

**MELATON N VE C V TAM N N N KRON K ALKOL K SIÇANLARIN
SEREBELLUM DOKUSUNDAK HASAR VE eNOS MMUNREAKT V TES
ÜZER NE ETK LER ***

**Effects of Melatonin and Vitamin C on Damage and Expression of Endothelial
NOS in Cerebellum of Chronic Alcoholic Rats**

Mehmet Fatih SÖNMEZ¹, Derya AKKU²

Özet : Bu çalı mada etanolün serebellumda olu turdu u hasar ve eNOS ekspresyonu üzerine melatonin ve C vitamininin koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalı mada 24 adet 200-250 gr a ırlı nda Wistar cinsi ergin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rasgele olarak dört gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol (n: 6); ikinci grup deney süresince (28 gün) alkol içeren sıvı diyet alan (n: 6); üçüncü grup deney boyunca alkol içeren sıvı diyet ile birlikte 40mg/kg/gün intraperitoneal C vitamini alan (n: 6); dördüncü grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet ile birlikte 4mg/kg/gün intraperitoneal melatonin (n: 6) alan sıçanlardan olu turuldu.

Deney süresince sadece alkol alan gruptaki sıçanların serebellum dokularında gangliyoner tabakada purkinje hücrelerinde dejenerasyon ve hücre sayılarında azalma gözlemlendi. Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda purkinje hücrelerindeki dejenerasyon oranının azaldı ı ayırt edildi. Kontrol grubu sıçanlarda, endotelial nitrik oksit sentaz immunoreaktivitesi için yapılan boyamada moleküler ve granüler tabakalarda (++) boyanma, purkinje hücrelerinde ise (++++) boyanma gözlemlendi. Alkol alan grupta dejenere olan purkinje hücrelerinde endotelial nitrik oksit sentaz immunoreaktivitesi gözlenmedi. Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda ise (++++) boyanma mevcuttu.

Sonuç olarak kronik alkol tüketimi serebellum dokusunda hasara yol açmakta. Bu hasar melatonin ve C vitamini ile kısmen düzelmektedir.

Anahtar kelimeler: Kronik alkol tüketimi, beyincik, eNOS, melatonin, C vitamini

Summary: The aim of this study was to determine the alterations in cerebellum caused by alcohol consumption and the effects of melatonin and vitamin C on these changes, in rats.

Twenty-four adult male Wistar rats weighting 200-250g were used in this study. Rats were divided into four groups. The first group served as control (n:6). The second group was the ethanol treatment for 28 days (n:6). The third group was given ethanol and supplemented with 40 mg/kg/day vitamin C (intraperitoneally) (n:6). The fourth group was given ethanol and supplemented with 4 mg/kg/day melatonin (intraperitoneally) (n:6).

Light microscopic examinations revealed Purkinje cell degeneration and decrease in the number of Purkinje cells in ganglionic layer of cerebellum. In melatonin and vitamin C treated groups, degeneration in Purkinje cells was less than the other groups. In the control group, endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity was (++++) in Purkinje cells, and (++) in granular and molecular layer. No endothelial nitric oxide synthase activity in degenerated Purkinje cells of alcohol group was observed. In melatonin and vitamin C treated groups, eNOS immunoreactivity was (++++).

Present results indicated that chronic alcohol consumption increased lipid peroxidation and especially melatonin and vitamin C administration produced in some degree protection against alcohol-induced damage in cerebellum.

Key words: Chronic alcohol consumption, cerebellum, eNOS, melatonin, vitamin C

¹ Yrd.Dç.Dr.Erciyes Ün. Tıp Fak.Histoloji-Emb. AD, Kayseri

² Y.Lisans Ö r, Erciyes Ün.Sa .Bil.Ens.His-Emb.AD, Kayseri

Geli Tarihi : 26.06.2009 Kabul Tarihi : 22.07.2009

* Bu çalı ma 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresinde (22-25 Haziran 2009) poster olarak sunulmu tur.

Çe itli içecekler içinde tüketilen etanol Dünya Sağlık Örgütü tarafından hem fizyolojik hem de psikolojik ba ımlılık yapan maddeler arasında sayılmaktadır. Alkol içecek olarak tüketildi i zaman hemen hemen tüm organları etkilemesine rağmen, merkezi sinir sistemi üzerine etkileri çok ciddidir. Merkezi sinir sistemindeki ba langıç etkileri disinhibisyon, öfori ve uyku halidir. Doz arttıkça inkoordinasyon, konfüzyon, koma ve ölüme neden olabilmektedir (1). Yapılan çalı malarda alkol tüketiminin beyinde nöron ölümünü tetikledi i gösterilmiştir (2). Serebellum alkole en çok duyarlı olan beyin alanlarından biridir. Serebellar kortekste bulunan Purkinje nöronları alkolün serebellumdaki ba lıca etki alanıdır. Kronik alkol tüketiminin purkinje hücrelerindeki dentrit uzantılarını azalttı ı bilinmektedir. Elektron mikroskopik çalı malarda purkinje dentritlerinde dejeneratif cisimciklerde artış tespit edilmiştir. Son çalı malarda alkolle ili kili motor bozulmanın serebellar granüler tabakadaki tonik inhibisyonundaki artıştan kaynaklandı ı bildirilmiştir (3).

Nitrik Oksit (NO) nörotransmisyon, immun düzenleme, renal ve vasküler hemostazis, hücre adhezyonu, proliferasyonu ve apoptozis gibi çok de i ik fonksiyonlara katılan bir haberci moleküldür (4). NO L-argininden NO sentaz (NOS) aktivitesiyle oluşturulmaktadır. NOS'un endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve induklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır.

Pineal bezden salgılanan bir hormon olan melatonin, endokrin ritmin düzenlenmesi, antigonadal etki, de i ik immun fonksiyonların nöroendokrin düzenlenmesi gibi aktivitelerinin yanında, antioksidan özelli e de sahip olduğu bildirilmiştir (5-8) Yapılan çalı malar sonunda melatoninin yüksek ekilde reaktif olan OH radikalini detoksifiye etmede çok etkili olduğu kanıtlanmıştır (9, 10). C vitamini (askorbik asit) suda çözünen önemli vitaminlerdendir (11). Fizyolojik fonksiyonunu büyük ölçüde oksido-redüksiyon yoluyla gösterir (12). C vitamini serbest oksijen radikallerinin etkisini önemli derecede azaltan ve diyet yoluyla alınan bir antioksidandır (13, 14).

Bu çalı mada alkolün serebellum dokusundaki muhtemel oksidatif hasar yapıcı etkisi üzerine antioksidan olarak melatonin ve C vitamininin etkileri ve bu süreç içinde eNOS'un bir rolünün olup olmadığını araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalı ma Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Ara tırma Merkezinde yapıldı. Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik kurulundan onay alındı. Çalı mada 24 adet 200-250 gr a ırlı ında Wistar cinsi ergin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 28 günlük deney süresince 21 °C oda ısısında ve 12 saat aydınlık (7:00-19:00) ve 12 saat karanlık (19:00-7:00) döngüsünün uygulandı ı ortamda çelik kafeslerde beslendi. Sıçanlar her bir grupta altı sıçan olacak ekilde rasgele olarak dört gruba ayrıldı. Birinci grup (kontrol) alkolsüz sıvı diyet ile beslenen sıçanlar; ikinci grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet alan; üçüncü grup deney boyunca alkol içeren sıvı diyet ile birlikte günlük 40mg/kg intraperitoneal C (Redokson, Bayer) vitamini uygulanan; dördüncü grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet ile birlikte günlük 4mg/kg intraperitoneal melatonin (Merck, kat. no:814537) uygulanan sıçanlardan oluştu.

Kronik alkol tüketimi için deneklerin her biri ayrı kafese yerleştirildi. Modifiye sıvı diyet literatürde belirtildi i gibi hazırlandı (15). Çalı manın ba langıcında bütün deneklere alı maları için bir hafta boyunca alkol içermeyen sıvı diyet verildi. Bir hafta sonunda deney gruplarına üç gün %2.4 alkol içeren sıvı diyet verildi. Daha sonra izleyen günlerde alkol konsantrasyonu önce dört gün boyunca % 4.8, sonraki 21 gün boyunca ise %7.2 olacak ekilde ayarlandı. Kontrol grubu alkol içermeyen izokalorik sıvı diyet ile beslendi. Sıvı diyet günlük olarak taze hazırlandı ve her gün aynı saatte (10:00) deneklere verildi. Sıçanların vücut a ırlıkları her gün ölçüldü ve aldıkları alkol miktarı günlük olarak kaydedildi. Denekler alkollü veya alkolsüz sıvı diyet dı ında ba ka bir madde ile beslenmedi.

Deneyin sonunda sıçanlar intraperitoneal ketamin (100mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Dekapitasyondan sonra serebellum dokuları hızlıca çıkarıldı. Klasik yöntemlere göre dokular %10'luk nötral formalin içinde 24 saat fikse edildi (16). Tespit edilen dokular musluk suyunda yıkandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilol ile effafla tırılan dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5–6 mm kalınlığında kesitler Hematoksilin-Eozin ve Masson'un üçlü boyası ile boyandı ve Olympus BX–51 fotomikroskopla incelenerek foto raflar elde edildi.

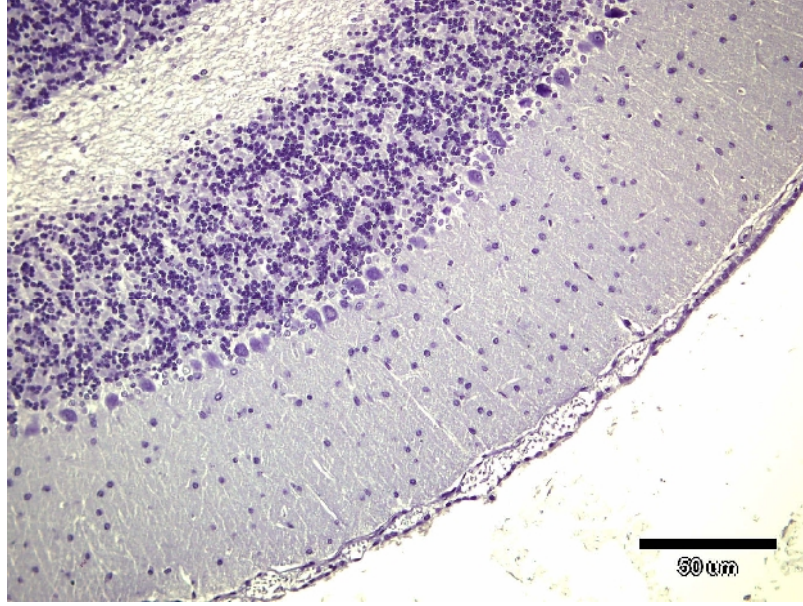
eNOS ekspresyonu streptavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle (17) tav an poliklonal antikorunu kullanarak serebellum dokularında immunohistokimyasal olarak saptandı. Parafin kesitler öncelikle ksilol ile deparafinize edildi. Deparafinize edilen kesitler dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildikten sonra 20 dak. antijen geri kazanımı için 2N HCl ile muamele edildi. Metanol içinde %3'lük H₂O₂ ile 10 dak. boyunca endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi. Daha sonra 3X5 dak. fosfat tamponuyla yıkanan dokular oda ısısında nemli ortamda 20 dak. fosfat tamponu içinde hazırlanmış % 1.5'lik normal keçi serumu ile inkube edildi. Kesitler daha sonra 4 °C de bir gece boyunca eNOS (sc.654 Santa Cruz Biotechnology, USA) (fosfat tamponunda hazırlanmış %1.5 normal keçi serumunda sulandırılmış 2µg/ml eNOS) primer antikor ile muamele edildi. Negatif kontrol kesitlerine primer antikor yerine fosfat tamponu uygulandı. Kesitler daha sonra fosfat tamponuyla yıkandıktan sonra oda ısısında nemli ortamda 30 dak. boyunca biotinli tav ana karı keçi IgG sekonder antikorunu ile inkube edildi. Fosfat tamponu ile yıkanan dokular

streptavidin-horseradish-peroksidaz ile 30 dak muamele edildikten sonra Aminoetil Karbazol (AEC) (kırmızı) substrat kit ile 5 dak. boyandı. Son olarak hematoksilin ile zıt boyama yapılan dokular dsitile su ile yıkandıktan sonra kapatma solüsyonuyla kapatıldı.

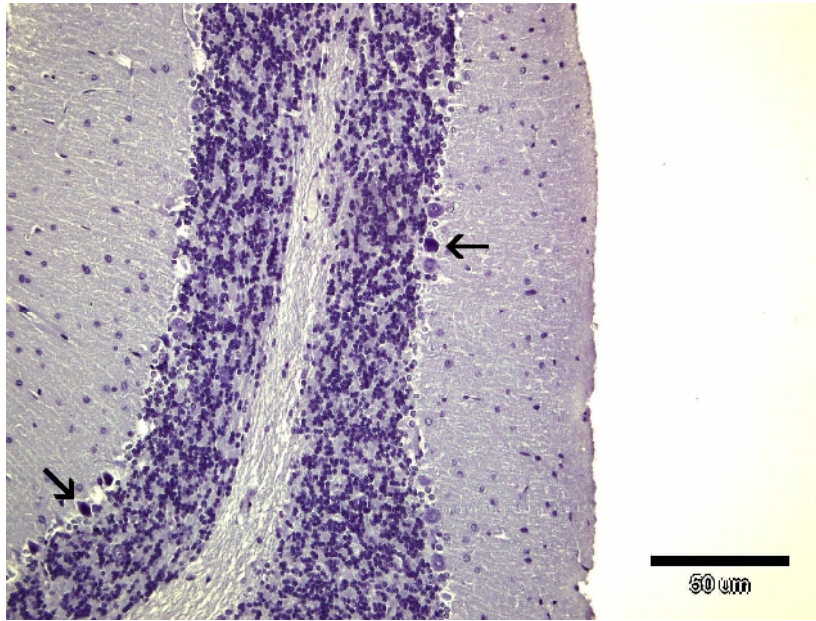
immunohistokimyasal boyama yo unlu u iki histolog tarafından ba ımsız olarak de erlendirildi. eNOS boyanma derecesi boyanma yoksa (-), az boyanma (+), orta boyanma (++) ve güçlü boyanma (+++) olacak ekilde skorlandı (17).

BULGULAR

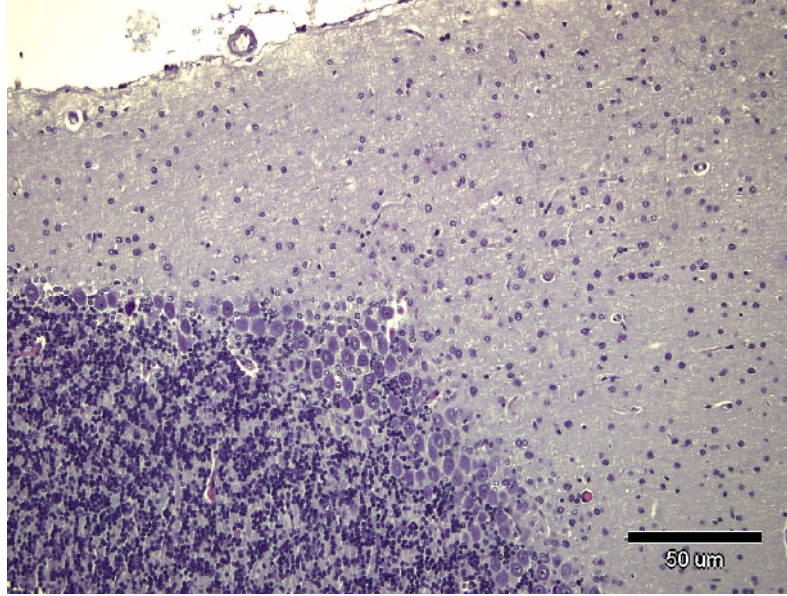
Günlük alkol tüketimi 13.4 ± 2.19 g/kg olarak belirlendi. Çalı mamızda ı k mikroskobik incelemelerde kontrol grubuna ait serebellum dokuları normal olarak gözlendi (ekil 1). Deney süresince sadece alkol alan gruptaki sıçanların serebellum dokularında gangliyoner tabakada purkinje hücrelerinde dejenerasyon ve hücre sayılarında azalma gözlendi (ekil 2). Bazı alanlarda purkinje hücrelerinin granüler tabaka ile iç içe geçti i tespit edildi (ekil 3). Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda purkinje hücrelerindeki dejenerasyon oranının azaldı ı ayırt edildi (ekil 4, ekil5). Kontrol grubu sıçanlarda eNOS immunreaktivitesi için yapılan boyamada moleküler ve granüler tabakalarda (++) boyanma, purkinje hücrelerinde ise (+++) boyanma gözlendi (ekil 6). Alkol alan grupta dejenere olan purkinje hücrelerinde eNOS immunreaktivitesi gözlenmedi (ekil 7). Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda ise (+++) boyanma mevcuttu. Negatif kontrol kesitlerinde pozitif boyanma gözlenmedi (ekil 8).



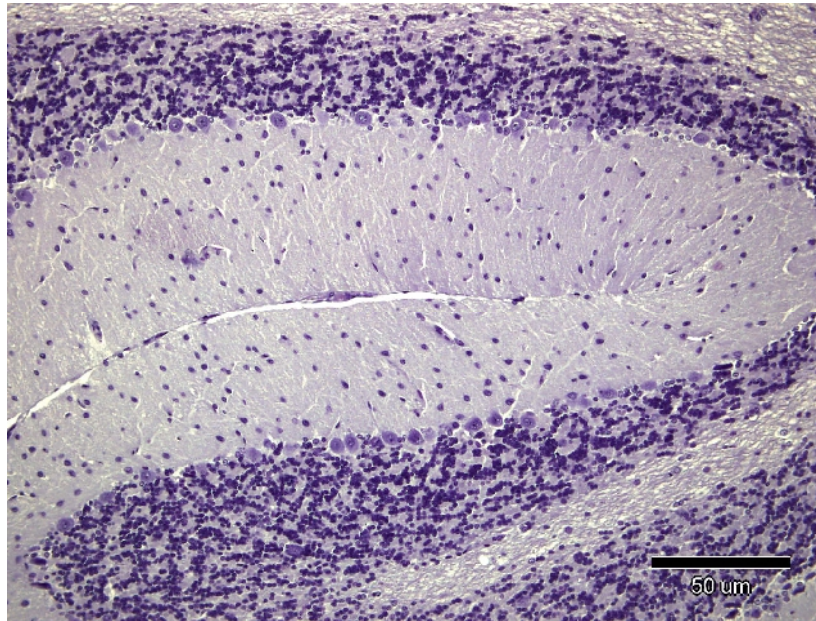
ekil 1. Sıvı diyet ile beslenen kontrol grubu sıçanlarda serebellum korteksi ve medulla tabakalarının normal görünümü. H&E. (Ölçek Çubu u: 50 µm)



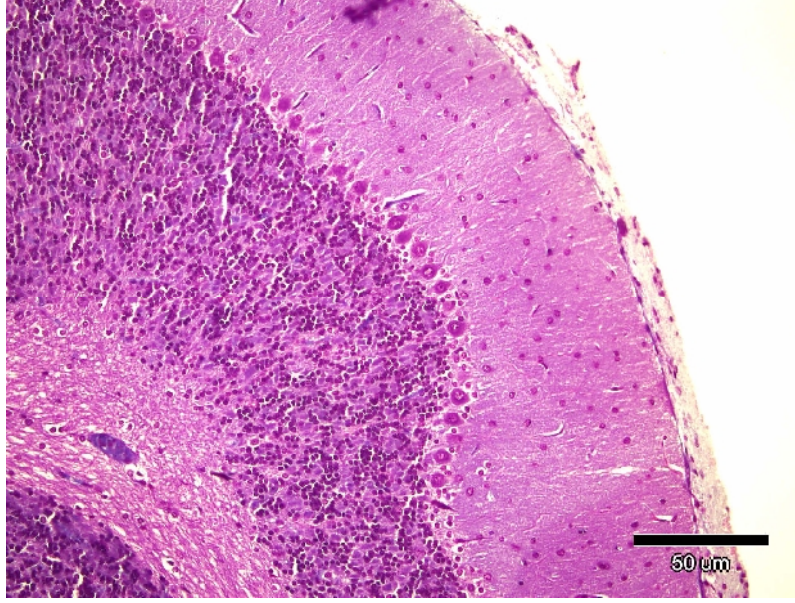
ekil 2. Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanlarda serebellum korteksindeki purkinje hücrelerindeki dejenerasyon (ok) ve sayıca azalmanın görünümü. H&E. (Ölçek Çubu u: 50 µm)



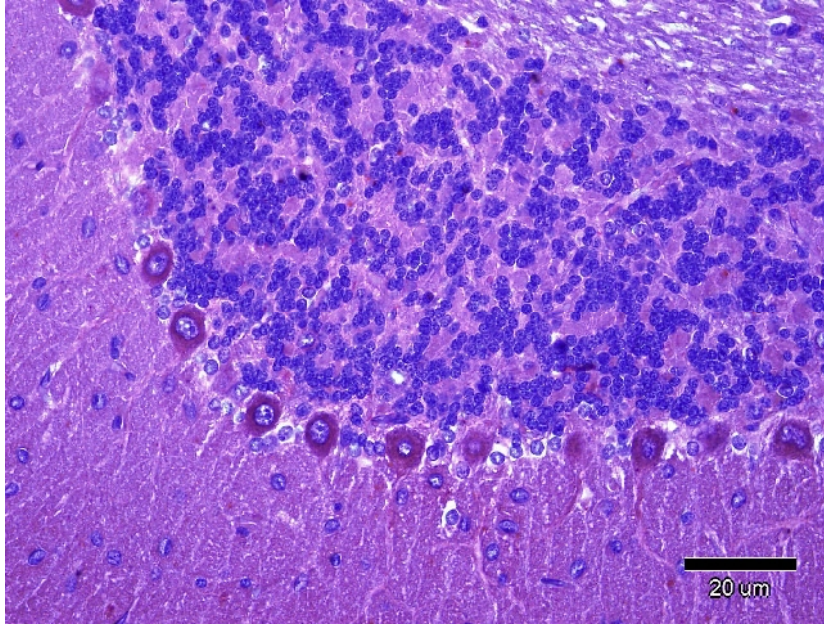
ekil 3. Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanlarda serebellum korteksindeki granüler ve gangliyoner tabakalardaki düzensizlik görünümü. H&E.



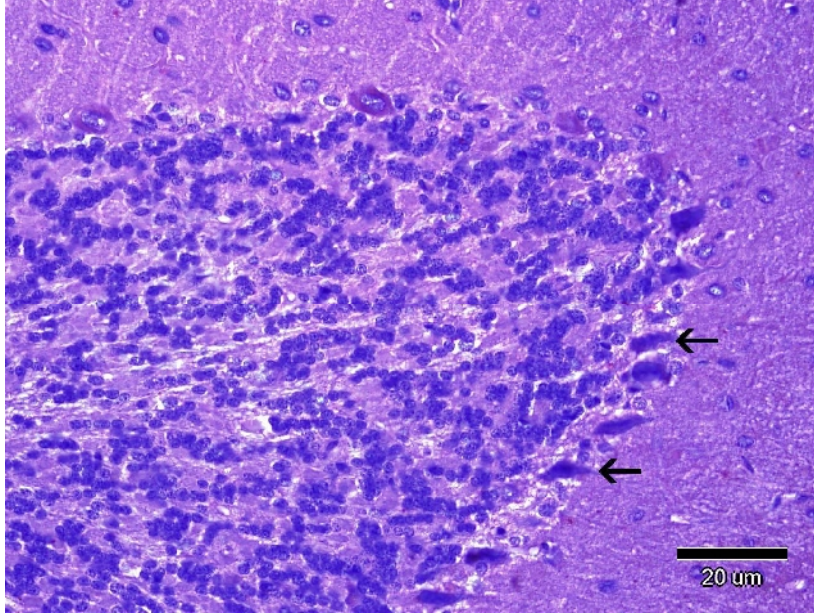
ekil 4. Alkol içeren sıvı diyet alan ve intraperitoneal olarak 4mg/kg/gün melatonin alan sıçanlarda serebellum korteksindeki normale yakın görünüm. H&E. (Ölçek Çubuğu: 50 µm)



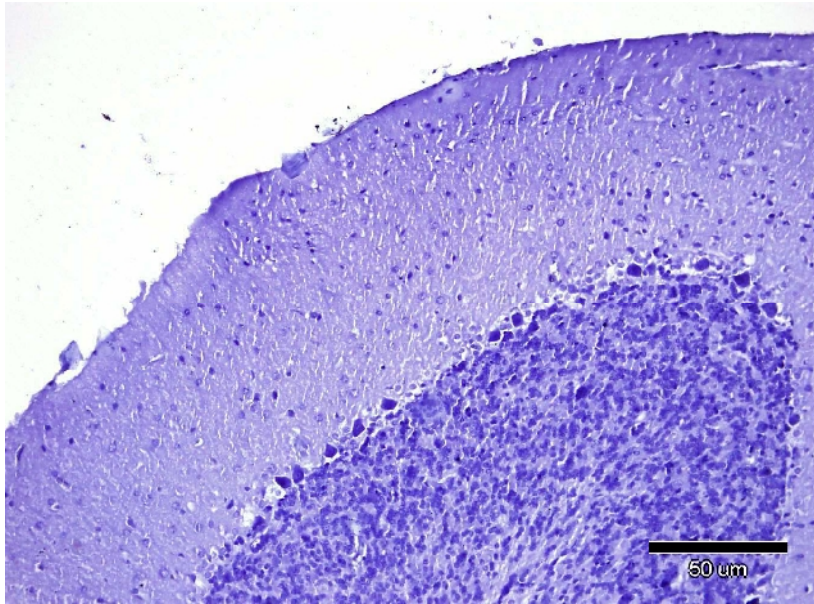
ekil 5. Alkol içeren sıvı diyet alan ve intraperitoneal olarak 40mg/kg/gün C vitamini alan sıçanlarda serebellum korteksindeki normale yakın görünüm. Masson'un üçlü boyası. (Ölçek Çubu u: 50 µm)



ekil 6. Sıvı diyet ile beslenen kontrol grubu sıçanlarda serebellumda purkinje hücrelerindeki (+++) eNOS, moleküler ve granüler tabakalarda (++) eNOS boyanması. mmunohistokimya. (Ölçek Çubu u: 20 µm)



ekil 7. Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanlarda, eNOS immunoreaktivitesi gözlenmeyen dejenere purkinje hücreleri. mmunohistokimya. (Ölçek Çubu u: 20 µm)



ekil 8. Negatif kontrol. (Ölçek Çubu u: 50 µm)

TARTI MA

Kronik alkol tüketiminin insanda de i ik beyin bölgelerinde nörodejeneratif etkileri bulunmaktadır. Özellikle hafızadan sorumlu beyin bölümü olan hipokampus ve ili kili oldu u bölümlerde nörodejeneratif etki ile hafıza kayıplarına yol açmaktadır (1). Gebelik sırasında alkol tüketimi do-um öncesi ve sonrası büyüme gerili i, merkezi sinir sistemi fonksiyon bozuklu u ve tipik fasiyal dismorfizm ile karakterize fetal alkol sendromuna yol açmaktadır (18). Alkol gebeler tarafından kullanıldı ında nöroterotojen etkilere neden olur. Alkolün bu etkilerinin yanı sıra serebellumda da yan etkileri oldu u yıllardır bilinmektedir. Alkol'ün serebellumdaki en önemli etki alanı purkinje hücreleridir (19).

Kronik alkoll tüketiminin purkinje hücreleri üzerine toksik etkisi oldu u yapılan çalı malar ile ortaya konmu tur (20-22). Serebellar purkinje hücreleri moleküler tabakadaki sepet ve yıldız hücrelerinden inhibitör GABA'erjik uyarılarını almaktadır. Alkol kullanımı yıldız ve sepet hücreleri ile purkinje hücreleri arasındaki sinaptik etkile imi bozmaktadır. Bu etki alkol intoksikasyonundaki serebellar fonksiyon bozulmasından kısmen sorumlu olabilir (20). Bu elektrofizyolojik etkilerinin yanı sıra uzun süreli alkol tüketimi purkinje hücrelerinde dendritik gerileme, total sinaps sayısında azalma, düz endoplazmik retikulum ve dendritlerde geni leme gibi morfolojik bozukluklara neden olmaktadır (21). Yine gebelik sırasında alkol kullanımı sonucu purkinje hücre göçünde ve sayısında azalmalar olmaktadır (22). Bu çalı mada kronik alkol tüketimi sonucu özellikle purkinje hücre sayılarında azalma ve bazı alanlarda purkinje hücrelerinin organizasyonunda düzensizlik gözlenmesi yukarıda verilen literatür (21,22) bilgileri ile uyumludur.

Yapılan çalı malarda özellikle geli im döneminde alkol alınması ile sinir sisteminin de i ik bölgelerinde nöron kaybı meydana geldi i bildirilmektedir (23-25). Alkol de i ik mekanizmalar ile beyin gelişimini etkilemektedir. Son zamanlardaki çalı malarda alkolün nörotoksitesinde oksidatif stres mekanizmaları çalı ılmı tur (26,27). Serbest radikaller ya da reaktif oksijen ürünleri oksidatif stres boyun-

ca üretilirler ve sonunda hücre ölümüne giden hücrel makro molekülleri hasara u ratırlar. Alkolün metabolizması sonucunda esas ürün olarak asetaldehit olu maktadır. Asetaldehit okside oldu u zaman serbest süperoksit radikallerinin üretimine neden olmaktadır. Monte ve Wands (28) yaptıkları çalı mada alkole maruz kalmanın serebellar nöronlarda oksidatif stresi artırdı ını göstermi lerdir. Ba ka bir çalı mada da neonatal alkol tüketimi sonucu serebellar malondialdehit ve glutatyon seviyelerinde artı saptanmı tur (29). Shirpoor ve arkadaşları (30) yaptıkları çalı mada alkolün olu turdu u hasarı bir antioksidan olan vitamin E'nin azalttı ını göstermi lerdir. Bu çalı mada da alkolün olu turdu u hasardan korunmak için antioksidan olarak melatonin ve C vitamini ayrı ayrı uyguladı ında, hem melatonin hem de C vitamini uygulamasının purkinje hücre sayılarındaki azalmayı engelledi i gözlendi. Edwars ve arkadaşlarının (31) melatonin uygulamasının purkinje hücre sayısındaki azalmayı düzeltmedi i yönündeki bulguları bu çalı mada sunulan bulgular ile uyumsuzdur. Bu sonuç bizim çalı mamız ile çeli maktadır. Ancak, Edwars ve arkadaşlarının (31) çalı masında alkol neonatal dönemde verilmi tir. Dolayısıyla bulgular arasındaki farklılı ın alkole maruz kalınan dönemin farklı olmasından ve uygulanan melatonin dozundaki farklılıklardan kaynaklandı ı dü ünülmü tür.

Merkezi sinir sisteminde üretilen NO'nun pek çok etkisi bulunmaktadır. Bunlar arasında kan akımının kontrolü, ö renme ve hafıza, nörotransmitter salınımı ve gen ekspresyonu sayılabilir. Merkezi sinir sistemi hücreleri üç NOS izoformunu da eksprese etmektedir (32). Nöronlar özellikle serebellumda nNOS eksprese ederler (33). Yapılan çalı malarda serebellumdaki de i ik hücrelerin her üç NOS izoformunu da eksprese etti i gösterilmi tir (34,35). Bu çalı mada kontrol grubu sıçanlarda serebellumdaki tüm tabakalarda eNOS ekspresyonu izlendi. Özellikle purkinje hücrelerinde yo un boyanma mevcuttu. Bu çalı ma alkolün serebellumda olu turdu u hasarda, eNOS'un rolünün olup olmadı ı ile ilgili yapılan ilk çalı madır. Alkol uygulanan sıçanların serebellum dokularında özellikle dejenere olan purkinje hücrelerinde eNOS boyanmasında azalma veya kaybolma izlendi. An-

tioksidan olarak melatonin ve C vitamini verilen gruplarında ise serebellumda eNOS immunoreaktivitesi (+++) olarak belirlendi.

Sonuç olarak kronik alkol tüketiminin serebellumda yapısal hasara yol açtığı, eNOS'un bu hasara aracılık edebileceği ve antioksidan özellikleri olan melatonin ve C vitamininin eNOS üzerinden bu hasara karşı koruyucu yönde etkili olabileceği düşünüldü.

KAYNAKLAR

1. Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 1998; 56 (4):385-431
2. Hwang DW, Givens B, Nishijima I. Ethanol-induced developmental neurodegeneration in secretin receptor-deficient mice. *Neuroreport* 2009; 20(7):698-701.
3. Dlugos C.A. Ethanol-related smooth endoplasmic reticulum dilation in Purkinje dendrites of aging rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 883–891.
4. Campese VM, Sindhu RK, Ye S, Bai Y, Vaziri ND, Jabbari B. Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain *Brain Res* 2007; 1134(1):27-32.
5. Forsling ML, Stoughton RP, Zhou Y, Kelestimur H, Demaine C. The role of the pineal in the control of the daily patterns of neurohypophysial hormone secretion. *J Pineal Res* 1993; 14: 45-51.
6. Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992; 18: 91-113.
7. Kılıç E, Özdemir YG, Bolay H, Kelestimur H, Dalkara T. Physiological melatonin release as well as exogenously given melatonin protect brain against focal ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 511-516.
8. Kus I, Sarsılmaz M, Ogeturk M, et al. Ultrastructural interrelationship between the pineal gland and the testis in the male rat. *Archives of Andrology* 2000; 45: 119- 124
9. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system protection by melatonin. *Prog. Neurobiol* 1998; 56:359-84.
10. Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX, Chen L, Manchester LC, Guerrero JM. Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol* 1993; 15(1+2):103-16.
11. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery ? An overview. *Nutr J* 2003; 2(1):7
12. Levin M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *New Engl J Med* 1986; 31:892-02
13. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford 1999.
14. Bendich A, Cohen M. Ascorbic acid safety: analysis factors affecting iron absorption. *Toxicol Lett* 1990; 51:189-90
15. Uzbay IT, Kayaalp SO. A modified liquid diet of chronic ethanol administration: validation by ethanol withdrawal syndrome in rats. *Pharmacol Res* 1995; 31:37–42.
16. Louis ED, Yi H, Erickson-Davis C, Vonsattel JP, Faust PL. Structural study of Purkinje cell axonal torpedoes in essential tremor *Neurosci Lett* 2009;450(3):287-91.
17. Sonmez MF, Colakoglu N, Kukner A, Ozan E, Dabak DO. Immunolocalization of TGF-beta2 in the rat thymus during late stages of prenatal development. *Acta Histochem* 2009;111(1):68-73.
18. Cebolla AM, Cheron G, Hourez R, et al. Effects of maternal alcohol consumption during breastfeeding on motor and cerebellar Purkinje cells behavior in mice. *Neurosci Lett* 2009; 455(1):4-7

19. Jaatinen P, Rintala J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. *Cerebellum* 2008; 7(3):332-47
20. Mameli M, Botta P, Zamudio PA, Zucca S, Valenzuela CF. Ethanol decreases Purkinje neuron excitability by increasing GABA release in rat cerebellar slices. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327(3):910-7
21. Dlugos CA. Ethanol-related increases in degenerating bodies in the Purkinje neuron dendrites of aging rats *Brain Res* 2008; 1221:98-107.
22. Lalonde R, Strazielle C. Motor coordination, exploration, and spatial learning in a natural mouse mutation (nervous) with Purkinje cell degeneration. *Behav Genet* 2003; 33: 59–66
23. D.J. Bonthius, J. Woodhouse, N.E. Bonthius, D.A. Taggard, E.W. Lothman, Reduced seizure threshold and hippocampal cell loss in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:70– 82.
24. Chen WJA, Parnell SE, West JR. Effects of alcohol and nicotine on developing olfactory bulb: loss of mitral cells and alterations in neurotransmitter levels, *Alcohol. Clin Exp Res* 1999; 23:18 – 25.
25. Pierce DR, Williams DK, Light KE. Purkinje cell vulnerability to developmental ethanol exposure in the rat cerebellum, *Alcohol. Clin Exp Res* 1999; 23:1650–1659
26. Heaton MB, Mitchell JJ, Paiva M. Amelioration of ethanol-induced neurotoxicity in the neonatal rat central nervous system by antioxidant therapy. *Alcohol. Clin Exp Res* 2000; 24: 512– 518.
27. Chen SY, Sulik KK. Free radicals and ethanol-induced cytotoxicity in neural crest cells, *Alcohol. Clin Exp Res* 1996; 20:1071– 1076
28. de la Monte SM, Wands JR. Chronic gestational exposure to ethanol impairs insulin-stimulated survival and mitochondrial function in cerebellar neurons, *Cell Moll. Life Sci* 2002; 59:882– 893.
29. Smith AM, Zeve DR, Grisel JJ, Chen WJ. Neonatal alcohol exposure increases malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels in the developing cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 160(2):231-8
30. Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, Minassian S, Yegiazarian M. Protective effect of vitamin E against ethanol-induced hyperhomocysteinemia, DNA damage, and atrophy in the developing male rat *BrainAlcohol Clin Exp Res* 2009. [Epub ahead of print]
31. Edwards RB, Manzana EJ, Chen WJ. Melatonin (an antioxidant) does not ameliorate alcohol-induced Purkinje cell loss in the developing cerebellum. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26(7):1003-9
32. Bruhwylter J, Chleide E, Liégeois JF, Carreer F. Nitric oxide: A new messenger in the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993; 17:373– 384.
33. Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, et al. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 1991; 7:615–624.
34. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:683–706.
35. Hartell NA, Furuya S, Jacoby S, Okada D. Intercellular action of nitric oxide increases cGMP in cerebellar Purkinje cells. *Neuroreport* 2001; 112:25–28.