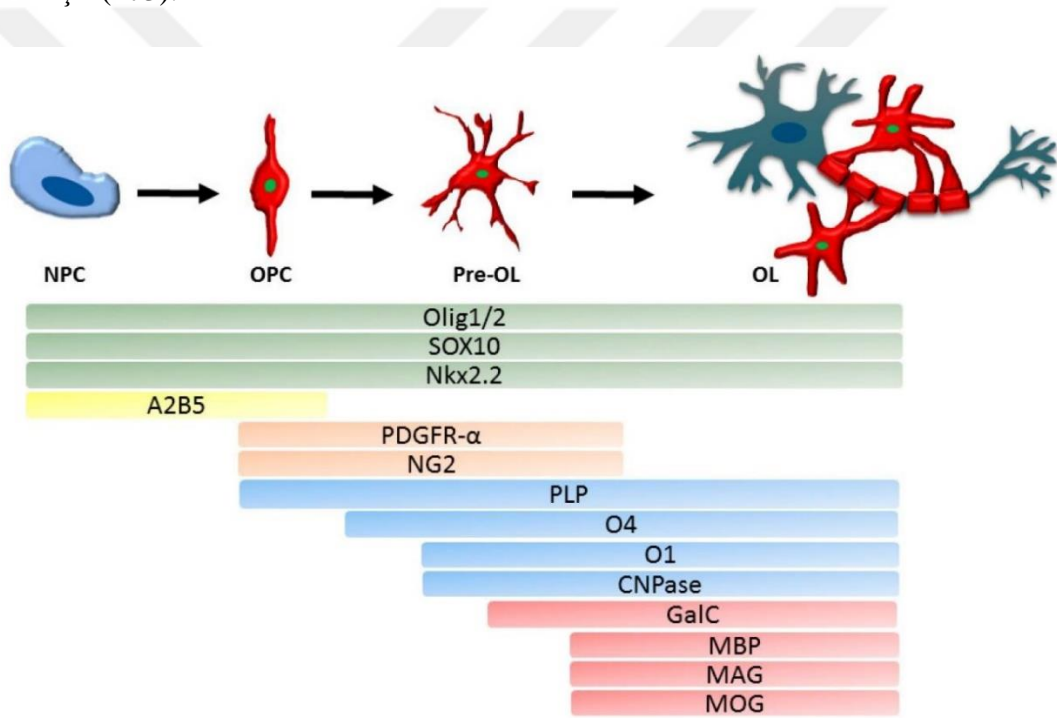
MSS'de OPC ve Oligodendrositlerin Dağılımı

Toplam glial hücrelerin yalnızca %5-8'i OPC'dir ve bu hücreler gri maddede nispeten daha az bulunmakla birlikte (160) beyaz ve gri maddede eşit olarak dağılmıştır. OPC konumları beyaz madde ve gri madde arasında davranışsal farklılıklara sebep olmaktadır. Organotipik beyin dilimlerindeki beyaz madde NG2+ OPC'ler, PDGF-A'ya daha fazla proliferatif yanıt verirken, gri madde OPC'ler, PDGF-A'ya daha az duyarlıdır. Ayrıca morfolojik ve genetik olarak gri madde OPC'ler, beyaz madde OPC'den daha az olgunlaşmıştır (161,162). Beyaz madde OPC'ler, GM OPC'den daha fazla miyelinleştirici oligodendrositlere farklılaşır. Dimou ve ark. tarafından gösterildiği gibi kalan hücrelerin birçoğu NG2+ öncüleridir ve bu da yetişkinlik döneminde potansiyel bir OPC yedek havuzu olduğunu düşündürmektedir (163,164). Yetişkin MSS'de, OPC'den oligodendrosit oluşumu yavaşlar ve beyaz madde OPC, korteksteki %5'e karşı murin korpus kallozumdaki toplam farklılaşmış ve miyelin yapan oligodendrositlerin yaklaşık %20'sini oluşturur (165). Bununla birlikte, kortikal gri madde oligodendroglial köken hücrelerinin %20'si farklılaşmış CNP+ NG2- oligodendrositlerdir, ancak bu hücreler miyelinleşmezler (165). Son zamanlarda, Hughes ve ark. kortikal NG2 + hücrelerinin oldukça dinamik olduğunu, popülasyonlarını proliferasyon, farklılaşma ve kendi kendini itme (self repulsiyon) ile dengeleyerek homeostazı koruduğunu göstermişlerdir (166).

Aksonal miyelinleşmenin meydana gelmesi için, OPC'lerin kendi köken konumlarından, MSS'nin gelişmekte olan beyaz madde yollarına göç etmesi gerekmektedir (167). Bu uzamsal mesafenin üstesinden gelmek için OPC'ler, WNT sinyal yolağına bağlı olan MSS içindeki kan dolaşımı boyunca sıçrama veya sürünme modunda göç etmektedir (168,169). Sonraki yoğun proliferasyon özellikle beyaz maddede gerçekleşir ve buda beyin ve omurilikte bol miktarda progenitör havuzu oluşmasına sebep olmaktadır (170).

OPC ve Oligodendrositlerin Gelişimsel Belirteçleri

Yeni doğmuş OPC'ler, en bol miyelin proteini olan proteolipid proteininin (PLP) bir izoformu olan DM-20 mRNA'nın ekspresyonu ile karakterizedir (140). Oligodendroglial hücre kökenini belirleyen ve gelişim aşamasını yansıtan çok sayıda belirteç bulunmaktadır ve en belirgin olanları **Şekil 7**'de özetlenmiştir. Oligodendroglial köküne bağlandıktan sonra, hücre yüzey antijenleri A2B5 gibi spesifik antikolar tarafından tanınabilir (171). *In vitro*, A2B5 pozitif hücreler hem oligodendrositlere hem de astrositlere farklılaşabilir ve bu nedenle oligodendrosit-tip-2 astrosit (O-2A) progenitör hücreler olarak adlandırılır (172). O-2A progenitör hücreleri, spesifik çevresel işaretler astrositlere farklılaşmayı yönlendirmedikçe, temel olarak oligodendrositlere farklılaşır (173).



Şekil 7. NPC'den, miyelinleştirici OL'ye kadar farklı gelişim aşamalarına özgü oligodendroglial belirteçlerinin şematik gösterimi (174)

NPC: Nöronal progenitör hücre, OL: Oligodendrosit, OPC: Oligodendrosit progenitör hücre

OPC'ler için en iyi karakterize edilen belirteç hem astrositler hem de nöronlar tarafından üretilen en güçlü OPC mitojeni ve sağkalım faktörü ve PDGF-A reseptör olan PDGFR-α'dır (175–178). Sonuç olarak, örneğin gelişim sırasında bu büyüme faktörünün aşırı ifadesi, OPC sayılarında artışa yol açmaktadır (178).

Pre-oligodendrositler, bir hedef aksonla etkileşime girer, böylece çift kutupluluğunu kaybeder ve lifsi miyelin gelişimi başlar. Bu farklılaşma aşamasında pre-oligodendrositler, miyelinle ilişkili üç ana belirteç ile karakterizedir. Bunlar; 2', 3'-siklik-nükleotid 3'-fosfodiesteraz (CNPaz) ve hücre yüzeyi belirteçleri O4 ve O1 (179,180). CNPaz'ın, farklı şekilde eksprese olan iki farklı izoformu vardır: oligodendrosit öncülleri yalnızca daha büyük izoformu ekspres ediyorken, miyelinleştirici oligodendrositlerin her iki izoformu da eksprese ettiği gösterilmiştir (181). O4 zaten eski progenitörlerde eksprese edilirken, O1 miyelinasyon öncesi oligodendrositler için ayırıcıdır (182) (**Şekil 7**).

Olgun, farklılaşmış oligodendrositler, miyelin ve miyelin proteinlerinin yapımı ile karakterize edilir ve bu olgunlaşma aşamasını tanımlamak için Olig2 gibi spesifik belirteç ile kombinasyon halindedir (**Şekil 7**). Miyelin proteinleri, plazma membranının sitoplazmik yüzeyinde (183) eksprese edilen myelin basic protein'ini (MBP) (184,185), transmembran proteini PLP'yi (140,186), myelin associated glycoprotein'i (MAG) (187), membran belirteç galactocerebroside (GalC) (188) ve yüzey belirteç myelin-oligodendrocyte glycoprotein'i (MOG) (184) kapsar. MBP ve MAG ilk olarak postnatal 5 ve 7. günler arasında murin MSS'den türetilmiş oligodendrositlerde ortaya çıkarken, MOG bir ila iki gün sonra ortaya çıkar (189). İlginç bir şekilde, PLP'nin son zamanlarda murin Olig2+PDGFR- α + hücrelerinde eksprese edildiği tanımlanmıştır, bu da onu OPC için erken bir belirteç haline getirmektedir (190).

Oligodendroglial köken boyunca genetik olarak ilişkili, ancak fonksiyonel olarak farklı iki transkripsiyon faktörü Olig1 ve Olig2 mevcuttur (191,192). Olig2, NPC'nin OPC'ye (193) dönüşmesi için temeldir ve OPC'de remiyelinizasyonu destekleyebilecek fonksiyon kazandırır (194). Olig1'in rolü daha az bilinmektedir. Olig1, murin beyin gelişiminde OPC farklılaşması ve miyelinasyonda bir role sahiptir; ancak omurilik OPC'leri, farklılaşma ve miyelinasyon için Olig1'e daha az bağımlıdır (195,196). Bununla birlikte onarımda, Olig1 eksikliği olan fareler, gecikmiş oligodendrosit farklılaşması ve demiyelinize MSS lezyonlarında bozulmuş remiyelinasyonu göstermiştir (197). Tüm oligodendroglial köken ile karakterize olan ve oligodendrosit gelişimine dahil olan bir başka transkripsiyon faktörü SOX10'dur (198). SOX10, erken gelişim sırasında NPC'den kaynaklı oligodendroglial köken tanımlaması ve OPC farklılaşması için elzemdir (199–201). Transkripsiyon faktörü Nkx2.2 ise oligodendrosit farklılaşmasının zamanlamasını destekler ve düzenler (202,203). Erken oligodendroglial köken hücreleri

için bir belirteç, proteoglikan NG2'dir, ancak NG2⁺ hücreleri hem oligodendrositlere hem de astrositlere farklılaşabilir (204).

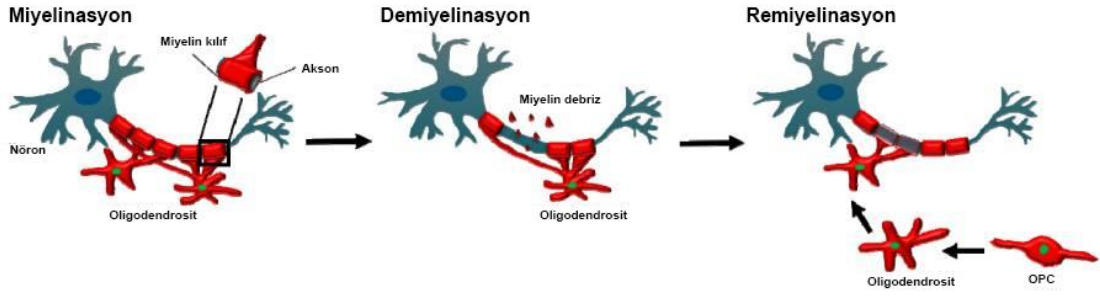
Diğer Miyelin Üreten Hücreler

Schwann hücreleri, nöral krestten türetilen periferik sinir sistemindeki (PNS) oligodendrosit dengi hücrelerdir (205). Oligodendrositler ve Schwann hücreleri, aksonlar için destek ve yalıtım sağlamada ana işlevleri paylaşırlar. Bununla birlikte, Schwann hücreleri, oligodendrositlerin tersine çoklu aksonlar yerine tek aksonu miyelinleme yapabilmektedir (206,207). Bu özellik, bir E3 ligaz bileşenine bağlıdır ve eksikliği, in vivo olarak murin Schwann hücrelerinde miyelinleşme potansiyelinin artmasına yol açmaktadır (208).

Oligodendrositlerin yanı sıra Schwann hücreleri, MSS ve PNS'de bölgeye özgüdür ve motor çıkış noktalarında bir glial bariyerin, oligodendrositlerin MSS'den çıkmasını engellediği bulunmuştur. Bu bariyeri oluşturan hücreler, miyelin üretebilen üçüncü hücre tipi olarak tanımlanan motor çıkış noktası (MEP) glia'dır (209,210). MEP glia, hem oligodendrositler hem de Schwann hücreleri ile ortak özellikleri paylaşır; OPC'ler de olduğu gibi, ventral nöral tüpten türetilirler ve oligodendroglial kök hücreleri gibi Olig2'yi eksprese ederler. MEP glia ayrıca SOX10 ve WIF1 ekspresyonu ile karakterizedir ve Olig2, Foxd3 ekspresyonu ile birleştirildiğinde, bu popülasyonu tanımlar (210). Schwann hücrelerine benzer şekilde, MEP glia, Foxd3'ü eksprese eder ve bu sürecin altında yatan moleküler mekanizma farklı olmasına rağmen, sadece bir aksonu miyelinleme yapabilir. MEP glia, Schwann hücreleri için önemli bir miyelinasyon başlatıcısı olan *krox20*'den yoksundur ve Schwann hücrelerinin aksine *gpr126* eksikliğinden de etkilenmez. Dahası, MEP glia seçici olarak spinal motor kök aksonlarını miyeline eder (209–211) ve OPC'nin perifere göçünü önlemede rol oynadığı açıklanmıştır (211).

2.6.3. Aksonların Miyelinasyonu

Miyelin kılıfı, **Şekil 8**'de gösterildiği gibi, sinir aksonlarının etrafını eşmerkezli bir şekilde saran oligodendrosit ve Schwann hücre plazma membranının bir uzantısıdır. 1717'de Leeuwenhoek, "sinircik" ve "yağlı kısımlar" olarak muhtemelen miyelinin ilk tanımını yapmıştır (212).



Şekil 8. Miyelinizasyondan remiyelinizasyona oligodendrositler (174)

O zamandan beri, histoloji ve optik tekniklerdeki teknik gelişmeler, miyelin kılıfının hem yapısının hem de fonksiyonunun ayrıntılı olarak araştırılmasına olanak sağlamıştır (213). Örneğin, *in vivo* miyelinasyon ve remiyelinasyonun dinamik süreçlerinin yüksek çözünürlüklü görüntüleme teknikleri, elektron mikroskobu ve manyetik rezonans ile görüntülenmesi, sağlık ve hastalık durumlarında oligodendrosit biyolojisi anlayışımızın ilerlemesinde büyük ölçüde faydalar sağlamıştır (213).

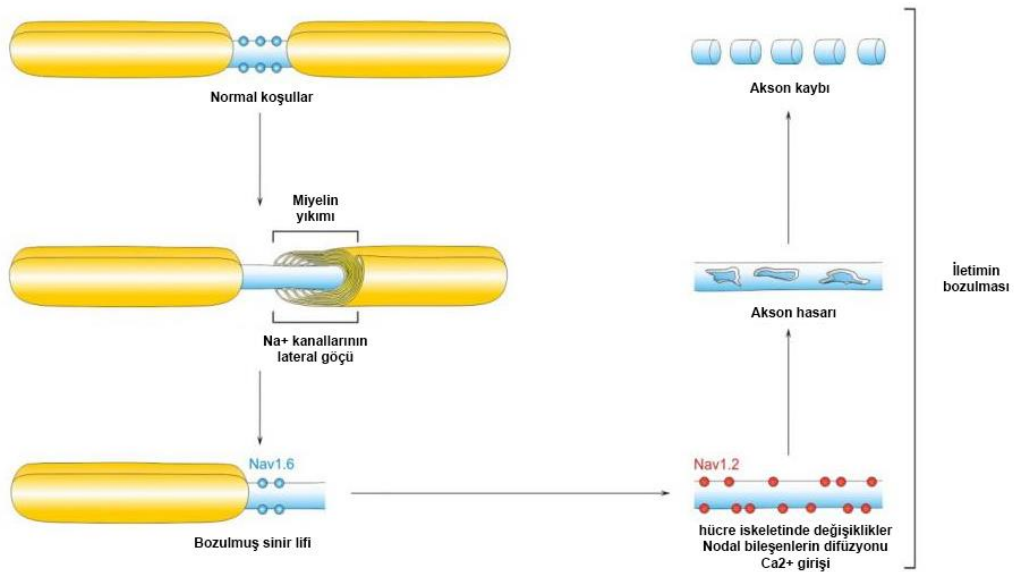
Miyelinasyon, karmaşık ve sıkı düzenlenmiş bir süreçtir (214). Transgenik zebra balıklarında *in vivo* hızlandırılmış görüntüleme, oligodendrositlerin son konumlarına yerleşmeden önce hareketlerini sürekli olarak aksonlara doğru uzattığını ve geri çektiğini ortaya çıkarmıştır (215). Oligodendrosit hareketleri aynı zamanda, miyelin segmentlerinin eşit aralıklı düğümlerle eşit aralıklı olmasını sağlamak için komşu hücreleri de algılamayı sağlar (216). Olgun bir oligodendrosit bir aksonla birleştiğinde, oligodendrosit plazma membran yapısı hızla değişir. Oligodendrositin aksonları sarıp kompakt bir miyelin kılıfı oluşturmak için plazma membranıyla nasıl etkileşimde olduğunu açıklamak için çok sayıda hipotez öne sürülmüştür (212). Bunlar; miyelinin ya bir iç uzantısını akson etrafında tekrar tekrar genişlettiğini (217) ya da alternatif olarak, miyelin kılıfının "kruvasan benzeri" katmanlarının önceden var olanların üzerinde oluştuğunu öne sürmektedir (218). Yüksek çözünürlüklü *in vivo* görüntüleme ve yüksek basınçlı dondurma ile sabitlenmiş optik sinir liflerinin 3D rekonstrüksiyonlarını birleştiren gelişmiş çalışmalar, dinamik miyelinasyon sürecinin gelişmiş düzeyde görselleştirilmesini kolaylaştırdı (219). Bu çalışmalar, miyelinasyonun, Geren ve Schmitt (217) tarafından önerilen orijinal mekanizma ile tutarlı bir keşif olan, paranodal halkaları oluşturmak için aksondan aşağı doğru plazma membranı uzaması yoluyla gerçekleştiğini ortaya çıkarmıştır (219).

Miyelinizasyon, çeşitli moleküler işaretler tarafından yönetilerek düzenlenmiş bir süreçtir. Sadece büyük çaplı aksonlar miyelinlidir (220). Miyelinasyon, akson çapını sadece akson etrafındaki ekstra miyelin kılıfları ile değil, aynı zamanda lokalize nörofilament birikimi ve fosforilasyon aracılığıyla da artırılır (221).

Miyelin kılıfı oluşumu, Schwann hücrelerinde nöregulin 1 (222) ve oligodendrositlerde Ca^{2+} aktivitesi (223) ve miyelinasyon için aksonları tanımlayabilen nöronal aktivite (158) gibi çeşitli faktörler aracılığıyla düzenlenir. Şaşırtıcı bir şekilde, nöronal aktivite aynı zamanda OPC proliferasyonunu, farklılaşmasını ve sağ kalımını da düzenler (159).

2.6.4. Miyelin Yıkımı

MS'de demiyelinizasyon, paranodal ve juxtapanodal alanların düzensizliği ile ilişkilidir. Demiyelinli lezyonlarda, paranodal (paranodin ve contactin ile ilişkili protein, Caspr) ve juxtapanodal (Kv kanalları ve Caspr2) proteinleri aşındırılmış aksonlar boyunca dağınık şekilde yayılır ve agregatlar kaybolur (224,225). Erken başkalaşmalar, Neurofascin (Nf)-155-pozitif paranodal yapıların, juxtapanodal Kv1.2 kanalları ile örtüşmesini içerir (226). Sonuç olarak, nodal sodyum kanalları, juxtapanodal potasyum kanallarına doğrudan bitişik olur ve bu da aksiyon potansiyellerinin saltatory iletiminin bozulmasına yol açar (Şekil 9). Bu veriler paranodal bağlantı noktalarının, demiyelinizasyonun ilk bölgesi olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 9. Demiyelinizasyon sürecinin özellikleri (227)

Aksonlar ve oligodendrositler arasındaki karşılıklı iletişimin önemi, oligodendrosit kaybı ve demiyelinizasyonun önemli bir akson dejenerasyonu ile ilişkili olduğu nörolojik hastalıklarda belirgindir. Aksonal hasar ve bağlantı kaybı, problemin ilerlemesinin açıkça kritik belirleyicileridir (228). Lenfositlerden veya çözünür inflamatuvar mediatörlerden miyelinli aksonlara doğrudan immünolojik saldırı, 'akut' inflamatuvar demiyelinizasyon ve akson kaybını açıklamaktadır.

2.6.5. Remiyelinizasyon Süreci

MS ve EAE (deneysel otoimmün ensefalomyelit)'de demiyelinizasyon ve dejenerasyonun ardından karşıt etki olan remiyelinizasyon ve nörojenez uyarılır ve progenitör hücreler hasar bölgelerine göç eder (229). Remiyelinizasyon, demiyeline aksonların yeni miyelin kılıfları ile kaplandığı varsayılan bir süreçtir (230). Remiyelinizasyon sadece inaktif lezyonlarda bulunmaz, aynı zamanda devam eden demiyelinizan aktiviteye sahip lezyonlarda da gözlenmektedir (231,232). Bununla birlikte, onarım süreci özellikle erken hastalık evresine karakterizedir (233). Belirgin remiyelinizasyon, MS'nin erken evrelerinde sıkça rapor edilmemesine rağmen (234) bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (232). Hatta remiyelinizasyon, aktif demiyelinizasyondan sonra bir veya iki ay içinde başlayabilir (232). Bunun aksine, geç evre MS'de remiyelinizasyon seyrek görünür ve inaktif lezyonların sınırlarıyla kısıtlıdır (234). MS'nin geç evresinde, remiyelinizasyon sürecinde oligodendrosit yoğunluğu sınırlıdır. Bu durum oligodendrositlerin bozulmuş sağkalım, proliferasyon ve/veya göçünün bir ürünü olarak görünmektedir. Bu nedenle, miyelin onarımı olarak adlandırılan remiyelinizasyon, MS'deki akut inflamatuvar lezyonlarda meydana gelir. Yeni miyelin kılıfı, hem hasar veren inflamatuvar moleküllere karşı koruyucu bir fiziksel bariyer görevi görebilir (235) hem de aksona trofik desteği geri kazandırabilir (236).

2.6.6. Multiple Sclerosis

Multipl skleroz (MS), tüm yaş gruplarında ortaya çıkan, ancak çoğunlukla genç erişkinlikte ortaya çıkan, etiyojisi bilinmeyen kronik inflamatuvar bir hastalıktır (237). İnsan MSS miyelinini etkileyen en sık görülen hastalıktır. Hastalar başlangıçta optik nörite bağlı görme bozuklukları veya duysal ve motor semptomlarla başvurabilirler (238). Beyin manyetik rezonans görüntülemesinde (MRI), mekan ve zamanda yayılan, sıklıkla ventriküllere bitişik veya jukstakortikal olarak yerleştirilmiş sınırlı hiperintens lezyonlar hastalığın karakteristiğidir. Gadolinyum kontrast artışı, sıklıkla aktif bağışıklık hücresi alımıyla ilişkilendirilen kan-beyin bariyerinin bozulmasına işaret eder (239).

Semptomlar başlangıçta oldukça iyi düzelir (tekrarlayan-düzelen MS), ancak hastaların ~%70'inde, 10-15 yıllık hastalık süresinden sonra nükslerden bağımsız olarak engellilik artma eğilimindedir (ikincil ilerleyici MS). Primer ilerleyici MS hastaları tipik olarak, hastalığın başlangıcından itibaren ve nükslerden bağımsız olarak, çoğunlukla alt ekstremitte fonksiyonu olmak üzere klinik engellilikte sinsi bir kötüleşme yaşarlar (240).

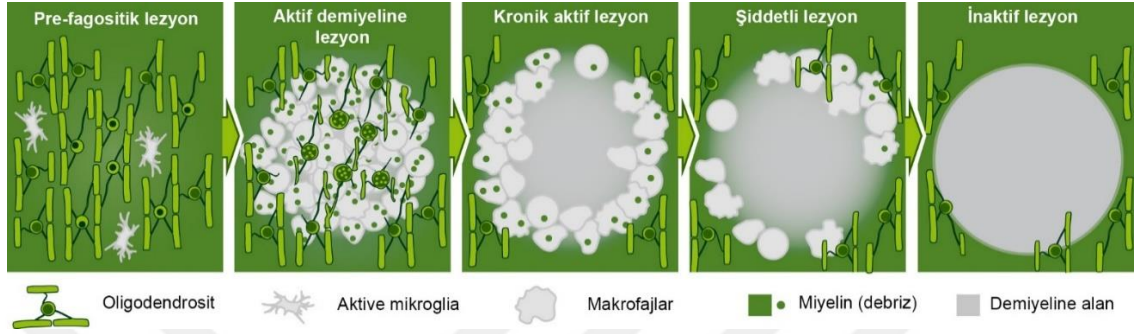
MS kadınlarda 2,3 kat daha siktir ve kuzey enlem bölgesinde ve Kuzey Avrupa kökenli popülasyonlarda daha yüksek bir insidansa sahiptir (241). Hastalık duyarlılığı, HLA lokusu ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve HLA-DRB1*15 gen lokusundaki homozigotluk, hastalığın gelişmesi için 7'lik bir olasılık oranı (odds ratio) verir. Ek olarak, çok sayıda yaygın varyant hastalığa yatkınlığa katkıda bulunur ve son yıllarda yapılan çok sayıda genom çapında ilişkilendirme çalışması 200'den fazla risk lokusu tanımlamıştır (242). Daha yüksek hastalık riski, hem adaptif hem de doğal bağışıklık, sitotoksik ve düzenleyici T hücresi ve özellikle IL2RA, IL7RA ve TNFRSF1A gibi mikroglia fonksiyonunu düzenleyen genlerdeki polimorfizmlerle ilişkilidir (243). Bununla birlikte, monozigotik ikizlerin uyum oranı sadece %20-30'dur ve bu, çevresel faktörlerin MS duyarlılığına önemli bir katkısını gösterir. Epstein-Barr virüsü ile enfeksiyon ve özellikle enfeksiyöz mononükleoz öyküsü, düşük D vitamini seviyeleri, çocukluk çağı obezitesi ve sigara kullanımı, hastalığa yakalanma olasılığının artmasıyla ilişkilendirilmiştir (244). Batı ülkelerinde bilinmeyen nedenlerle özellikle kadınlarda hastalık insidansı artmaktadır (245).

2.6.7. MS'de Miyelin Patolojisi

MS lezyonunun gelişimi sıklıkla aylar ve yıllara dayanır ve tipik bir hücreyel olaylar dizisinden oluşur (**Şekil 10**).

Otopside, kronik MS hastalarından alınan beyin dokusu en belirgin şekilde lateral ventriküllerin çevresinde ve derin hemisferik beyaz maddede, serebellar pedinküllerde, beyin sapı veya omurilikte çıplak gözle görülebilen grimsi, belirgin sınırlı lezyonlarla karakterizedir. Miyelin için Luxol fast blue (LFB) gibi boyalarla boyanmış histolojik kesitler, demiyelinizan lezyonları, kalıntı miyelin kılıfları varsa çok az tanımlar. Bu kronik inaktif demiyelinize MS lezyonlarının içinde ve kenarında miyelin fagositozuna dair hiçbir kanıt saptanmamıştır. Olgun oligodendrositlerde, mikroglia ve sıklıkla oligodendrosit öncü hücrelerinde önemli bir azalma niteliği taşımaktadır (243). Adaptif veya doğuştan gelen immün aktivasyon belirtileri seyrek veya yoktur (246). Aksonal

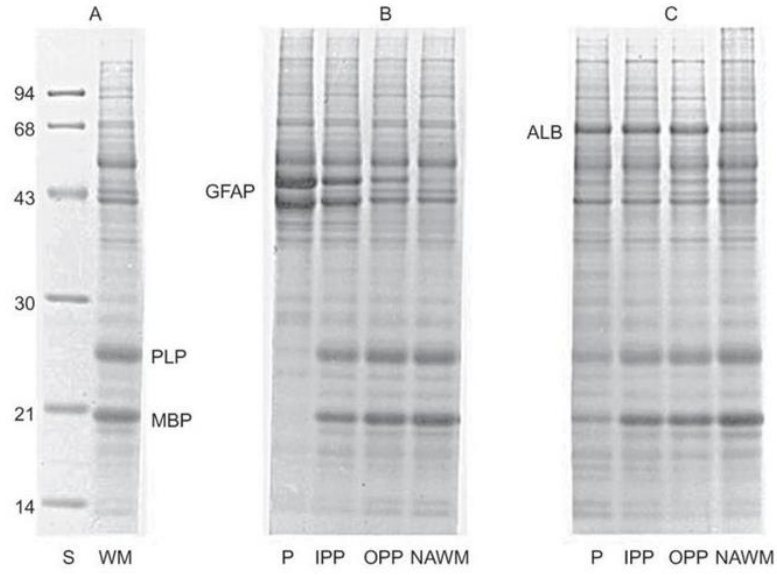
azalma değişkindir ancak %80'e kadar önemli seviyelere ulaşabilir (247). Daha az yoğun miyelin boyalı alanlar sıklıkla kronik demiyelinizan lezyonların sınırına eşlik eder ve elektron mikroskopisi ile kanıtlanan remiyelinli lezyon alanlarını gösterir (248). Kronik inaktif demiyelinli lezyonlar, miyelin yıkımı ve inflamasyon olmaksızın lezyon oluşumunun son aşamasını temsil eder.



Şekil 10. Multipl skleroz fokal lezyon patolojisi (243)

2.6.8. MS Biyokimyası

MS'de demiyelinizasyonun biyokimyası ayrıntılı olarak gözden geçirilmiştir (249). Etkilenen MS beyaz madde alanları, miyelin bileşenlerinde beklenen azalmayı ve kolesterol esterlerinin çoğalmasını sergiler. Örneğin, makroskopik olarak normal görünen beyaz madde, dış periplak, iç periplak ve plak homojenatlarının poliakrilamid jel elektroforezi, hem kronik hem de akut durumda MBP ve PLP'nin beklenen düşüşünü gösterir (Şekil 11). Kronik plağın merkezinde bu miyelin proteinlerinin fiilen yokluğu ve astrogliosisın göstergesi olan bir glial fibril asidik protein (GFAP) birikimi vardır (Şekil 11B). Daha akut bir lezyondan gelen bir plak, bir miktar MBP ve PLP'nin varlığının gösterdiği gibi tamamen demiyelinize değildir ve GFAP birikimi yoktur (Şekil 11C). Daha akut plak, kan-beyin bariyerinin yıkılmasının bir sonucu olarak albümin içerir. Bir dizi biyokimyasal çalışma, MS beyninin makroskopik olarak normal görünen beyaz maddesinin bazı bölgelerinde bile, miyelin bileşenlerinin, sağlıklı beyaz maddeye kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermiştir ve bu, büyük olasılıkla, etkilenen beyindeki mikro lezyonların varlığı ile açıklanmaktadır (250).



Şekil 11. Proteinlerin poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü (250)

Total proteinler SDS (sodyum dodesil sülfat) ile çözündürüldü ve boyutlarına göre poliakrilamid jel sistemi üzerinde yürütüldü. Elektroforezden sonra proteinler Coomassie Brilliant Blue boya ile boyandı. (A) Moleküler kütlelerine (kDa) göre etiketlenmiş standartlar. S=standards, WM= White matter. (B) Kronik MS plak bölgesinden örnekler. (C) Akut MS plak bölgesinden örnekler. ALB, serum albümini; GFAP, glial fibril asidik protein; IPP, iç periplak; MBP, miyelin basic proteini; NAWM, plak yakınında makroskopik olarak normal görünen beyaz madde; OPP, dış periplak; P, plak merkezi; PLP, proteolipid proteini.

MS biyokimyasını içeren son araştırmalar, akut lezyonlardaki ve kronik olarak demiyelinizan aksondaki hasarın moleküler mekanizmalarına odaklanmıştır (251). Akut lezyonlardaki inflamatuvar mikroçevre, proteolitik enzimler, sitokinler, oksidatif ürünler ve serbest radikaller gibi hücrelere doğrudan zarar verebilen çeşitli maddeler içerir. İnflamatuvar mikroçevrede bulunan diğer maddeler, sonuçta yaralanmaya neden olan veya hasar veya onarımla ilgili hücrelerin göçünü etkileyen sinyal iletim olaylarını indükleyebilir. Kronik lezyonlarda nörodejenerasyon mekanizmasının, aksonal enerji talebi ile sınırlı enerji arzı arasındaki bir dengesizliği temsil ettiği öne sürülmüştür (252). Miyelinsiz aksonlarda sinir iletimi, miyelinli aksonlardan daha fazla ATP gerektirir. MS beyinlerindeki bir analiz, nükleer kodlanmış mitokondriyal genlerin ekspresyonunun lezyon olmayan kortekste azaldığını, bu da MS beyninde bozulmuş mitokondriyal enerji üretimi anlamına geldiğini gösterdi. Aksonlarda bozulmuş ATP üretimi, aksonlara zarar verebilen aksoplazmik Ca^{2+} birikimi ve Ca^{2+} bağımlı proteolitik enzimlerin aktivasyonu dahil olmak üzere değişen iyonik gradyanlara neden olabilir.

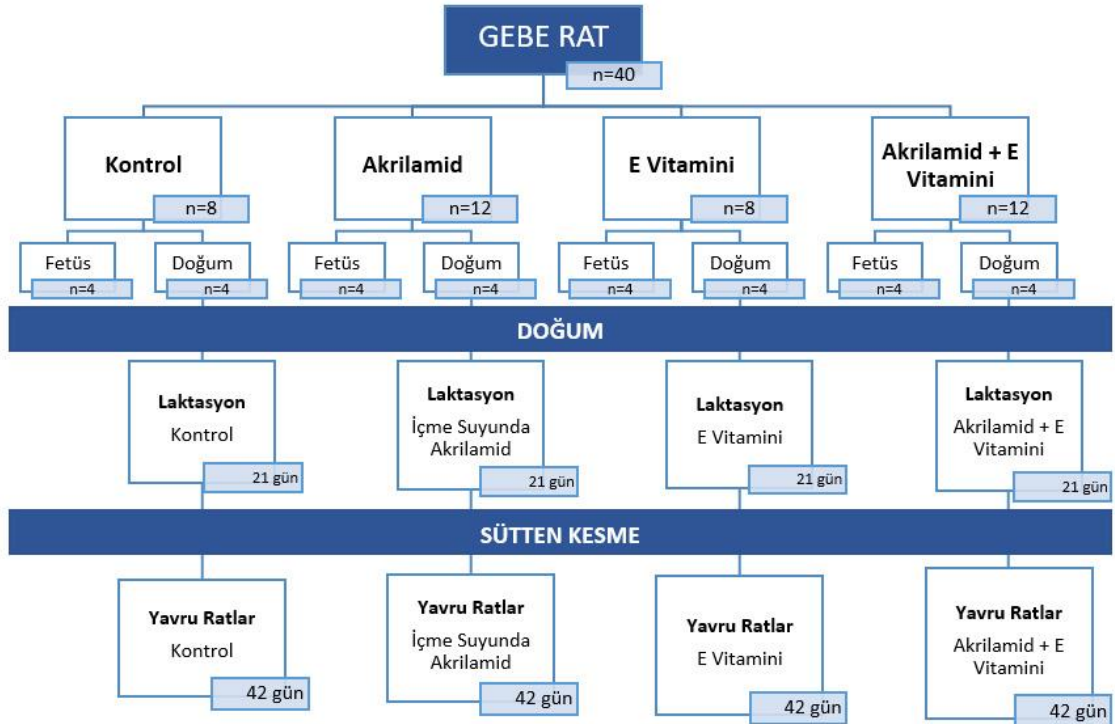
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Hayvanı Temini

İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden ağırlığı ortalama 200-250 g olan 12 haftalık 40 adet gebe dişi Sprague Dawley rat, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 2019/A-33 protokol no'lu izni ile temin edilmiştir.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Çalışma Protokolü

Gruplar arası (Kontrol, Akrlamid, E-vitamini, Akrlamid + E-vitamini) farklılık için %95 güven düzeyinde ($\alpha=0.05$) ve %80'lik güç ile ($\beta=0.20$) karşılaştırılması için etki büyüklüğü 0.52 olarak değerlendirildiğinde her bir grup için minimum dahil edilmesi gereken rat sayısının örneklem büyüklüğü 8 olarak belirlenmiştir. AKR'nin toksik özelliğinden dolayı AKR uygulanan gruplarda kayıp yaşanma ihtimali bulunmaktadır. Bu gruplarda grup başına olması gereken örneklem büyüklüğünün altına düşmemesi için rat sayısı 12 olarak belirlenmiştir. Çalışmaya ait gruplar Şekil 12'de özetlenmiştir.



Şekil 12. Deney hayvanı araştırma grupları

Araştırmaya dahil edilen dişi ratlar, her 2 dişiye bir tane erkek olacak şekilde tekli kafeslere alındı. Ertesi gün'e kadar aynı kafeste bulunan ratlardan erkek ratlar kafeslerden uzaklaştırıldı. Bir süre için erkek sıçanlarla birlikte barındırılan dişi sıçanlardan vajinal smearlar alındı. Vajinal smear için ratın karnı yukarı ve baş aşağı olacak şekilde 0,5 ml salin solüsyonu vajinaya yavaşça enjekte edildi. Vajinal salguların ve spermelerin pipete alınması sağlandı. Pipet içindeki birkaç damla sıvı bir lam üzerine yerleştirildi ve mikroskop altında incelendi. Mikroskobik incelemede sperm tespit edilmesi durumunda ratlar yarım günlük gebe olarak kabul edildi. Gebe ratlar deney hayvanı üretim merkezinde uygun koşullarda (12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta, sürekli havalandırılmalı odalarda) muhafaza edildi. Ratlar çalışma boyunca ad libitum beslendiler.

Araştırmaya dahil edilen gebe ratlar ve normal doğum sonrası süttten kesilme sonrası erkek ve dişi yavruları rastgele seçilerek aşağıdaki şekilde gruplara ayrıldılar.

Kontrol grubu: Bu gruptaki gebe ratlar gebelik ve laktasyon süresince normal yem ve su ile ad libitum olarak beslendi. Gebe ratlar normal yolla doğum yaptıktan sonra laktasyon süresi sonunda (postnatal 21. gün) dişi ve erkek olacak şekilde ayrı ayrı kafeslere alındı ve araştırma süresince normal yem ve su ile ad libitum olarak beslenmeye devam edildi.

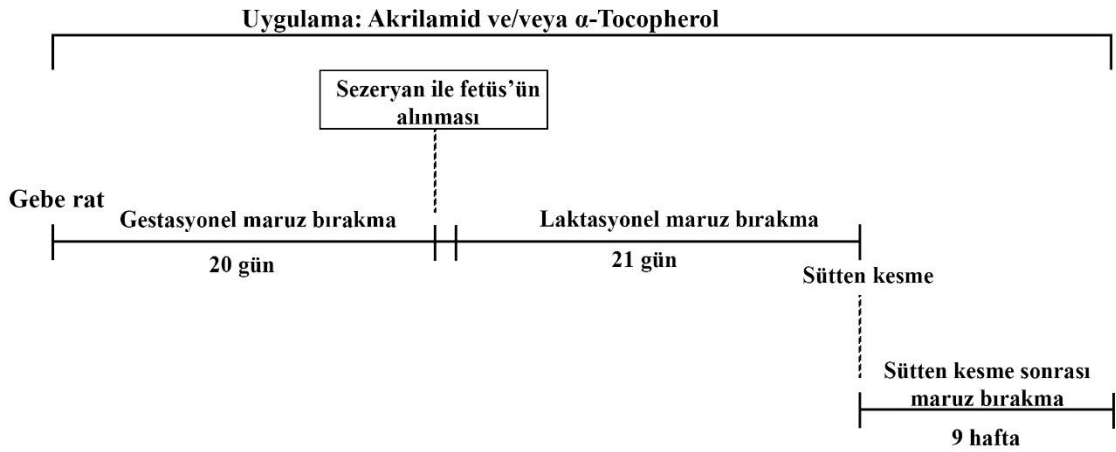
Akrilamid grubu: Bu gruptaki gebe ratlara gebeliğin 0-20.günlerinde 100 ppm konsantrasyonda içme suyu ile AKR uygulandı. Gebe ratlara normal doğum sonrası laktasyon süresince içme suyunda 100 ppm konsantrasyonda AKR uygulanmaya devam edildi. Laktasyon süresi sonunda (postnatal 21. gün) dişi ve erkek olacak şekilde ayrı ayrı kafeslere alındı ve postnatal 9. haftaya kadar içme suyunda 100 ppm AKR verilmeye devam edildi.

E Vitamini grubu: Bu gruptaki gebe ratlara gebeliğin 0-20. günlerinde 300 ppm konsantrasyonda içme suyu içinde E vitamini uygulandı. Gebe ratlara normal doğum sonrası laktasyon süresince 300 ppm su içinde E Vitamini uygulanmaya devam edildi. Yavrular laktasyon süresi sonunda (postnatal 21. gün) dişi ve erkek olacak şekilde ayrı ayrı kafeslere alındı ve postnatal 9. haftaya kadar 300 ppm E vitamini içme suyu ile uygulanmaya devam edildi.

Akrilamid + E vitamini grubu: Bu gruptaki gebe ratlara, gebeliğin 0-20. günlerinde 100 ppm konsantrasyonda AKR ve 300 ppm E vitamini içme suyu ile uygulandı. Gebe ratlara normal doğum sonrası laktasyon süresince 100 ppm AKR ve 300

ppm E Vitamini içme suyu ile uygulanmaya devam edildi. Laktasyon süresi sonunda (postnatal 21. gün) dişi ve erkek olacak şekilde ayrılarak her bir kafeste 4-5 rat bulunacak şekilde ayrı ayrı kafeslere alındı ve postnatal 9. haftaya kadar 100 ppm AKR ve 300 ppm E Vitamini içme suyu ile verilmeye devam edildi.

Her bir gruptaki gebe ratların yarısı normal yol ile fetuslarını doğurdu ve doğan yavrular süttten kesilme süresi sonuna kadar (21. güne kadar) annelerinin yanında bırakıldı. Gebe ratların diğer yarısı ise, doğum yapmaları beklenen günden 1 gün önce yüksek doz anestezi altında sezeryan ile fetusları alındı. Normal doğum yapan anne ratlar, postnatal laktasyon süresi sonunda (21. gün sonu) dişi ve erkek olacak şekilde ayrılarak ayrı ayrı kafeslere alındı ve postnatal 9. haftaya kadar ad libitum beslendiler. Tüm araştırma boyunca ratlara yapılacak uygulamaların özeti **Şekil 13**'te verilmiştir.



Şekil 13. Çalışma dizaynı

3.3. Akrilamid ve E Vitamini Uygulama Yöntemi

Gebelik ve laktasyon süresince annelere ve laktasyondan doğum sonrası 9. haftanın sonuna kadar yavrulara günde 100 ppm konsantrasyonda AKR (Acrylamide; Sigma) ve 300 ppm konsantrasyonda E vitamini (DL- α -Tocopherol acetate, MP Biomedicals) içme suyu içerisinde çözülerek uygulandı. Önce AKR daha sonrada E Vitamini içme suyunda çözüldü ve AKR+E vitamini çözeltisi hazırlandı. Bu iki maddenin çözelti içinde birbiriyle etkileşime uğrayıp uğramadığı, çözeltide meydana gelebilecek bulanıklık, çökelti, renk değişimi gibi faktörler gözlemlenerek kontrol edilmiştir. 24 saat süreyle aralıklı olarak yapılan kontrollerde çözeltide herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir.

3.4. CRL Mesafesi, Fetus ve Beyin Ağırlıklarının Ölçümü

Sezeryan ile alınan fetuslar için fetal gelişimi belirleyebilmek için, gebe ratlardan sezeryan ile alınan fetusların ağırlığı ve fetuslara ait CRL mesafesi (tepe-oturma noktası uzunluğu) ölçülmüştür. Normal doğum sonrası dişi ve erkek olarak ayrılan yavru ratlardan alınan total beyinlerin ağırlıklarının ölçümü yapılmıştır.

3.5. Rat Canlı Ağırlıkları, Su ve Yem Tüketimlerinin Takibi

Deney hayvanı çalışması süresince belirtilen yöntem ve dozlarda uygulama yapılırken,

- 1- Ratların haftalık olarak ağırlık takibi yapılmıştır.
- 2- AKR ve Kontrol gruplarına ait kafes suları haftalık olarak değiştirilmiş olup takibi yapılmıştır.
- 3- E Vitamini ve AKR + E Vitamini gruplarına ait kafes suları ise haftada 3 kez (Pazartesi, Çarşamba ve Cuma) olacak şekilde yenilenmiş ve takibi yapılmıştır.
- 4- Ratların yem tüketimleri ise her kafes için haftalık olarak takip edilmiştir.

3.6. Water Maze testi

Bilişsel fonksiyonların araştırılması için Morris Water Maze Testi uygulandı. Test, İnönü Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik araştırma laboratuvarında Water Maze testi için ayrılmış özel alanda gerçekleştirilmiştir. Morris'in bu testi; sıçanlarda ve farelerde en yaygın olarak kullanılan öğrenme ve hafıza testidir. Testte kullanılan tank 120 cm çapında, galvanizli ve 50 cm yüksekliğinde yuvarlak bir tanktır. Deneyde 25 cm'ye kadar tank su ile dolduruldu, çapı 10 cm olan platform, su yüzeyinin 2 cm altına konuldu ve görüşü engellemek için suya boya atılmıştır. Su sıcaklığı sabit tutulmuştur (24 ± 2 °C). Sıçanların buldukları yerin uzamsal konumunu algılayabilmeleri için tankın dışına görsel işaretler yerleştirildi. Platform, tankın dörtte birlik bir kısmının ortasına bırakılmıştır. Sıçanlar her seferinde çeyreklik bölgelerden birinden bırakılır ve yüzerken platformu bulması için 90 saniye süre ile suda tutulur. Bu her çeyreklikten yüzdürme işlemi 4 gün boyunca her rat için uygulandı ve ratların öğrenme kapasitesi kaydedildi. Bellek pekiştirmeyi test etmek için, 4 günlük öğrenme testlerinden sonra probe testi uygulandı. Bu testte platform tanktan çıkarılır ve ratların yüzmesi sağlanır. Ratlar, daha önce platformu buldukları çeyreklik bölümde daha fazla zaman geçirirler. Böylece platformu bulma yetenekleri bilişsel olarak kaydedilmiş olur.

3.7. Numunelerin Alınması, Tartılması ve Analizlere Hazırlık İşlemleri

Postnatal 9. haftanın bitiminde erkek ve dişi yavru ratlara yüksek dozda ksilazin-ketamin (15 mg ksilazin - 120 mg ketamin) enjeksiyonu sonrası tüm yavru ratlar dekapite edilerek beyin dokuları diseke edildi. Tüm gruptaki ratlardan alınan beyin dokularının ağırlıkları tartıldı. RT-PCR analizleri için, aseptik şartlara dikkat ederek beyin örnekleri alındı ve RNA saklama (RNA later) çözeltisinde muhafaza edildi. Western blot analizleri için beyin dokusundan ayrı örnekler alınarak saklandı. Ayrıca histopatolojik ve elektron mikroskop analizleri için de ayrı ayrı örnekler alınarak ilgili çözeltileri içerisinde Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına teslim edildi. Elde edilen serum ve doku örnekleri, analizleri daha sonra yapılmak üzere -80 °C’de saklandı.

3.8. mRNA Düzeylerinin qRT-PCR İle Analizi

RT-PCR analizleri, İnönü Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. Beyin Dokularından RNA Saflaştırılması

Dokulardan total RNA saflaştırılmasında QIAGEN firmasından temin edilen “RNeasy Mini Kit” (Lot no: 136261038 ve cat no: 74104) saflaştırma kiti kullanıldı. Total RNA saflaştırılmasının her aşaması, ilgili firmanın test protokülüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Beyin dokularından saflaştırılan total RNA’ların saflığı ve yıkımlanmanın olup olmadığı, RNA numunelerinin agaroz elektroforezinde yürütülmesi ile kontrol edilmiştir.

Ayrıca beyin dokularından saflaştırılan total RNA’ların saflık ve miktar tayinleri spektrofotometrik olarak kontrol edildi. Spektrofotometrik analiz sonuçları ile, örneklerin saf RNA içerdiği ortaya konuldu. Örneklerin RNA miktarlarının tayini için, “Biotek” marka mikropate okuyucuda, “Gen5” programı kullanılarak örneklerin 260 ve 280 nm’de absorbanları ölçüldü ve absorbanların 260/280 oranları hesaplandı. RNA miktarları ng/μL olarak ifade edildi. Örneklerin 260/280 oranı yaklaşık 2 olanları cDNA sentezinde kullanıldı.

3.8.2. cDNA Sentez Protokolü

Ratların beyin dokularından saflaştırılan total RNA’lardan MBP, MAG, MOG, BDNF ve β-Aktin cDNA’larının sentezinde, Roche firmasından temin edilen “Transcriptor First strand cDNA Synthesis” analiz kiti (Ref No: 04 896 866 001)” kullanıldı. cDNA sentez ortamına ilave edilen RNA, deoksitri nükleotid, primerler,

RNAaz inhibitörü, rivörs transkriptaz miktarlarının seçimi ve cDNA sentezinin her aşamasının şartları, ilgili firmanın protokolüne uyularak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen MBP, MAG, MOG, BDNF ve β -Aktin cDNA'ları çoğaltılma işleminde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.8.3. cDNA'ların Çoğaltılma Protokolü

MBP, MAG, MOG, BDNF ve β -Aktin cDNA'larının çoğaltılması işlemi, Roche Light Cycler 96 RT-PCR cihazında, Roche ve Tib Molbiol firmalarından temin edilen "Fast Start Essential DNA Probes Master kit (Ref No: 06 402 682 001)", MBP (TIB reference no: 021112818, Product Description No: 2111349), MAG (TIB reference no: 021112818, Product Description No: 2111353), MOG (TIB reference no: 021112818, Product Description No: 2111357), BDNF (Config No: 100129595, AssayId: 502486, LOT: 0000054844) ve β -Aktin (Config No:100081783, AssayId: 500152, LOT:0000010971) genlerine spesifik hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı. RT-PCR işleminin her aşaması ilgili firmaların direktiflerine uyularak gerçekleştirildi. MBP, MAG, MOG, BDNF ve β -Aktin genlerine spesifik hidroliz problu primerlerinin dizilimleri **Tablo 4**'de verilmiştir.

Tablo 4. MBP, MAG, MOG, BDNF ve β -Aktin Primerlerinin Dizilimleri

Gen	Primer dizisi (Forward ve Reverse)	Ref. Seq. Number
<i>β-Aktin</i>	F: 5' CTGGCTCCTAGCACCATGA 3' R: 5'TAGAGCCACCAATCCACACA 3'	NM_031144
<i>MBP</i>	F: 5' TTCTTCAAGAACATTGTGACACCT R: 5' TCCCTTGTGAGCCGATTTATAG	NM_002385
<i>MAG</i>	F: 5' GGGAGTACTGGTGTGTAGCTGAG R: 5' GGATTTTACCACACACAGGCA	NM_080600
<i>MOG</i>	F: 5' GAACGTGAGGTTCTCGGATG R: 5' CATAGGCACAAGGGCAATG	NM_206814
<i>BDNF</i>	F: 5' GTGGAGGCTAAGTGGAGCTG 3' R: 5' GTCCTACCGGTGAGTCTTTA 3'	NM_012513

Gruplardan elde edilen beyin doku örneklerinden izole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar, MBP, MAG, MOG, BDNF ve β -Aktin genlerine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile çoğaltıldı. MBP, MAG, MOG ve BDNF genlerinin ifade edilme düzeyleri β -aktin genine oranlanarak hesaplandı.

3.9. Western Blot Analizi

Western Blot analizleri, İnönü Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Western Blot; bir numunede bulunan proteinin varlığını, konsantrasyonunu ve farklı gruplar arasındaki proteinin konsantrasyon farkını göstermek için kullanılan bir metottür. Deneysel çalışma sonrası fetus, yetişkin dişi ve erkek yavruların beyin dokularında MBP, MAG, MOG, BDNF ve pro-BDNF protein düzeyleri Western Blot yöntemi ile belirlendi.

3.9.1. Numunenin Hazırlanışı

Western blot yapılacak gruplarına ait beyin dokuları 1 mM PMSF ve proteaz inhibitör koktail'i içeren RIPA tamponunda (50 mM tris HCl, 150 mM NaCl, % 1 NP-40, % 0.5 Sodyum Deoksikolat, 1 mM EDTA, % 0.1 SDS; pH: 7.4) homojenize edildi. Doku homojenatı +4°C sıcaklıkta 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin ardından süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne alındı. Alınan süpernatantın bir kısmı protein tayini için kullanıldı, kalan kısmı da Western blot analizinde kullanılmak üzere parsellenip -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.9.2. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

Homojenize edilen örneğin protein ölçümü için Lowry metodu kullanıldı. Bu amaçla BIO-RAD marka (BIO-RAD DC Protein Assay, U.S) protein tayin kiti kullanıldı. Protein standartı olarak bidistile su içerisinde 0 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1mg/ml, 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml, 7.5 mg/ml, 10 mg/ml, konsantrasyonlarında sığır serum albümini (BSA, Sigma) standartları hazırlandı. Protein ölçümü için 96 kuyucuklu plakaya örnekler ve standartlar 5 µL olacak şekilde eklendi. Üzerlerine 25 µL DC Protein Assay Reagent A ve 200 µL DC Protein Assay Reagent B ilave edildi. Kit reaktifleriyle karıştırılan örnekler 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra mikrolakaya okuyucuda 750 nm'de okutuldu ve mg/mL cinsinden protein konsantrasyonları belirlendi.

3.9.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) Jelin Hazırlanması

Çalışmada SDS-PAGE jelin hazırlanması için Bio-Rad marka vertikal elektroferez sistemi, elektroferez tankı, jel dökme sistemi (Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad) ve güç kaynağı (Power Pac 3000, Bio-Rad) kullanıldı. SDS-Poliakrilamid jelin hazırlanması için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

1. Jel dökmek için kullanılan ince ve kalın camlar vertikal elektroforez sistemine yerleştirildi.
2. Hazırlanan jel çözeltisi pipet yardımıyla iki cam arasındaki boşluğa döküldü. Jel **Tablo 5**'te belirtildiği gibi hazırlanmıştır.
3. Jelin üst sınırının düzgün olması için üzerine izopropanol eklendi.
4. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra üstteki izopropanol uzaklaştırıldı.
5. Stoklama jel çözeltisi hazırlandı ve ayırma jelin üzerine döküldü.
6. 10 kuyulu tarak 45° açı ile iki cam arasına yerleştirildi ve polimerizasyon için bir süre beklendi.
7. Örnekler 20-30 µg protein olacak şekilde hesaplandı. 2X örnek yükleme tamponu ve %10 oranında β-merkaptolanol ile örnekler karışımı hazırlandı.
8. Protein karışımını içeren ependorf tüpler 95°C'de 5 dk inkübe edilip denetürasyonun ardından örnek grupları jele yüklendi.

Tablo 5. Ayırma ve Stoklama Jeli Karışım Kompozisyonu

BİLEŞENLER	%10 AYIRMA JELİ KARIŞIMI	%5 STOKLAMA JELİ KARIŞIMI
DİSTİLE SU	4.02 mL	3 mL
%30 AKRİLAMİD STOĞU	3.33 mL	660 µL
TRİS TAMPONU	2.5 mL	1.26 mL
%10 SDS	100 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL
%10 APS	50 µL	25 µL

3.9.4. Elektroforetik Yürütme

Örnek yüklendikten hemen sonra tank sisteminin üzeri kapatıldı. Tank sisteminin güç kaynağı ile bağlantısı kuruldu. Yüklenen örnekler ayırma jeline girine kadar düşük akımda 100 Volt gerilim uygulandı. Örnekler ayırıcı jele geçtikten sonra gerilim 120 volta çıkarıldı. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna geldiğinde akım kesildi ve jeller tank sistemden alındı.

3.9.5. Proteinlerin Membrana Transferi

Proteinlerin membrana transferi için Semi-Dry transfer yöntemi uygulandı. Transfer için önce jel tanktan çıkarıldı ve tarak kısımları kesilip atıldı. Daha sonra transfer cihazının kasetine önce filtre sonra membran, jel ve yine filtre olacak şekilde yerleştirildi. BIO-RAD Semi-Dry transfer cihazı kullanılarak proteine uygun kDa'da program seçildi. 25V sabit voltaj ile 5-10 dk sürede proteinlerin jelden membrana göçü sağlandı.

3.9.6. Bloklama

Transfer sonrası proteinlerin aktarıldığı membran 1 saat %5'lik süt tozu ve 1X TBST (10X TBS, Tween-20, ddH₂O) tamponunda çalkalamaya bırakıldı. Bu süre sonunda membran 10 dakika aralıklarla 3 kez 1X TBST çözeltisi yıkandı.

3.9.7. Primer Antikor ile İnkübasyon

Tavşanda üretilmiş sıçan spesifik monoklonal MBP 1:1000 (Cell Signaling Technology, 78896), monoklonal MAG 1:1000 (Cell Signaling Technology, 9043), monoklonal MOG 1:1000 (Cell Signaling Technology, 96457), monoklonal BDNF 1:1000 (Abcam, ab108319), monoklonal β -aktin (Cell Signaling Technology, 4970) ferede üretilmiş sıçan spesifik monoklonal pro-BDNF 1:100 (Santa Cruz, sc-65514), antikorları, 1X TBST çözeltisi ile belirtilen oranda dölüye edildi. Membran, ilgili primer antikorları ile +4 °C'de bir gece düşük çalkalama ile inkübe edildi. Bir gün sonra membran alınarak 3 kez 10'ar dakika TBST ile yıkandı ve bağlanmayan antikorları uzaklaştırıldı.

3.9.8. Sekonder Antikor ile İnkübasyon

Primer antikor inkübasyonundan alınan ve yıkanan membran 1:2000 oranında Anti-rabbit (Cell Signaling Technology, 7074) veya Anti-mouse sekonder antikorları (Cell Signaling Technology, 7076) ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Membran tekrar 3 kez 10'ar dakika TBST ile yıkandı ve bağlanmayan antikorları uzaklaştırıldı.

3.9.9. Görüntüleme ve Dansitometrik Analiz

Görüntüleme için Thermo Scientific marka elektrokemilüminisens (ECL Plus Western Blotting Substrate, REF32132, USA) western blot görüntüleme kiti kullanıldı. Sekonder antikora bağlı bulunan horse radish peroksidaz enzimi, ECL çözeltisi içinde bulunan substratı katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ışımaya yol açmaktadır. Bu ışımaya, Biochemi (DNR Bio-imaging system, İsrail) görüntüleme cihazı

ile görüntülendi. Protein bant yoğunlukları ImageJ Analysis Software (Version 1.53e, USA) programında değerlendirildi. Veriler β -aktin'e oranlanarak standardize edildi.

3.10. Histopatolojik İnceleme Yöntemi

Histopatolojik incelemeler, İnönü Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.10.1. Histolojik Doku Takibi

Anestezi altında fetuslardan, dişi ve erkek yetişkin ratlardan çıkarılan beyin dokusu örnekleri histolojik incelemeler ve histomorfometrik analizler için %10'luk formaldehit içerisine alındı. Oda sıcaklığında 24 saatlik tespit süresi sonrasında beyin örnekleri trimlenerek Tissue-Tek VIP/SAKURA doku takip cihazı ile doku takip işlemi uygulandı (**Tablo 6**). Doku takip işlemlerinin ardından beyin doku örnekleri katı parafin içerisine gömüldü.

Tablo 6. Histolojik doku takibi prosedürü

Doku takibi prosedürü

1. Musluk suyu	1 saat
2. Musluk suyu	1 saat
3. %80 alkol	1 saat
4. %96 alkol	1 saat
5. %96 alkol	1 saat
6. Absolü alkol	1 saat
7. Absolü alkol	1 saat
8. Ksilen	1 saat
9. Ksilen	1 saat
10. Ksilen	1 saat
11. Parafin I	1 saat
12. Parafin II	1 saat
13. Parafin III	1 saat
14. Parafin IV	1 saat

3.10.2. Histomorfometrik ve Histopatolojik Analizler

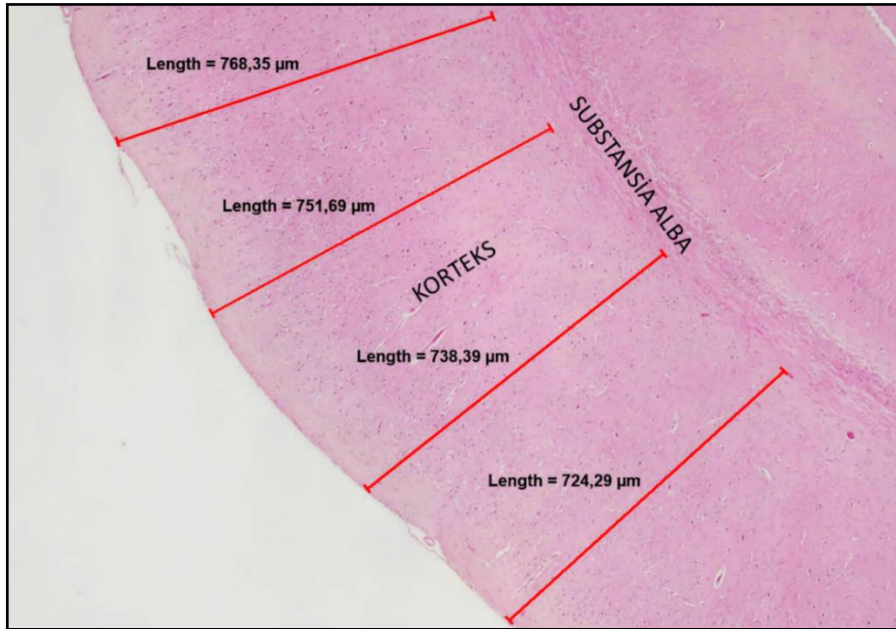
Histomorfolojik ölçümler ve histopatolojik değerlendirmeler ve uygulamalar için beyin parafin bloklarından mikrotom ile 5 μ m kalınlığında kesitler alındı. Kesit işleminin ardından histomorfolojik ölçümler ve histopatolojik skorlamalar için kesitler hematoksilin eozin (HE) boyama için Leica Autostainer XL boyama cihazında HE boyama prosedürüne göre boyandı (**Tablo 7**).

Tablo 7. Hematoksilen eozin (HE) boyama prosedürü

HE boyama prosedürü

1. İnkübasyon (60°C)	1 saat
2. Ksilen	5 dk x 3
3. %96 alkol	3 dk
4. %96 alkol	3 dk x 2
5. Absolü alkol	3 dk x 2
6. Musluk suyu	5 dk
7. Hematoksilen	10 dk
8. Musluk suyu	5 dk x 3
9. Eozin	2 dk
10. %96 alkol	3 dk x 2
11. Absolü alkol	3 dk x 2
12. Ksilen	5 dk x 3
13. Kapama	

HE ile boyanan doku kesitlerinde beyin korteks çap ölçümü yapıldı. Çap ölçümü için erkek ve dişi gruplarında 1. 2. ve 3. ventrikülün görüldüğü kesitlerde 4x objektifte, beyin korteksinin farklı dört bölgesinde piameterden substansia albaya dik bir çizgi çekilerek ölçüm yapıp ortalamaları alındı (Şekil 14). Fetuslarda korteks medulla ayırımı yapılamadığından korteks çapı açısından bu grupta değerlendirme yapılmadı.



Şekil 14. Korteks çapı ölçümü

Beyin korteksinin farklı bölgelerinde piameterden substansia albaya dik bir çizgi çekilerek ölçüm yapılmıştır. H&E, 4X

Nükleus heterokromazisi analizi için, rastgele seçilen 5 farklı alanda 20x objektifte korteks nöronlarının nükleusları heterokromazi şiddetine göre, 0; normal-ökromatik nükleus, 1; hafif heterokromatik nükleus, 2; orta şiddetli heterokromatik nükleus, 3; ileri düzey heterokromatik+piknotik nükleus olarak skorlandı.

3.10.3. İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal analizler, İnönü Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimyasal olarak MBP, MOG ve BDNF immünoreaktivitesi araştırıldı. Kesitler rutin kromojenik immünohistokimyasal boyama protokolüne göre (**Tablo 8**) MBP (Cell Signaling Technology, 78896), MOG (Cell Signaling Technology, 96457) ve BDNF (Abcam, ab108319) primer antikorları ve HRP IHC kiti (Thermo Fisher) kullanılarak boyandı. Tüm antikorlar için immünoreaktivite değerlendirmesi 40x objektif kullanılarak, beyin korteksinde rastgele seçilen 10 farklı alanda boyanma şiddeti değerlendirilerek H skorlaması ile yapıldı. Fetus beyinleri için tüm gruplarda MOG ve MBP immünoreaktivitesi gözlenmediği için bu antikorlar için skorlama yapılamadı.

Tablo 8. İmmünohistokimya boyama prosedürü

IHC boyama prosedürü

1. Deparafinizasyon	
2. Antijen Retrieval	15dk, 121°C
3. Distile Su	1 dk
4. PBS	1 dk
5. Hidrojen Peroksit	10 dk
6. PBS	1 dk
7. Protein Blok	5 dk
8. Primer Antikor	40 dk
9. PBS	5 dk
10. Sekonder Antikor	20 dk
11. PBS	5 dk
12. Streptevadin Peroksidaz (HRP)	10 dk
13. PBS	1 dk
14. Kromojen	10 dk
15. PBS	1 dk
16. Distile Su	1 dk
17. Hematoksilen	2 dk
18. Musluk Suyu	1 dk x 3
19. Distile Su	1 dk

Tüm analizler için boyanan doku kesitleri, Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, DS-Fi3 camera (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) ve NIS-Elements Documentation 5.02 Görüntü Analiz Sistemi (Nikon Corp., Tokyo, Japan) kullanılarak incelenip fotoğraflar alındı.

3.10.4. Transmisyon Elektron Mikroskopik İnceleme

Elektron mikroskopik incelemeler, İnönü Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Fetus, dişi ve erkek yavru sıçanların beyin kortekslerinden elektron mikroskopik inceleme için 2x2x2 mm boyutlarında doku örnekleri alındı. Doku örneklerine % 2,5 gluteraldehit içinde üç saat % 1 Osmiyum tetroksit (OsO₄) ile 2 saat tespit işlemi uygulandı. Tespit işlemi tamamlanan doku örnekleri %30, %50, %70, %90 ve %100 aseton ile dehidrate edildi. Dehidrasyon işlemi takiben doku örneklerine araldit infiltrasyonu uygulandıktan sonra araldit bloklar içine gömülerek polimerize edildi. Araldit bloklardan ultramikrotom ile 70 nm kalınlığında kesitler bakır gridler üzerine alınarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. Tüm kesitler Zeiss Libra 120 Transmission elektron mikroskop (TEM) (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen Germany) ile incelenerek fotoğraflandı.

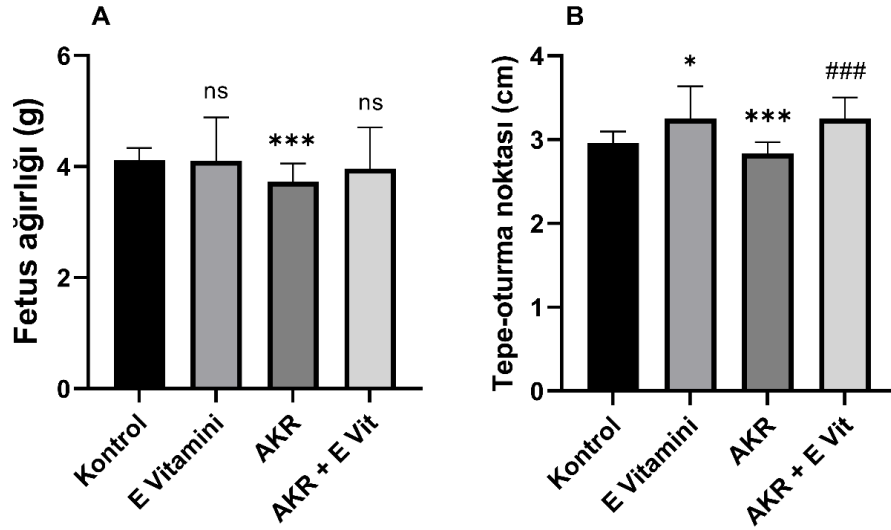
3.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) ile yapıldı. Veri dağılımının normalliği Shapiro-Wilk testleri ile değerlendirildi. Grupların istatistiksel karşılaştırmaları için, Dunnett's çoklu karşılaştırma testinin ardından one-way ANOVA varyans analizi uygulandı. Verilerin normal dağılım göstermemesi durumunda Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunn's post hoc testi kullanıldı. Veriler, tekrarlar için mean ± SD olarak ifade edildi. *p* değerleri, 0.05'ten küçük anlamlı kabul edildi ve istatistiki anlamlılık * *p*<0.05, ** *p*<0.01 veya *** *p*<0.001 olarak etiketlendi.

4. BULGULAR

4.1. CRL Mesafesi, Fetus ve Beyin Ağırlıkları

Tüm gruplardaki gebe ratlardan sezeryan ile alınan fetusların ağırlık, CRL mesafesi ölçüldü. Organogenezin bir ölçütü olabilecek tartım ve incelemeler istatistiksel olarak ele alındığında 21 günlük fetusların ağırlıkları, AKR uygulaması ile önemli derecede azalırken ($p<0.001$), E vitamini uygulaması, bu olumsuz etkiyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde düzeltmiştir ($p<0.05$). Fetus ağırlıklarının gruplara göre grafiksel gösterimi Şekil 15A'da verilmiştir.

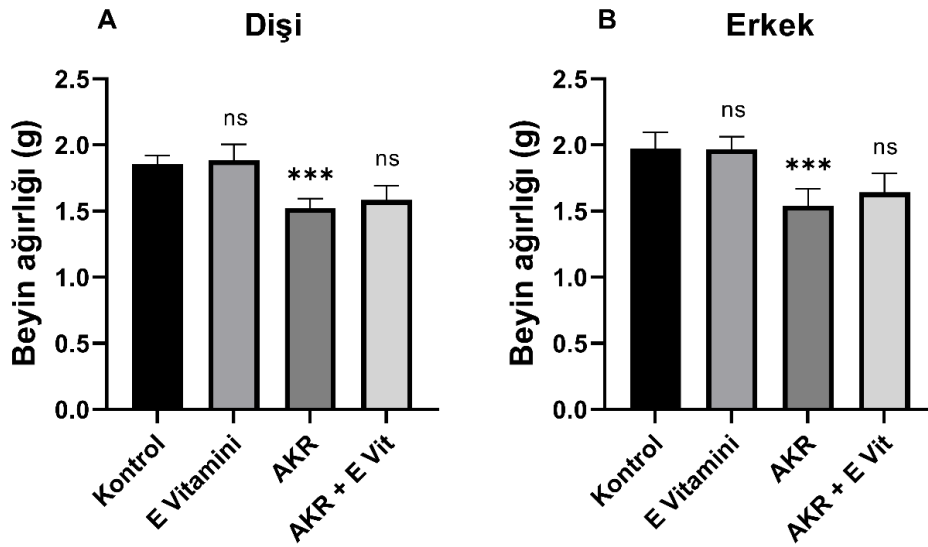


Şekil 15. Fetus ağırlıkları ve CRL mesafesinin grafiksel gösterimi

A. Fetusların total vücut ağırlıkları. B. Fetusların CRL (tepe-oturma noktası) ölçümleri. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $*p<0.05$ ve $***p<0.001$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık $###p<0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

Organogenez ve gelişimin bir göstergesi olması açısından değerlendirilen CRL mesafesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 21 günlük fetuslarda, AKR uygulanan grupta belirgin ölçüde azalırken ($p<0.001$), AKR + E vitamini grubunda E vitamininin ise CRL'yi önemli ölçüde artırdığı görülmüştür ($p<0.001$). CRL mesafesinin gruplara göre grafiksel gösterimi Şekil 15B'de verilmiştir.

Ayrıca normal yolla doğum yapan ratlardan doğan yavrular dişi ve erkek olarak gruplandırılıp total beyin dokuları alınıp tartımları yapılmıştır. Beyin ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde hem dişi hem de erkek ratlarda AKR uygulanan gruplarda önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir ($p<0.001$). Her iki cinsiyette de E vitamini uygulaması beyin ağırlıklarını artırmıştır ancak bu artış AKR grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Her iki cinsiyetteki ratların ölçülen total beyin ağırlıkları Şekil 16’te verilmiştir.

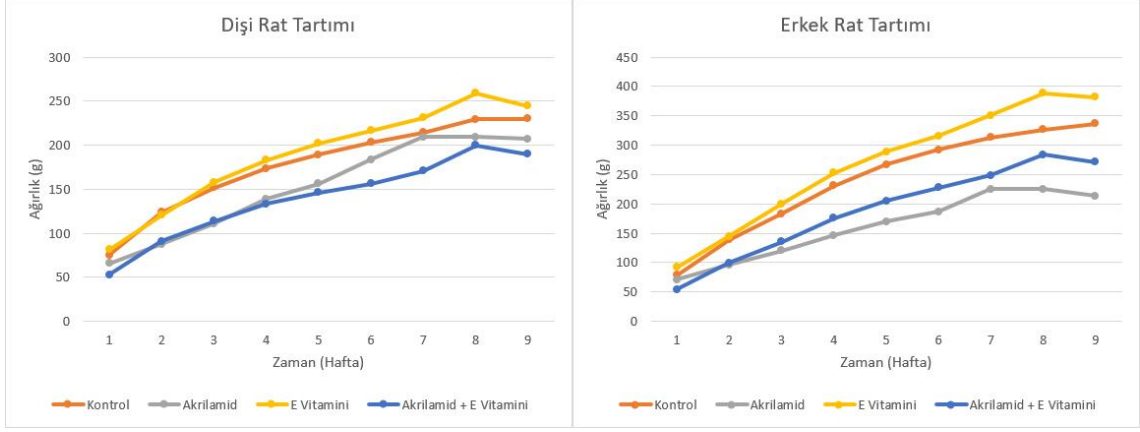


Şekil 16. Ratların beyin ağırlıklarının grafiksel gösterimi

A. Dişi ratların total beyin ağırlıkları. B. Erkek ratların total beyin ağırlıkları. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $***p<0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil

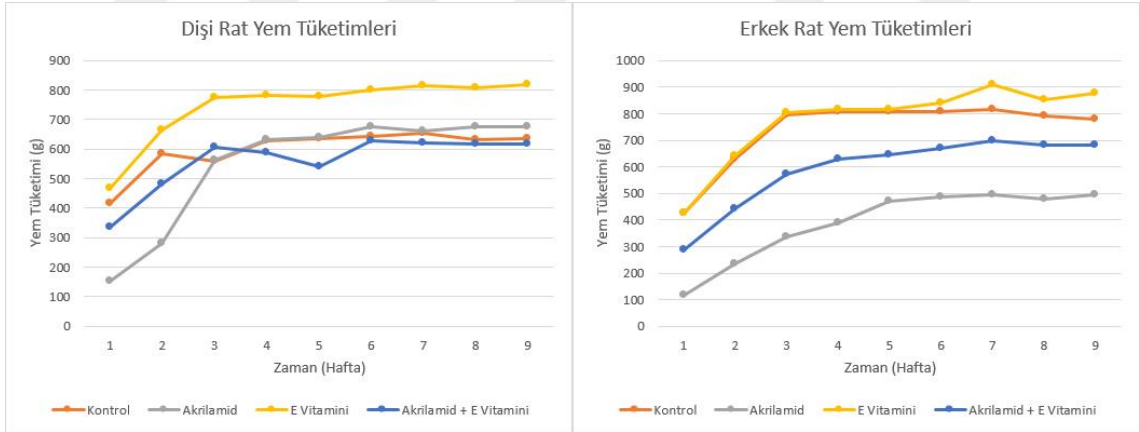
4.2. Ratların Canlı Ağırlıkları, Su ve Yem Tüketimleri

Hem dişi hem de erkek yavru ratların her grup için haftalık olarak canlı ağırlıkları hassas terazi ile tartılarak kaydedilmiştir. Hem dişi hem de ratlarda en fazla canlı ağırlık E vitamininin uygulandığı gruplarda tespit edilmiştir. Her iki cinsiyette kontrol grubu canlı ağırlığı E Vitaminini takip etmiştir. Erkek ratlarda en az canlı ağırlık genel olarak AKR grubunda gözlenmiştir. Tüm gruplarda kaydedilen canlı ağırlıklar Şekil 17’de verilmiştir.



Şekil 17. Ratların canlı ağırlıklarının haftalık takip grafikleri

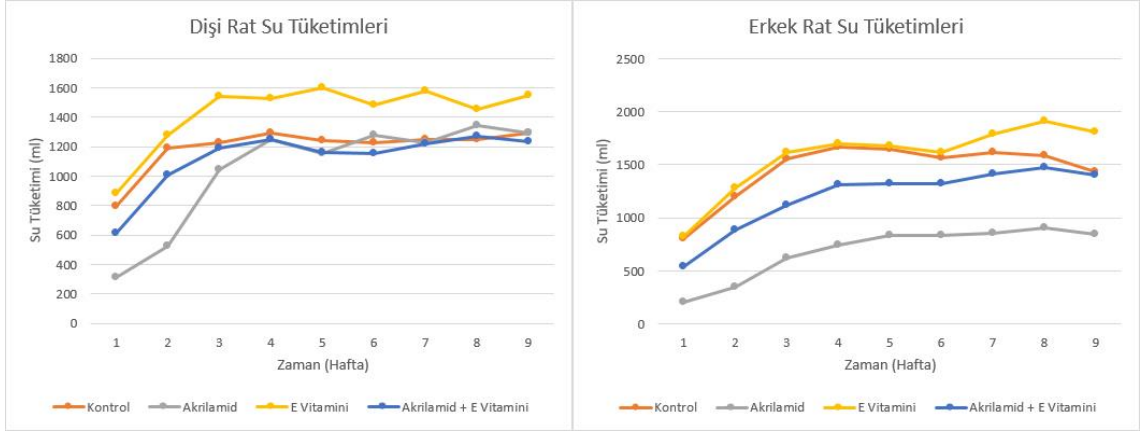
Tüm gruplarda her kafes için haftalık tüketilen yem miktarı kaydedilmiştir. Ratların canlı ağırlıklarıyla paralel olarak hem dişi hemde erkek ratlarda en çok yem tüketimi E Vitamini gruplarında gözlenmiştir. Her iki cinsiyette Kontrol grubu yem tüketimi açısından E Vitamini grubuna göre daha az tüketim göstermiştir. Erkek ratlarda en az yem tüketimi genel olarak AKR grubunda gözlenmiştir. Tüm gruplarda tüketilen yemler Şekil 18’de verilmiştir.



Şekil 18. Ratların yem tüketimlerinin haftalık takip grafikleri

Tüm gruplarda her kafes için haftalık tüketilen su miktarı kaydedilmiştir. AKR ve kontrol grupları haftada 1 kez ölçülmüştür. E Vitamini ve AKR+E Vitamini grupları ise hafta 3 kez değiştirilerek takip kaydedilmiştir. Ratların canlı ağırlıklarıyla paralel olarak hem dişi hemde erkek ratlarda en çok su tüketimi E Vitamini gruplarında gözlenmiştir.

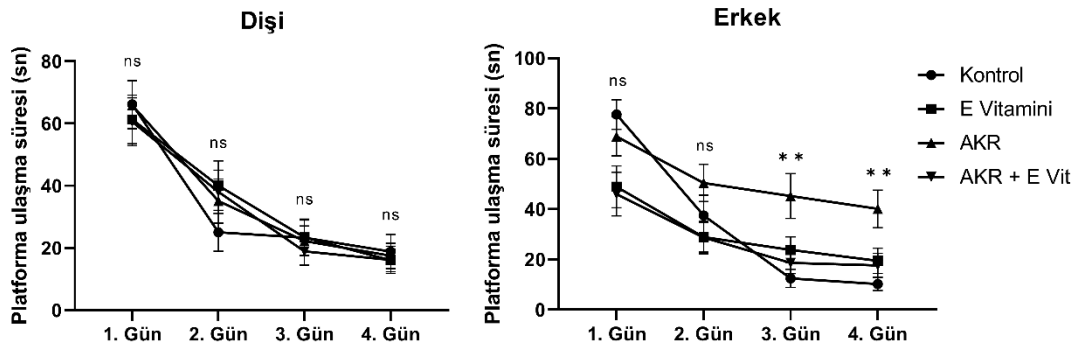
Erkek ratlarda en az su tüketimi genel olarak AKR grubunda gözlenmiştir. Tüm gruplarda tüketilen sular **Şekil 19**'da verilmiştir.



Şekil 19. Ratların su tüketimlerinin haftalık takip grafikleri

4.3. Water Maze Bilişsel Fonksiyon Testi

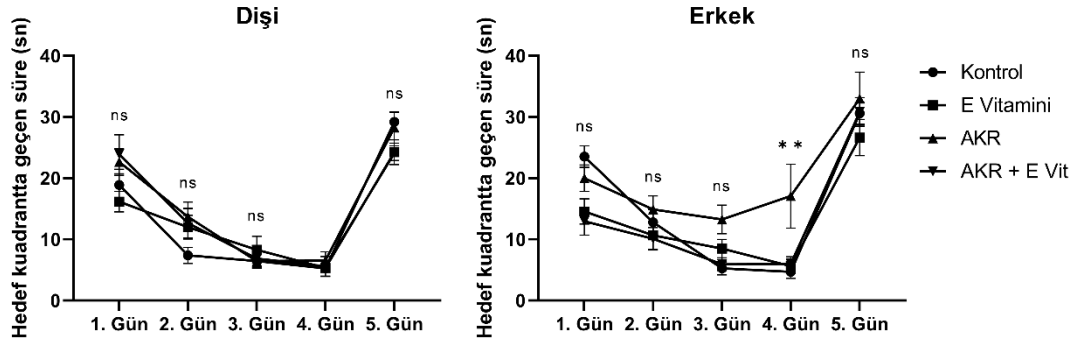
Hafızanın pekiştirilmesi için uygulanan probe testinde ratların platforma ulaşma sürelerinin takip edildiği 4 günlük yüzdürme süreleri karşılaştırıldığında; dişi ratlar için kontrol grubu ile AKR grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır. Ancak erkek ratlarda 3. ve 4. gün AKR grubunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli fark görülmüştür ($p<0.01$). AKR+E vitamini grubu ise platformu bulma süresini önemli derecede azaltmıştır. Dişi ve erkek ratların ilk 4 gün için platformu bulma süreleri **Şekil 20**'da verilmiştir.



Şekil 20. Water maze testinde ratların platformu bulma süreleri

Aynı gün için kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $**p<0.01$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

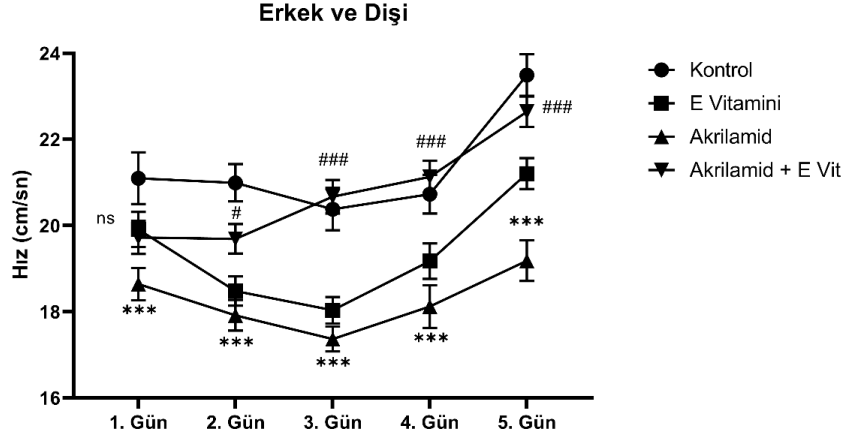
Hafızanın pekiştirilmesi için uygulanan probe testinde ratların platformun bulunduğu kuadranda geçirdikleri süreler karşılaştırıldığında; hem dişi hem de erkek ratlarda ilk 4 gün içerisinde azalan bir süre tespit edilmiştir. Probe'un kaldırıldığı 5. günde ise ratların ilk 4 günde geçirdiği süreden daha fazla süre geçirdiği görülmüştür. 5. gün değerlendirildiğinde hedef kuadranda geçirilen süre açısından, kontrol grubuna göre AKR grubundan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (**Şekil 21**).



Şekil 21. Water maze testinde ratların hedef kuadrantta geçirdikleri süreler

Aynı gün için kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $**p < 0.01$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

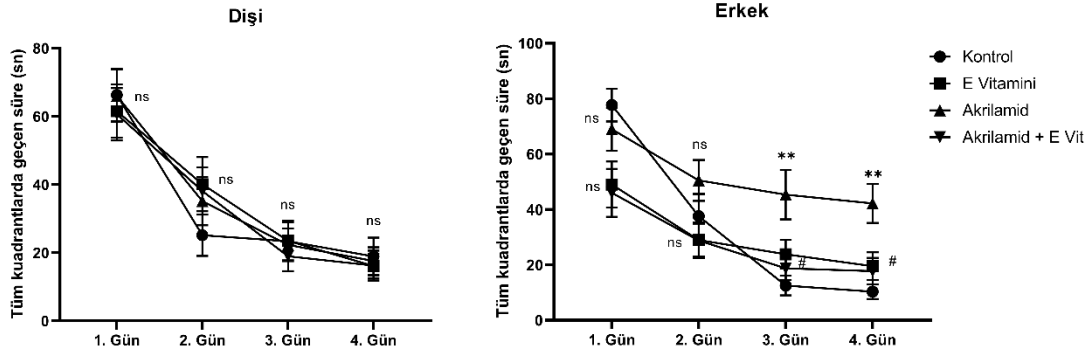
Water maze testinde tüm ratların 5 gün boyunca yüzme hızları karşılaştırıldığında; tüm günlerde AKR grubunda, kontrol grubuyla kıyaslandığında yüzme hızlarında önemli azalma tespit edildi ($p < 0.001$). AKR+E vitamini grubu, AKR grubu ile kıyaslandığında ise yüzme hızlarında 1. gün haricinde tüm günlerde istatistiksel olarak önemli derecede artış görülmüştür (2. gün için $p < 0.05$, diğer günler için $p < 0.001$). Dişi ve erkek ratların 5 gün için yüzme hızları **Şekil 22**'de verilmiştir.



Şekil 22. Water Maze testinde dişi ve erkek ratların ortalama yüzme hızları

Aynı gün için AKR grubunun Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı $***p < 0.001$. Aynı gün için AKR + E vitamini grubunun, AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılığı $\#p < 0.05$ $###p < 0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

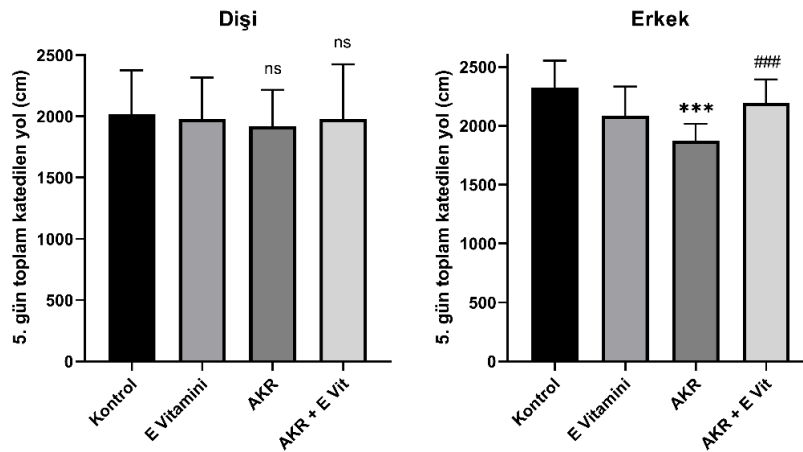
Dişi ve erkek ratların tüm kuadrantlarda geçirdikleri süreler karşılaştırıldığında; hem dişi hem de erkek ratlarda ilk 4 gün içerisinde azalan bir süre tespit edilmiştir. Dişi ratların ilk 4 günde tüm alanlarda geçirdikleri sürelerde gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Erkek ratlarda ise tüm kuadrantlarda geçirilen süre değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre 3. ve 4. günde AKR grubundan anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.01$). AKR+E vitamini grubu, AKR grubu ile kıyaslandığında 3. ve 4. günlerde istatistiksel anlamlı azalma belirlenmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 23. Water Maze testinde ratların tüm kuadrantlarda yüzme süreleri

AKR grubunun Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı $**p<0.01$. AKR + E vitamini grubunun, AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılığı $\#p<0.05$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

Probe testinin yapıldığı 5. günde dişi ve erkek ratların toplam katettikleri yollar incelenmiştir. Buna göre, dişi ratlarda gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.5$). Erkek ratlarda ise AKR grubunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında katedilen yol açısından önemli azalma tespit edilmiştir ($p<0.001$). AKR+E vitamini grubu, AKR grubu ile kıyaslandığında ise E vitamini uygulamasının azalmış olan katedilen yolu önemli derecede artırdığı belirlenmiştir ($p<0.001$).

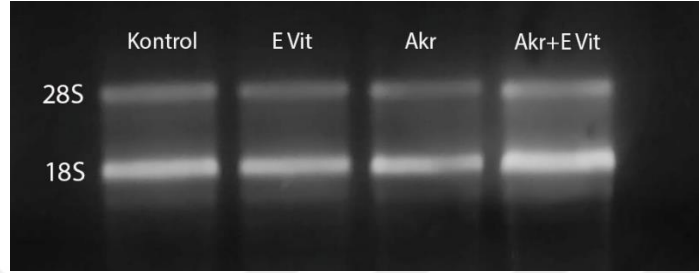


Şekil 24. Water Maze testinde ratların 5. gün toplam katettikleri yol

Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $***p<0.001$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık $###p<0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

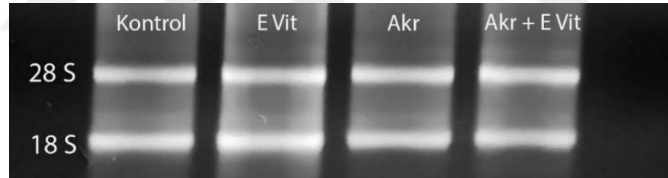
4.4. qRT-PCR ile mRNA Düzeylerinin Analiz Sonuçları

Her bir grubun beyin dokularından 28S ve 18S ribozomal RNA'lar saflaştırılmış, bantlarının mevcudiyeti ve bantlarda herhangi bir yıkılımın olup olmadığı agaroz elektroforezi ile kontrol edildi. **Şekil 25** ve **Şekil 26**'de verilen elektroforegramlar, 28S ve 18S ribozomal RNA bantlarının mevcut olduğu ve bantlarda herhangi bir yıkılımın meydana gelmediğini göstermektedir.



Şekil 25. Dişi beyin dokularından saflaştırılan RNA'ların elektroforegramı

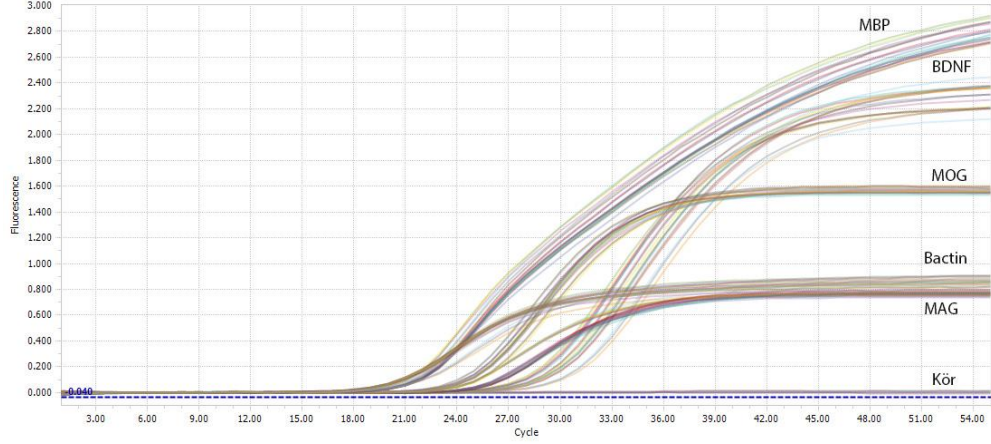
Dişi beyin dokularından izole edilen total RNA'ların saflığı ve yıkımlanmanın olup olmadığı, RNA numunelerinin %0,5'lik agaroz jelde elektroforezde yürütülerek 28S ve 18S rRNA bantları ile kontrol edilmiştir.



Şekil 26. Erkek beyin dokularından saflaştırılan RNA'ların elektroforegramı

Erkek beyin dokularından izole edilen total RNA'ların saflığı ve yıkımlanmanın olup olmadığı, RNA numunelerinin %0,5'lik agaroz jelde elektroforezde yürütülerek 28S ve 18S rRNA bantları ile kontrol edilmiştir.

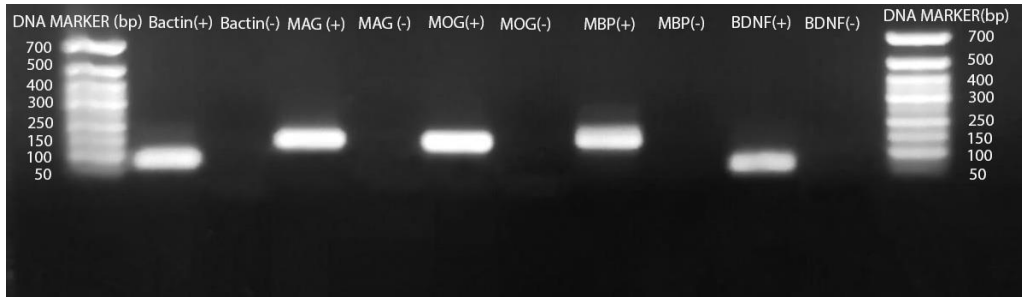
Gen analizleri "Hydrolysis Probe" kullanılarak yapılmıştır. β -aktin ve MBP, MAG, MOG, BDNF mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların qRT-PCR ile çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. MBP, MAG, MOG, BDNF ve β -aktin mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların qRT-PCR ile çoğaltım eğrisi **Şekil 27**'de verilmiştir.



Şekil 27. β -aktin ve MBP, MAG, MOG, BDNF mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların qRT-PCR ile total çoğalım eğrisi

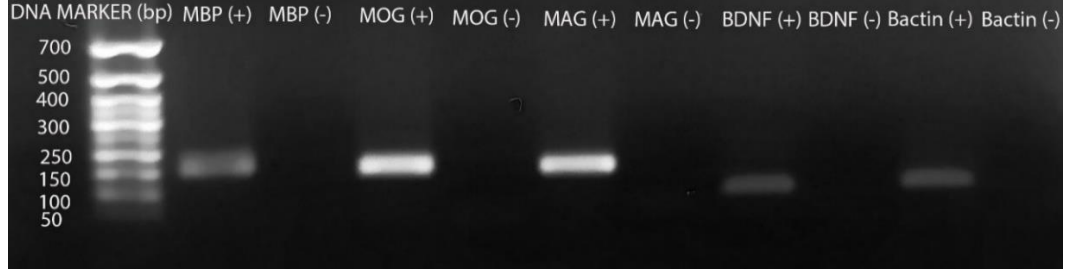
Total RNA'dan sentezlenen MBP, MAG, MOG, BDNF amplifikasyonlarının RT-PCR eğrileri. Hesaplanan döngü eşiği (Cycle threshold, Ct) ile her numune için bir Ct değerinin belirlenmesini sağlar. MBP: Miyelin basic protein, MAG: Miyelin ilişkili protein, MOG: Miyelin oligodendrosit protein, BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör.

qRT-PCR ile MBP, MAG, MOG, BDNF ve β -aktin cDNA'larının sentezi sonrası, primer bağlanmasının özgülüğünü kontrol etmek için agaroz jelinde örnekler yürütülmüştür. Elektroforezde MBP, MAG, MOG, BDNF ve β -aktin Aromataz genleri için tek ve istenilen boyda DNA bantlarının oluştuğu görüldü. Agaroz jelde elde edilen elektroforegramlar **Şekil 28** ve **Şekil 29**'te verilmiştir.



Şekil 28. Dişi beyin dokusunda β -aktin ve MBP, MAG, MOG, BDNF cDNA'larının RT-PCR'daki çoğalımının elektroforegram görüntüsü

Elektroforezde 50 bp'lik DNA belirteci kullanılmıştır (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007). MBP: Miyelin basic protein, MAG: Miyelin ilişkili protein, MOG: Miyelin oligodendrosit protein, BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör.

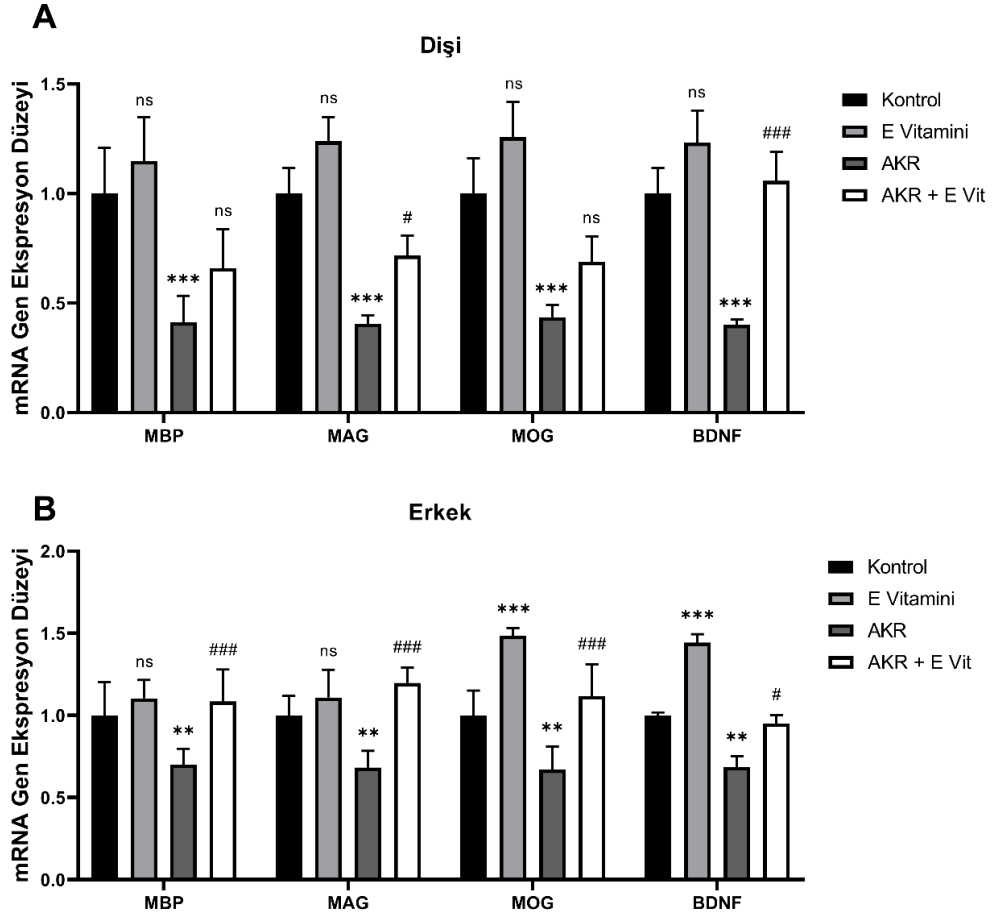


Şekil 29. Erkek beyin dokusunda β -aktin ve MBP, MAG, MOG, BDNF cDNA'larının RT-PCR'daki çoğalımının elektroforegram görüntüsü

Elektroforezde 50 bp'lik DNA belirteci kullanılmıştır (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007), MBP: Miyelin basic protein, MAG: Miyelin ilişkili protein, MOG: Miyelin oligodendrosit protein, BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör.

Dişi rat yavrusunun beyin dokusunda qRT-PCR ile yapılan analizler sonucunda, AKR uygulamasının MBP ($p<0.001$), MAG ($p<0.001$), MOG ($p<0.001$) ve BDNF ($p<0.001$) gen ekspresyonlarını ciddi derecede azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, AKR uygulamasının dişi beyinlerinde miyelinle ilişkili genlerin ve BDNF geninin transkripsiyonunu azalttığını ortaya koymaktadır. AKR+E vitamini grubunda ise E vitamini uygulaması gen ekspresyonlarını artırmıştır. Bu artışlar, AKR grubuyla kıyaslandığında MAG ($p<0.05$) ve BDNF ($p<0.001$) mRNA düzeyleri için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dişi beyinlerinde hesaplanan gen ekspresyon düzeyleri **Şekil 30A**'da verilmiştir.

Erkek rat yavrusunun beyin dokusunda qRT-PCR ile yapılan analizler sonucunda, dişi gruplarına benzer şekilde AKR uygulamasının MBP ($p<0.01$), MAG ($p<0.01$), MOG ($p<0.01$) ve BDNF ($p<0.01$) gen ekspresyonlarını ciddi derecede azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, AKR uygulamasının erkek beyinlerinde miyelinle ilişkili genlerin ve BDNF geninin transkripsiyonunu azalttığını ortaya koymaktadır. AKR+E vitamini grubunda ise E vitamini uygulaması AKR grubuna kıyasla MBP ($p<0.001$), MAG ($p<0.001$), MOG ($p<0.001$) ve BDNF ($p<0.05$) gen ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artırmıştır. Erkek beyinlerinde hesaplanan gen ekspresyon düzeyleri **Şekil 30B**'da verilmiştir.



Şekil 30. Dişi ve Erkek yavru rat gruplarında hesaplanan mRNA düzeyleri

A. Dişi rat beyinlerinde tüm gruplar için MBP, MAG, MOG, BDNF mRNA gen ekspresyonlarının β -actin gen ekspresyonuna bağlı hesaplanmasıyla elde edilen histogram grafiği. B. Erkek rat beyinlerinde tüm gruplar için MBP, MAG, MOG, BDNF mRNA gen ekspresyonlarının β -actin gen ekspresyonuna bağlı hesaplanmasıyla elde edilen histogram grafiği. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $**p < 0.01$ ve $***p < 0.001$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık $\#p < 0.05$ ve $###p < 0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil, MBP: Miyelin basic protein, MAG: Miyelin ilişkili protein, MOG: Miyelin oligodendrosit protein, BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör.

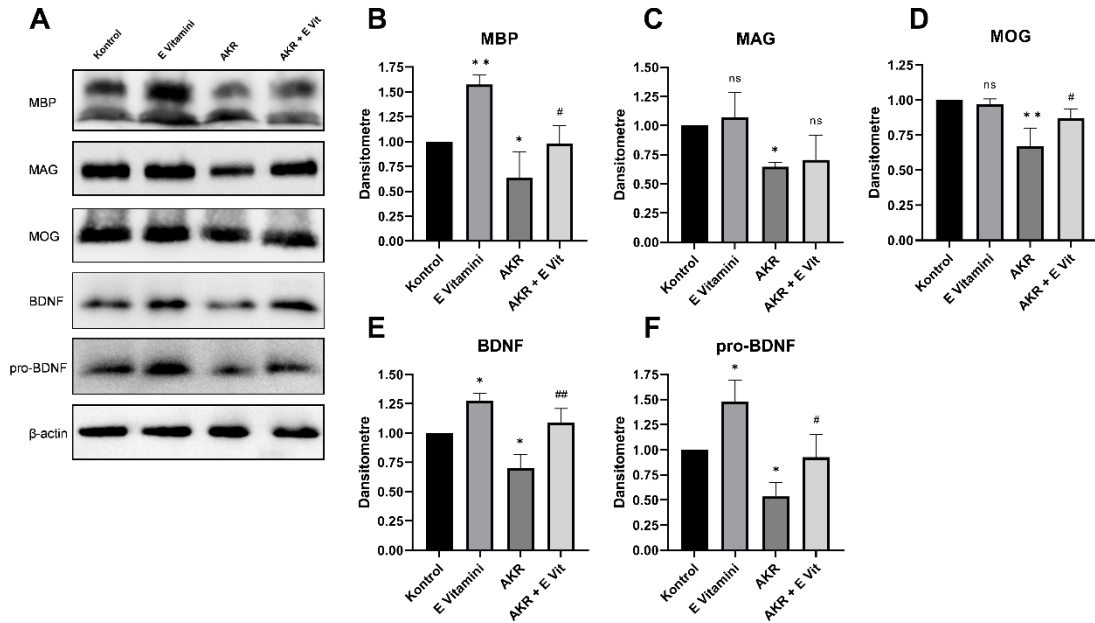
4.5. Beyin Dokusu Western-Blot Analiz Sonuçları

Fetus, dişi ve erkek yavru ratlarına ait tüm gruplardan alınan total beyin dokularından RIPA ile ekstrake edilen MBP, MAG, MOG, BDNF, pro-BDNF ve β -aktin proteinleri western-blot ile analiz edilmiştir.

4.5.1. Fetus Beyninde Ölçülen Protein Düzeyleri

Fetuslardan alınan total beyin dokularına ait proteinler %10 SDS-PAGE ile ayrılıp MBP antikoru ile immünoiblot edildikten sonra 12 kDa ve 18 kDa'da olmak üzere MBP'ye spesifik 2 bandlık görüntüler elde edilmiştir. MAG antikoru ile 100 kDa, MOG antikoru ile 28 kDa, BDNF ve pro-BDNF antikolarıyla ise 14 kDa'luk bandlar kaydedilmiştir. Tüm bandlar için sinyaller beklenen bölgelerde kaydedilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre, AKR uygulamasının beyin MBP ($p<0.05$), MAG ($p<0.05$), MOG ($p<0.01$), BDNF ($p<0.05$) ve pro-BDNF ($p<0.05$) düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. AKR + E vitamini grubunda ise, E Vitamini uygulamasının, AKR'nin bu olumsuz etkisini MBP ($p<0.05$), MOG ($p<0.05$), BDNF ($p<0.01$) ve pro-BDNF ($p<0.05$) düzeylerini AKR grubuna göre anlamlı derecede artırdığı tespit edilmiştir. E Vitamini uygulaması, AKR'nin düşürdüğü MAG protein ekspresyon düzeyini artırmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Tüm antikolarla elde edilen bandlar ve dansitometrik analizlere ait grafiksel görüntüler Şekil 31'te verilmiştir.



Şekil 31. Fetus beyin dokusunda elde edilen Western Blot band görüntüleri

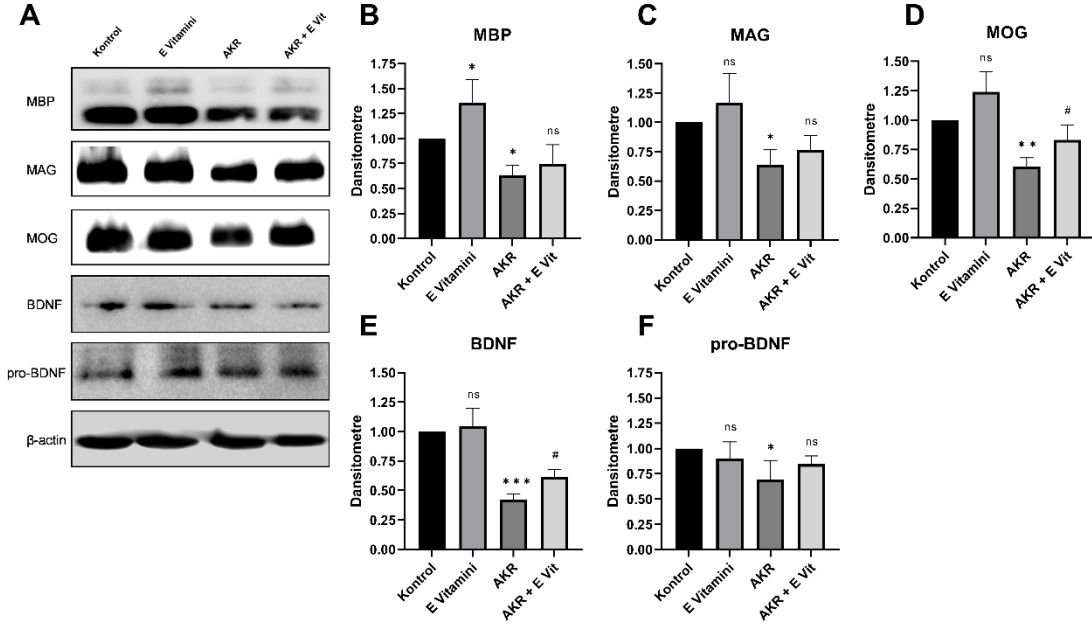
A. Fetus beyinlerinde tüm gruplar için elde edilen MBP, MAG, MOG, BDNF, pro-BDNF proteinlerinin western blot bantları. B. Fetus beyin dokularında MBP protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. C. Fetus beyin dokularında MAG protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. D. Fetus beyin dokularında MOG protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. E.

Fetus beyin dokularında BDNF protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. F. Fetus beyin dokularında pro-BDNF protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık # $p < 0.05$ ve ## $p < 0.01$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil, MBP: Miyelin basic protein, MAG: Miyelin ilişkili protein, MOG: Miyelin oligodendrosit protein, BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör, pro-BDNF: pro-Beyin kökenli nörotrofik faktör.

4.5.2. Dişi Rat Beyninde Ölçülen Protein Düzeyleri

Dişi ratlardan alınan total beyin dokularına ait proteinler %10 SDS-PAGE ile ayrılıp MBP antikoruna ile immüno-blot edildikten sonra 12 kDa ve 18 kDa'da olmak üzere MBP'ye spesifik 2 bandlık görüntüler elde edilmiştir. MAG antikoruna ile 100 kDa, MOG antikoruna ile 28 kDa, BDNF ve pro-BDNF antikorlarıyla ise 14 kDa'luk bandlar kaydedilmiştir. Tüm bandlar için sinyaller beklenen bölgelerde kaydedilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre, AKR uygulamasının beyin MBP ($p < 0.05$) , MAG ($p < 0.05$), MOG ($p < 0.01$), BDNF ($p < 0.001$) ve pro-BDNF ($p < 0.05$) düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. AKR + E vitamini grubunda ise, E Vitamini uygulamasının, MOG ($p < 0.05$) ve BDNF ($p < 0.05$) düzeylerini AKR grubuna göre anlamlı derecede artırdığı tespit edilmiştir. E Vitamini uygulaması, AKR'nin düşürdüğü MBP, MAG ve pro-BDNF protein ekspresyon düzeylerini artırmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). Tüm antikorlarla elde edilen bandlar ve dansitometrik analizlere ait grafiksel görüntüler **Şekil 32**'te verilmiştir.



Şekil 32. Dişi rat beyin dokusunda elde edilen Western Blot band görüntüleri

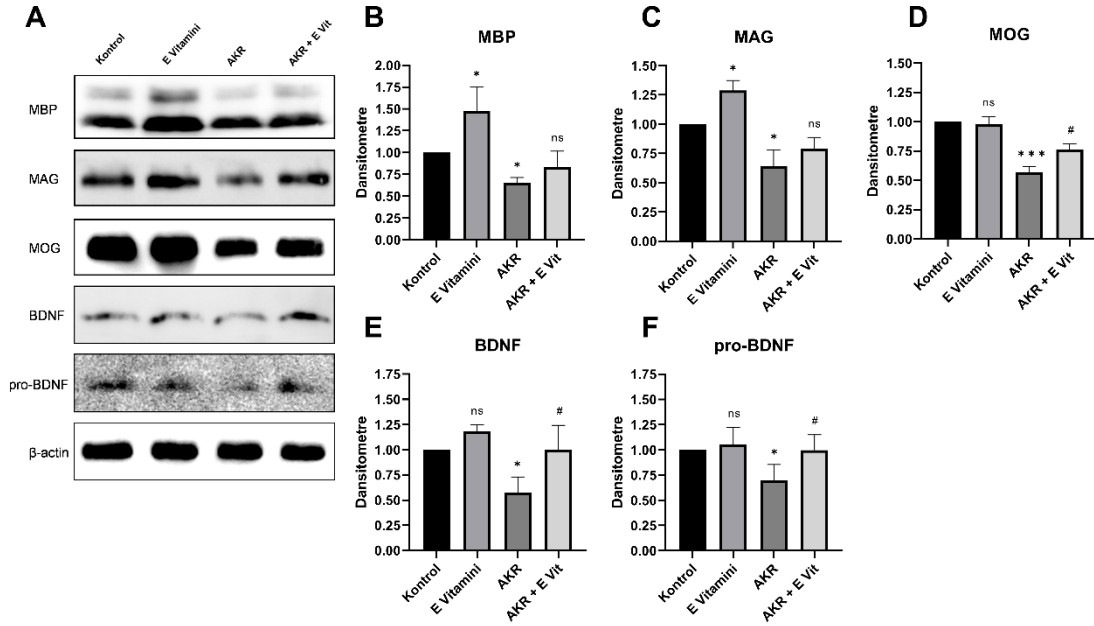
A. Dişi rat beyinlerinde tüm gruplar için elde edilen MBP, MAG, MOG, BDNF, pro-BDNF proteinlerinin western blot bantları. B. Dişi rat beyin dokularında MBP protein düzeylerinin densitometrik analizleri. C. Dişi rat beyin dokularında MAG protein düzeylerinin densitometrik analizleri. D. Dişi rat beyin dokularında MOG protein düzeylerinin densitometrik analizleri. E. Dişi rat beyin dokularında BDNF protein düzeylerinin densitometrik analizleri. F. Dişi rat beyin dokularında pro-BDNF protein düzeylerinin densitometrik analizleri. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $*p<0.05$, $**p<0.01$ ve $***p<0.01$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık $\#p<0.05$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil, MBP: Miyelin basic protein, MAG: Miyelin ilişkili protein, MOG: Miyelin oligodendrosit protein, BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör, pro-BDNF: pro-Beyin kökenli nörotrofik faktör.

4.5.3. Erkek Rat Beyninde Ölçülen Protein Düzeyleri

Erkek ratlardan alınan total beyin dokularına ait proteinler %10 SDS-PAGE ile ayrılıp MBP antikoruna ile immüno blot edildikten sonra 12 kDa ve 18 kDa'da olmak üzere MBP'ye spesifik 2 bandlık görüntüler elde edilmiştir. MAG antikoruna ile 100 kDa, MOG antikoruna ile 28 kDa, BDNF ve pro-BDNF antikorlarıyla ise 14 kDa'luk bandlar kaydedilmiştir. Tüm bantlar için sinyaller beklenen bölgelerde kaydedilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre, AKR uygulamasının beyin MBP ($p<0.05$), MAG ($p<0.05$), MOG ($p<0.001$), BDNF ($p<0.05$) ve pro-BDNF ($p<0.05$) düzeylerini

istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. AKR + E vitamini grubunda ise, E Vitamini uygulamasının, AKR'nin bu olumsuz etkisini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Bu iyileşme MBP ve MAG protein düzeyleri için istatistiksel olarak anlamlı değilken, MOG, BDNF ve pro-BDNF için istatistiksel anlamlılık belirlenmiştir ($p<0.05$). Tüm antikorlarla elde edilen bandlar ve dansitometrik analizlere ait grafiksel görüntüler Şekil 33'te verilmiştir.



Şekil 33. Erkek rat beyin dokusunda elde edilen Western Blot band görüntüleri

A. Erkek rat beyinlerinde tüm gruplar için elde edilen MBP, MAG, MOG, BDNF, pro-BDNF proteinlerinin western blot bantları. B. Erkek rat beyin dokularında MBP protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. C. Erkek rat beyin dokularında MAG protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. D. Erkek rat beyin dokularında MOG protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. E. Erkek rat beyin dokularında BDNF protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. F. Erkek rat beyin dokularında pro-BDNF protein düzeylerinin dansitometrik analizleri. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $*p<0.05$ ve $***p<0.01$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık $\#p<0.05$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil, MBP: Miyelin basic protein, MAG: Miyelin ilişkili protein, MOG: Miyelin oligodendrosit protein, BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör, pro-BDNF: pro-Beyin kökenli nörotrofik faktör.

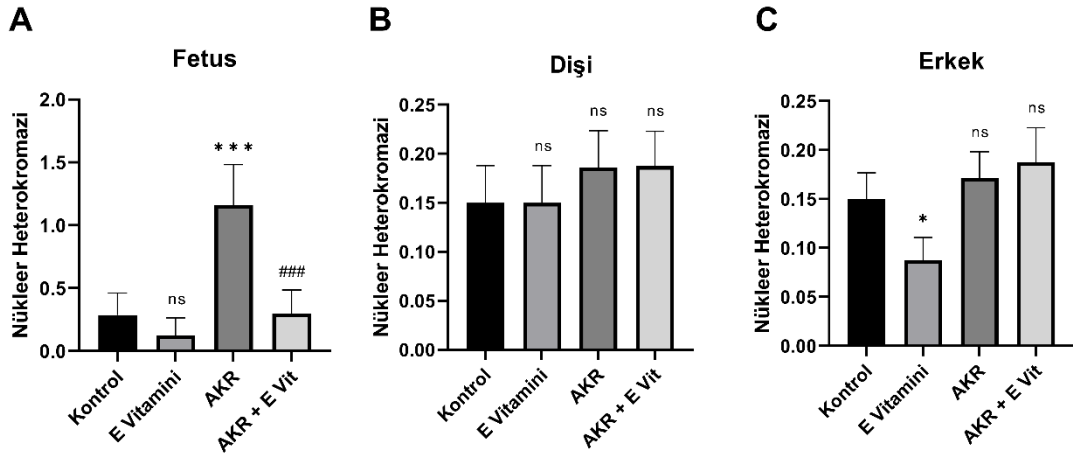
4.6. Histomorfometrik, Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

4.6.1. Beyin Korteks Hücreleri Nükleus Heterokromazisi

Fetus beyinleri korteks hücre nükleuslarında heterokromazi verileri karşılaştırıldığında, AKR grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$) bulunurken, heterokromazi değerleri AKR + Vit E grubunda, AKR'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 34A, Şekil 35).

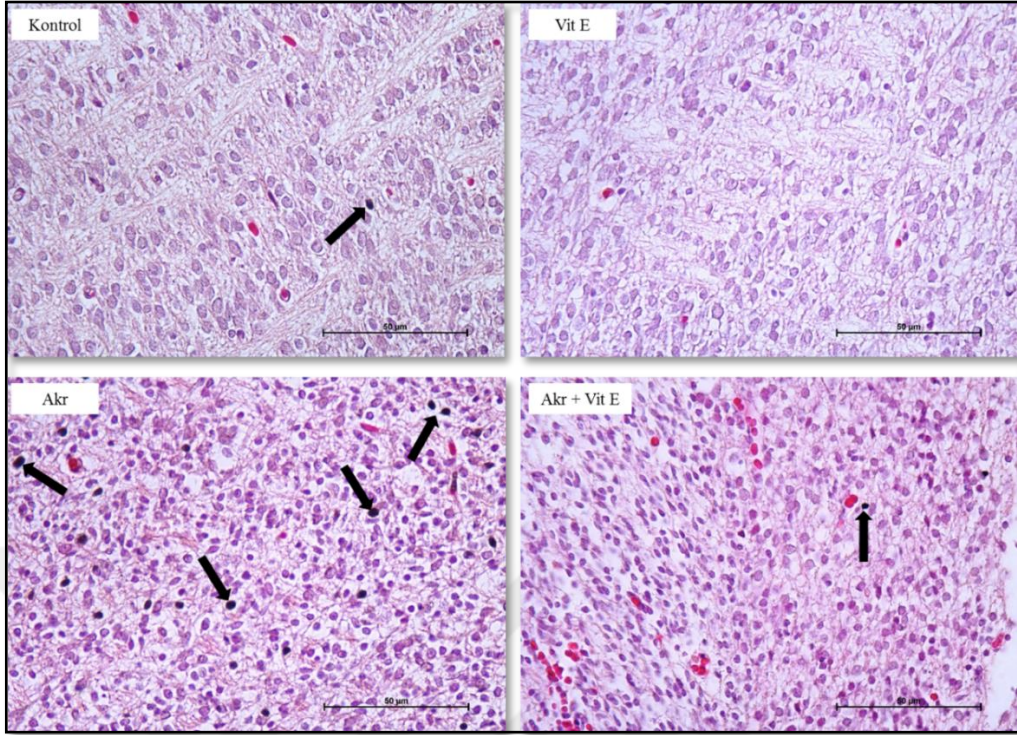
Erkek sıçanların beyin korteks hücreleri nükleus heterokromazisi açısından E vitamini grubu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bununla birlikte, nükleus heterokromazisi AKR ve AKR + E vitamini gruplarında kontrole göre yüksek gözlenirken, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 34C, Şekil 36).

Dişi ratların beyin korteksi hücreleri nükleus heterokromazisi karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir. Erkek gruplara benzer şekilde dişi yavruların AKR ve AKR + E vitamini gruplarında kontrole göre yüksek bulunmuştur. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 34B, Şekil 37).



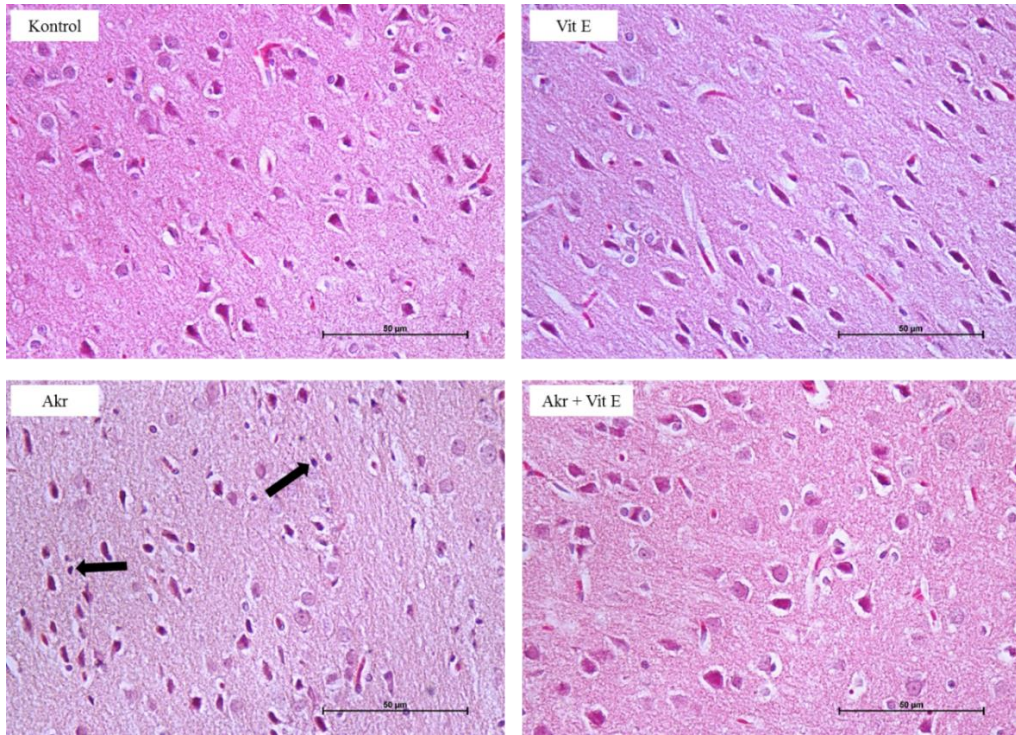
Şekil 34. Beyin nükleus heterokromazisi skorlama verileri

Rastgele seçilen 5 farklı alanda korteks nöronlarının nükleusları heterokromazi şiddetine göre skorlanması. Skorlama şiddetleri: 0; normal-ökromatik nükleus, 1; hafif heterokromatik nükleus, 2; orta şiddetli heterokromatik nükleus, 3; ileri düzey heterokromatik+piknotik nükleus. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $*p<0.05$ ve $***p<0.01$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık $###p<0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



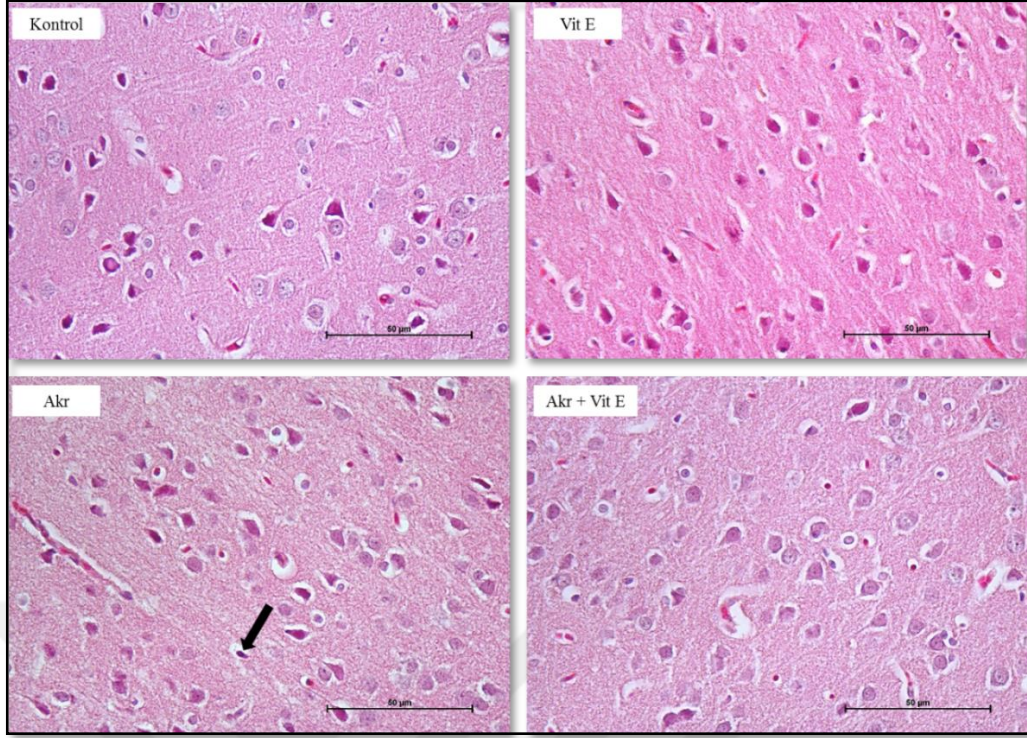
Şekil 35. Fetus beyin korteksi nükleus heterokromazisi

Korteks nöronlarının nükleuslarının heterokromazi değerlendirilmesi. Oklar: Heterokromatik nükleuslar, H&E, 40x



Şekil 36. Erkek beyin korteksi nükleus heterokromazisi

Korteks nöronlarının nükleuslarının heterokromazi değerlendirilmesi. Kontrol ve E Vitamini grubu önkromatik nükleuslar, oklar: heterokromatik nükleuslar, H&E, 40x



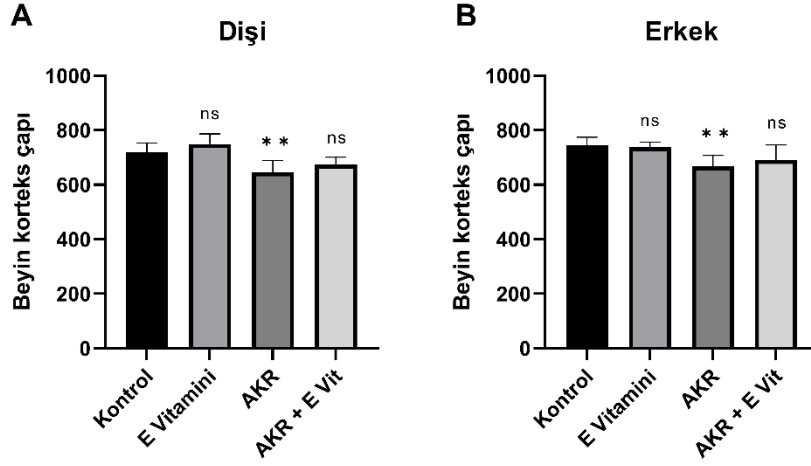
Şekil 37. Dişi beyin korteksi nükleus heterokromazisi

Korteks nöronlarının nükleuslarının heterokromazi değerlendirmesi. Oklar: Heterokromatik nükleuslar, H&E, 40x

4.6.2. Korteks Çapı Ölçümleri

Erkek sıçanların beyin korteks çapları karşılaştırıldığında (**Şekil 38**) AKR grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.01$). AKR+Vit E grubu ise, AKR grubuna göre yüksek bulunmakla beraber, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Benzer şekilde, dişi sıçanların beyin korteks çapları değerlendirildiğinde (**Şekil 38**) AKR grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunurken ($p<0.01$), AKR+Vit E grubu da AKR grubuna kıyasla artış göstermiştir, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).



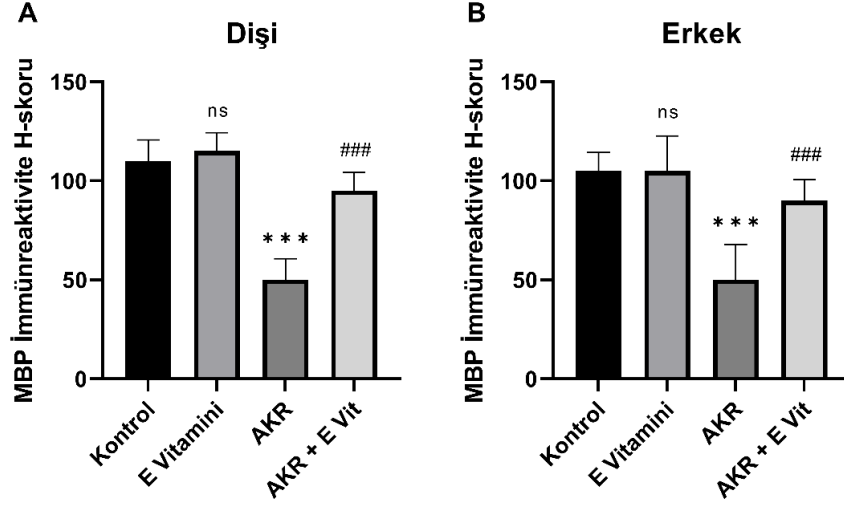
Şekil 38. Beyin korteks çapı ölçümleri

A. Dişi beyin doku kesitlerinde tüm gruplarda yapılan korteks çap ölçümleri. B. Erkek beyin doku kesitlerinde tüm gruplarda yapılan korteks çap ölçümleri. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $**p<0.01$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

4.6.3. MBP İmmünoreaktivitesi

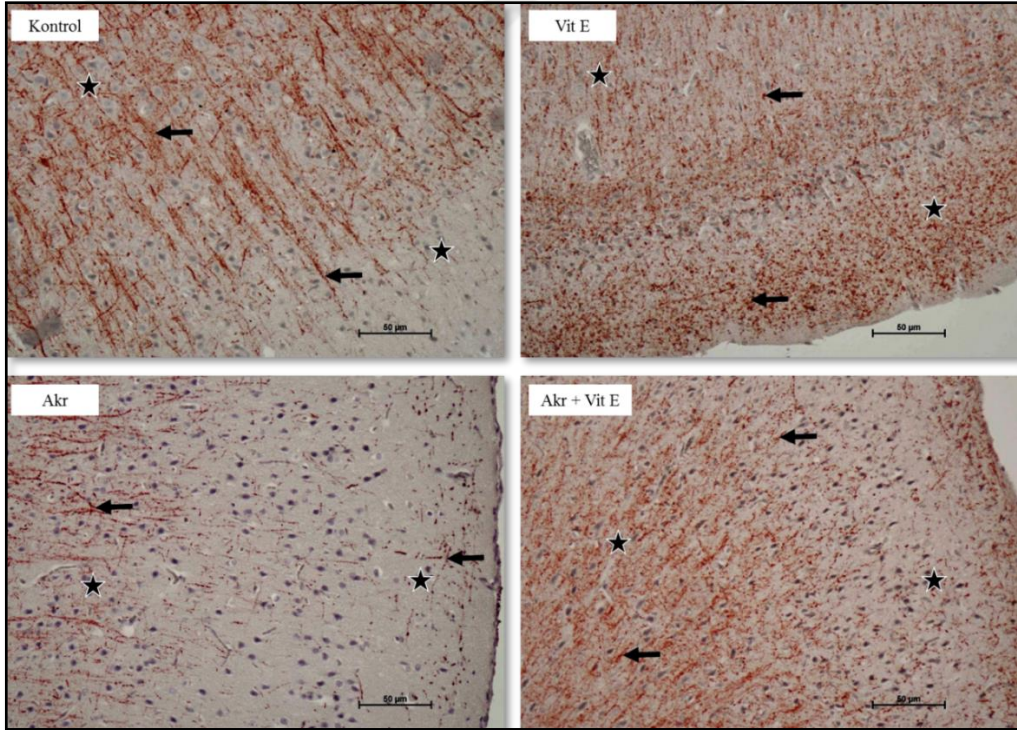
Erkek beyin korteksi MBP immünoreaktivitesi H-skorumları açısından değerlendirildiğinde, AKR grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış ($p<0.001$) bulundu. AKR + Vit E grubu ise AKR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p<0.001$) (Şekil 39, Şekil 40).

Dişi beyin korteksi MBP ekspresyonu H-skorumları karşılaştırıldığında, erkek grup ile benzer şekilde AKR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüş ($p<0.001$) tespit edilirken, AKR + Vit E grubu ise AKR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p<0.001$) (Şekil 39, Şekil 41).



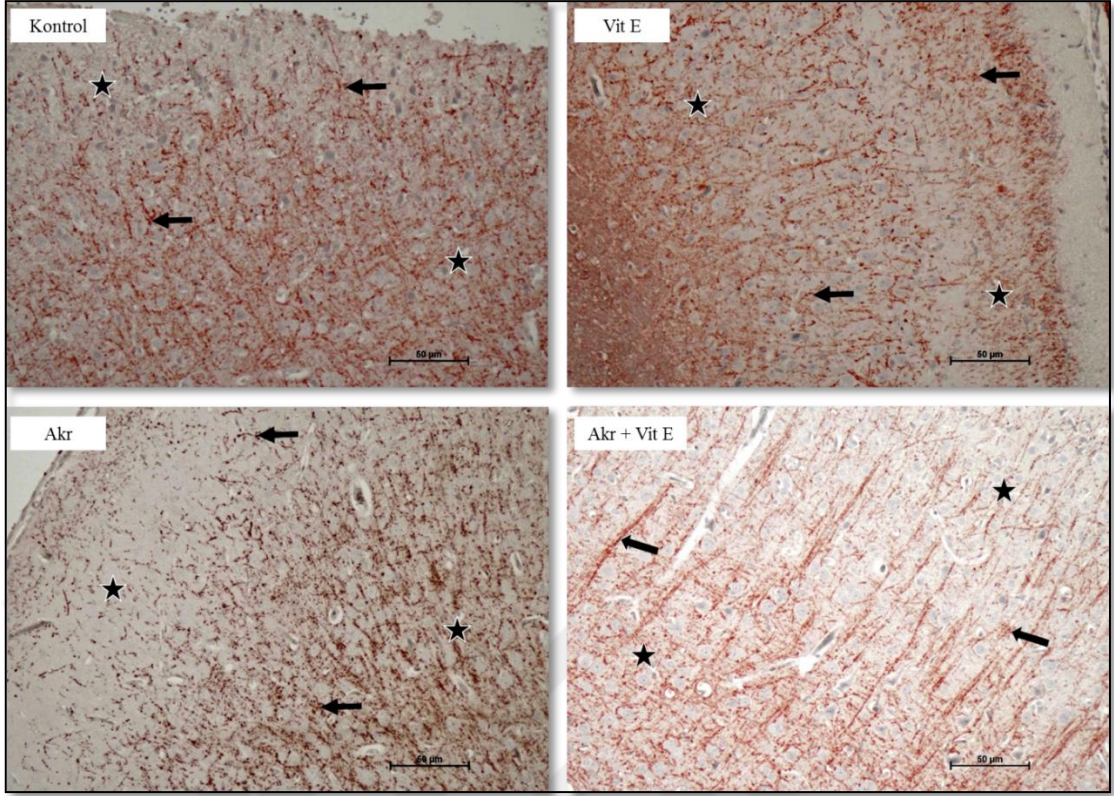
Şekil 39. MBP İmmünoreaktivite H-skoru

A. Dişi beyin doku kesitlerinde tüm gruplarda yapılan MBP immünoreaktivite değerlendirmelerinin histogram grafiği. B. Erkek beyin doku kesitlerinde tüm gruplarda yapılan MBP immünoreaktivite değerlendirmelerinin histogram grafiği. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık *** $p<0.001$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık ### $p<0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



Şekil 40. Erkek rat beyin dokusu MBP immünoreaktivitesi

Beyin korteksi (yıldız), pozitif MBP immünoreaktivite gösteren nöronlar (oklar). 20X



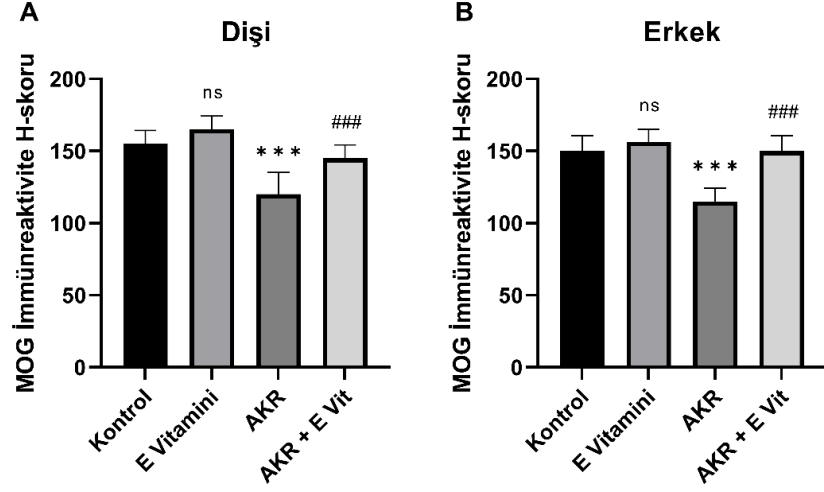
Şekil 41. Dişi rat beyin dokusu MBP immünoaktivitesi

Beyin korteksi (yıldız), pozitif MBP immünoaktivite gösteren nöronlar (oklar). 20X

4.6.4. MOG İmmünoaktivitesi

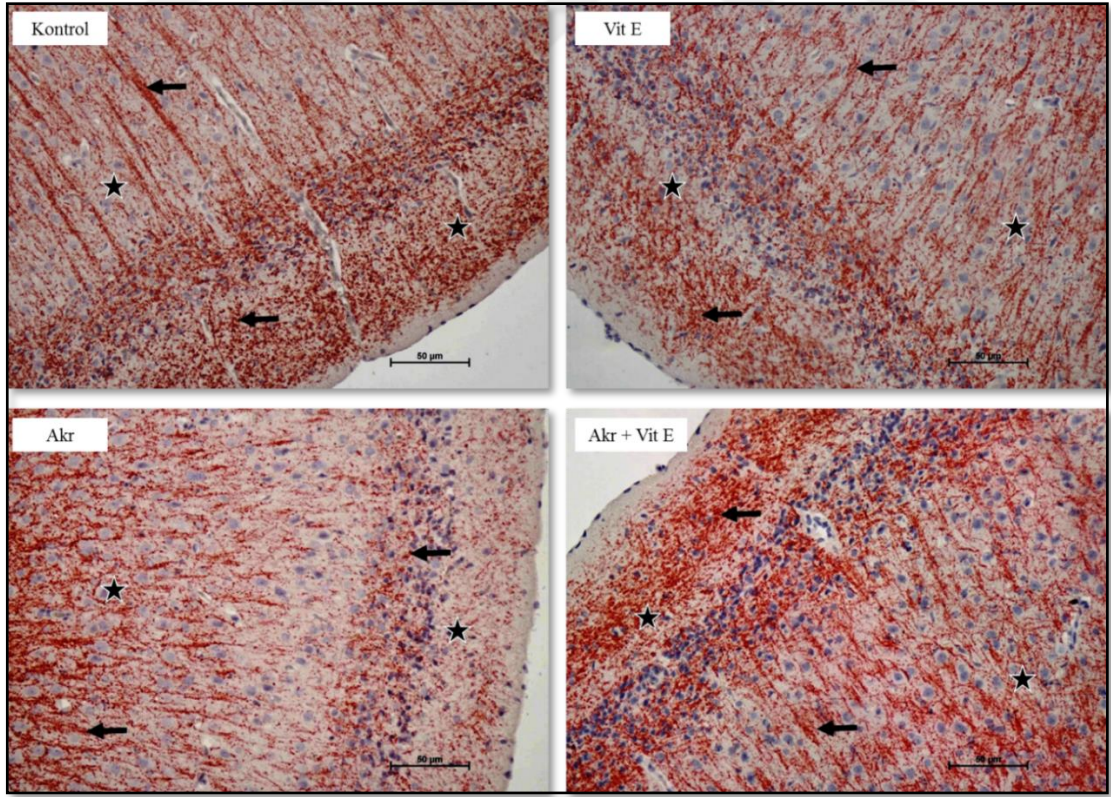
Erkek beyin korteksi MOG immünoaktivitesi H-skorumları değerlendirildiğinde, AKR grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ($p<0.001$) bulundu. AKR + Vit E grubunda ise AKR grubuna göre önemli derecede artış ($p<0.001$) olduğu saptandı (Şekil 42, Şekil 43).

Benzer şekilde, dişi beyin korteksi MOG ekspresyonu H-skorum açısından, AKR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalış ($p<0.001$) tespit edilirken, AKR + Vit E grubunda AKR grubuna göre istatistiksel olarak önemli ($p<0.001$) artış olduğu tespit edildi (Şekil 42, Şekil 44).



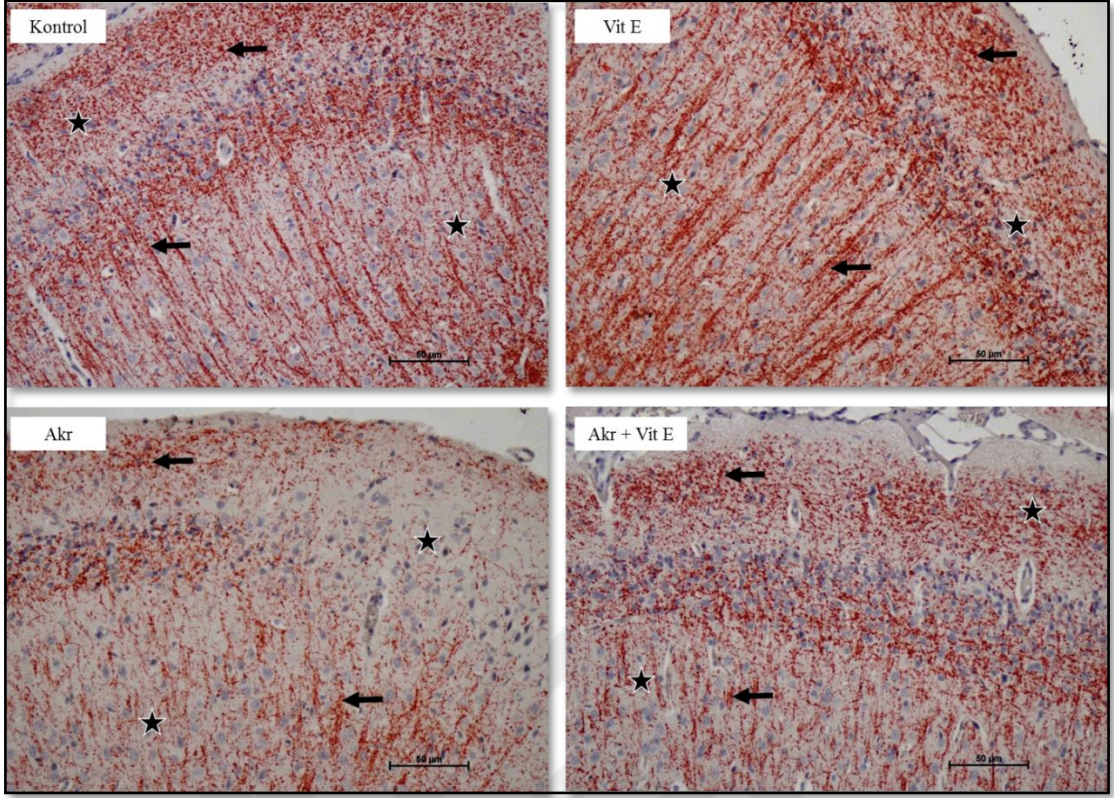
Şekil 42. MOG immünoreaktivite H-skoru

A. Dişi beyin doku kesitlerinde tüm gruplarda yapılan MOG immünoreaktivite değerlendirmelerinin histogram grafiği. B. Erkek beyin doku kesitlerinde tüm gruplarda yapılan MOG immünoreaktivite değerlendirmelerinin histogram grafiği. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık *** $p < 0.001$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık ### $p < 0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



Şekil 43. Erkek rat beyin dokusu MOG immünoreaktivitesi

Beyin korteksi (yıldız), pozitif MOG immünoreaktivite gösteren nöronlar (oklar). 20X



Şekil 44. Dişi rat beyin dokusu MOG immünoreaktivitesi

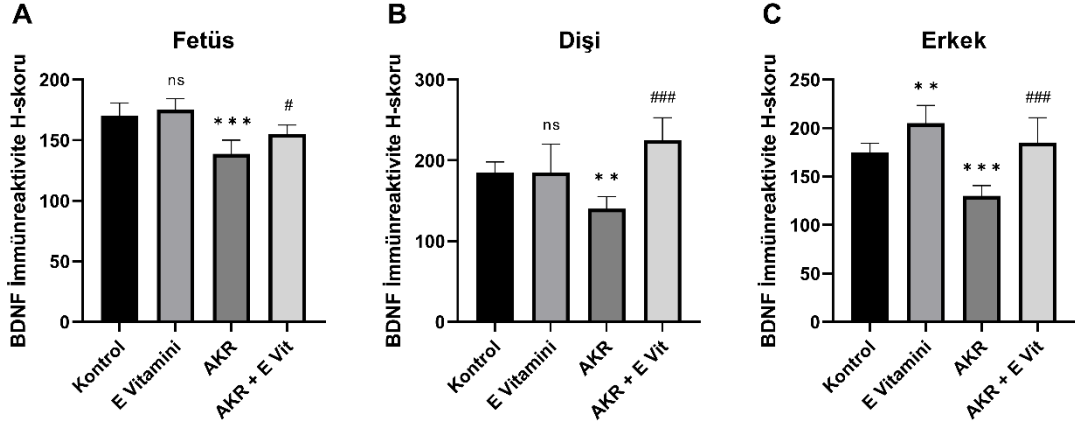
Beyin korteksi (yıldız), pozitif MOG immünoreaktivite gösteren nöronlar (oklar). 20X

4.6.5. BDNF İmmünoreaktivitesi

BDNF immünoreaktivitesi H-skoru açısından, fetus beyinlerinde AKR grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ($p<0.001$) bulundu. AKR+Vit E grubu da AKR grubuna göre yüksek bulundu ($p<0.05$) (Şekil 45, Şekil 46).

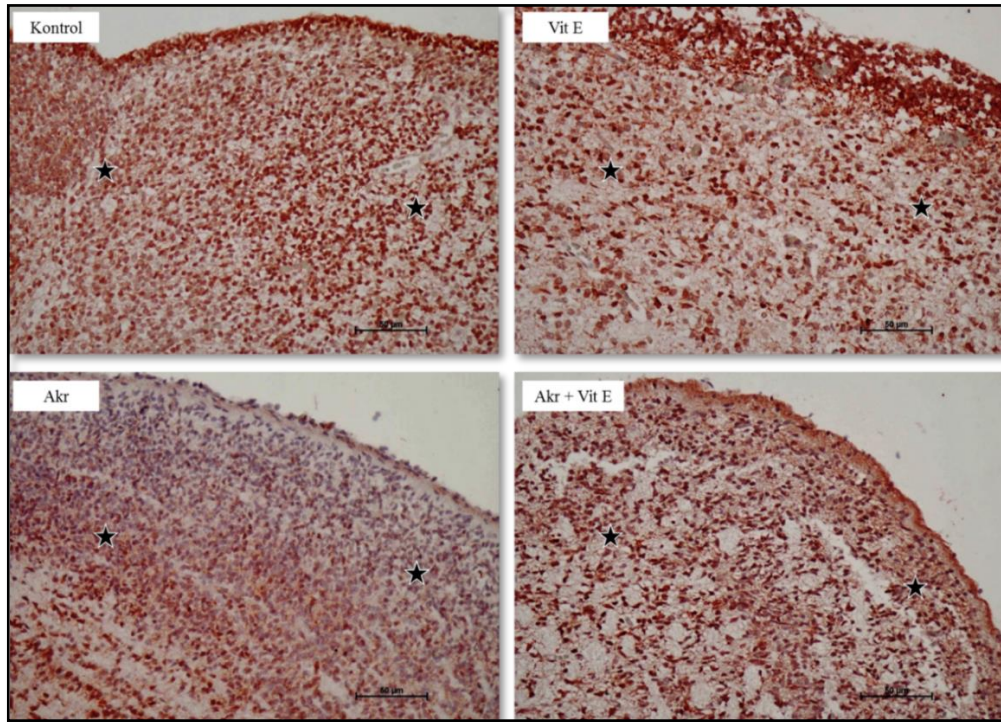
Erkek beyin korteksi BDNF ekspresyonu H-skoru açısından AKR grubu kontrol grubuna göre anlamlı derece azalış ($p<0.001$) gösterirken, AKR + Vit E grubunda AKR grubuna göre artış olduğu ($p<0.001$) tespit edilmiştir (Şekil 45, Şekil 47).

Dişi beyin korteksi BDNF ekspresyonu H-skoru açısından ise, AKR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derece azalış ($p<0.01$) tespit edilirken, AKR + Vit E grubunda AKR grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu ($p<0.001$) görüldü (Şekil 45, Şekil 48).



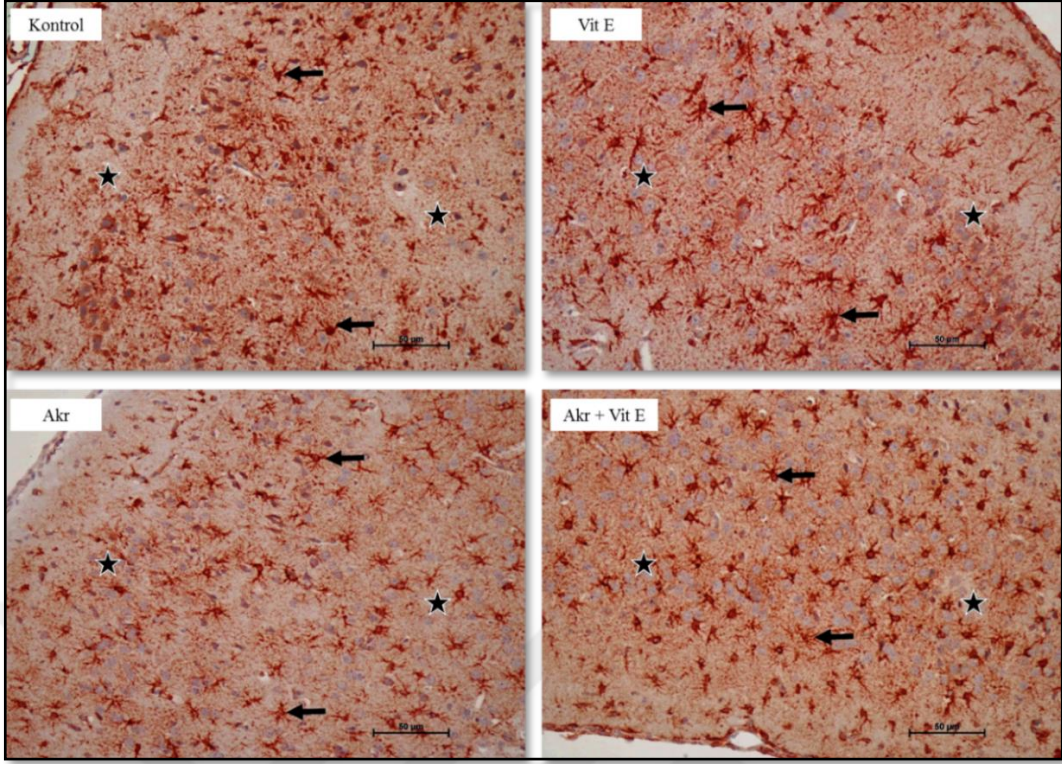
Şekil 45. BDNF immünoreaktivite H-skoru

A. Fetus beyin doku kesitlerinde tüm gruplarda yapılan BDNF immünoreaktivite değerlendirmelerinin histogram grafiği. B. Dişi beyin doku kesitlerinde tüm gruplarda yapılan BDNF immünoreaktivite değerlendirmelerinin histogram grafiği. C. Erkek beyin doku kesitlerinde tüm gruplarda yapılan BDNF immünoreaktivite değerlendirmelerinin histogram grafiği. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $**p < 0.01$ ve $***p < 0.001$. AKR grubuna göre istatistiksel anlamlılık $#p < 0.05$ ve $###p < 0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



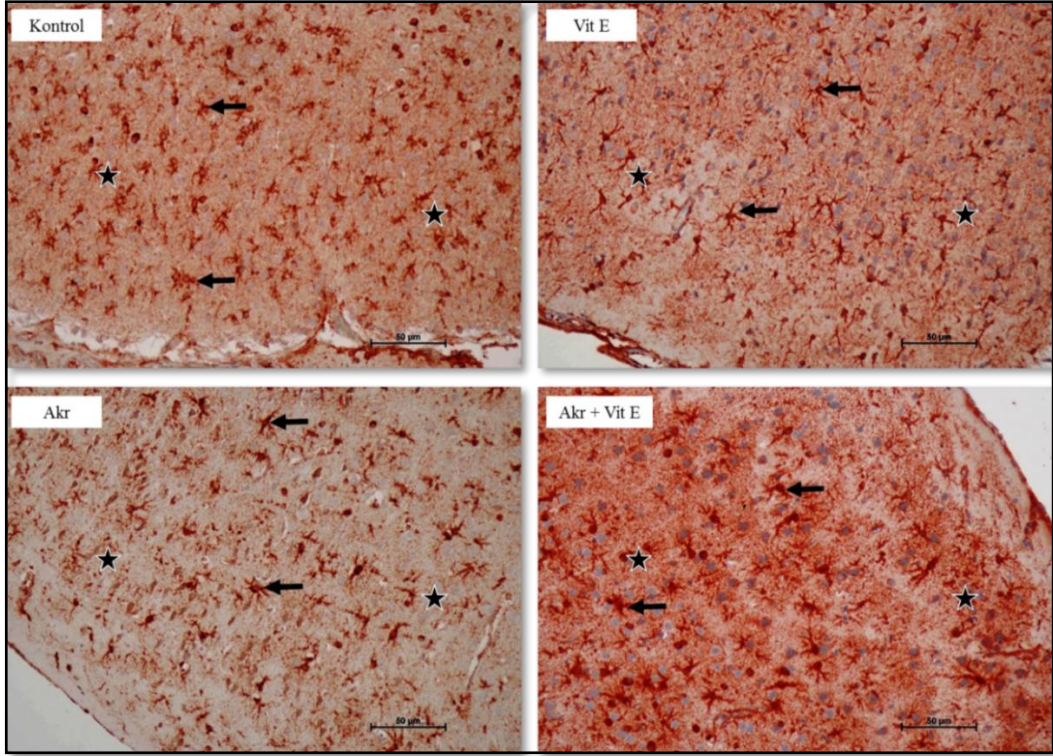
Şekil 46. Fetus beyin dokusu BDNF immünorekativitesi

Beyin korteksi (yıldız). 20X



Şekil 47. Erkek rat beyin dokusu BDNF immünoreaktivitesi

Beyin korteksi (yıldız), pozitif BDNF immünoreaktivite gösteren nöronlar (oklar). 20X



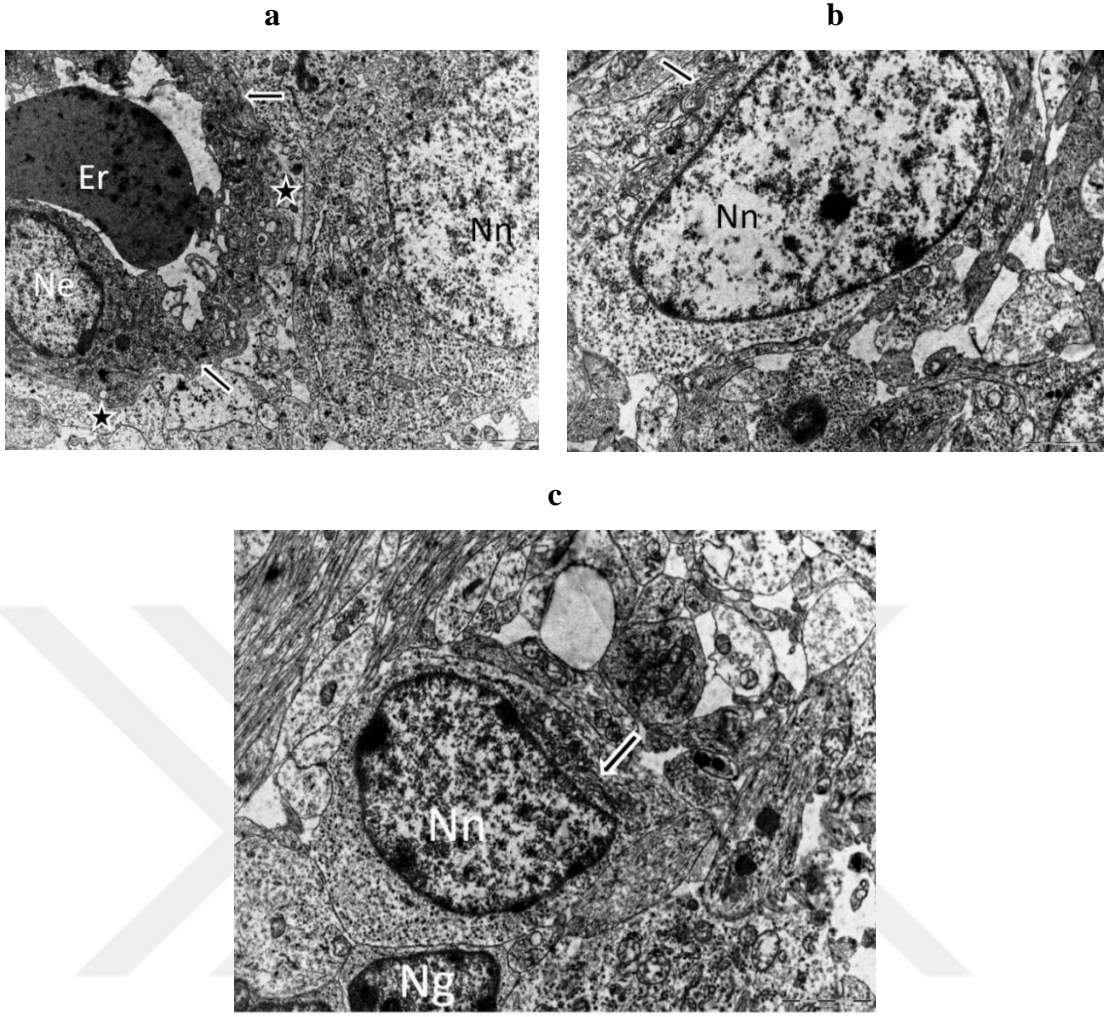
Şekil 48. Dişi rat beyin dokusu BDNF immünoreaktivitesi

Beyin korteksi (yıldız), pozitif BDNF immünoreaktivite gösteren nöronlar (oklar). 20X

4.7. Transmisyon Elektron Mikroskopik (TEM) İnceleme Sonuçları

4.7.1. Fetus Beyin Dokusunun TEM İncelemesi

Kontrol grubu (Şekil 49) ve E Vitamini (Şekil 50) grubundaki sıçan fetuslarına ait beyin dokusu kesitlerinin TEM incelenmesinde her iki grupta benzer şekilde nöron ve glia dokusuna ait hücreler normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi. Nöronların nükleusları ökromatik görünümde ve düzgün konturlu izlendi. Sitoplazma içinde genellikle perinuklear alanda yerleşik Golgi aparatları dikati çaktı. Ayrıca diğer organel ve intrasitoplazmik içerik perikaryon, akson ve dendritlerde normal görünümde izlendi. Nöronların akson ve dentrit yapıları ile nöron-glia dokusu bağlantısı ve yoğunluğu olağan yapıda değerlendirildi. Kesitlerde izlenen kapillerler etrafında astrosit son ayakçıkları konum, düzenlenme ve sitoplazmik içerik açısından kan beyin bariyerinin olağan yapısı ile uyumlu görünüyordu.

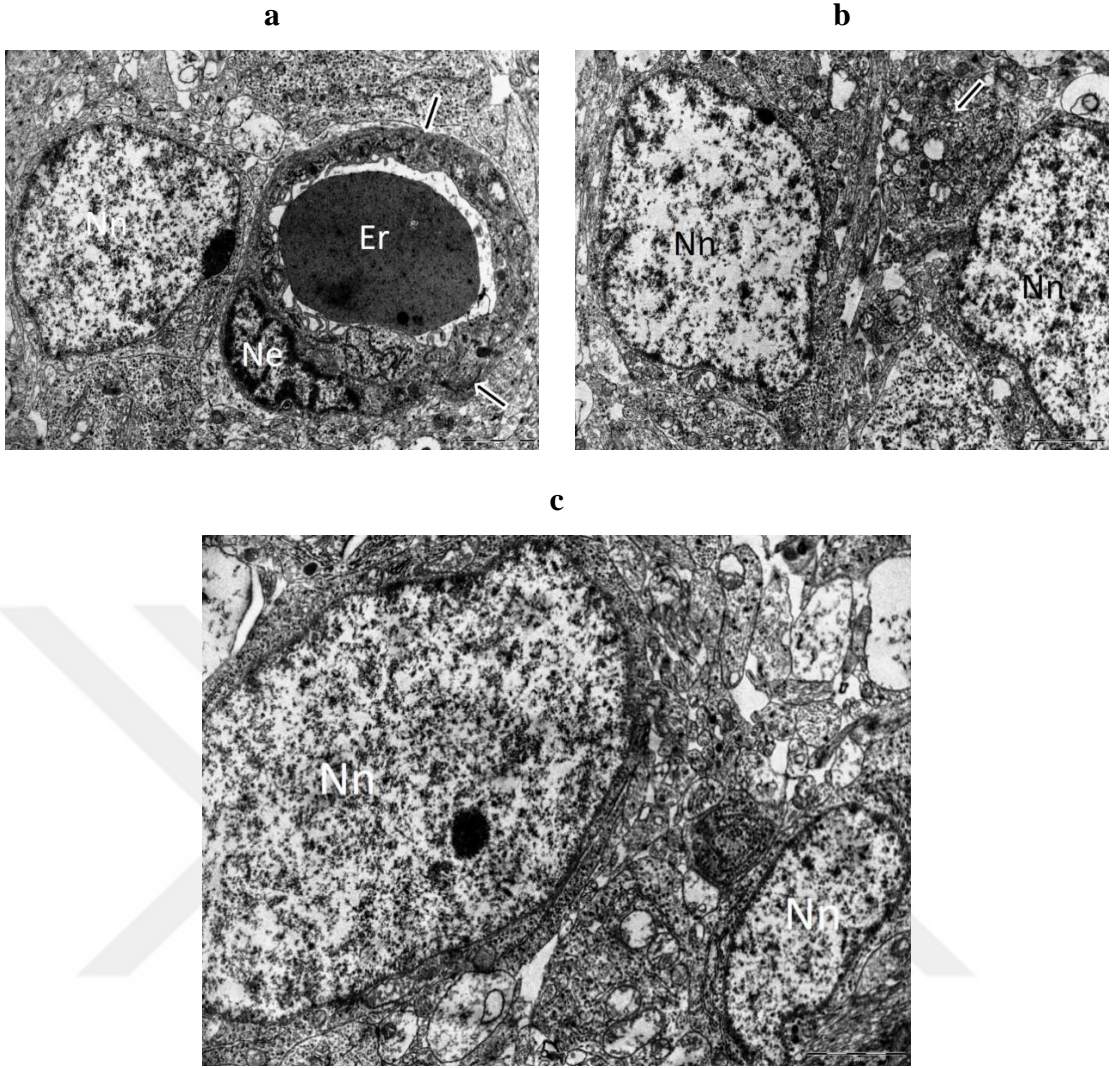


Şekil 49. Kontrol grubu fetus beyin dokusu TEM görüntüleri

a. Fetus, kontrol grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron ve kapiller. Nöron nükleusu (Nn), kapiller endotel nükleusu (Ne), kapiller lümeninde eritrosit (Er), kapiller duvarı (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μm .

b. Fetus, kontrol grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn), Golgi aparatusu (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μm .

c. Fetus, kontrol grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn), Golgi aparatusu (ok), glia hücre nükleusu (Ng). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μm .



Şekil 50. E vitamini grubu fetus beyin dokusu TEM görüntüleri

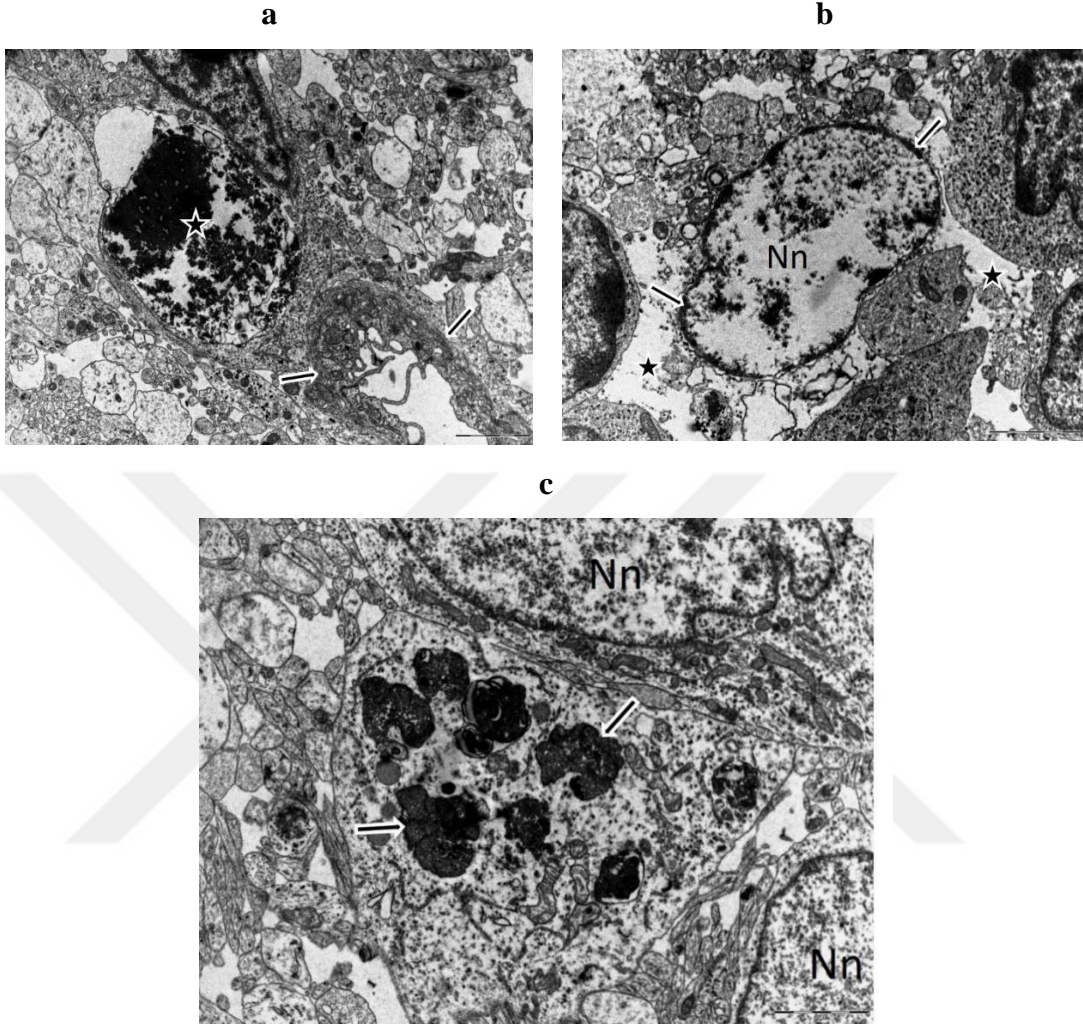
a. Fetus, E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron ve kapiller. Nöron nükleusu (Nn), kapiller endotel nükleusu (Ne), kapiller lümeninde eritrosit (Er), kapiller duvarı (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.

b. Fetus, E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn), Golgi aparatüsü (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.

c. Fetus, E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.

Akrilamid grubundaki rat fetuslarına ait beyin dokusu kesitlerinin TEM incelenmesinde nöron nükleuslarında farklı derecelerde kromatolizis ve perinuklear kromatin yoğunlaşması dikkati çekti. Bazı nöronlarda intrasitoplazmik ödem ve organel kaybı ve yer yer nekrotik hücreler tespit edildi. Ayrıca bazı nöronlarda intrasitoplazmik alanda farklı büyüklüklerde elektron yoğun, düzensiz şekilli otofagozomlar tespit edildi.

İncelenen kesitlerde perivaküler ödem ve elektron yoğun granüler materyal içeren vakuoller izlendi (Şekil 51).



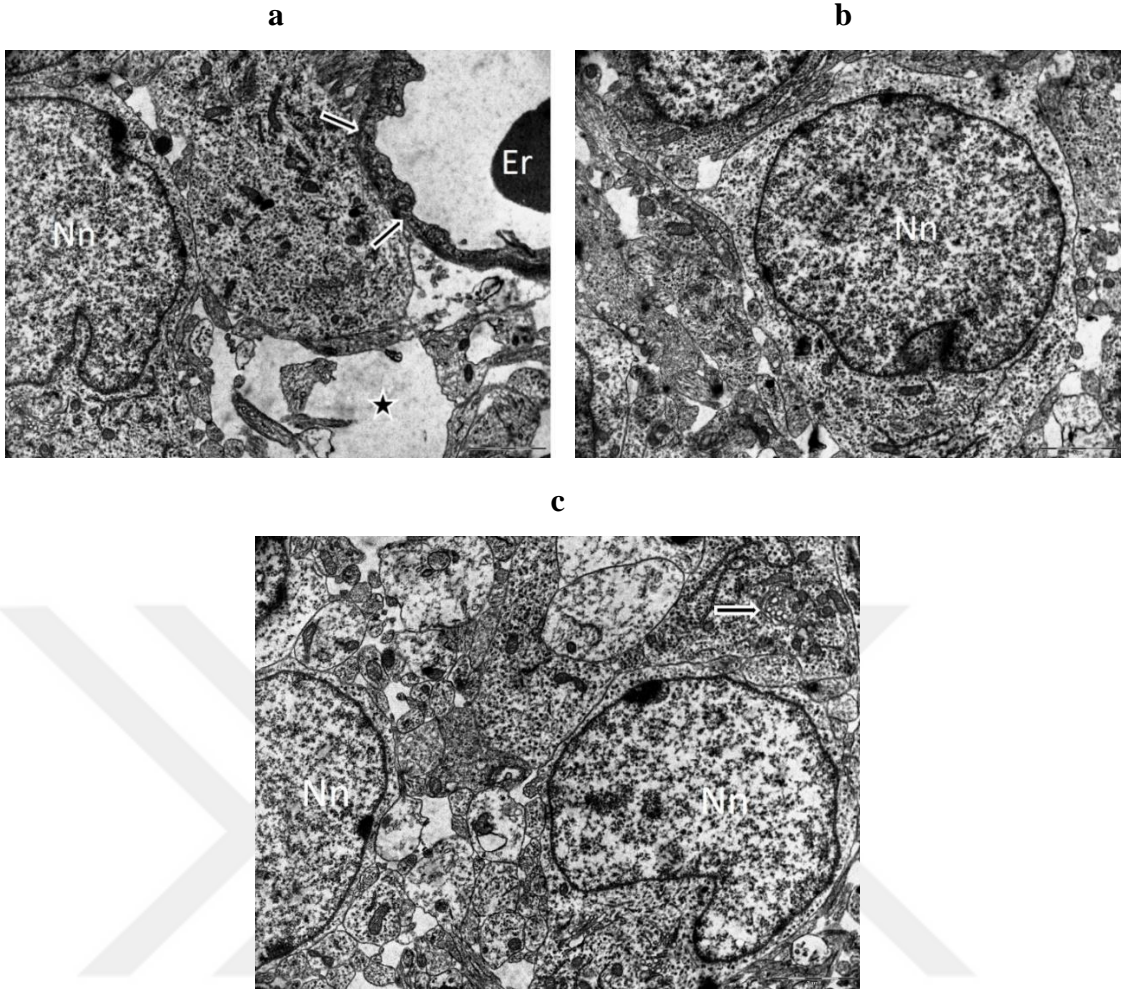
Şekil 51. AKR grubu fetus beyin dokusu TEM görüntüleri

a. Fetus, AKR grubu: Perikapiller alanda yoğun elektron yoğun granüler materyal içeren vakuol (yıldız), kapiller duvarı (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.

b. Fetus, AKR grubu: Nöron sitoplazmasında ödem ve organel kaybı (yıldız), nöron nükleusunda kromatolizis (Nn) ve perinuklear kromatin yoğunlaşması (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.

c. Fetus, AKR grubu: Nöron nükleusu (Nn), nöron sitoplazmasında dejenere mitokondriyonlar içeren elektron yoğun otofagozomlar (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.

AKR + E Vitamini grubundaki sıçan fetuslarına ait beyin dokusu kesitlerinin TEM incelenmesinde nöron ve glia hücreleri genel olarak normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi. Ancak bazı alanlarda minimal düzeyde perivasküler ödem ve yer yer ödematöz vakuoller dikkati çekti (Şekil 52).



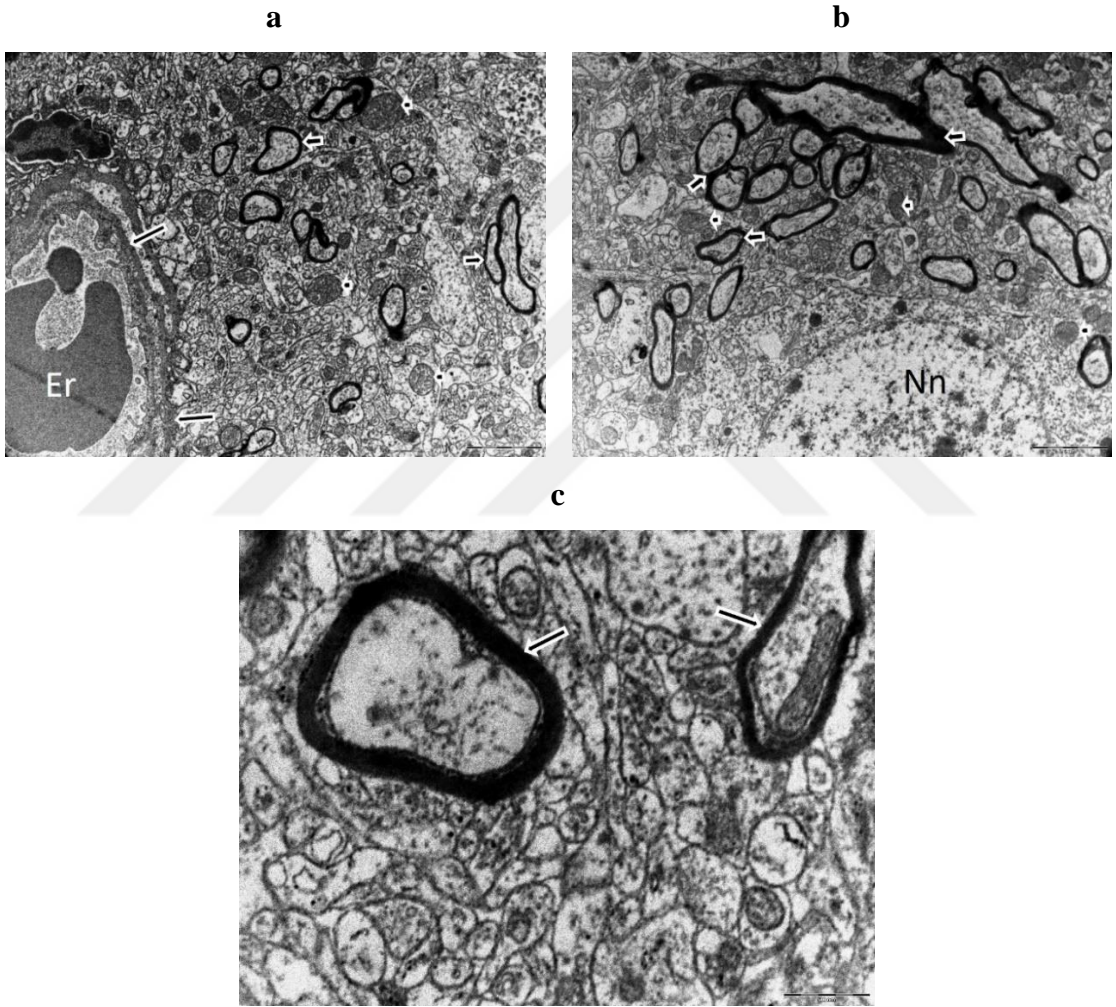
Şekil 52. AKR + E vitamini grubu fetus beyin dokusu TEM görüntüleri

- a. Fetus, AKR + E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron ve kapiller. Nöron nükleusu (Nn), kapiller lümeninde eritrosit (Er), kapiller duvarı (ok), interselüler alanda ödem (yıldız). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.
- b. Fetus, AKR + E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.
- c. Fetus, AKR + E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn), Golgi aparatı (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.

4.7.2. Dişi ve Erkek Beyin Dokusunun TEM İncelemesi

Kontrol grubu dişi (Şekil 53) ve erkek (Şekil 54) sıçanlar ile E Vitamini grubundaki dişi (Şekil 55) ve erkek (Şekil 56) sıçanlara ait beyin dokusu kesitlerinin TEM incelenmesinde nöron perikaryon, nükleus, akson ve dendritleri olağan organel içeriğine sahip ve normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi. Nöronların nükleusları iri, oval-dairesel şekilli, sınırları düzgün ve ökromatik görünümde olup normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi. Kapiller düzeyinde izlenen vasküler yapılar ve

perivasküler alanlar normal ultrastrüktürel görünümde izlendi. Kapillar duvarı ve astrosit son ayakçıkları olağan kan-beyin yapısını yansıtacak düzende görüldü. Kesit alanlarında izlenen değişik çaplardaki miyelinli aksonlarda miyelin kılıf düzenli, homojen elektron yoğunluğa izlendi. Akson çapı ile miyelin kılıf kalınlığının doğru orantılı olduğu görüldü. Miyelinli ve miyelinsiz aksonlarda aksoplazma içinde izlenen nörofilament, nörotübül, agranüler endositoplazmik retikulum sisternaları ile mitokondriyonlar normal ultrastrüktürel yapı ve yoğunlukta değerlendirildi. Ayrıca perikaryon ve dendrit kesitleri normal ultrastrüktürel yapı ve içerikte izlendi.

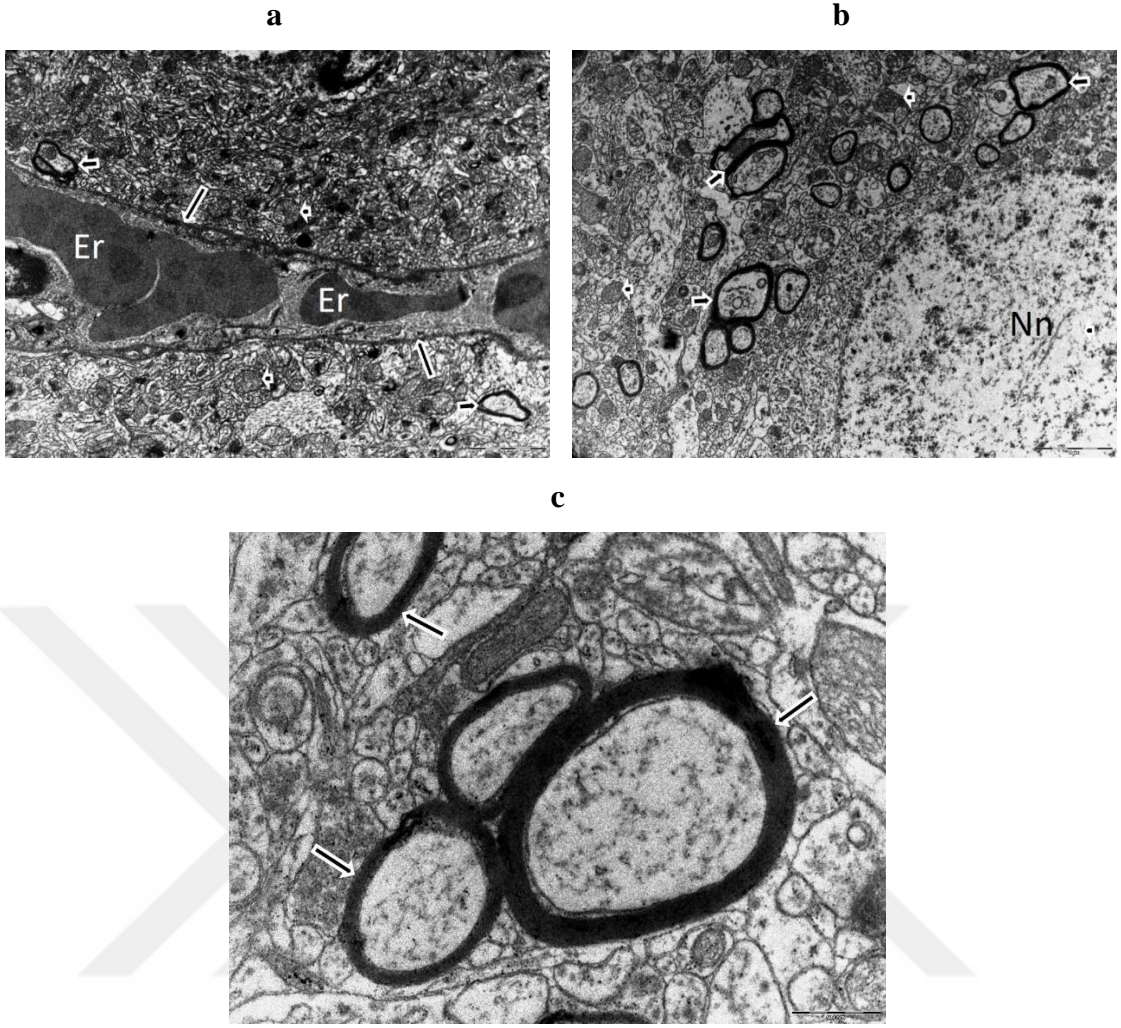


Şekil 53. Kontrol grubu dişi beyin dokusu TEM görüntüleri

a. Dişi, kontrol grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöronal yapılar ve kapiller. Miyelinli akson (kısa ok), mitokondriyon (ok başı), kapiller lümeninde eritrosit (Er), kapiller duvarı (uzun ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.

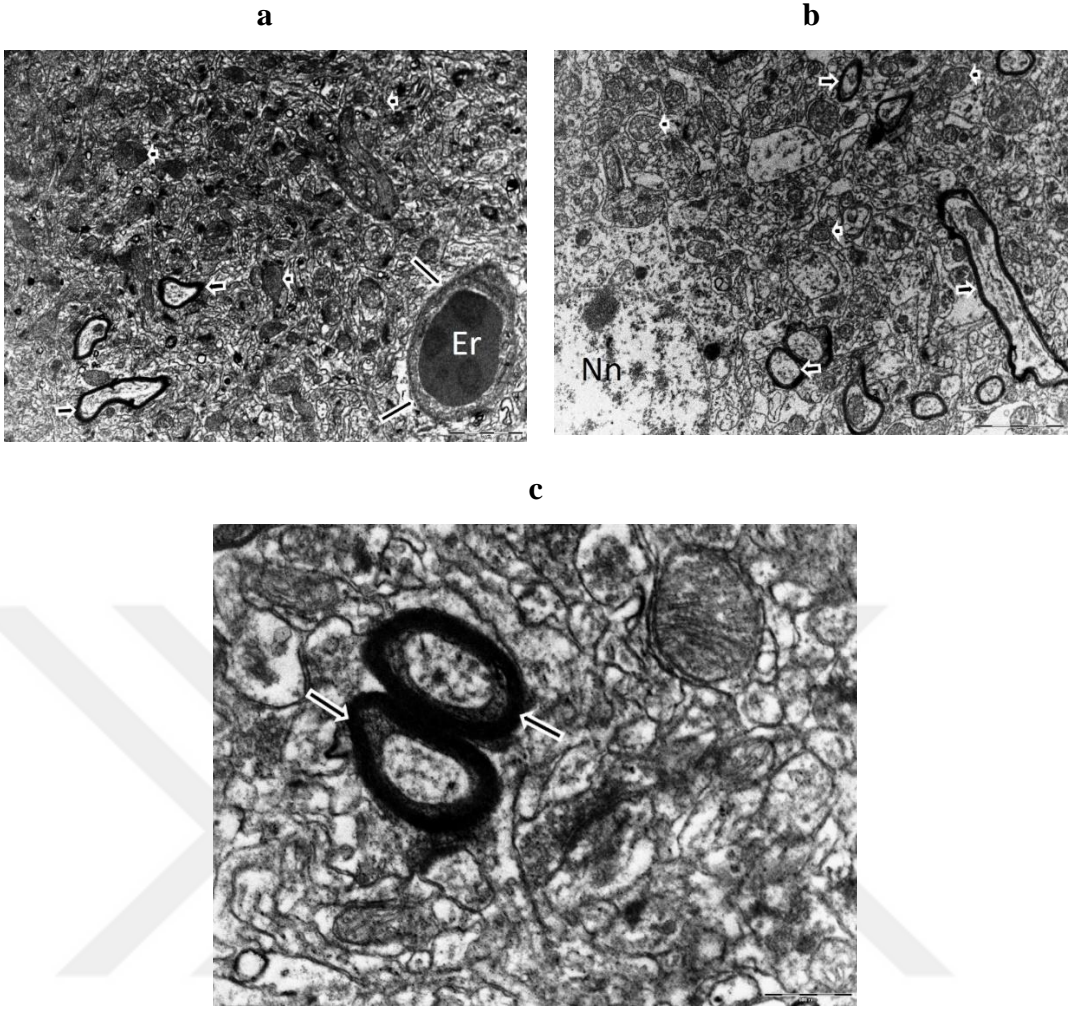
b. Dişi, kontrol grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn), miyelinli akson (ok), mitokondriyon (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.

c. Dişi, kontrol grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda miyelinli akson ve miyelin kılıf (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 500 nm.



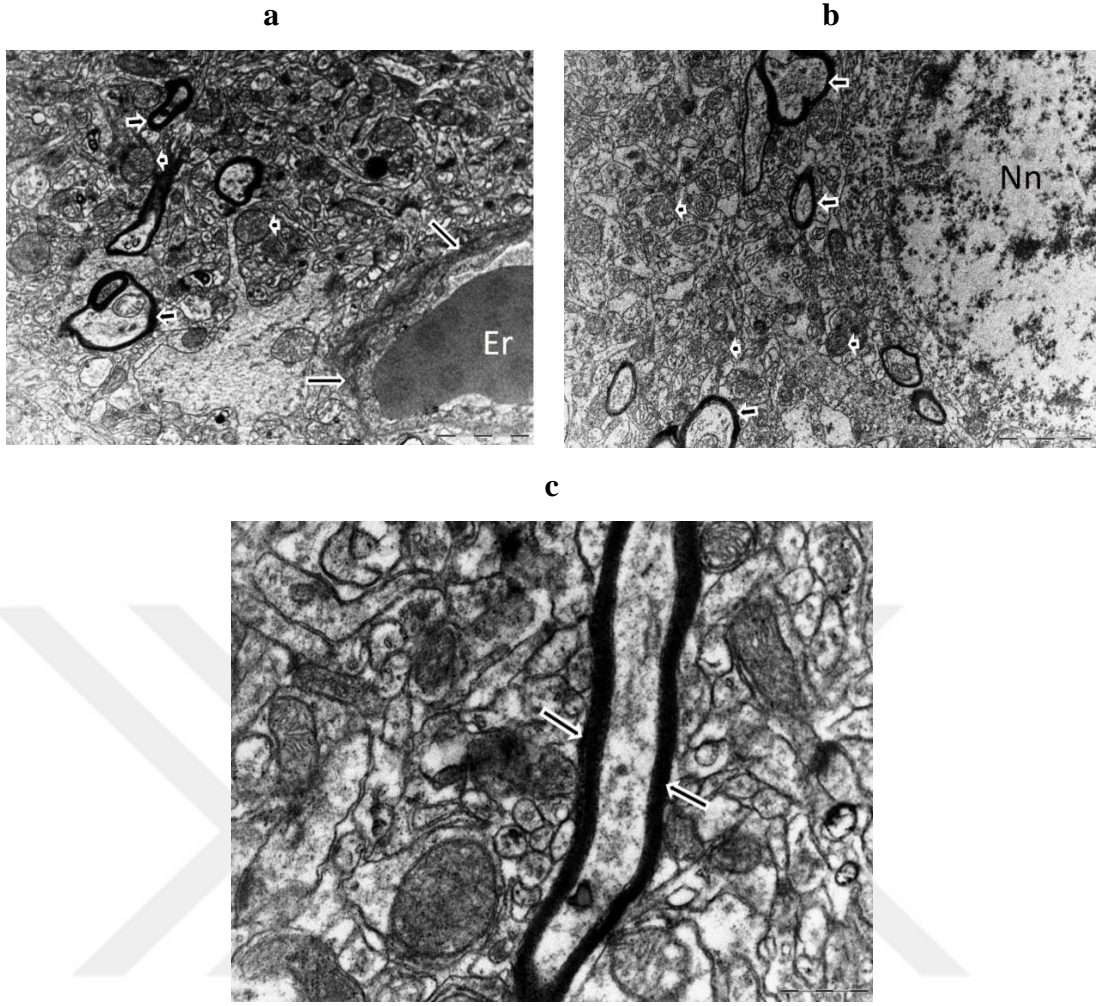
Şekil 54. Kontrol grubu erkek beyin dokusu TEM görüntüleri

- a. Erkek, kontrol grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöronal yapılar ve kapiller. Miyelinli akson (kısa ok), mitokondriyon (ok başı), kapiller lümeninde eritrosit (Er), kapiller duvarı (uzun ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.
- b. Erkek, kontrol grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn), miyelinli akson (ok), mitokondriyon (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.
- c. Erkek, kontrol grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda miyelinli akson ve miyelin kılıf (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 500 nm.



Şekil 55. E vitamini grubu dişi beyin dokusu TEM görüntüleri

- a. Dişi, E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöronal yapılar ve kapiller. Miyelinli akson (kısa ok), mitokondriyon (ok başı), kapiller lümeninde eritrosit (Er), kapiller duvarı (uzun ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μm .
- b. Dişi, E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn), miyelinli akson (ok), mitokondriyon (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μm .
- c. Dişi, E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda miyelinli akson ve miyelin kılıf (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 500 nm.

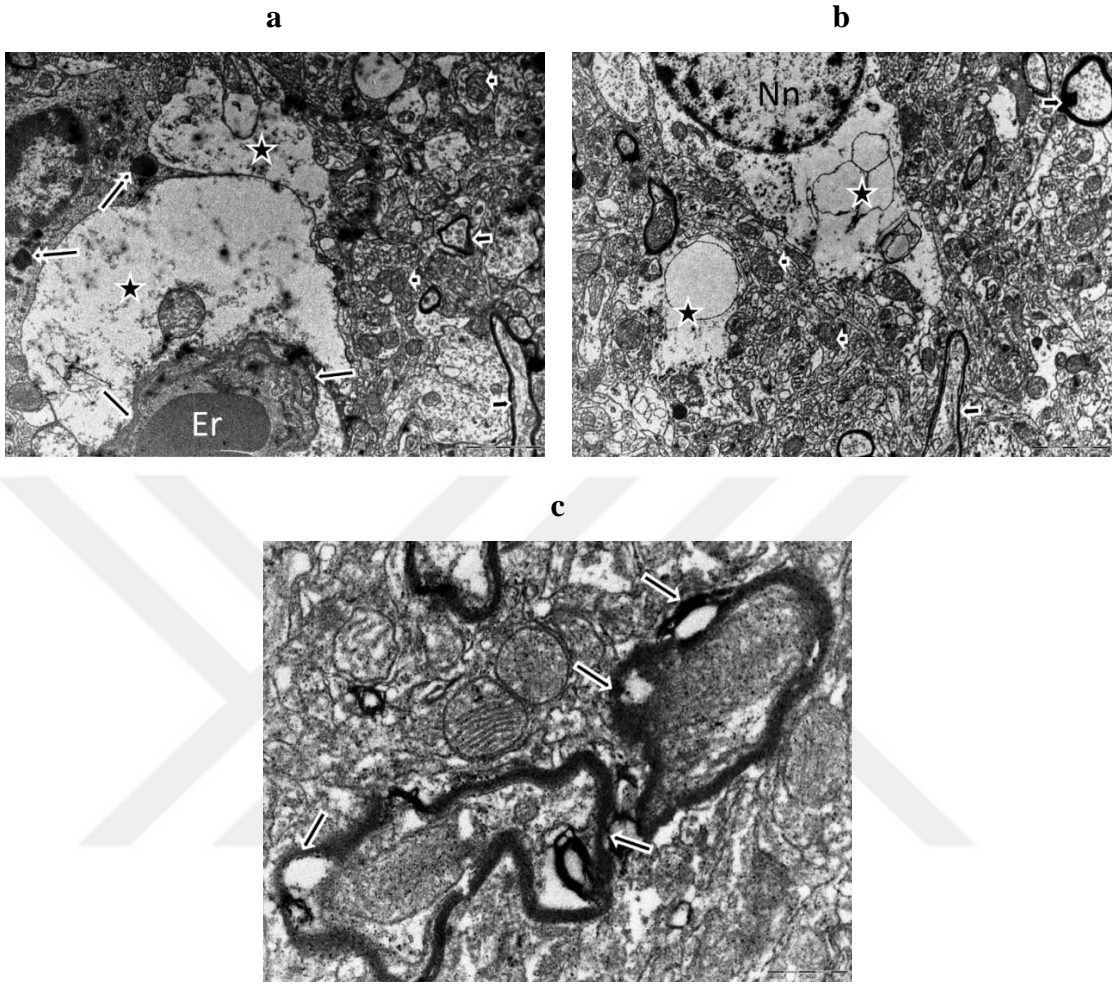


Şekil 56. E vitamini grubu erkek beyin dokusu TEM görüntüleri

- a. Erkek, E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöronal yapılar ve kapiller. Miyelinli akson (kısa ok), mitokondriyon (ok başı), kapiller lümeninde eritrosit (Er), kapiller duvarı (uzun ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.
- b. Erkek, Erkek, E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron. Nöron nükleusu (Nn), miyelinli akson (ok), mitokondriyon (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.
- c. Erkek, E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda miyelinli akson ve miyelin kılıf (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 500 nm.

Akrilamid grubundaki dişi (Şekil 57) ve erkek (Şekil 58) sıçanlara ait beyin dokusu kesitlerinin TEM incelenme bulgularının benzer olduğu görüldü. İncelenen kesitlerde bazı nöronlarda intrasitoplazmik ödem ve organel hasarı ile perinuklear kromatin yoğunlaşması tespit edildi. Perivasküler alanlarda geniş ödematöz alanlar ve vakuoller ile astrosit son ayakçıklarında dilatasyon ve organel hasarı dikkati çekti. Bazı kesitlerde perivasküler alanlarda lenfositler saptandı. Ayrıca miyelinli aksonların miyelin

kıfları heterojen elektron yoğunlukta izlendi. Miyelin kılıflarda düzensizlik ve kırılmalar ile miyelin tabakaları arasında bölgesel ayrılmalar mevcuttu.

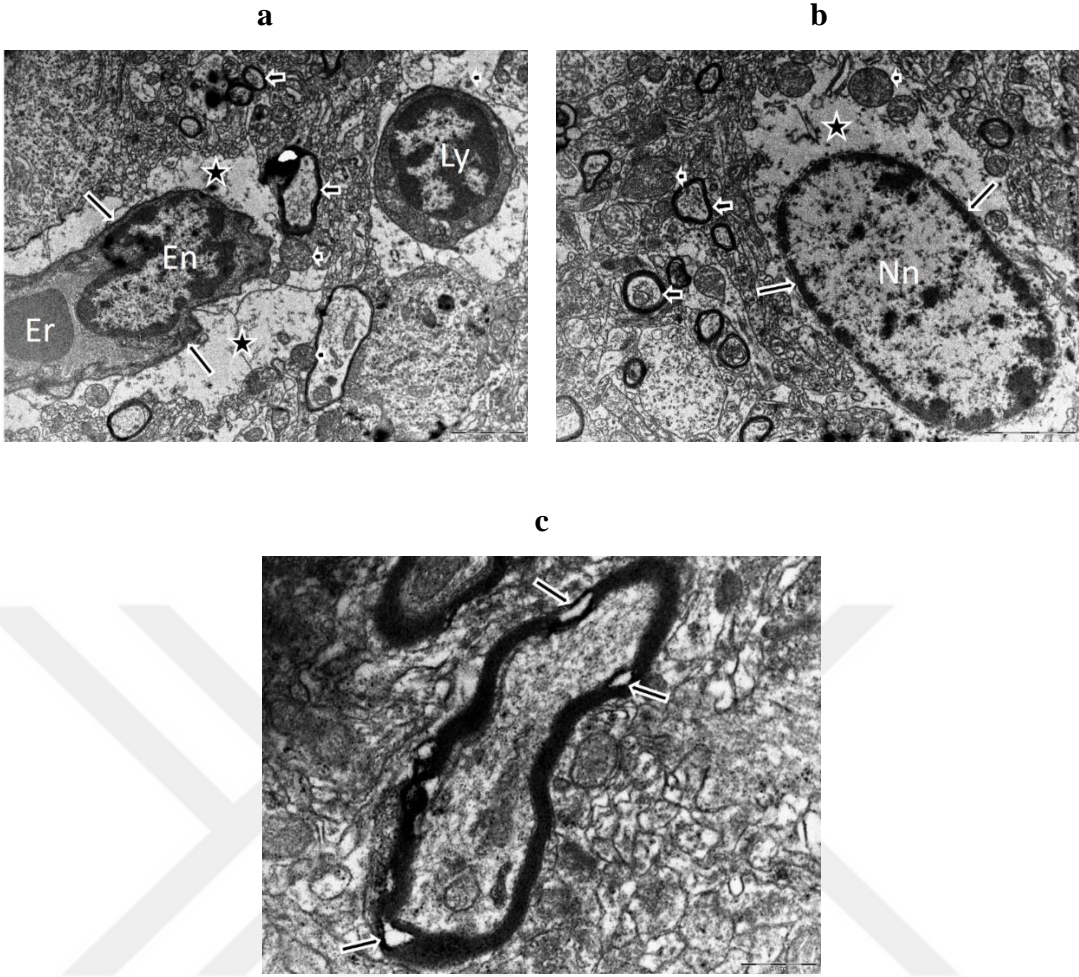


Şekil 57. AKR grubu dişi beyin dokusu TEM görüntüleri

a. Dişi, AKR grubu: Perivasküler ödem (yıldız), astrosit sitoplazmasında lizozomlar (çift başlı ok), kapiller duvarı (uzun ok), kapiller lümeninde eritrosit (Er), miyelinli akson (kısa ok), mitokondriyon (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μm .

b. Dişi, AKR grubu: Nöron sitoplazmasında ödem, vakuolizasyon ve organel hasarı (yıldız), miyelinli akson (ok), mitokondriyon (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μm .

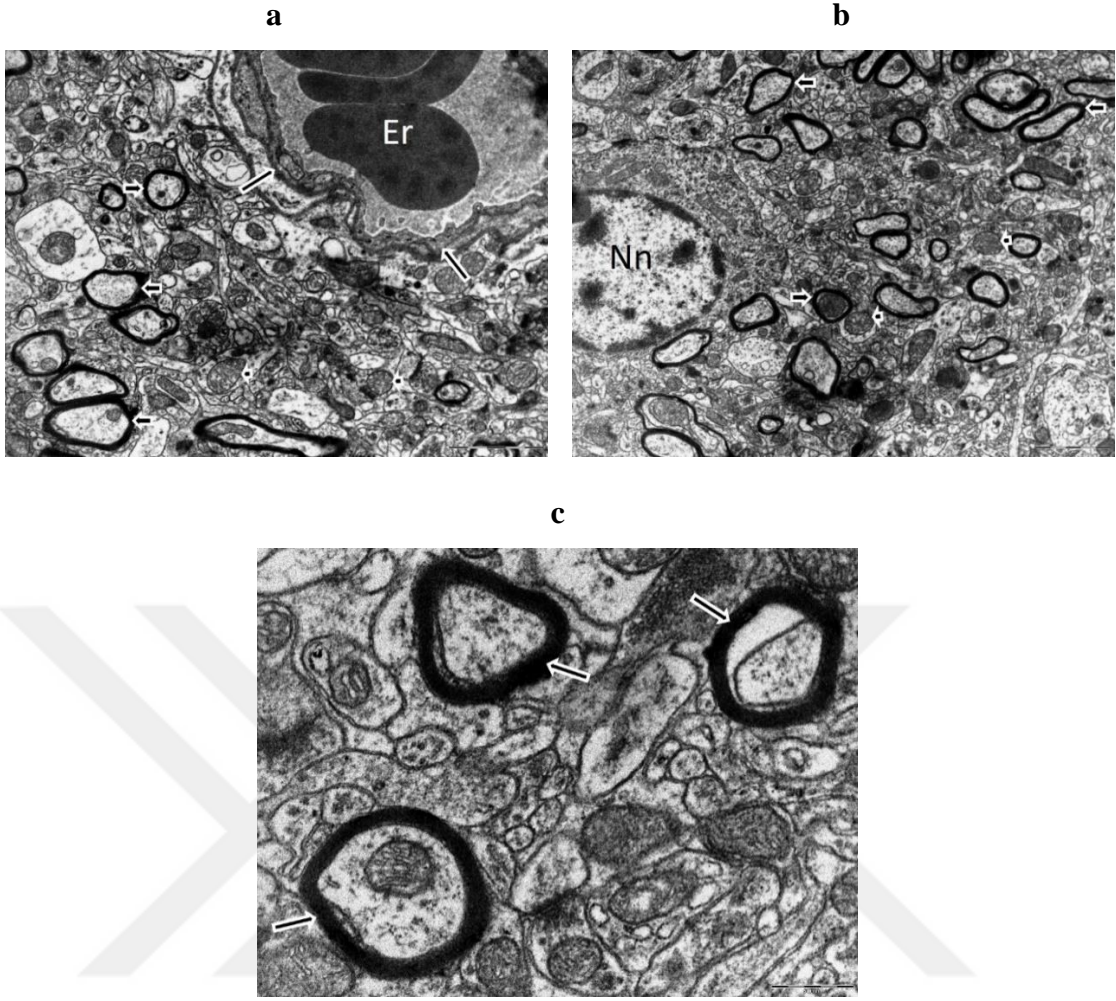
c. Dişi, AKR grubu: Miyelinli aksonların miyelin kılıflarında kırılma ve miyelin tabakaları arasında ayrılmalar. Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 500 nm.



Şekil 58. AKR grubu erkek beyin dokusu TEM görüntüleri

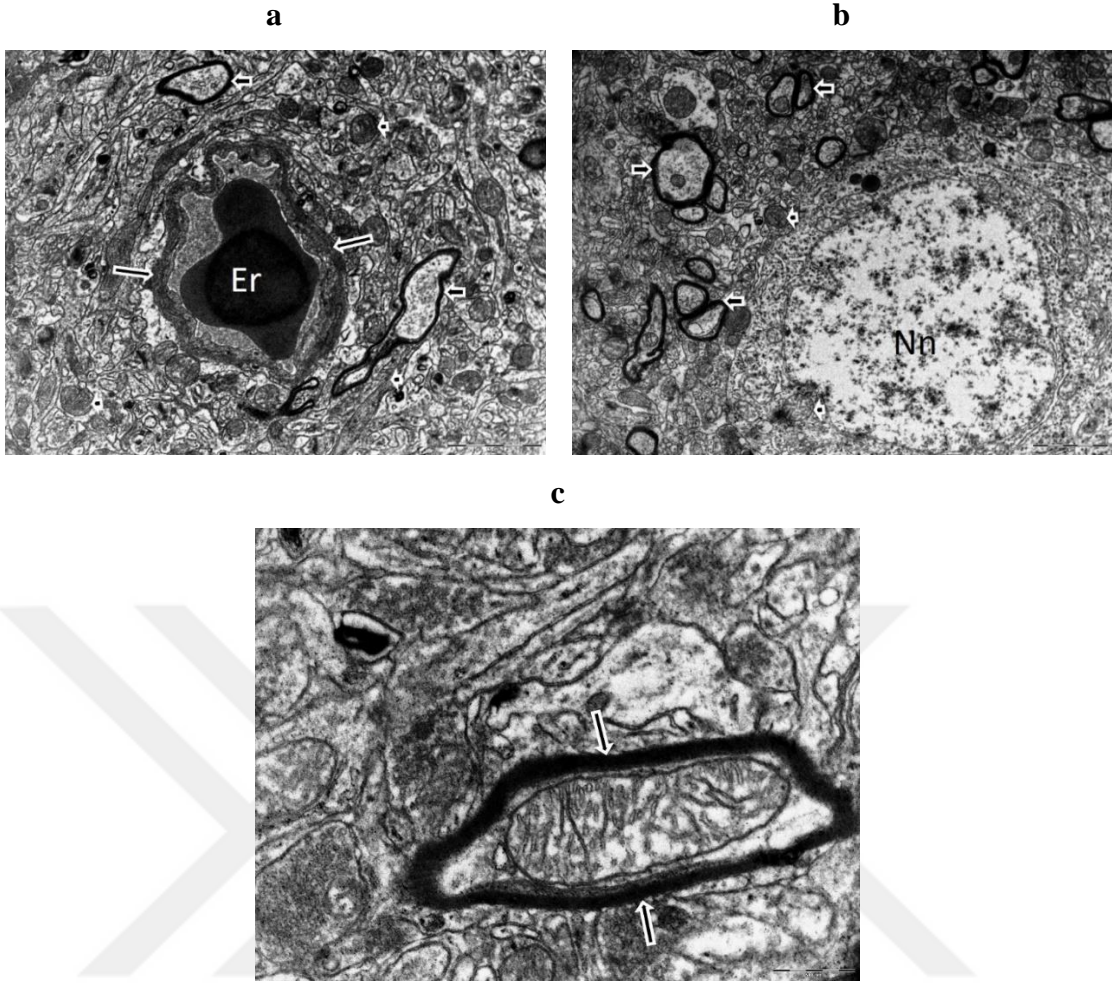
- a. Erkek, Akrilamid grubu: Perivasküler ödem (yıldız), kapiller duvarı (uzun ok), kapiller endotel nükleusu (En), kapiller lümeninde eritrosit (Er), miyelinli akson (kısa ok), mitokondriyon (ok başı), perivasküler alanda lenfosit. Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.
- b. Erkek, Akrilamid grubu: Nöron nükleusu (Nn), perinuklear kromatin yoğunlaşması (uzun ok), nöron sitoplazmasında ödem, vakuolizasyon ve organel hasarı (yıldız), miyelinli akson (kısa ok), mitokondriyon (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.
- c. Erkek, Akrilamid grubu: Miyelinli aksonların miyelin kılıflarında kırılma ve miyelin tabakaları arasında ayrılmalar. Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 500 nm.

AKR + E Vitamini grubundaki dişi (Şekil 59) ve erkek (Şekil 60) sıçanlara ait beyin dokusu kesitlerinin TEM incelenmesinde nöron, glia hücreleri ve vasküler yapılar genel olarak normal ultrastrüktürel yapıda izlendi.



Şekil 59. AKR + E vitamini grubu dişi beyin dokusu TEM görüntüleri

- a. Dişi, AKR + E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöronal yapılar ve kapiller. Miyelinli akson (kısa ok), mitokondriyon (ok başı), kapiller lümeninde eritrosit (Er), kapiller duvarı (uzun ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m
- b. Dişi, AKR + E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron ve nöronal yapılar. Nöron nükleusu (Nn), miyelinli akson (ok), mitokondriyon (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μ m.
- c. Dişi, AKR + E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda miyelinli akson ve miyelin kılıf (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 500 nm.



Şekil 60. AKR + E vitamini grubu erkek beyin dokusu TEM görüntüleri

- a. Erkek, AKR + E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöronal yapılar ve kapiller. Miyelinli akson (kısa ok), mitokondriyon (ok başı), kapiller lümeninde eritrosit (Er), kapiller duvarı (uzun ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μm
- b. Erkek, AKR + E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda nöron ve nöronal yapılar. Nöron nükleusu (Nn), miyelinli akson (ok), mitokondriyon (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 2 μm .
- c. Erkek, AKR + E Vitamini grubu: Normal ultrastrüktürel yapıda miyelinli akson ve miyelin kılıf (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, TEM. Ölçüm cetveli 500 nm.

5. TARTIŞMA

Araştırmamızda ratlara gebelik boyunca ve doğum sonrasında subkronik olarak AKR uygulamasının, miyelin sentezini ve gelişimini nasıl etkilediği, miyelinle ilgili protein ve BDNF düzeylerinde nasıl değişikliklere sebep olduğu incelenmiştir. Ayrıca ratların total vücut ve beyin ağırlıklarının yanı sıra fetus CRL ölçümleriyle gelişim süreci incelenmiş olup, bilişsel fonksiyonun değerlendirilmesi için Water Maze testi uygulanmıştır. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyonun değerlendirilmesinde Western Blot, RT-PCR, histopatolojik, immünohistojimyasal ve elektron mikroskopik yöntemler kullanılmıştır. Ayrıca, bu çalışma ile birlikte AKR'ye maruz kalan fetus ve yavru beyinlerinde oluşan demiyelinizasyona karşı E vitamini ailesinin üyesi olan α -tokoferolün nöroprotektif etkileri ortaya konmuştur.

Akrilamid'in (AKR), onlarca yıldır sadece sanayide yoğun olarak kullanılan bir sentetik kimyasal olduğu bilinmekteydi. Ancak günümüzde ise, ısıl işlem görmüş gıdalarda da AKR'nin varlığı keşfedilmiş ve AKR'nin toksik etkileriyle ilgili endişe artmıştır. Patates kızartması, kahve, cips, bisküvi gibi on binlerce gıdanın AKR içerdiği bilinmektedir. Yüksek seviyelerde AKR, kanser ve nörolojik hasar ile ilişkilendirilmektedir. AKR'nin gıdalarda bulunan seviyelerinin gerçek sağlık etkileri konusundaki belirsizliklere rağmen, bu bileşik hakkında kamuoyunda farkındalık artmıştır. AKR'nin gıda ürünlerinde ve çevremizde bol miktarda bulunması nedeniyle insan sağlığı üzerindeki riskine önemle dikkat çekilmesi gerekmektedir.

AKR, nörotoksitesitesi insan ve hayvan deneyleri ile doğrulanmış olan gelişimsel genotoksitesite, nörotoksitesite ve potansiyel kanserojenezden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (253). Bu nedenle, AKR nörotoksitesitesi insan sağlığı ile yakından ilişkilidir. Uzun yıllardır yapılan araştırmalarda, 0.5 ila 50 mg/kg/gün arasında değişen AKR seviyelerine tekrar tekrar maruz kalan köpekler, kediler, kobaylar, tavşanlar ve kemirgenler dahil olmak üzere çeşitli laboratuvar hayvanlarında benzer fenotipte nörotoksitesite gösterilmiştir (254). Bu nörolojik bozukluklara presinaptik nöronun aktif yerinde, nükleofilik sistein ve AKR arasındaki kovalent eklenti oluşumu neden olabilir. Bu süreç nöronları devre dışı bırakarak nörotransmitter transferini etkileyerek nörotoksitesiteye yol açar (255). Son yıllarda AKR ile ilişkili nörotoksitesitenin altında yatan çeşitli potansiyel moleküler mekanizmalar çok yönlü olmasına rağmen, AKR kaynaklı nörotoksitesitenin mekanizması tam olarak ortaya çıkartılamamıştır. Ayrıca oksidatif stres,

biyokimyasal ve fizyolojik bir aktivasyon sinyali olarak hizmet eder ve AKR'nin neden olduğu nörotoksisite ile doğrudan ve dolaylı olarak ilişkilidir (256).

Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) kapsamında AKR ile ilgili çok sayıda deney yapılmıştır. İçme suyunda ve diyet ile farklı dozlarda AKR'nin uygulandığı araştırmalarda hem erkek hem de dişi ratlarda bulunan toksik etkiler incelenmiştir. Bu deneylerde, AKR uygulanan tüm sıçanlarda beyin ağırlıklarının azaldığı gösterilmiştir (257). El Sayyad ve ark., gebe ratlara AKR uygulaması yapmış ve doğan yavrularında gecikmiş büyüme ve azalmış vücut ve beyin ağırlığı gözlemlemişlerdir (258). Gebelik sırasında maternal AKR maruziyetini takiben azalan yavru vücut ağırlığı, farelerde ve sıçanlarda tutarlı bir şekilde gözlenmiştir (259). Araştırmamızdan elde ettiğimiz bulgular, AKR'ye maruz bırakılan gebe sıçanların fetus ve doğan yavrularının canlı ağırlıklarını, total beyin ağırlıklarını ve vücut ağırlıklarını olumsuz etkileyerek önemli derecede azalttığını göstermiştir. Ancak AKR'nin bu olumsuz etkilerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. AKR'nin, enzimler, reseptörler ve hücre iskeleti proteinleri dahil olmak üzere proteinlerdeki sülfhidril ve amino kalıntıları ile kolayca reaksiyona girme yeteneği, çok sayıda hücresel işlemi etkileyebilir. Ayrıca vücut ağırlığındaki azalma, leptin transport bozukluklarından kaynaklanan iştah kaybından, eşlik eden AKR toksisitesinden ve gebe ratlarda ise prolaktin düzeyindeki azalmadan kaynaklanabilir (260).

Water maze testi, hayvanların uzaysal öğrenme ve hafıza yeteneklerini araştırmak için kullanılan en yaygın nörodavranışsal testlerden biridir. Çalışmamızda dişi ve erkek yavrularda ayrı ayrı yapılan water maze testinde platformu bulma süreleri değerlendirilmiştir. Dişilerde platformu bulma süresi açısından gruplar arasında fark gözlenmezken, erkeklerde bu süre AKR grubunda diğer gruplardan daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde platformun bulunduğu quadrantta geçirilen sürede dişiler arasında fark bulunmazken erkeklerde AKR grubunda bu süre daha yüksekti. Bu bulgular AKR'nin erkeklerde öğrenme ve hafıza bozukluklarına sebep olduğunu düşündürmektedir. Özellikle hipokampusta nöronal hasar ve sinaptik iletim disfonksiyonunun, bilişsel bozulma ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (261). Zhang ve ark., AKR'ye maruz kalan sıçanların serebral kortekslerinde ve serebellalarında sinaps sayısının ve sinapsin protein seviyelerinin azaldığını bildirmiştir (262). Çalışmamızda da analizi yapılan proteinlerin ekspresyonu dramatik bir şekilde azalmıştır, bu da sinaptik iletim hasarının AKR kaynaklı bilişsel bozulma ile yakından bağlantılı

olabileceğini göstermektedir. AKR aracılı bellek bozuklukları, dış uyarımlar veya öğrenme ile yeniden şekillenebilen beyin plastisitesindeki değişikliklerle ilişkili olabilir (263). Ayrıca, çalışmamızda elde edilen histopatolojik ve elektron mikroskopik inceleme sonuçları, AKR'ye maruz kalmanın öğrenme ve hafıza kaybına neden olduğunu doğrular niteliktedir.

Miyelinizasyon, MSS'de elektriksel sinyal iletiminde etkili olan temel faktördür. Aksonların miyelinizasyonu, yüksek düzeyde düzenlenen bir süreçtir ve çeşitli intrinsik ve ekstrinsik faktörler tarafından kontrol edilir. Bu çalışmada, AKR'nin miyelinin bazı gen ve proteinlerinin düzenlenmesindeki rolüne odaklanılmıştır. Miyelin proteinlerinin vücuttaki en uzun ömürlü proteinler arasında olması, bu proteinlerin miyelin stabilitesi ve sinir sisteminin normal işleyişindeki önemini göstermektedir (264). Miyelin, MBP gibi spesifik miyelin proteinleri ile bir arada tutulan, sıkıca paketlenmiş tekrarlayan lipid ikili tabakalardan oluşur (265). MBP, miyelin kılıfı içinde dağılan ve olgun miyelinin çok katmanlı yapısını oluşturan katmanlaşma sürecinin ayrılmaz bir parçasıdır (266). MBP, toplam MSS miyelin proteinlerinin %30'unu oluşturan ve miyelin içinde en bol bulunan proteinlerden birisi olması sebebiyle miyelin kılıfının fonksiyon ve bütünlüğündeki rolü oldukça büyüktür (267). MBP, iyi tanımlanmış bir globüler yapıdan yoksun, çevresine ve etkileşimlerine bağlı olarak konformasyonunu değiştirebilen, özünde düzensiz bir proteindir (268). Bu özelliğinden dolayı AKR gibi toksikantların MBP'nin yapı ve işlevine kolayca etki etmesi muhtemeldir. Bunun aksine, düzensiz bir protein olması, MBP'nin çok işlevli bir protein olabileceğini de düşündürülebilir (267). MBP, membran bağlayıcı bir protein olarak karakterize edilmiş olsa da (269), bir dizi protein-protein etkileşimi içerisindedir (270,271). Bu farklı etkileşimler miyelinin doğru oluşumu için önemlidir (272). MBP'nin, kalmodulin ve hücre iskeleti proteinleri gibi diğer birçok proteine bağlandığı ve bunlarla etkileşime girdiği (273) ve sinyal yollarında rol oynadığı bilinmektedir (271).

Çalışmamızda, AKR uygulaması, miyelinin en önemli yapı bileşenlerinden olan MBP'nin mRNA gen ekspresyonunu hem dişi hemde erkek ratlarda önemli derecede azaltmıştır. Benzer şekilde fetus, dişi ve erkek ratlarda MBP protein düzeyini önemli derecede baskılamıştır. İmmünohistokimyasal verilerde beyin korteksinde, pozitif MBP immünoreaktivite gösteren nöronlarda azalmalar tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, miyelinin yapı ve fonksiyonunda ciddi etkisi olan MBP ifadenmesinin azalmasının doğrudan veya dolaylı olarak nörodejenerasyona ve hatta başta MS gibi

demiyelinizan hastalıkların patogeneziye katkısını göstermektedir. Bununla birlikte, yağda çözünen ve KBB'yi geçerek MSS'ye nüfuz eden E vitamini, AKR'nin sebep olduğu demiyelinizasyonu durdurma kabiliyetini ve remiyelinizasyonu başlatma potansiyelini gösteren MBP gen ve protein düzeylerini artırmıştır. Araştırmamızda, AKR kaynaklı toksisiteye karşı E vitamininin tercih edilme sebebi ise, güçlü nöroprotektif bir antioksidan ve antiapoptotik özellikte bir vitamin olmasıdır (274,275).

Tüm bunlara ek olarak MBP'nin, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerini göstermek için kullanılabilir önemli belirteç olduğu rapor edilmiştir (276). Miyelin hasarı oluşması durumunda, beyin dokusundaki bu proteinin miktarı azalmaktadır (277). Araştırmalarda anti-MBP antikorlarının demiyelinizasyona neden olup olmadığı incelenmiştir. Anti-MBP antikorlarına ek olarak, MBP proteini incelenmiş ve hem serumda hem de BOS'ta beyin dokusu hasarı ve nörodejeneratif hastalıklar için olası bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği önerilmiştir (278,279). Kompakt miyelinin ayrılmaz bir bileşeni olan MBP'nin BOS'ta saptanması, miyelin yapısının bozulmasının doğrudan bir işareti. Buna paralel olarak, çoğu MS hastasının BOS'unda relaps sırasında MBP ve fragmanları saptanabilmektedir (280,281). Miyelin kılıf kaybı, MS'in önemli bir özelliğidir ve bu sebeple MS gibi demiyelinizan hastalıklarda miyelin kılıfının tahribinin gözlenmesi, nörodejenerasyon ve elektriksel iletimin başarısızlığını gösteren önemli bir belirteçtir. MS patogeneziinde MBP'nin ve kompakt miyelinin yapısında değişikliklerin meydana geldiği araştırmalarda belirlenmiştir (282).

Deneysel MS modellerinde, demiyelinizasyon ve nörodejenerasyonu değerlendirmek için histopatolojik incelemelerin yanında MBP düzeyleri belirlenmektedir. Bu araştırmalarda, nöronal piknoz, dejenerasyon, demiyelinizasyonun yanı sıra (oligodendrosit yıkımı, miyelin kaybı ve aksonal hasarın bir sonucu olarak MS plağı oluşumu) hipokampus ve kortekste MBP seviyesinde önemli bir azalma belirlenmiştir (283,284). Yine farklı bir araştırmada, histopatolojik değişikliklerle birlikte MBP düzeyinde azalma ve demiyelinizasyon rapor edilmiştir (285). Msd (myelin synthesis-deficit) farelerde, olgun miyelin kılıfın bir belirteci olan MBP immünoboyamasının yapıldığı bir incelemede, beyaz madde, talamus ve kortekste nadir ve zayıf MBP boyamaları gözlemlenmiştir (286). Yine shiverer farelerde benzer zayıf ve seyrek boyanmalar tespit edilmiştir (287). Bu durum fare beyinlerinde oligodendrositlerin kompakt miyelin kılıfı oluşturma kabiliyetinde başarısız olduğunu ve hipomiyelinasyonu ifade etmektedir.

Miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG), MSS ve PSS miyelininde bulunan bir glikoproteindir. MAG, çok katmanlı kompakt miyelin içinde değil, miyelin kılıflarının periaksonal glial membranlarında bulunmaktadır. Aksonun yanındaki bu konumu, onun miyelin oluşturan hücreler ve aksolemma arasında adezyon ve sinyalleşmede işlev gördüğünü düşündürmektedir (288). MAG, miyelin aksonlarını koruyan, akson-miyelin stabilitesini destekleyen ve eksikliğinde ise aksonal fonksiyon bozukluğunun ortaya çıkmasıyla karakterize bir glikoproteindir (289). Anti-MAG antikorlarının siyatik sinire transferinin demiyelinizasyona neden olduğunu gösteren bir araştırmada, bu antikorların nöropatiye neden olduğu gösterilmiştir (290). Fareler üzerinde yapılan bir araştırma, MAG eksikliğinde miyelinin akson-Schwann hücre biriminin devam edemediğini göstermiştir. Bu nedenle, miyelin oluşumu için MAG oldukça önemli bir proteindir (291). Bu gözlemler, MAG'ın MS gibi demiyelinizan hastalıklarda rol oynadığını düşündürmektedir. MAG knockout farelerde yapılan araştırmalarda MSS miyelinizasyonunda gecikme, periaksonal ve paranodal yapısal anormallikler, miyelin kılıfı oluşumunda bozukluklar görülmüştür. Bu *in vivo* bulgular, aksonlardan oligodendrositlere MAG aracılı sinyalleşmenin verimli miyelinizasyon için gerekli olduğunu göstermektedir (288). Araştırmamızda AKR'nin MAG gibi miyelinin önemli bir bileşeninin mRNA gen ekspresyonunu hem dişi hem de erkek ratlarda düşürdüğü, protein ekspresyon düzeylerini ise fetus, dişi ve erkek ratlarda önemli derecede azalttığı, buna karşılık E vitamininin, bu genin ekspresyon ve protein düzeylerini belirgin şekilde uyardığı görülmüştür. Bu bulgular AKR'nin demiyelinizasyona sebep olan etkisinin altında yatan mekanizmalarında MAG'ın önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer bir miyelinle ilişkili glikoprotein ise miyelin kılıfının dış yüzeyinde bulunan miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG)'dir. MOG, MSS'nin miyelin oluşturan hücreleri olan oligodendrositler tarafından üretilen birkaç proteinden biridir. MBP ve MAG'ın yanısıra MOG, oligodendrosit yüzey membranlarının temel bir bileşenidir. Bu glikoproteinler, miyelin kılıflarının oluşumunda, korunmasında ve dağılımında temel rollere sahiptir (292). İnsanlarda ve kemirgenlerde, MOG geni majör histo-uyumluluk kompleksi lokusunda bulunur (293). Bu bölge tarafından kodlanan moleküller, hücrelerin yüzeylerinde bulunur ve antijen sunumunda, inflamasyonun düzenlenmesinde, kompleman sisteminde ve doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık yanıtlarda yer alır (293). Hücre iskeletinin oluşumu ve mikrotübül stabilizasyonu MBP ile MOG etkileşimlerine

bağlıdır (294). Deneysel çalışmalar, seçilen anti-MOG antikorlarının, miyelin içinde önemli bir proteaz-aracılı MBP kaybını indüklediğini göstermiştir (295). MOG'u MSS'de böylesine özel kılan bazı özellikler bulunmaktadır. Miyelin kılıfının dış yüzeyinde lokalize olan MOG, MSS demiyelinizasyonunu ortaya çıkarmak için bilinen tüm patojenik gereksinimleri karşılayan ilk miyelin antijeni olduğundan, MS'de otoimmün atak için dikkat çekici bir hedef antijendir (250,296). Yüzey konumu ayrıca, hücre dışı matriksten veya bitişik miyelin kılıflarından oligodendrositlere bilgi ileterek sinyal iletiminde işlev görebileceğini düşündürmektedir (288). Periferik sinirde veya diğer dokularda protein veya mRNA düzeyinde MOG saptanmadığı için MSS miyelininin spesifik bir antijeni olarak görülmektedir (297). Saflaştırılmış anti-MOG antikor, doğrudan veya dolaylı olarak MSS demiyelinizasyona neden olmaktadır (298). Akut deneysel otoimmün ensefalomyelit olan hayvanlara anti-MOG antikor intravenöz olarak verildikten sonra MSS'de demiyelinizasyon görülmüş ve bu durum anti-MOG'un bozulmuş kan-beyin bariyeri yoluyla MSS'ye girebildiği ile ilişkilendirilmiştir (298,299). Normal sıçanlara anti-MOG antikorunun intratekal enjeksiyonu da MSS demiyelinizasyonuna neden olmaktadır (300). MOG'un MSS miyelinizasyonundaki bu dikkat çekici özellikleri birlikte değerlendirildiğinde MS gibi demiyelinizan hastalıkların patogenezindeki etkisi araştırma konumuz olmuştur. MOG'nin miyelin kılıflarının dış tabakasında ve oligodendrosit zarının yüzeyindeki lokalizasyonu, bu proteinin bağışıklık sistemi ile etkileşime geçebileceği ve demiyelinizan bozuklukların patofizyolojisine dahil olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda AKR'nin MOG gen ekspresyonu ve protein düzeylerini dişi ve erkek rat beyinlerinde önemli derecede azalttığı görülmüştür. Bulgularımızdaki bu azalma, demiyelinizasyonda MOG'un önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. E vitamini ise bu etkiyi geri döndürmüştür. MOG immünoaktivitesi de western blot ile uyum içindedir. Dişi ve erkek beyin korteksi incelendiğinde MOG immünoreaktif olan nöronlar AKR grubunda azalmıştır. Buna karşılık E vitamininin, MOG immünoaktivitesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. En sık görülen demiyelinizan hastalık olan MS'te MOG'un yüksek immünojenik potansiyele sahip olması, bu proteinin MS için spesifik bir antijen olabileceğini düşündürmektedir (301).

Beyin kaynaklı nörotrofik faktörü (BDNF), başlangıçta bir öncü protein olan pro-BDNF olarak sentezlenir ve daha sonra biyolojik olarak aktif olan olgun BDNF'ye serbestleşir (302). BDNF'nin, uzun zamandır nöronal fonksiyondaki kritik rolleri bilinmektedir (303). BDNF, nörotransmitter salınımını kolaylaştırarak nöronal

plastisiteyi de etkiler (304). Ayrıca, BDNF'nin önemli bir pro-miyelinizan molekül olduğunu gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır (305). Çalışmalar, proBDNF'nin miyelinizasyonu desteklediğini ve miyelin yapı proteini olan MAG'ın ekspresyonuna aracılık ettiğini göstermiştir (306). MAG, uzun süreli akson-miyelin stabilitesi, Ranvier düğümlerinin yapısı ve akson hücre iskeletinin devamlılığı için oldukça önemlidir (307). BDNF knockout olan farelerde ön beyin, korpus kallozum, omurilik ve optik sinirlerdeki miyelin proteinlerinin (MBP, MAG ve MOG) ifadesinde önemli azalmalar gösterilmiştir (308,309). Daha da önemlisi, bu moleküler değişiklikler, miyelin üzerindeki yapısal değişikliklere yansımıştır. 2 haftalık BDNF knockout farelerin incelendiği bir çalışmada, optik sinirdeki miyelinli aksonların oranı, wild tipte yavru farelere kıyasla %50 oranında azaldığı görülmüştür (310). Bu durum, BDNF'nin nöronal gelişimden ziyade miyelinizasyona özgü bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Miyelinizasyondaki bu azalma, doğum sonrası üçüncü haftaya kadar devam etmiş, bu duruma miyelinsiz aksonların sayısında artış ve akson çapında önemli azalış eşlik etmiştir (310). Bu veriler, endojen BDNF'nin *in vivo* gelişim sırasında MSS miyelinizasyonunu güçlendirdiğinin göstergesidir. BDNF'nin nöron-glia etkileşimindeki rolü, remiyelinizasyon ve/veya miyelin onarım sürecinin düzenlenmesinde yer alan bir başka önemli yönünü temsil eder (306). Ayrıca, BDNF'nin, miyelinin yapısal bütünlüğünü kontrol eden yapısal miyelin proteinlerinin dağılımını düzenlediği bilinmektedir (311). Örneğin, deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) BDNF knockout fareler, miyelinin yapısal bütünlüğü için gerekli olan miyelin proteinlerinin anormal dağılımından kaynaklanan önemli miyelin yapısal hasara sahiptir (311). Benzer şekilde, diğer çalışmalar da miyelin yapısal proteinlerinin dağılım modellerini düzenlemede BDNF'yi işaret etmişlerdir (310,312). Ayrıca, BDNF'nin, remiyelinizasyon ve/veya miyelin onarım sürecinde temel adımlar olan miyelin hasarı bölgelerinde (313) oligodendrosit progenitör hücre proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir (310). Ek olarak, MS hastalarında lezyon çevresinde BDNF'nin varlığı gösterilmiş (314) ve bunun miyelin onarımında rolü olabileceği ifade edilmiştir (313). Miyelinizasyonda BDNF'nin önemli bir rolü olmasından dolayı araştırmamızda AKR toksisitesiyle oluşan demiyelinizasyonun, pro-BDNF ve BDNF düzeyleriyle ilişkisi incelenmiştir. Çalışmamızda, kronik olarak uygulanan AKR'nin hem öncü protein olan pro-BDNF hem de BDNF'nin protein düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir. AKR grubundaki bu azalmaya BDNF gen ekspresyon düzeyindeki azalma eşlik etmiş, immünohistokimyasal olarakta hem fetusta hemde dişi ve erkek yavrularda bu durum desteklenmiştir.

Çalışmalar, MS'e yanıt olarak miyelin onarımında BDNF'nin rolünü de göstermektedir (315,316). Tekrarlayan ve düzelen MS (RRMS) hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, hastalığın hem remisyon hem de relaps fazında daha düşük seviyelerde BDNF salgıladığı gösterilmiştir (315). Bu sonuçlar, RRMS hastalarının sağlıklı kontrollere kıyasla genel olarak daha düşük BDNF seviyelerine sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, daha düşük BDNF düzeylerinin MS'li bireylerin miyelin hasarına yatkın hale gelmesine ve remisyon dönemlerinde bile miyelin onarımını gerçekleştirme yeteneğini sınırlamasına sebep olabilir. Buna karşılık, MS atağı sırasında hastalarda, hastalığın stabil fazındaki seviyelere kıyasla daha yüksek serum BDNF seviyeleri tespit edilmiştir (317,318). Bu sonuçlar, bir MS atağı sırasında, miyelin onarımını kolaylaştırmak ve nörolojik iyileşmeyi desteklemek için BDNF seviyelerinin up-regüle düzenlendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, BDNF seviyeleri, miyelin hasarını etkin bir şekilde onarmak veya tam remiyelinizasyonu desteklemek için yeterli seviyelere ulaşmamaktadır. Benzer şekilde farklı çalışmalarda, BDNF'nin MS kaynaklı lezyonların remiyelinizasyona katkıda bulunduğu dair kanıtlar sunulmaktadır (318,319). BDNF'nin MSS miyelinizasyonunu desteklediğine dair bilgiler, felç, travmatik yaralanma ve MS dahil olmak üzere demiyelinizan durumlar için terapötik bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Felç ve omurilik yaralanmasında rekombinant BDNF'yi aşırı eksprese etmek için doğrudan infüzyon veya hücre bazlı gen tedavisi uygulaması, oligodendrosit hücre sayılarını ve MBP, MOG ve PLP proteinlerinin ekspresyonunu önemli ölçüde artırmıştır (320,321). BDNF'nin bu multifonksiyonlarının, miyelin oluşumu da dahil olmak üzere MSS'nin biyolojik aktivitelerini seçici olarak etkileme potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir.

Ayrıca araştırmalar, BDNF ekspresyonunun bilişsel işlevlerdeki, özellikle öğrenme ve hafıza ile ilgili süreçlerdeki önemine dikkat çekmektedir. Yapılan toksikolojik çalışmalarda, düşük AKR konsantrasyonlarının BDNF ekspresyonunu etkilediği ifade edilmiştir (322). 4 yıl takip edilen prospektif kohort bir çalışma, AKR'ye maruz kalmanın, yaşlı erkeklerde artan zayıf biliş ve hafif bilişsel gerileme riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir (76). Araştırmamızda, AKR ile muamele edilen ratlarda azalan BDNF ve pro-BDNF gen ve protein ifadesi gösterilmiştir. AKR'nin bu toksik özelliği, genel olarak beyin gelişimini baskılamasından ve doğum öncesi dönemden kaynaklanan muhtemel nörogelişimsel bozukluklara sebep olduğundan kaynaklanmış olabilir.

Histopatolojik değerlendirmeler incelendiğinde dişi ve erkek ratların beyinlerinde korteks çapları değerlendirilmiş ve beyin korteks çapları karşılaştırıldığında AKR gruplarında önemli azalmalar tespit edilmiştir. Ayrıca fetus, dişi ve erkek ratların beyin korteks hücre nükleuslarında heterokromazi verileri değerlendirildiğinde AKR, fetus heterokromazisini önemli derecede artırırken, dişi ve erkeklerde oluşan heterokromazi artışı istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Heterokromatik görüntüler sitoplazma ve nükleusu içeren yoğunlaşmayı ifade etmektedir. Bu yoğunlaşma ise hücrelerde fonksiyon ve metabolik olayların azalmasına ve hatta hücrenin apoptoza gidebileceğine işaret etmektedir. Özellikle heterokromatik hücrelerin fetus beyinlerinde daha fazla görülmüş olması embriyonik gelişim sırasında AKR'nin beyin gelişimindeki etkisini daha çarpıcı Şekilde ortaya koymaktadır. TEM incelemelerinde ise AKR grubunda hem dişi hemde erkek Őıanlara ait beyin dokusu kesitlerinde benzer bulgular grlmştir. İncelenen kesitlerde bazı nöronlarda ödem ve organel hasarı tespit edilmiştir. Ayrıca ödematöz alanlar ve bazı kesitlerde perivasküler alanlarda lenfositler saptanmıştır. Özellikle miyelinli aksonların miyelin kılıfları heterojen elektron yoğunlukta izlenmiştir. Miyelin kılıflarda düzensizlik ve kırılmalar ile miyelin tabakaları arasında bölgesel ayrılmalar gözlenmiştir. Elde edilen bulgular gösteriyorki; çalışmamızda elde edilen moleküler analizler, histopatolojik değişiklikler ve TEM sonuçlarında görülen miyelin kılıf dejenerasyonları birbirleri ile uyum içerisinde-dir. AKR + E Vitamini grubunda E vitamini uygulaması ise nöron, glia hücreleri ve vasküler yapıların genel olarak normal ultrastrüktürel yapıda olmasını sağlamıştır.

Diğer dokularla karşılaştırıldığında beyin, yüksek metabolizma hızına, yüksek lipid içeriğine ve nispeten düşük koruyucu antioksidan sistemlere sahip olduğu için oksidatif hasara daha duyarlıdır (323). Araştırmalar, α -tokoferol uygulamasının beyin oksidatif hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini ve bu korumanın lipid peroksidasyonunun azalmasıyla sağlandığını göstermiştir (324). 1997 yılında Alzheimer hastalığında tedavi olarak E vitamininin etkinliğini gösteren çift kör, randomize çok merkezli klinik bir çalışma yapılmıştır. Araştırmada, orta derecede Őiddette bozukluğu olan yz kırk Alzheimer hastasında iki yıl boyunca 2000 IU/gün vitamin E uygulanmıştır. Sonuç olarak, E vitamininin Alzheimer hastalığı ilerlemesini yavaşlattığı sonucuna varılmıştır (325). E vitamini ailesinin doğada bulunan sekiz üyesinin tümü biyolojik olarak aktif olmakla birlikte, memelilerde, α -tokoferol biyolojik olarak en aktif olarak kabul edilir (326). α -Tokoferol, büyük lde α -tokoferol transfer proteinine (α -

TTP) yüksek afinitesi nedeniyle biyolojik olarak en aktif form olarak kabul edilmektedir (327). α -Tokoferol, yağda çözünen bir molekül olması nedeniyle, α -TTP aracılığıyla transferi gerçekleştirilir. α -Tokoferol, KBB'yi oluşturan endotel hücrelerden geçtiğinde, α -tokoferolün doğrudan Bergmann glia hücreleri adı verilen özel astrositlere iletilmesi söz konusudur. Rat Bergmann glia hücrelerinde α -TTP'nin ekspresyonu ediliyor olması, α -tokoferol'ün MSS'ye kolayca ulaşması anlamına gelebilir (328). TTP ekspresyonunun Alzheimer hastası olan bireylerde hipokampusun Purkinje hücrelerinde ve CA2 Piramidal hücrelerinde lokalize olduğu, ancak sağlıklı bireylerde durumun böyle olmadığı doğrulanmıştır (329). Hücre içi TTP'nin beynin farklı bölgeleri boyunca değişken bir şekilde ifade edilmesi ve ifadenin nöronal sağlığa dayalı olarak değişiklik gösteriyor olması, α -tokoferol'ün nörodejeneratif hastalıklarda etkinliğiyle ilgili bilgiler sunmaktadır. Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stres aktivitesi göz önüne alındığında, ROS düzeylerinin artması, TTP ekspresyonunu up-regüle etmesiyle ilişkilendirilebilir. Bu durum MSS'de özellikle beynin ihtiyaç duyulandan daha fazla bölgesinde, α -tokoferol transportunu modüle eden feedback mekanizmasına sahip olabileceğini düşündürmektedir (326). Yapısal olarak, astrositler KBB boyunca uzanırlar ve bütünlükleri için α -tokoferole bağımlı nöronlar olan Purkinje hücreleri ile yakından ilişki içerisindedirler (330). α -Tokoferol'ün nöronlara ve hatta oligodendroglial sürece transport ve etki mekanizması tam olarak bilinmesede bu gözlemler, esasen KBB'den α -tokoferolü ve hücrede dolaşan diğer vitaminleri alan astrositlere, nöronlara ve oligodendrositlere yoğunlaşılması gerektiğini düşündürmektedir. Böylece, E vitamininin MSS'de taşınmasının ve bulunabilirliğinin anlaşılması, MS gibi nörodejeneratif hastalıkların ilerleme ve önlenmesinde önemli stratejik hedefler haline gelebilir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında AKR'nin embriyonal gelişimden yetişkinliğe kadar olan süreçte, miyelinle ilişkilendirilen majör proteinlerin (MBP, MAG, MOG, BDNF ve pro-BDNF) transkripsiyon ve translasyon düzeylerini baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, AKR'nin organogeneze ve bilişsel fonksiyonlar üzerine negatif etki göstererek miyelin sentez ve gelişimini anlamlı derecede bozduğu tam olarak ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra sonuçlarımız, E vitamininin AKR kaynaklı beyin toksisitesine karşı organogenezde rol aldığını, histomorfolojik koruma etkisinin olduğunu ve bu özelliklerinden dolayı E vitamininin AKR kaynaklı nörotoksositeye karşı nöroprotektif bir ajan olarak hareket edebileceğini ortaya koymuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gebelik, laktasyon ve laktasyon sonrası 9. haftaya kadar dişi ve erkek yavrulara AKR ve AKR'nin E vitamini ile birlikte uygulandığı çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre;

- AKR uygulanan gebe ratlardan sezeryan ile alınan fetus ağırlıkları değerlendirildiğinde, AKR'nin total fetus ağırlığını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. CRL ölçümleride benzer şekilde AKR ile azalmıştır. E vitamini ise her iki parametreyi de kayda değer ölçüde artırmıştır. Ayrıca AKR, dişi ve erkek ratların beyin ağırlıklarını da olumsuz etkilemiştir.
- Bilişsel fonksiyonun ölçülmesi için uygulanan water maze testi sonuçları, AKR uygulamasının dişi ratlarda platformu bulma süresi üzerine etki etmediğini göstermiştir. AKR, erkek ratlarda ise platformu bulma sürelerinin artmasına sebep olmuştur. Bununla birlikte dişi ratların hedef kuadranda geçirdikleri sürelerde de önemli fark görülmezken, erkek ratlarda bu sürenin uzadığı tespit edilmiştir. Erkek ratlarda AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulaması bilişsel fonksiyon testi üzerinde pozitif etki göstermiş, süreleri kontrol grubu değerlerine getirmiştir.
- AKR uygulaması hem erkek hem de dişi ratlarda miyelinle ilişkili MBP, MAG, MOG ve BDNF gen ekspresyonları üzerine oldukça önemli derecede negatif etki göstermiştir. Benzer şekilde fetus, dişi ve erkek ratlarda MBP, MAG, MOG, BDNF ve pro-BDNF protein düzeyleri üzerinde negatif etki göstermiştir. AKR+E vitamini grubunda, E vitamini uygulaması AKR kaynaklı bu gen ekspresyonlarını ve protein düzeylerini önemli derecede artırmıştır. Benzer şekilde MBP, MOG ve BDNF ile yapılan immünohistokimyasal incelemelerden elde edilen sonuçlar RT-PCR ve western blot analizlerini doğrulamıştır.
- Fetus, dişi ve erkek ratlarda yapılan histopatolojik değerlendirmeler, AKR uygulamasının özellikle fetus beyin korteks nükleus heterokromazisine sebep olduğunu göstermiştir. Ayrıca AKR'nin dişi ve erkek ratların beyin korteks çaplarını da önemli derece azalttığı belirlenmiştir. AKR+E vitamini grubunda E

vitamini uygulaması ile ökromatik hücrelerin arttığı ve beyin korteks çaplarının ise pozitif yönde etkilendiği görülmüştür.

- TEM incelemeleri ise göstermiştir ki; AKR uygulaması, nöronlarda ödem, organel hasarı, perivasküler alanlarda lenfositlerin artışı ve özellikle miyelinli aksonların miyelin kılıflarında düzensizlik, kırılmalar ve bölgesel ayrılmaların oluşmasına sebep olmuştur. E vitamini uygulaması ise nöron ve glia hücrelerinin normal ultrastrüktürel yapıda olmasını ve miyelin bütünlüğünün korunmasını sağlamıştır.
- Mevcut çalışmada, histopatolojik, immünohistokimyasal ve moleküler incelemeler sonucunda, AKR'nin gestasyonel, laktasyonel ve süten kesme sonrasını içeren uzun bir sürede, miyelinle ilgili bazı temel proteinler ve BDNF üzerinde zararlı etkilerinin olduğu görülmüştür. Bu zararlı etkilerin, insanlarda MS gibi demiyelinizan hastalıkların patogeneğinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, yoğun miktarda AKR içeren kızartma ve fast-food gibi gıdaların daha az tüketilmesiyle nörodejeneratif hastalıkların gelişiminin azaltılabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca, E vitamininin AKR toksisitesine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle, günlük diyetle alınan E vitamini miktarının artırılmasını, nöroprotektif doğal bir yöntem olarak tavsiye ediyoruz.

KAYNAKLAR

1. Friedman M. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *J Agric Food Chem* 2003, 50(16): 4504–26.
2. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* 2002, 50(17): 4998–5006.
3. Petersen BJ, Tran N. Exposure to acrylamide: placing exposure in context. *Adv Exp Med Biol* 2005, 561(1): 63–76.
4. Benford D, Ceccatelli S, Cottrill B, DiNovi M, Dogliotti E, Edler L, Farmer P, Fürst P, Hoogenboom L, Katrine Knutsen H, Lundebye AK, Metzler M, Mutti A, Schouten L, Schrenk D, Vleminckx C. Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA J* 2015, 13(6): 4104.
5. Aldawood N, Alrezaki A, Alanazi S, Amor N, Alwasel S, Sirotkin A, Harrath AH. Acrylamide impairs ovarian function by promoting apoptosis and affecting reproductive hormone release, steroidogenesis and autophagy-related genes: An in vivo study. *Ecotoxicol Environ Saf* 2020, 197(110595): 1–10.
6. Senthilkumar S, Raveendran R, Madhusoodanan S, Sundar M, Shankar SS, Sharma S, Sundararajan V, Dan P, Sheik Mohideen S. Developmental and behavioural toxicity induced by acrylamide exposure and amelioration using phytochemicals in *Drosophila melanogaster*. *J Hazard Mater* 2020, 394(122533): 1–12.
7. Gwinn WM, Auerbach SS, Parham F, Stout MD, Waidyanatha S, Mutlu E, Collins B, Paules RS, Merrick BA, Ferguson S, Ramaiahgari S, Bucher JR, Sparrow B, Toy H, Gorospe J, Machesky N, Shah RR, Balik-Meisner MR, Mav D, Phadke DP, Roberts G, DeVito MJ. Evaluation of 5-day In Vivo Rat Liver and Kidney With High-throughput Transcriptomics for Estimating Benchmark Doses of Apical Outcomes. *Toxicol Sci* 2020, 176(2): 343–54.
8. Li D, Wang P, Liu Y, Hu X, Chen F. Metabolism of Acrylamide: Interindividual and Interspecies Differences as Well as the Application as Biomarkers. *Curr Drug*

Metab 2016, 17(4): 317–26.

9. Abou-Donia MB, Ibrahim SM, Corcoran JJ, Lack L, Friedman MA, Lapadula DM. Neurotoxicity of glycidamide, an acrylamide metabolite, following intraperitoneal injections in rats. *J Toxicol Environ Health* 1993, 39(4): 447–64.
10. Komoike Y, Matsuoka M. In vitro and in vivo studies of oxidative stress responses against acrylamide toxicity in zebrafish. *J Hazard Mater* 2019, 365(1): 430–9.
11. Sui X, Yang J, Zhang G, Yuan XF, Li WH, Long JH, Luo Y, Li Y, Wang Y. NLRP3 inflammasome inhibition attenuates subacute neurotoxicity induced by acrylamide in vitro and in vivo. *Toxicology* 2020, 432(152392): 1–12.
12. Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH. Netter's Essential Histology : with Correlated Histopathology. *Elsevier* 2020, 8(1): 508.
13. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 2000, 61(3): 267–304.
14. Lopachin RM, Lehning EJ, Castiglia CM, Saubermann AJ. Acrylamide disrupts elemental composition and water content of rat tibial nerve. III. Recovery. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993, 122(1): 54–60.
15. Al-Gholam MA, Nooh HZ, El-Mehi AE, El-Barbary AEM, El Fokar AZ. Protective effect of rosemary on acrylamide motor neurotoxicity in spinal cord of rat offspring: postnatal follow-up study. *Anat Cell Biol* 2016, 49(1): 34–49.
16. Tabeshpour J, Mehri S, Abnous K, Hosseinzadeh H. Neuroprotective Effects of Thymoquinone in Acrylamide-Induced Peripheral Nervous System Toxicity Through MAPKinase and Apoptosis Pathways in Rat. *Neurochem Res* 2019, 44(5): 1101–12.
17. Gohil K, Vasu VT, Cross CE. Dietary alpha-tocopherol and neuromuscular health: search for optimal dose and molecular mechanisms continues! *Mol Nutr Food Res* 2010, 54(5): 693–709.
18. Nishida Y, Ito S, Ohtsuki S, Yamamoto N, Takahashi T, Iwata N, Jishage KI, Yamada H, Sasaguri H, Yokota S, Piao W, Tomimitsu H, Saido TC, Yanagisawa K, Terasaki T, Mizusawa H, Yokota T. Depletion of Vitamin E Increases Amyloid β Accumulation by Decreasing Its Clearances from Brain and Blood in a Mouse

- Model of Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 2009, 284(48): 33400–8.
19. Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. *Pharmacol Ther* 2010, 128(2): 336–74.
 20. Cao L, Chen R, Xu J, Lin Y, Wang R, Chi Z. Vitamin E inhibits activated chaperone-mediated autophagy in rats with status epilepticus. *Neuroscience* 2009, 161(1): 73–7.
 21. Numakawa Y, Numakawa T, Matsumoto T, Yagasaki Y, Kumamaru E, Kunugi H, Taguchi T, Niki E. Vitamin E protected cultured cortical neurons from oxidative stress-induced cell death through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem* 2006, 97(4): 1191–202.
 22. Tekkeli SEK, Önal C, Önal A. A Review of Current Methods for the Determination of Acrylamide in Food Products. *Food Anal Methods* 2012, 5(1): 29–39.
 23. Capuano E, Fogliano V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Sci Technol* 2011, 44(4): 793–810.
 24. Cartus A, Schrenk D. Current methods in risk assessment of genotoxic chemicals. *Food Chem Toxicol* 2017, 106(B): 574–82.
 25. Zamani E, Shokrzadeh M, Fallah M, Shaki F. A review of acrylamide toxicity and its mechanism. *Pharm Biomed Res* 2017, 3(1): 1–7.
 26. Michalak J, Czarnowska-Kujawska M, Klepacka J, Gujska E zbieta. Effect of Microwave Heating on the Acrylamide Formation in Foods. *Molecules* 2020, 25(4140): 1–21.
 27. Kumar J, Das S, Teoh SL. Dietary Acrylamide and the Risks of Developing Cancer: Facts to Ponder. *Front Nutr* 2018, 5(14): 1–12.
 28. Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SPD, Müller DJG, Olin S, Petersen BJ, Schlatter J, Scholz G, Scimeca JA, Slimani N, Törnqvist M, Tuijtelaars S, Verger P. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol* 2005, 43(3): 365–410.

29. Michalak J, Gujska E, Czarnowska M, Klepacka J, Nowak F. Effect of Storage on Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural Contents in Selected Processed Plant Products with Long Shelf-life. *Plant Foods Hum Nutr* 2016, 71(1): 115–22.
30. Keramat J, LeBail A, Prost C, Jafari M. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. *Food Bioprocess Technol* 2011, 4(4): 530–43.
31. Krishnakumar T, Visvanathan R. Acrylamide in Food Products: A Review. *J Food Process Technol* 2014, 05(7): 1–14.
32. Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem* 2003, 51(16): 4782–7.
33. Maan AA, Anjum MA, Khan MKI, Nazir A, Saeed F, Afzaal M, Aadil RM. Acrylamide Formation and Different Mitigation Strategies during Food Processing – A Review. *Food Rev Int* 2020, 38(1): 70–87.
34. Miśkiewicz K, Rosicka-Kaczmarek J, Nebesny E. Effects of Chickpea Protein on Carbohydrate Reactivity in Acrylamide Formation in Low Humidity Model Systems. *Foods (Basel, Switzerland)* 2020, 9(2): 167.
35. Hedegaard R V., Frandsen H, Skibsted LH. Kinetics of formation of acrylamide and Schiff base intermediates from asparagine and glucose. *Food Chem* 2008, 108(3): 917–25.
36. Salazar R, Arámbula-Villa G, Luna-Bárceñas G, Figueroa-Cárdenas JD, Azuara E, Vázquez-Landaverde PA. Effect of added calcium hydroxide during corn nixtamalization on acrylamide content in tortilla chips. *LWT - Food Sci Technol* 2014, 56(1): 87–92.
37. Muttucumaru N, Elmore JS, Curtis T, Mottram DS, Parry MAJ, Halford NG. Reducing acrylamide precursors in raw materials derived from wheat and potato. *J Agric Food Chem* 2008, 56(15): 6167–72.
38. Torres JD, Dueik V, Carré D, Bouchon P. Effect of the Addition of Soluble Dietary Fiber and Green Tea Polyphenols on Acrylamide Formation and In Vitro Starch Digestibility in Baked Starchy Matrices. *Molecules* 2019, 24(20): 3674.
39. Martinez E, Rodriguez JA, Mondragon AC, Lorenzo JM, Santos EM. Influence of

- Potato Crisps Processing Parameters on Acrylamide Formation and Bioaccessibility. *Molecules* 2019, 24(21): 3827.
40. Rifai L, Saleh FA. A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies. *Int J Toxicol* 2020, 39(2): 93–102.
 41. Jing Y, Li X, Hu X, Ma Z, Liu L, Ma X. Effect of buckwheat extracts on acrylamide formation and the quality of bread. *J Sci Food Agric* 2019, 99(14): 6482–9.
 42. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002, 419(6906): 449–50.
 43. Michalak J, Czarnowska-Kujawska M, Gujska E. Acrylamide and Thermal-Processing Indexes in Market-Purchased Food. *Int J Environ Res Public Health* 2019, 16(23): 4724.
 44. Kocadağlı T, Gökmen V. Metabolism of Acrylamide in Humans and Biomarkers of Exposure to Acrylamide, Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects. *Acad Press* 2016, 1(6): 109–28.
 45. Miller MJ, Carter DE, Sipes IG. Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982, 63(1): 36–44.
 46. Kadry AM, Friedman MA, Abdel-Rahman MS. Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 1999, 7(2): 127–33.
 47. Doerge DR, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Churchwell MI. Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, 208(3): 199–209.
 48. Doerge DR, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Churchwell MI. Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, 202(3): 258–67.
 49. Bjellaas T, Ølstørn HBA, Becher G, Alexander J, Knutsen SH, Paulsen JE. Urinary metabolites as biomarkers of acrylamide exposure in mice following dietary crisp bread administration or subcutaneous injection. *Toxicol Sci* 2007, 100(2): 374–80.

50. Sörgel F, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, Landersdorfer C. Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy* 2002, 48(6): 267–74.
51. Boettcher MI, Bolt HM, Drexler H, Angerer J. Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Arch Toxicol* 2006, 80(2): 55–61.
52. Fennell TR, Sumner SCJ, Snyder RW, Burgess J, Friedman MA. Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicol Sci* 2006, 93(2): 256–67.
53. Kopp EK, Dekant W. Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009, 235(2): 135–42.
54. Settels E, Bernauer U, Palavinskas R, Klaffke HS, Gundert-Remy U, Appel KE. Human CYP2E1 mediates the formation of glycidamide from acrylamide. *Arch Toxicol* 2008, 82(10): 717–27.
55. Sumner SCJ, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol* 1999, 12(11): 1110–6.
56. Calleman CJ, Bergmark E, Costa LG. Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem Res Toxicol* 1990, 3(5): 406–12.
57. Sumner SCJ, MacNeela JP, Fennell TR. Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Res Toxicol* 1992, 5(1): 81–9.
58. Bandarra S, Fernandes AS, Magro I, Guerreiro PS, Pingarilho M, Churchwell MI, Gil OM, Batinić-Haberle I, Gonçalves S, Rueff J, Miranda JP, Marques MM, Beland FA, Castro M, Gaspar JF, Oliveira NG. Mechanistic insights into the cytotoxicity and genotoxicity induced by glycidamide in human mammary cells. *Mutagenesis* 2013, 28(6): 721–9.

59. Baum M, Fauth E, Fritzen S, Herrmann A, Mertes P, Merz K, Rudolphi M, Zankl H, Eisenbrand G. Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutat Res* 2005, 580(1–2): 61–9.
60. Hartmann EC, Boettcher MI, Schettgen T, Fromme H, Drexler H, Angerer J. Hemoglobin adducts and mercapturic acid excretion of acrylamide and glycidamide in one study population. *J Agric Food Chem* 2008, 56(15): 6061–8.
61. Ramu K, Fraiser LH, Ahmed T, Kehrer JP, Mamiya B. Acrolein mercapturates: synthesis, characterization, and assessment of their role in the bladder toxicity of cyclophosphamide. *Chem Res Toxicol* 1995, 8(4): 515–24.
62. Fennell TR, Friedman MA. Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Adv Exp Med Biol* 2005, 561(1): 109–16.
63. Fuhr U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, Taubert D, Tomalik-Scharte D, Pournara P, Jakob V, Harlfinger S, Klaassen T, Berkessel A, Angerer J, Sörgel F, Schömig E. Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, 15(2): 266–71.
64. Fennell TR, Sumner SCJ, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE, Friedman MA. Metabolism and Hemoglobin Adduct Formation of Acrylamide in Humans. *Toxicol Sci* 2005, 85(1): 447–59.
65. Doroshenko O, Fuhr U, Kunz D, Frank D, Kinzig M, Jetter A, Reith Y, Lazar A, Taubert D, Kirchheiner J, Baum M, Eisenbrand G, Berger FI, Bertow D, Berkessel A, Sörgel F, Schömig E, Tomalik-Scharte D. In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, 18(2): 433–43.
66. Hulaś-Stasiak M, Dobrowolski P, Tomaszewska E. Maternal Acrylamide and Effects on Offspring. *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects. Acad Press* 2016, 1(5): 93–107.
67. Fawcett L, Brent R. Pathogenesis of Abnormal Development, Developmental and Reproductive Toxicology. *CRC Press* 2011, 1(3): 870.
68. Hood R, Miller D. Maternally mediated effects on development. *CRC Press* 2012,

1(3): 870.

69. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002, 419(6906): 448–9.
70. Duarte-Salles T, von Stedingk H, Granum B, Gützkow KB, Rydberg P, Törnqvist M, Mendez MA, Brunborg G, Brantsæter AL, Meltzer HM, Alexander J, Haugen M. Dietary Acrylamide Intake during Pregnancy and Fetal Growth—Results from the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Environ Health Perspect* 2013, 121(3): 374.
71. Manson J, Brabec MJ, Buelke-Sam J, Carlson GP, Chapin RE, Favor JB, Fischer LJ, Hattis D, Lees PSJ, Perreault-Darney S, Rutledge J, Smith TJ, Tice RR, Working P, Shelby M. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of acrylamide. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2005, 74(1): 17–113.
72. Pedersen M, Von Stedingk H, Botsivali M, Agramunt S, Alexander J, Brunborg G, Chatzi L, Fleming S, Fthenou E, Granum B, Gutzkow KB, Hardie LJ, Knudsen LE, Kyrtopoulos SA, Mendez MA, Merlo DF, Nielsen JK, Rydberg P, Segerbäck D, Sunyer J, Wright J, Törnqvist M, Kleinjans JC, Kogevinas M. Birth weight, head circumference, and prenatal exposure to acrylamide from maternal diet: the European prospective mother-child study (NewGeneris). *Environ Health Perspect* 2012, 120(12): 1739–45.
73. Lindeman B, Johansson Y, Andreassen M, Husøy T, Dirven H, Hofer T, Knutsen HK, Caspersen IH, Vejrup K, Paulsen RE, Alexander J, Forsby A, Myhre O. Does the food processing contaminant acrylamide cause developmental neurotoxicity? A review and identification of knowledge gaps. *Reprod Toxicol* 2021, 101(1): 93–114.
74. Mulloy KB. Two case reports of neurological disease in coal mine preparation plant workers. *Am J Ind Med* 1996, 30(1): 56–61.
75. Kjuus H, Goffeng LO, Heier MS, Sjöholm H, Øvrebø S, Skaug V, Paulsson B, Törnqvist M, Brudal S. Effects on the peripheral nervous system of tunnel workers exposed to acrylamide and N-methylolacrylamide. *Scand J Work Environ Heal* 2004, 30(1): 21–9.

76. Liu ZM, Tse LA, Chen B, Wu S, Chan D, Kowk T, Woo J, Xiang YT, Wong SYS. Dietary acrylamide exposure was associated with mild cognition decline among non-smoking Chinese elderly men. *Sci Rep* 2017, 7(1): 1–7.
77. LoPachin RM, Lehning EJ. Acrylamide-induced distal axon degeneration: a proposed mechanism of action. *Neurotoxicology* 1994, 15(2): 247–59.
78. Burg R V, Penney DP, Conroy PJ. Acrylamide neurotoxicity in the mouse: a behavioral, electrophysiological and morphological study. *J Appl Toxicol* 1981, 1(4): 227–33.
79. Spencer PS, Schaumburg HH. Nervous system degeneration produced by acrylamide monomer. *Environ Health Perspect* 1975, 11(1): 129–33.
80. An L, Li G, Si J, Zhang C, Han X, Wang S, Jiang L, Xie K. Acrylamide Retards the Slow Axonal Transport of Neurofilaments in Rat Cultured Dorsal Root Ganglia Neurons and the Corresponding Mechanisms. *Neurochem Res* 2016, 41(5): 1000–9.
81. LoPachin RM, Barber DS, He D, Das S. Acrylamide inhibits dopamine uptake in rat striatal synaptic vesicles. *Toxicol Sci* 2006, 89(1): 224–34.
82. Mohr S, Stamler JS, Brüne B. Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents. *FEBS Lett* 1994, 348(3): 223–7.
83. L’Episcopo F, Drouin-Ouellet J, Tirolo C, Pulvirenti A, Giugno R, Testa N, Caniglia S, Serapide MF, Cisbani G, Barker RA, Cicchetti F, Marchetti B. GSK-3 β -induced Tau pathology drives hippocampal neuronal cell death in Huntington’s disease: involvement of astrocyte-neuron interactions. *Cell Death Dis* 2016, 7(4): 2206.
84. Yan D, Yao J, Liu Y, Zhang X, Wang Y, Chen X, Liu L, Shi N, Yan H. Tau hyperphosphorylation and P-CREB reduction are involved in acrylamide-induced spatial memory impairment: Suppression by curcumin. *Brain Behav Immun* 2018, 71(1): 66–80.
85. Murray SM, Waddell BM, Wu CW. Neuron-specific toxicity of chronic acrylamide exposure in *C. elegans*. *Neurotoxicol Teratol* 2020, 77(106848): 10.

86. Kopańska M, Łagowska A, Kuduk B, Banaś-Ząbczyk A. Acrylamide Neurotoxicity as a Possible Factor Responsible for Inflammation in the Cholinergic Nervous System. *Int J Mol Sci* 2022, 23(4): 2030.
87. Janoutová J, Šerý O, Hosák L, Janout V. Is Mild Cognitive Impairment a Precursor of Alzheimer's Disease? Short Review. *Cent Eur J Public Health* 2015, 23(4): 365–7.
88. Benedetto A, Au C, Avila DS, Milatovic D, Aschner M. Extracellular dopamine potentiates mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 2010, 6(8): e1001084.
89. Farouk SM, Gad FA, Almeer R, Abdel-Daim MM, Emam MA. Exploring the possible neuroprotective and antioxidant potency of lycopene against acrylamide-induced neurotoxicity in rats' brain. *Biomed Pharmacother* 2021, 138(111458): 1–12.
90. Cota P, Saha S, Tewari S, Sasikumar A, Saran MY, Senthilkumar S, Mohideen SS. Acrylamide: A Neurotoxin and a Hazardous Waste. *IntechOpen* 2022, 1(1): 20.
91. Guo J, Cao X, Hu X, Li S, Wang J. The anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin on acrylamide-induced neurotoxicity in rats. *BMC Pharmacol Toxicol* 2020, 21(1): 1–16.
92. Tabeshpour J, Mehri S, Abnous K, Hosseinzadeh H. Role of Oxidative Stress, MAPKinase and Apoptosis Pathways in the Protective Effects of Thymoquinone Against Acrylamide-Induced Central Nervous System Toxicity in Rat. *Neurochem Res* 2020, 45(2): 254–67.
93. Yousef MI, El-Demerdash FM. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology* 2006, 219(1–3): 133–41.
94. Pan X, Zhu L, Lu H, Wang D, Lu Q, Yan H. Melatonin Attenuates Oxidative Damage Induced by Acrylamide In Vitro and In Vivo. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 2015(703709): 12.
95. Lebda MA, Gad SB, Rashed RR. The effect of lipoic acid on acrylamide-induced neuropathy in rats with reference to biochemical, hematological, and behavioral

- alterations. *Pharm Biol* 2015, 53(8): 1207–13.
96. Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 2017, 360(1): 201–5.
 97. Mehri S, Meshki MA, Hosseinzadeh H. Linalool as a neuroprotective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 2015, 38(2): 162–6.
 98. Gur C, Kandemir FM, Darendelioglu E, Caglayan C, Kucukler S, Kandemir O, Ileriturk M. Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: an investigation into different signal pathways. *Environ Sci Pollut Res Int* 2021, 28(36): 49808–19.
 99. Evans HM, Scott Bishop K. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science* 1922, 56(1458): 650–1.
 100. Leonard SW, Paterson E, Atkinson JK, Ramakrishnan R, Cross CE, Traber MG. Studies in humans using deuterium-labeled α - and γ -tocopherols demonstrate faster plasma γ -tocopherol disappearance and greater γ -metabolite production. *Free Radic Biol Med* 2005, 38(7): 857–66.
 101. Traber MG, Sokol RJ, Kohlschutter A, Yokota T, Muller DPR, Dufour R, Kayden HJ. Impaired discrimination between stereoisomers of alpha-tocopherol in patients with familial isolated vitamin E deficiency. *J Lipid Res* 1993, 34(2): 201–10.
 102. Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. *Natl Acad Press* 2000, 1(1): 529.
 103. Mène-Saffrané L, DellaPenna D. Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiol Biochem* 2010, 48(5): 301–9.
 104. Netscher T. Synthesis of Vitamin E. *Vitam Horm* 2007, 76(1): 155–202.
 105. Li B, Pratt DA. Methods for determining the efficacy of radical-trapping antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2015, 82(1): 187–202.
 106. Burton GW, Ingold KU. Autoxidation of Biological Molecules. 1. The Antioxidant Activity of Vitamin E and Related Chain-Breaking Phenolic Antioxidants in Vitro.

- J Am Chem Soc* 1981, 103(21): 6472–7.
107. Leng X, Kinnun JJ, Marquardt D, Ghefli M, Kučerka N, Katsaras J, Atkinson J, Harroun TA, Feller SE, Wassall SR. α -Tocopherol Is Well Designed to Protect Polyunsaturated Phospholipids: MD Simulations. *Biophys J* 2015, 109(8): 1608–18.
 108. Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med* 2011, 51(5): 1000–13.
 109. Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med* 2020, 152(1): 175–85.
 110. Traber MG, Head B. Vitamin E: How much is enough, too much and why! *Free Radic Biol Med* 2021, 177(1): 212–25.
 111. Lisa S, Marc B, Stefan L, Maria W. Complexity of vitamin E metabolism. *World J Biol Chem* 2016, 7(1): 14.
 112. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, Nakagawa K, Miyazawa T. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life* 2019, 71(4): 430–41.
 113. Fattoretti P, Malavolta M, Fabbietti P, Papa R, Giacconi R, Costarelli L, Galeazzi R, Paoloni C, Postacchini D, Lattanzio F, Giuli C. Oxidative Stress in Elderly with Different Cognitive Status: My Mind Project. *J Alzheimers Dis* 2018, 63(4): 1405–14.
 114. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell* 2019, 18(6): e13031.
 115. Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic Biol Med* 1991, 10(5): 263–75.
 116. Rehman SU, Ali T, Alam SI, Ullah R, Zeb A, Lee KW, Rutten BPF, Kim MO. Ferulic Acid Rescues LPS-Induced Neurotoxicity via Modulation of the TLR4 Receptor in the Mouse Hippocampus. *Mol Neurobiol* 2019, 56(4): 2774–90.
 117. Nishimura Y, Kanda Y, Sone H, Aoyama H. Oxidative Stress as a Common Key Event in Developmental Neurotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* 2021,

2021(6685204): 10.

118. Sen CK, Khanna S, Roy S, Packer L. Molecular basis of vitamin E action. Tocotrienol potently inhibits glutamate-induced pp60(c-Src) kinase activation and death of HT4 neuronal cells. *J Biol Chem* 2000, 275(17): 13049–55.
119. Khanna S, Roy S, Ryu H, Bahadduri P, Swaan PW, Ratan RR, Sen CK. Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* 2003, 278(44): 43508–15.
120. Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Wilson RS, Aggarwal NT, Scherr PA. Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change. *Am J Clin Nutr* 2005, 81(2): 508–14.
121. Farina N, Llewellyn D, Isaac MGEKN, Tabet N. Vitamin E for Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment. *Cochrane database Syst Rev* 2017, 4(4): 28–54.
122. Schirinzi T, Martella G, Imbriani P, Di Lazzaro G, Franco D, Colona VL, Alwardat M, Salimei PS, Mercuri NB, Pierantozzi M, Pisani A. Dietary Vitamin E as a Protective Factor for Parkinson's Disease: Clinical and Experimental Evidence. *Front Neurol* 2019, 10(148): 1–7.
123. Taghizadeh M, Tamtaji OR, Dadgostar E, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Abolhassani J, Aarabi MH, Kouchaki E, Memarzadeh MR, Asemi Z. The effects of omega-3 fatty acids and vitamin E co-supplementation on clinical and metabolic status in patients with Parkinson's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurochem Int* 2017, 108(1): 183–9.
124. Peyser CE, Folstein M, Chase GA, Starkstein S, Brandt J, Cockrell JR, Bylsma F, Coyle JT, McHugh PR, Folstein SE. Trial of d-alpha-tocopherol in Huntington's disease. *Am J Psychiatry* 1995, 152(12): 1771–5.
125. Regner-Nelke L, Nelke C, Schroeter CB, Dziewas R, Warnecke T, Ruck T, Meuth SG. Enjoy Carefully: The Multifaceted Role of Vitamin E in Neuro-Nutrition. *Int J Mol Sci* 2021, 22(18): 10087.
126. Miron VE, Franklin RJM. Macrophages and CNS remyelination. *J Neurochem* 2014, 130(2): 165–71.

127. Osorio-Querejeta I, Alberro A, Muñoz-Culla M, Mäger I, Otaegui D. Therapeutic potential of extracellular vesicles for demyelinating diseases; Challenges and opportunities. *Front Mol Neurosci* 2018, 11(434): 1–8.
128. Sahel A, Ortiz FC, Kerninon C, Maldonado PP, Angulo MC, Nait-Oumesmar B. Alteration of synaptic connectivity of oligodendrocyte precursor cells following demyelination. *Front Cell Neurosci* 2015, 9(77): 1–12.
129. Miron VE, Kuhlmann T, Antel Jack P. JP. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2011, 1812(2): 184–93.
130. Rosetti CM, Maggio B, Oliveira RG. The self-organization of lipids and proteins of myelin at the membrane interface. Molecular factors underlying the microheterogeneity of domain segregation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2008, 1778(7–8): 1665–75.
131. Norton WT, Autilio LA. The lipid composition of purified bovine brain myelin. *J Neurochem* 1966, 13(4): 213–22.
132. Xu L, Anchordoquy TJ. Cholesterol domains in cationic lipid/DNA complexes improve transfection. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1778(10): 2177–81.
133. Wheeler D, Bandaru VVR, Calabresi PA, Nath A, Haughey NJ. A defect of sphingolipid metabolism modifies the properties of normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 2008, 131(11): 3092–102.
134. Podbielska M, Hogan EL. Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis? *Mult Scler* 2009, 15(9): 1011–29.
135. Pérez-Cerdá F, Sánchez-Gómez MV, Matute C. Pío del Río horteiga and the discovery of the oligodendrocytes. *Front Neuroanat* 2015, 9(92): 1–6.
136. Hardy R, Reynolds R. Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development* 1991, 111(4): 1061–80.
137. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 1952, 96(3): 415–95.

138. Nornes HO, Das GD. Temporal pattern of neurogenesis in spinal cord of rat. I. An autoradiographic study - time and sites of origin and migration and settling patterns of neuroblasts. *Brain Res* 1974, 73(1): 121–38.
139. Ginhoux F, Prinz M. Origin of microglia: Current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015, 7(8): a020537.
140. Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L, Zalc B. Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J Neurosci* 1995, 15(2): 1012–24.
141. Warf BC, Fok-Seang J, Miller RH. Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1991, 11(8): 2477–88.
142. Vallstedt A, Klos JM, Ericson J. Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* 2005, 45(1): 55–67.
143. Fogarty M, Richardson WD, Kessaris N. A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development* 2005, 132(8): 1951–9.
144. Davis AA, Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 1994, 372(6503): 263–6.
145. Rogister B, Ben-Hur T, Dubois-Dalcq M. From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 1999, 14(4–5): 287–300.
146. Hajihosseini M, Tham TN, Dubois-Dalcq M. Origin of oligodendrocytes within the human spinal cord. *J Neurosci* 1996, 16(24): 7981–94.
147. Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 2006, 9(2): 173–9.
148. Tripathi RB, Clarke LE, Burzomato V, Kessaris N, Anderson PN, Attwell D, Richardson WD. Dorsally and ventrally derived oligodendrocytes have similar electrical properties but myelinate preferred tracts. *J Neurosci* 2011, 31(18): 6809–19.
149. Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M, Qiu M. Generation of

- oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron* 2005, 45(1): 41–53.
150. Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992, 70(1): 31–46.
 151. Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W. Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol* 1997, 137(2): 459–68.
 152. Barres BA, Raff MC. Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* 1999, 147(6): 1123–8.
 153. Orduz D, Benamer N, Ortolani D, Coppola E, Vigier L, Pierani A, Angulo MC. Developmental cell death regulates lineage-related interneuron-oligodendroglia functional clusters and oligodendrocyte homeostasis. *Nat Commun* 2019, 10(1): 4249.
 154. Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisén J. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 2010, 7(4): 470–82.
 155. Inta D, Alfonso J, Von Engelhardt J, Kreuzberg MM, Meyer AH, Van Hooft JA, Monyer H. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(52): 20994–9.
 156. Tiane A, Schepers M, Rombaut B, Hupperts R, Prickaerts J, Hellings N, van den Hove D, Vanmierlo T. From OPC to Oligodendrocyte: An Epigenetic Journey. *Cells* 2019, 8(10): 1236.
 157. Hughes EG, Orthmann-Murphy JL, Langseth AJ, Bergles DE. Myelin remodeling through experience-dependent oligodendrogenesis in the adult somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 2018, 21(5): 696–706.
 158. Gibson EM, Purger D, Mount CW, Goldstein AK, Lin GL, Wood LS, Inema I, Miller SE, Bieri G, Zuchero JB, Barres BA, Woo PJ, Vogel H, Monje M. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian

- brain. *Science* 2014, 344(6183): 1252304.
159. Mitew S, Gobius I, Fenlon LR, McDougall SJ, Hawkes D, Xing YL, Bujalka H, Gundlach AL, Richards LJ, Kilpatrick TJ, Merson TD, Emery B. Pharmacogenetic stimulation of neuronal activity increases myelination in an axon-specific manner. *Nat Commun* 2018, 9(1): 306.
 160. Dawson MRL, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: An abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 2003, 24(2): 476–88.
 161. Hill RA, Patel KD, Medved J, Reiss AM, Nishiyama A. NG2 cells in white matter but not gray matter proliferate in response to PDGF. *J Neurosci* 2013, 33(36): 14558–66.
 162. Lentferink DH, Jongsma JM, Werkman I, Baron W. Grey matter OPCs are less mature and less sensitive to IFN γ than white matter OPCs: Consequences for remyelination. *Sci Rep* 2018, 8(2113): 1–15.
 163. Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Götz M. Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 2008, 28(41): 10434–42.
 164. Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE. NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 2010, 68(4): 668–81.
 165. Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessaris N, Richardson WD. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 2008, 11(12): 1392–401.
 166. Hughes EG, Kang SH, Fukaya M, Bergles DE. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci* 2013, 16(6): 668–76.
 167. Lachapelle F, Gumpel M, Baulac M, Jacque C, Due P, Baumann N. Transplantation of CNS fragments into the brain of shiverer mutant mice: Extensive myelination by implanted oligodendrocytes: I. Immunohistochemical studies. *Dev Neurosci* 1983, 6(6): 325–34.

168. Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, Tien AC, Kuo CJ, Chan JR, Daneman R, Fancy SPJ. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 2016, 351(6271): 379–84.
169. Niu J, Tsai HH, Hoi KK, Huang N, Yu G, Kim K, Baranzini SE, Xiao L, Chan JR, Fancy SPJ. Aberrant oligodendroglial–vascular interactions disrupt the blood–brain barrier, triggering CNS inflammation. *Nat Neurosci* 2019, 22(5): 709–18.
170. Miller RH, Payne J, Milner L, Zhang H, Orentas DM. Spinal cord oligodendrocytes develop from a limited number of migratory, highly proliferative precursors. *J Neurosci Res* 1997, 50(2): 157–68.
171. Fok-Seang J, Miller RH. Distribution and differentiation of A2B5+ glial precursors in the developing rat spinal cord. *J Neurosci Res* 1994, 37(2): 219–35.
172. Raff MC, Abney ER, Miller RH. Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve. *Dev Biol* 1984, 106(1): 53–60.
173. Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M. Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 1988, 335(6185): 70–3.
174. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 2019, 8(11): 1424.
175. Pringle NP, Richardson WD. A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* 1993, 117(2): 525–33.
176. Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 1988, 333(6173): 560–2.
177. Yeh HJ, Ruit KG, Wang YX, Parks WC, Snider WD, Deuel TF. PDGF A-chain gene is expressed by mammalian neurons during development and in maturity. *Cell* 1991, 64(1): 209–16.
178. Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD. Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 1998,

- 20(5): 869–82.
179. Sommer I, Schachner M. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: An immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 1981, 83(2): 311–27.
 180. Braun PE, Sandillon F, Edwards A, Matthieu JM, Privat A. Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *J Neurosci* 1988, 8(8): 3057–66.
 181. Scherer SS, Braun PE, Grinspan J, Collarini E, Wang D y., Kamholz J. Differential regulation of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development. *Neuron* 1994, 12(6): 1363–75.
 182. Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat* 2009, 3(5): 1–15.
 183. Barbarese E, Barry C, Chou CJ, Goldstein DJ, Nakos GA, Hyde-DeRuyscher R, Scheld K, Carson JH. Expression and Localization of Myelin Basic Protein in Oligodendrocytes and Transfected Fibroblasts. *J Neurochem* 1988, 51(6): 1737–45.
 184. Brunner C, Lassmann H, Waehneltd T V., Matthieu J -M, Linnington C. Differential Ultrastructural Localization of Myelin Basic Protein, Myelin/Oligodendroglial Glycoprotein, and 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase in the CNS of Adult Rats. *J Neurochem* 1989, 52(1): 296–304.
 185. Linnington C, Webb M, Woodhams PL. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol* 1984, 6(6): 387–96.
 186. Michalski JP, Anderson C, Beauvais A, de Repentigny Y, Kothary R. The proteolipid protein promoter drives expression outside of the oligodendrocyte lineage during embryonic and early postnatal development. *PLoS One* 2011, 6(5): e19772.
 187. Trapp BD. Myelin-Associated Glycoprotein Location and Potential Functions. *Ann N Y Acad Sci* 1990, 605(1): 29–43.

188. Raff MC, Mirsky R, Fields KL, Lisak RP, Dorfman SH, Silberberg DH, Gregson NA, Leibowitz S, Kennedy MC. Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. *Nature* 1978, 274(5673): 813–6.
189. Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, Lazzarini RA. Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 1986, 102(2): 384–92.
190. Harlow DE, Saul KE, Culp CM, Vesely EM, Macklin WB. Expression of proteolipid protein gene in spinal cord stem cells and early oligodendrocyte progenitor cells is dispensable for normal cell migration and myelination. *J Neurosci* 2014, 34(4): 1333–43.
191. Zhou Q, Wang S, Anderson DJ. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 2000, 25(2): 331–43.
192. Zhou Q, Anderson DJ. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 2002, 109(1): 61–73.
193. Rowitch DH. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* 2004, 5(5): 409–19.
194. Wegener A, Deboux C, Bachelin C, Frah M, Kerninon C, Seilhean D, Weider M, Wegner M, Nait-Oumesmar B. Gain of Olig2 function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination. *Brain* 2015, 138(1): 120–35.
195. Xin M, Yue T, Ma Z, Wu FF, Gow A, Lu QR. Myelinogenesis and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in Olig1-null mice. *J Neurosci* 2005, 25(6): 1354–65.
196. Dai J, Bercery KK, Ahrendsen JT, Macklin WB. Olig1 function is required for oligodendrocyte differentiation in the mouse brain. *J Neurosci* 2015, 35(10): 4386–402.
197. Arnett HA, Fancy SPJ, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJM, Stiles CD. bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science* 2004, 306(5704): 2111–5.

198. Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 1998, 18(1): 237–50.
199. Pozniak CD, Langseth AJ, Dijkgraaf GJP, Choe Y, Werb Z, Pleasure SJ. Sox10 directs neural stem cells toward the oligodendrocyte lineage by decreasing Suppressor of Fused expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(50): 21795–800.
200. Claus Stolt C, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U, Wegner M. Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* 2002, 16(2): 165–70.
201. Stolt CC, Lommes P, Friedrich RP, Wegner M. Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development* 2004, 131(10): 2349–58.
202. Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J, Fu H, Rao M, Sussel L, Rubenstein J, Qiu M. Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* 2001, 128(14): 2723–33.
203. Zhu Q, Zhao X, Zheng K, Li H, Huang H, Zhang Z, Mastracci T, Wegner M, Chen Y, Sussel L, Qiu M. Genetic evidence that Nkx2.2 and Pdgfra are major determinants of the timing of oligodendrocyte differentiation in the developing CNS. *Dev* 2014, 141(3): 548–55.
204. Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 2008, 135(1): 145–57.
205. Woodhoo A, Sommer L. Development of the schwann cell lineage: From the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* 2008, 56(14): 1481–90.
206. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 2005, 6(9): 671–82.
207. Salzer JL. Schwann cell myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015, 7(8): a020529.
208. Harty BL, Coelho F, Pease-Raissi SE, Mogha A, Ackerman SD, Herbert AL, Gereau RW, Golden JP, Lyons DA, Chan JR, Monk KR. Myelinating Schwann

- cells ensheath multiple axons in the absence of E3 ligase component Fbxw7. *Nat Commun* 2019, 10(1): 2976.
209. Kucenas S, Wang W Der, Knapik EW, Appel B. A selective glial barrier at motor axon exit points prevents oligodendrocyte migration from the spinal cord. *J Neurosci* 2009, 29(48): 15187–94.
210. Smith CJ, Morris AD, Welsh TG, Kucenas S. Contact-Mediated Inhibition Between Oligodendrocyte Progenitor Cells and Motor Exit Point Glia Establishes the Spinal Cord Transition Zone. *PLoS Biol* 2014, 12(9): e1001961.
211. Fontenas L, Welsh TG, Piller M, Coughenour P, Gandhi A V., Prober DA, Kucenas S. The Neuromodulator Adenosine Regulates Oligodendrocyte Migration at Motor Exit Point Transition Zones. *Cell Rep* 2019, 27(1): 115-128.e5.
212. Jack R. A brief history of myelinated nerve fibers: one hundred and fifty years of controversy. *J Neurocytol* 1999, 28(4–5): 251–62.
213. Nave KA. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 2010, 468(7321): 244–52.
214. Klaus-Armin N, Hauke B. W. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014, 30(1): 503–33.
215. Kirby BB, Norio T, Andrew J L, Jimann S, Thomas J C, Robert N K, Bruce A. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci* 2006, 9(12): 1506–11.
216. Mikael S, Jacqueline T. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* 2007, 17(5): 533–40.
217. Betty Ben G, Francis S. The Structure of the Schwann Cell and Its Relation to the Axon in Certain Invertebrate Nerve Fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1954, 40(9): 863–70.
218. Bettina S, Urs Z, Andres K, Burkhard B, Norbert G. CNS live imaging reveals a new mechanism of myelination: the liquid croissant model. *Glia* 2011, 59(12): 1841–9.
219. Nicolas S, Möbius W, Czopka T, Hekking LHP, Mathisen C, Verkleij D, Goebbels

- S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA, Nave KA, Simons M. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P₃-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 2014, 156(1–2): 277–90.
220. Seonok L, Michelle K L, Stephanie A R, Christin C, Synthia H M, Samuel J T, Zhang-Qi F, Joseph M C, Jonah R C. A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nat Methods* 2012, 9(9): 917–22.
221. Sánchez I, Hassinger L, Ram K. S, Don C, Panaiyur M, Ralph A. N. Local control of neurofilament accumulation during radial growth of myelinating axons in vivo. Selective role of site-specific phosphorylation. *J Cell Biol* 2000, 151(5): 1013–24.
222. Klaus-Armin N, James L S. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 2006, 16(5): 492–500.
223. Marion B, Sigrid K, David A. L. Ca²⁺ activity signatures of myelin sheath formation and growth in vivo. *Nat Neurosci* 2018, 21(1): 19–25.
224. Wolswijk G, Balesar R. Changes in the expression and localization of the paranodal protein Caspr on axons in chronic multiple sclerosis. *Brain* 2003, 126(7): 1638–49.
225. Coman I, Aigrot MS, Seilhean D, Reynolds R, Girault JA, Zalc B, Lubetzki C. Nodal, paranodal and juxtaparanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain* 2006, 129(12): 3186–95.
226. Howell OW, Palser A, Polito A, Melrose S, Zonta B, Scheiermann C, Vora AJ, Brophy PJ, Reynolds R. Disruption of neurofascin localization reveals early changes preceding demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain* 2006, 129(12): 3173–85.
227. Podbielska M, Banik NL, Kurowska E, Hogan EL. Myelin Recovery in Multiple Sclerosis: The Challenge of Remyelination. *Brain Sci* 2013, 3(3): 1282.
228. Vickers JC, King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MT, Staal JA, McCormack GH, Blizzard CA, Musgrove REJ, Mitew S, Liu Y, Chuckowree JA, Bibari O, Dickson TC. Axonopathy and cytoskeletal disruption in degenerative diseases of the central nervous system. *Brain Res Bull* 2009, 80(4–5): 217–23.

229. Aharoni R, Arnon R, Eilam R. Neurogenesis and neuroprotection induced by peripheral immunomodulatory treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 2005, 25(36): 8217–28.
230. Liebetanz D, Merkler D. Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2006, 202(1): 217–24.
231. Raine CS, Wu E. Multiple Sclerosis: Remyelination in Acute Lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993, 52(3): 199–204.
232. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho E -S. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 1993, 33(2): 137–51.
233. Hagemeyer K, Brück W, Kuhlmann T. Multiple sclerosis - remyelination failure as a cause of disease progression. *Histol Histopathol* 2012, 27(3): 277–87.
234. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 2006, 129(12): 3165–72.
235. Redford EJ, Smith KJ, Gregson NA, Davies M, Hughes P, Gearing AJH, Miller K, Hughes RAC. A combined inhibitor of matrix metalloproteinase activity and tumour necrosis factor-alpha processing attenuates experimental autoimmune neuritis. *Brain* 1997, 120(10): 1895–905.
236. Lobsiger CS, Smith PM, Buchstaller J, Schweitzer B, Franklin RJM, Suter U, Taylor V. A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. *Glia* 2001, 36(1): 48–57.
237. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2018, 378(2): 169–80.
238. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018,

- 17(2): 162–73.
239. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L, Rovira A, Sastre-Garriga J, Tintorè M, Frederiksen JL, Gasperini C, Palace J, Reich DS, Banwell B, Montalban X, Barkhof F. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol* 2016, 15(3): 292–303.
 240. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014, 83(3): 278–86.
 241. Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol* 2016, 36(2): 103–14.
 242. Baranzini SE, Oksenberg JR. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends Genet* 2017, 33(12): 960–70.
 243. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the central nervous system: Structure, function, and pathology. *Physiol Rev* 2019, 99(3): 1381–431.
 244. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol* 2015, 14(3): 263–73.
 245. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 2010, 9(5): 520–32.
 246. Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, Butovsky O, Weiner HL, Lassmann H. Loss of “homeostatic” microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain* 2017, 140(7): 1900–13.
 247. Schirmer L, Antel JP, Brück W, Stadelmann C. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2011, 21(4): 428–40.

248. Périer O, Grégoire A. Electron microscopic features of multiple sclerosis lesions. *Brain* 1965, 88(5): 937–52.
249. Cuzner ML, Norton WT. Biochemistry of demyelination. *Brain Pathol* 1996, 6(3): 231–42.
250. Staugaitis SM, Trapp BD. Diseases Involving Myelin, *Basic Neurochemistry. Elsevier Public Heal Emerg Collect* 2012, 39(2012): 691–704.
251. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 2008, 31(1): 247–69.
252. Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2009, 8(3): 280–91.
253. Exon JH. A review of the toxicology of acrylamide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2006, 9(5): 397–412.
254. LoPachin RM. The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2004, 25(4): 617–30.
255. LoPachin RM, Gavin T, DeCaprio A, Barber DS. Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) theory to toxicant--target interactions. *Chem Res Toxicol* 2012, 25(2): 239–51.
256. Zamani E, Shokrzadeh M, Ziar A, Abedian-Kenari S, Shaki F. Acrylamide attenuated immune tissues' function via induction of apoptosis and oxidative stress: Protection by l-carnitine. *Hum Exp Toxicol* 2018, 37(8): 859–69.
257. National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of acrylamide (CASRN 79-06-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed and drinking water studies). *Natl Toxicol Progr Tech Rep Ser* 2012, 575(1): 1–234.
258. El-Sayyad HI, El-Gammal HL, Habak LA, Abdel-Galil HM, Fernando A, Gaur RL, Ouhtit A. Structural and ultrastructural evidence of neurotoxic effects of fried potato chips on rat postnatal development. *Nutrition* 2011, 27(10): 1066–75.
259. Tyl RW, Friedman MA. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod Toxicol* 2003, 17(1): 1–13.
260. Friedman MA, Tylb RW, Marr MC, Myers CB, Gerling FS, Ross WP. Effects of

- lactational administration of acrylamide on rat dams and offspring. *Reprod Toxicol* 1999, 13(6): 511–20.
261. Lynch MA. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev* 2004, 84(1): 87–136.
262. Zhang B, Shao H, Wang XH, Chen X, Li ZS, Cao P, Zhu D, Yang YG, Xiao JW, Li B. Acrylamide-induced Subacute Neurotoxic Effects on the Cerebral Cortex and Cerebellum at the Synapse Level in Rats. *Biomed Environ Sci* 2017, 30(6): 432–43.
263. Sailor KA, Schinder AF, Lledo PM. Adult neurogenesis beyond the niche: its potential for driving brain plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2017, 42(1): 111–7.
264. Toyama BH, Savas JN, Park SK, Harris MS, Ingolia NT, Yates JR, Hetzer MW. Identification of long-lived proteins reveals exceptional stability of essential cellular structures. *Cell* 2013, 154(5).
265. Raasakka A, Ruskamo S, Kowal J, Barker R, Baumann A, Martel A, Tuusa J, Myllykoski M, Bürck J, Ulrich AS, Stahlberg H, Kursula P. Membrane Association Landscape of Myelin Basic Protein Portrays Formation of the Myelin Major Dense Line. *Sci Rep* 2017, 7(1).
266. Fulton D, Paez PM, Campagnoni AT. The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte. *ASN Neuro* 2010, 2(1): 25–37.
267. Martinsen V, Kursula P. Multiple sclerosis and myelin basic protein: insights into protein disorder and disease. *Amino Acids* 2022, 54(1): 99.
268. Majava V, Wang C, Myllykoski M, Kangas SM, Kang SU, Hayashi N, Baumgärtel P, Heape AM, Lubec G, Kursula P. Structural analysis of the complex between calmodulin and full-length myelin basic protein, an intrinsically disordered molecule. *Amino Acids* 2010, 39(1): 59–71.
269. Wang C, Neugebauer U, Bürck J, Myllykoski M, Baumgärtel P, Popp J, Kursula P. Charge isomers of myelin basic protein: structure and interactions with membranes, nucleotide analogues, and calmodulin. *PLoS One* 2011, 6(5).
270. Roth GA, Gonzalez MD, Monferran CG, De Santis ML, Cumar FA. Myelin basic protein domains involved in the interaction with actin. *Neurochem Int* 1993, 23(5):

459–65.

271. Boggs JM, Rangaraj G, Heng YM, Liu Y, Harauz G. Myelin basic protein binds microtubules to a membrane surface and to actin filaments in vitro: effect of phosphorylation and deimination. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1808(3): 761–73.
272. Snaidero N, Velte C, Myllykoski M, Raasakka A, Ignatev A, Werner HB, Erwig MS, Möbius W, Kursula P, Nave KA, Simons M. Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin. *Cell Rep* 2017, 18(2): 314–23.
273. Chan K -F J, Robb ND, Chen WH. Myelin basic protein: interaction with calmodulin and gangliosides. *J Neurosci Res* 1990, 25(4): 535–44.
274. Sedigheh S, Morteza A, Mahmood AT, Mohammad H sharifabad. The Effects of Vitamin E on the Liver Integrity of Mice Fed with Acrylamide Diet. *Iran J Pathol* 2014, 9(2): 89–98.
275. Venkata Subbaiah KC, Valluru L, Rajendra W, Ramamurthy C, Thirunavukkarasu C, Subramanyam R. Newcastle disease virus (NDV) induces protein oxidation and nitration in brain and liver of chicken: Ameliorative effect of vitamin E. *Int J Biochem Cell Biol* 2015, 64(1): 97–106.
276. Lindner M, Heine S, Haastert K, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Grothe C, Baumgärtner W, Stangel M. Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008, 34(1): 105–14.
277. Müller C, Bauer N, Schäfer I, White R. Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation. *Front Cell Neurosci* 2013, 7(1): 1–14.
278. Katsavos S, Anagnostouli M. Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview. *Mult Scler Int* 2013, 2013(1): 1–20.
279. Zavialova MG, Shevchenko VE, Nikolaev EN, Zgoda VG. Is myelin basic protein a potential biomarker of brain cancer? *Eur J mass Spectrom* 2017, 23(4): 192–6.
280. Lamers KJB, De Reus HPM, Jongen PJH. Myelin basic protein in CSF as indicator of disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998, 4(3): 124–6.

281. Sellebjerg F, Christiansen M, Garred P. MBP, anti-MBP and anti-PLP antibodies, and intrathecal complement activation in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998, 4(3): 127–31.
282. Wood DD, Bilbao JM, O’Connors P, Moscarello MA. Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann Neurol* 1996, 40(1): 18–24.
283. Yu H, Wu M, Lu G, Cao T, Chen N, Zhang Y, Jiang Z, Fan H, Yao R. Prednisone alleviates demyelination through regulation of the NLRP3 inflammasome in a C57BL/6 mouse model of cuprizone-induced demyelination. *Brain Res* 2018, 1678(1): 75–84.
284. Yu Q, Hui R, Park J, Huang Y, Kusnecov AW, Dreyfus CF, Zhou R. Strain differences in cuprizone induced demyelination. *Cell Biosci* 2017, 7(59): 1–11.
285. Ohgomori T, Jinno S. Cuprizone-induced demyelination in the mouse hippocampus is alleviated by phytoestrogen genistein. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019, 363(1): 98–110.
286. Takanashi JI, Saito S, Aoki I, Barkovich AJ, Ito Y, Inoue K. Increased N-acetylaspartate in model mouse of pelizaeus-merzbacher disease. *J Magn Reson Imaging* 2012, 35(2): 418–25.
287. Takanashi JI, Nitta N, Iwasaki N, Saito S, Tanaka R, Barkovich AJ, Aoki I. Neurochemistry in shiverer mouse depicted on MR spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 2014, 39(6): 1550–7.
288. Rasband MN, Macklin WB. Myelin Structure and Biochemistry, Basic Neurochemistry. *Acad Press* 2011, 8(1): 180–99.
289. Pronker MF, Lemstra S, Snijder J, Heck AJR, Thies-Weesie DME, Pasterkamp RJ, Janssen BJC. Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling. *Nat Commun* 2016, 7(1): 1–13.
290. Jahngir MU, Govindarajan R. Acute Autonomic Symptoms with Anti-myelin-associated Glycoprotein Neuropathy as a Presentation of Small B Cell Lymphoma: A Case Report and Literature Review. *Cureus* 2018, 10(8): 3105.
291. Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J*

- Neurochem* 2007, 100(6): 1431–48.
292. Quarles RH. Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59(11): 1851–71.
 293. Ambrosius W, Michalak S, Kozubski W, Kalinowska A. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Disease: Current Insights into the Disease Pathophysiology, Diagnosis and Management. *Int J Mol Sci* 2021, 22(1): 1–16.
 294. Harauz G, Ladizhansky V, Boggs JM. Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry* 2009, 48(34): 8094–104.
 295. Menon KK, Piddlesden SJ, Bernard CCA. Demyelinating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein and galactocerebroside induce degradation of myelin basic protein in isolated human myelin. *J Neurochem* 1997, 69(1): 214–22.
 296. Bernard CCA, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 1997, 75(2): 77–88.
 297. Gardinier M V., Amiguet P, Linington C, Matthieu J -M. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res* 1992, 33(1): 177–87.
 298. Linington C, Engelhardt B, Kapocs G, Lassman H. Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. *J Neuroimmunol* 1992, 40(2–3): 219–24.
 299. Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 1988, 130(3): 443.
 300. Lassmann H, Linington C. The Role of Antibodies Against Myelin Surface Antigens in Demyelination in Chronic EAE. *A Multidiscip Approach to Myelin Dis* 1987, 142(1): 219–25.
 301. Jarius S, Metz I, König FB, Ruprecht K, Reindl M, Paul F, Brück W, Wildemann B. Screening for MOG-IgG and 27 other anti-glia and anti-neuronal

- autoantibodies in “pattern II multiple sclerosis” and brain biopsy findings in a MOG-IgG-positive case. *Mult Scler* 2016, 22(12): 1541–9.
302. Chao M V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4(4): 299–309.
303. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001, 24(1): 677–736.
304. Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao M V., Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer’s disease. *Nat Med* 2009, 15(3): 331–7.
305. Fletcher JL, Murray SS, Xiao J. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Central Nervous System Myelination: A New Mechanism to Promote Myelin Plasticity and Repair. *Int J Mol Sci* 2018, 19(4131): 1–16.
306. KhorshidAhmad T, Acosta C, Cortes C, Lakowski TM, Gangadaran S, Namaka M. Transcriptional Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) by Methyl CpG Binding Protein 2 (MeCP2): a Novel Mechanism for Re-Myelination and/or Myelin Repair Involved in the Treatment of Multiple Sclerosis (MS). *Mol Neurobiol* 2015 532 2015, 53(2): 1092–107.
307. Keita M, Magy L, Heape A, Richard L, Piasser M, Vallat JM. Immunocytological studies of L-MAG expression regulation during myelination of embryonic brain cell cocultures. *Dev Neurosci* 2002, 24(6): 495–503.
308. Djalali S, Hölting M, Große G, Rothe T, Stroh T, Große J, Deng DR, Hellweg R, Grantyn R, Hörtnagl H, Ahnert-Hilger G. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *J Neurochem* 2005, 92(3): 616–27.
309. Xiao J, Wong AW, Willingham MM, Van Den Buuse M, Kilpatrick TJ, Murray SS. Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes. *Neurosignals* 2010, 18(3): 186–202.

310. Cellierino A, Carroll P, Thoenen H, Barde YA. Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* 1997, 9(5–6): 397–408.
311. Lee DH, Geyer E, Flach AC, Jung K, Gold R, Flügel A, Linker RA, Lühder F. Central nervous system rather than immune cell-derived BDNF mediates axonal protective effects early in autoimmune demyelination. *Acta Neuropathol* 2012, 123(2): 247–58.
312. Du Y, Lercher LD, Zhou R, Dreyfus CF. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates effects of brain-derived neurotrophic factor on differentiation of basal forebrain oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 2006, 84(8): 1692–702.
313. Nakajima H, Uchida K, Yayama T, Kobayashi S, Guerrero AR, Furukawa S, Baba H. Targeted retrograde gene delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010, 35(5): 497–504.
314. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WEF, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999, 189(5): 865–70.
315. Caggiula M, Batocchi AP, Frisullo G, Angelucci F, Patanella AK, Sancricca C, Nociti V, Tonali PA, Mirabella M. Neurotrophic factors in relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients during interferon beta therapy. *Clin Immunol* 2006, 118(1): 77–82.
316. Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, Miler A, Karni A. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: reversal by glatiramer acetate. *J Neuroimmunol* 2005, 167(1–2): 215–8.
317. Azoulay D, Urshansky N, Karni A. Low and dysregulated BDNF secretion from immune cells of MS patients is related to reduced neuroprotection. *J Neuroimmunol* 2008, 195(1–2): 186–93.
318. De Santi L, Annunziata P, Sessa E, Bramanti P. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptor in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple

- sclerosis. *J Neurol Sci* 2009, 287(1–2): 17–26.
319. Makar TK, Bever CT, Singh IS, Royal W, Sahu SN, Sura TP, Sultana S, Sura KT, Patel N, Dhib-Jalbut S, Trisler D. Brain-derived neurotrophic factor gene delivery in an animal model of multiple sclerosis using bone marrow stem cells as a vehicle. *J Neuroimmunol* 2009, 210(1–2): 40–51.
320. Ramos-Cejudo J, Gutiérrez-Fernández M, Otero-Ortega L, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Vallejo-Cremades MT, Hernanz TN, Cerdán S, Díez-Tejedor E. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke. *Stroke* 2015, 46(1): 221–8.
321. McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci* 1998, 18(14): 5354–65.
322. Attoff K, Johansson Y, Cediél-Ulloa A, Lundqvist J, Gupta R, Caiment F, Gliga A, Forsby A. Acrylamide alters CREB and retinoic acid signalling pathways during differentiation of the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Sci Rep* 2020, 10(16714): 1–15.
323. Awad AS. Effect of combined treatment with curcumin and candesartan on ischemic brain damage in mice. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2011, 20(6): 541–8.
324. Haghnejad Azar A, Oryan S, Bohlooli S, Panahpour H. Alpha-Tocopherol Reduces Brain Edema and Protects Blood-Brain Barrier Integrity following Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Med Princ Pract* 2017, 26(1): 17.
325. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 1997, 336(17): 1216–22.
326. Lee P, Ulatowski LM. Vitamin E: Mechanism of transport and regulation in the CNS. *IUBMB Life* 2019, 71(4): 424–9.

327. Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H, Inoue K. Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* 1997, 409(1): 105–8.
328. Hosomi A, Goto K, Kondo H, Iwatsubo T, Yokota T, Ogawa M, Arita M, Aoki J, Arai H, Inoue K. Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. *Neurosci Lett* 1998, 256(3): 159–62.
329. Copp RP, Wisniewski T, Hentati F, Larnaout A, Ben Hamida M, Kayden HJ. Localization of alpha-tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders. *Brain Res* 1999, 822(1–2): 80–7.
330. Yamada K, Watanabe M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int* 2002, 77(2): 94–108.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Onay Belgesi

