

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOLUENİN IN VITRO VE IN VIVO OLARAK
ERİTROSİT ZAR STABİLİTESİNE ETKİSİ**

Dr. İsmail KARABULUT

**Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2007

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOLUENİN IN VITRO VE IN VIVO OLARAK
ERİTROSİT ZAR STABİLİTESİNE ETKİSİ**

Dr. İsmail KARABULUT

**Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Z. Dicle BALKANCI**

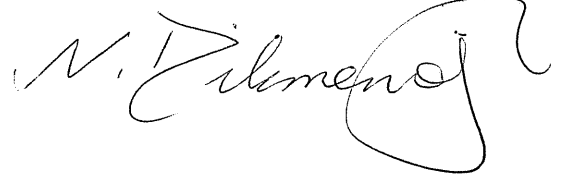
ANKARA

2007

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

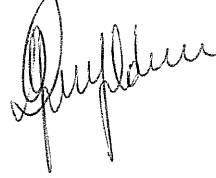
Jüri Başkanı: Prof. Dr. Neslihan H. Dikmenoğlu
Hacettepe Üniversitesi




Danışman: Doç. Dr. Dicle Balkancı
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Gülseli Yıldırım
Ankara Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Ethem Gelir
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Yrd. Doç. Dr. Ayşen Erdem
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yazar bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Doç. Dr. Dicle Balkancı, tez danışmanım olarak çalışmaya yol gösterici katkılarda bulunmuş ve çalışmanın gerçekleşmesi için her türlü desteği sağlamıştır.

Sayın Doç. Dr. Ersin Fadıllıoğlu tez izleme komitesinde görev alarak ve çalışmada yer alan *oksidatif stres* parametrelerinin bakılması için katkıda bulunarak destek olmuşlardır.

Sayın Prof. Dr. Neslihan H. Dikmenoğlu, Prof. Dr. Abid Y. Rıdvanağaoğlu ve Prof. Dr. Orhan Duman tez izleme komitesinde görev alarak değerli katkılarda bulunmuşlardır.

Sayın Prof.Dr. Süeda Hekimoğlu ve Farmasötik Teknoloji A.D. uv spektrofotometre ve soğutmalı santrifüj aletinin kullanılmasını sağlayarak çalışmaya katkıda bulunmuşlardır.

Tez çalışmalarım boyunca aile bireylerim ve bölüm arkadaşlarım anlayışla ve sabırla destek olmuşlardır.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen bir proje kapsamında gerçekleşmiştir. (Proje numarası: 06 D05 101 003)

ÖZET

Karabulut İ. Toluenin in vivo ve in vitro olarak eritrosit zar stabilitesine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2007. Toluen, endüstride çok yaygın olarak kullanılan organik bir çözücüdür. Başta santral sinir sistemi olmak üzere bir çok organı etkilemektedir. Güçlü lipofilik özelliği nedeniyle hücre membranlarında birikir ve hücre membran transportunu bozar. Metabolitleri reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumundan sorumludur ve karaciğer, ince bağırsak, böbrek, beyin gibi dokularda lipid peroksidasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Eritrositler oksidatif hasara yatkındırlar. Oksijen radikalleri eritrositlerde doymamış yağ asitleri ve proteinlerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna ve protein yıkımına yol açarlar. Ürün olarak malondialdehit (MDA) ve protein karbonil (PC) meydana gelir. Bununla beraber eritrositlerin savunma sistemleri de güçlüdür ve oksijen radikallerini ortamdan uzaklaştıran katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimleri yoğun olarak içerirler. Bu çalışmada toluenin ozmotik frajiliteyi azaltıcı etkisiyle, oksidatif stresi artırıcı etkisi arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır ve toluene mesleksi (in vivo) ve in vitro olarak maruz kalan insan eritrositlerinde eş zamanlı ozmotik frajilite, ortalama hücre hacmi (MCV), oksidatif stres parametreleri ve antioksidan enzim aktivitelerine bakılmıştır. Ozmotik frajilite deneyleri için eritrositler farklı derişimlerdeki NaCl solüsyonlarına eklenmiştir (kör, % 0.38, % 0.40, % 0.42, % 0.44, % 0.46, % 0.48 ve stok). Kör solüsyonundaki hemoliz miktarı %100 kabul edilerek, her bir solüsyondaki hemoliz yüzdesi hesaplanmıştır. Eritrosit MCV ölçümleri tam kan sayım cihazıyla yapılmıştır. Ozmotik frajilite deneylerinin ve MCV ölçümlerinin yapıldığı gün hazırlanan eritrosit paketleri, MDA, PC seviyesi, CAT ve GSH-Px aktivitesinin bakılacağı güne kadar -85 °C'de saklanmıştır. İstatiksel değerlendirme Mann-Whithney U Testi'yle yapılmıştır. Toluen eritrositlerde hem in vivo, hem de in vitro maruziyet ile oksidatif stres parametrelerini anlamlı olarak artırmıştır ve antioksidan enzimlerini tüketerek aktivitelerinin anlamlı olarak azalmasına (in vitro CAT aktivitesinde anlamlı olmayan bir azalma) yol açmıştır. Ozmotik frajiliteyi azaltıcı etkisi ise çalışmanın sadece in vitro kısmında görülmüştür. Eritrosit MCV ölçümlerinin hiç birinde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Sonuç olarak, toluen hem in vivo, hem de in vitro maruziyet ile eritrositlerde lipid peroksidasyonuna ve protein hasarına yol açmıştır. Toluene in vitro maruziyet ile eritrositlerde oluşan ozmotik frajilite azalması onun lipofilik özelliği nedeniyle membranı stabilize edici etkisinden kaynaklanmıştır ve bu etki toluenin oksidatif stresi artırarak oluşturduğu ozmotik frajiliteyi artırıcı etkisine baskın gelmiştir.

Anahtar Kelimeler: Toluen, ozmotik frajilite, oksidatif stres, membran stabilitesi.

Destekleyen Kurumlar: H. Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi (06 D05 101 003)

ABSTRACT

Karabulut I. Effect of toluene on erythrocyte membrane stability under in vivo and in vitro conditions. Hacettepe University Institute of Health Sciences Physiology Program, Doctorate Thesis, Ankara, 2007. Toluene is an organic solvent used widely in the industry. It has adverse on various organs including the central nervous system. Since it is highly lipophilic it accumulates in the cell membrane impeding transport through it. Its metabolites are responsible for the formation of reactive oxygen species (ROS) and are known to trigger lipid peroxidation in tissues such as liver, small intestine, kidney and brain. Erythrocytes are also prone to oxidative damage. Oxygen radicals react with unsaturated fatty acids and proteins in erythrocytes leading to lipid peroxidation and protein breakdown. Malonyldialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PC) are produced as end products of these reactions. On the other hand the defense system of erythrocytes is strong including antioxidant enzymes like catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) that scavenge the oxygen radicals. In this study, we aimed to investigate the relationship between the osmotic fragility of erythrocytes and the oxidative stress inducing effect of the toluene. Measurements of osmotic fragility, mean corpuscular volume (MCV), oxidative stress parameters and antioxidant enzyme activities were performed simultaneously both in the individuals exposed to toluene professionally (in vivo) and the human erythrocytes treated with toluene (in vitro). To measure osmotic fragility erythrocytes were placed in NaCl solutions at various concentrations (blank, 0.38%, 0.40%, 0.42%, 0.44%, 0.46%, 0.48% and stock). Percent of hemolysis in each solution was calculated with respect to the hemolysis in the blank solution (100%). Erythrocyte MCV measurements were done by on automatic analyzer. The erythrocyte packs prepared at the same day of above mentioned measurements were kept at -85°C until the time for determination of MDA and PC levels, and CAT and GSH-Px activities. The data were analyzed statistically by Mann-Whitney U Test. Toluene increased oxidative stress parameters significantly both in in vivo and in vitro exposure, it also caused a significant decrease in the activities of antioxidant enzymes by exhausting them (in vitro CAT activity was lower but did not reach statistical significance). Osmotic fragility was altered observed only in the in vitro experiments. Erythrocyte MCV values didn't exhibit any change. In conclusion toluene resulted in lipid peroxidation and protein damage both by in vivo and in vitro exposure. The decreased osmotic fragility in erythrocytes treated with toluene in vitro was a result of the membrane stabilizing effect of toluene which in turn is due to its lipophilic properties. Oxidative properties of toluene may be expected to increase osmotic fragility. The decrease in osmotic fragility that was observed in our experiments is probably due to the membrane stabilizing action of this chemical through its lipophilicity.

Key words: Toluene, osmotic fragility, oxidative stress, membrane stability

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Eritrosit	3
2.2. Toluen	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Denekler	35
3.2. Toluen Ölçümü	35
3.3. Kan Alma	36
3.4. Tam Kan Sayımı ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	36
3.5. Ozmotik Frajilite Deneyi	36
3.6. Kontrol ve <i>In vitro</i> Toluen Gruplarında MCV Ölçümü	38
3.7. Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü	38
3.8. İstatistiksel Yöntem	40
3.9. Etik Kurul İzni	40
4. BULGULAR	41
4.1. Deneklerin Genel Özellikleri	41
4.2. Toluene Maruziyet Miktarı	42
4.3. <i>In Vivo</i> Toluen Grubuna Uygulanan Anket Sonuçları	42
4.4. Kontrol ve <i>In Vitro</i> Toluen Gruplarında Ozmotik Frajilite Deney Sonuçları	43
4.5. Kontrol ve <i>In Vitro</i> Toluen Gruplarında MCV Sonuçları	44

4.6. Kontrol ve <i>In Vivo</i> Toluen Gruplarında Eritrositle İlgili Değerler	45
4.7. Kontrol ve <i>In Vivo</i> Toluen Gruplarında Ozmotik Frajilite Deney Sonuçları	45
4.8. Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçüm Sonuçları	47
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
EKLER	
EK 1	

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ALT	Alanin aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
AST	Aspartat aminotransferaz
CAT	Katalaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Glutatyon (okside)
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH-Red	Glutatyon redüktaz
Hb	Hemoglobin
Htc	Hematokrit
MCH	Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	Ortalama eritrosit hücre hacmi
MDA	Malondialdehit
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OD	Optik dansite
PAS	Periyodik Asit-Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Protein karbonil
RDW	Eritrosit hücre dağılım genişliği
ROS	Reaktif oksijen türevleri
SOD	Superoksit dismutaz
SSS	Santral sinir sistemi

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. İzotonik çözeltideki eritrosit boyutları	4
2.2. Eritrosit zar iskeleti ve taşıyıcı proteinleri	8
2.3. Eritrositin <i>diskosit-ekinosit</i> şekil değişikliği	15
2.4. Eritrositin <i>diskosit-stamatosit</i> şekil değişikliği	15
2.5. <i>Emden-Meyerhof</i> glikolizi	18
2.6. Glutasyonun hidrojen peroksitin (H ₂ O ₂) detoksifikasyon reaksiyonu	19
2.7. Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu ile bunların sonucunda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunun oluşumu	20
2.8. Toluenin kimyasal yapısı	22
2.9. Toluene maruziyet sınırları	26
2.10. Toluen metabolitleri	27
4.1. Kontrol ve <i>in vitro</i> toluen gruplarının ozmotik frajilite sonuçları	44
4.2. Kontrol ve <i>in vivo</i> toluen gruplarının ozmotik frajilite sonuçları	46
4.3. Deney gruplarında eritrosit MDA düzeyleri	49
4.4. Deney gruplarında eritrosit PC düzeyleri	49
4.5. Deney gruplarında eritrosit CAT enzim aktiviteleri	50
4.6. Deney gruplarında eritrosit GSH-Px enzim aktiviteleri	50

TABLÖLAR

	Sayfa
3.1. Farklı derişiklerdeki NaCl çözeltileri	37
4.1. Kontrol grubunun genel özellikleri	41
4.2. <i>In-vivo</i> toluen grubunun genel özellikleri	42
4.3. Kontrol ve <i>in vitro</i> toluen gruplarının eritrosit ozmotik frajilite sonuçları	43
4.4. Kontrol ve <i>in vivo</i> toluen gruplarında eritrositlerin özellikleri	45
4.5. Kontrol ve <i>in vivo</i> toluen gruplarının ozmotik frajilite sonuçları	46
4.6. Kontrol ve <i>in vitro</i> toluen gruplarında eritrositlerin MDA, PC miktarları ve CAT, GSH-Px enzim aktivite düzeyleri	47
4.7. Kontrol ve <i>in vivo</i> toluen gruplarında eritrositlerin MDA, PC miktarları ve CAT, GSH-Px enzim aktivite düzeyleri	48

1. GİRİŞ

Toluen, günümüz endüstrisinde organik bir çözücü olarak kullanılan tinerin temel bileşenidir. Aromatik hidrokarbonlar grubundan olan toluen, yine aynı grubun üyesi olan ancak karsinojenik etkileri saptandığı için artık kullanılmayan benzenin yerini almıştır. Boya, ilaç, kozmetik, ayakkabı ve otomotiv sanayi ile patlayıcı ve yapıştırıcı maddelerin yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Toluene maruziyet başlıca inhalasyon yoluyla olmakla beraber gastrointestinal sistem, deri ve mukoza yoluyla gerçekleşebilir. Mesleki maruziyet özellikle inhalasyon yoluyla olur. Toluen etkisini kana, dokulara ve doku sıvılarına geçerek gösterir. Lipofilik özelliği nedeniyle hücre zarında birikir. Akut olarak genellikle öfori, baş ağrısı, baş dönmesi, bulanık görme, ataksi gibi santral sinir sistemi (SSS) depresyonu bulguları oluşturmakla birlikte ağır akut olgularda koma, kövülziyon ve akciğer yetmezliğine bağlı ölümler de bildirilmiştir. Düşük dozda ancak uzun süreli maruziyet durumunda ise beyin ve karaciğer gibi yağdan zengin dokularda birikip davranış ve hafıza bozukluğu gibi SSS bulgularına ek olarak, renal ve hepatik hasara da yol açabilir. Karaciğer, ince bağırsak, böbrek ve beyin gibi dokularda lipit peroksidasyonuna ve reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretimine yol açtığı bilinmektedir.

Ozmotik frajilite, eritrositlerde yüzey alanı/hacim oranının bir göstergesidir. Eğer yüzey/hacim oranı düşerse eritrositlerin ozmotik frajilitesi artar, tersine bu oran yükselirse ozmotik frajilite azalır, ozmotik hemolize direnç artar. Frajilitenin azalması zarın stabilize olduğunu gösterir. Kana geçen toluenin önemli bir miktarının eritrositlerde birikmesi nedeniyle, eritrositlerin de toluenden etkilenmesi beklenir. Toluenin ozmotik frajiliteye etkisi bugüne dek yalnızca sıçan eritrositlerinde incelenmiş, düşük dozlarda ozmotik direnci artırdığı ve bu artışın geri dönüşümlü olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan mesleki olarak toluen soluyanlarda eritrositlerin oksidan hasara maruz kaldığı, lipit peroksidasyonunun arttığı, bildirilmiştir. Eritrositlerin oksidatif stresle karşılaşması ozmotik frajiliteyi artırır. Bu durumda toluene maruz kalan insan eritrositlerinde oksidan hasar ve ozmotik frajilite artışının, eritrositlerin yaşam süresini, yapı ve işlevlerini etkilemesi beklenir. Ulaşabildiğimiz kaynaklarda insan eritrositlerinde toluenin ozmotik frajiliteye etkisinin incelendiğine ilişkin bilgiye rastlanmamış, lipit peroksidasyonu ve bazı

antioksidan enzimlerin ise sadece mesleki maruziyet durumunda incelendiği görölmüşütr.

Biz bu çalışmada kısa süreli *in vitro* toluen maruziyetinin ve uzun süreli mesleksi maruziyetin insan eritrositlerin ozmotik frajilite, lipit peroksidasyonu, protein hasarı ve antioksidan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelere etkisini incelemeyi, böylece toluenin insan eritrositlerinde zar stabilize edici etkisini ve bu etkinin oksidatif stresle ilişkisini araştırmayı amaçladık. Sonuçların işçi ve çevre sağlığı açısından yararlı olacağını, bu konuda daha ileri çalışmalara yol göstereceğini umuyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

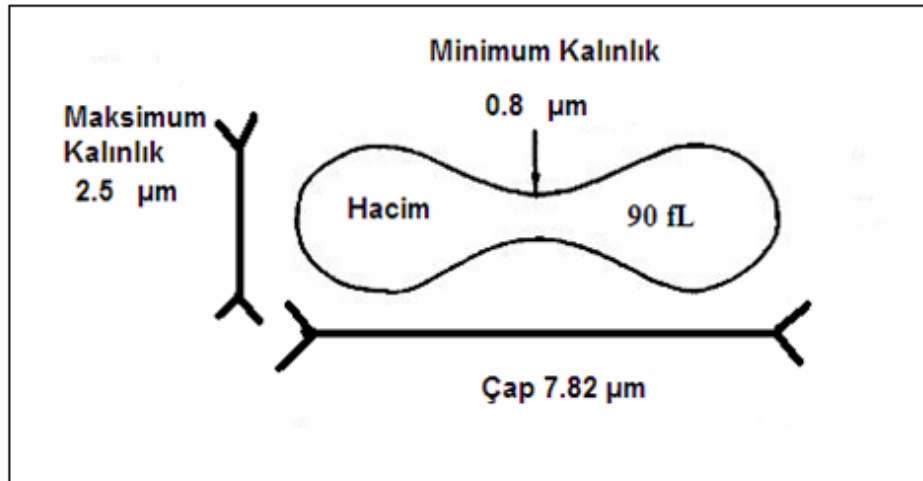
2.1. Eritrosit:

Eritrosit; insan vücudunda önemli ve kritik görevler üstlenen, farklı fizyolojik koşullarda, çeşitli ksenobiotiklere maruziyetlerde dinamik davranış biçimleri sergilemek zorunda olan ve oksidan stresle sürekli karşılaşan çok iyi özelleşmiş bir hücredir. İlaç veya kimyasalların inhale edilmesi, alımı, enjekte edilmesi veya deriye tatbiki sonucu ksenobiotiklerle yüzleşen ilk hücrelerden biridir. Basit görünümüne rağmen çok iyi özelleşmiş ve farklılaşmış bir hücre olan eritrositin birincil fonksiyonu oksijeni taşımaktır. Farklılaşmasını tamamlamış eritrosit nükleusunu, ribozomlarını, mitokondriasını, diğer organellerini kaybeder, çoğalamaz, protein sentezleyemez ve metabolizmasının enzimatik olayları çok sınırlıdır [1]. Sitoplazmasındaki proteinlerin %95'inden fazlası oksijen taşımakla görevli hemoglobindir [2]. Olgun eritrosit kuru ağırlığının neredeyse % 90'nını (30-35 g/dL) yapan hemoglobin akciğerde yüksek oksijen derişigiyle karşılaştığında oksijeni geri dönüşümlü bağlar ve düşük parsiyel oksijen basınca sahip dokuda ise oksijeni serbest bırakır. Böylece dokulara serbest bırakılan moleküler oksijen miktarının maksimumda tutulması için çalışır [1].

2.1.1. Eritrosit Şekli:

Eritrositin bikonkav disk olarak belirtilen bir şekli vardır. Yayma yapıldığında sadece düz yüzeyleri gözleendiğinden dairesel görünümlüdür. Çapı 7-8 μm 'dir. Kurutma ve boyamayla fikse edilen preparatlardaki ölçümler izotonik çözeltideki ölçümlere göre daha küçük bulunur [2]. Fikse edilen preparatlarda boyutları genellikle sabit olduğundan diğer hücrelerin büyüklüklerini tahmin etmede kullanılabilirler. Bu özelliklerinden dolayı "histolojik cetvel" olarak da isimlendirilebilirler [3].

Eritrosit daire merkezi soluk görünümlüdür, yaklaşık 0,8 μm kalınlığındadır. Merkezden uzak çevre bölgenin kalınlığı 2,5 μm 'ye kadar ulaşır (Şekil 2.1). Eritrosit yüzey alanı 135 μm^2 'dir. Ortalama hücresel hacim 85-91 fl arasında değişirken hücrelerin %95'i 60-120 fl arasındadır. Retikülositler olgun eritrositlerden %24-35 daha büyüktürler [2].



Şekil 2.1: İzotonik çözeltideki eritrosit boyutları.

Eritrositin şekli ve görevi birbiriyle çok iyi örtüşmektedir. Bikonkav disk şeklindeki eritrositin zar yüzeyi aynı sitoplazmik hacme sahip küre şeklindeki bir hücrenin zar yüzeyinden % 40 daha fazladır. Eğer eritrosit küre şeklinde olsaydı aynı hacim için minimum zara ihtiyaç duyulacaktı ama hücre içi difüzyon için maksimum mesafe gerekecekti ve O₂ alışverişi zorlaşacaktı. Ayrıca hücre zarı plastisitesini (esnekliğini) kaybedecekti. Öyleyse bu şekil hem gaz transferini kolaylaştırmakta hem de mikrovasküler yataktan geçmek zorunda olan eritrositin deformabilite özelliğini sağlamaktadır [1, 3, 4].

2.1.2. Eritrosit Zarı:

Eritrosit zarı çift katlı lipit bir tabakadan meydana gelmiştir. Zarın %52'si proteinden, %40'ı lipitten ve %8'i karbonhidrattan oluşmaktadır. Lipit moleküllerinin nonpolar grupları birbirine bakarken hidrofilik polar başlar ise dışarıya dönüktür. Dolayısıyla polar başlar hem sitoplazma hem de plazmayla etkileşim içindedir. Hidrofilik iki tabaka yaklaşık 2.5 nm kalınlığında olup ortadaki hidrofobik tabaka yaklaşık 2 nm'dir. Toplam zar kalınlığı 7 nm'yi bulur [2].

Lipit zar içindeki proteinler ise deniz içinde yüzen adacıklara benzerler. Bazıları zarı boydan boya geçerken bir kısmı kısmen kat eder ve zarın sadece bir yüzeyine bakarlar. Bir kısım proteinler ise çift katlı lipit tabakayı birden çok kesebilirler. Bazılarında belirgin bir lateral hareketlilik söz konusudur. Yalnız, çoğu diğer zar bileşenleriyle etkileşim halinde olduklarından kısmen hareketsizdirler.

Hücre zarını kat eden proteinler zarın sitoplazmik tarafında bir protein ağı olan hücre iskeleti proteinleriyle etkileşirler [2]. Hücre iskeleti ve zarı arasındaki ilişki dinamiktir, kırmızı kan hücre morfolojisinin değişmesine izin verecek şekildedir ve eritrosit mekanik özelliklerini belirleyen temel faktörlerdendir [1, 5].

2.1.3. Eritrosit Zarının Lipit İçeriği:

Olgun eritrositlerdeki lipitlerin hemen hemen tamamı hücre zarında bulunur. Zarın lipit içeriğinin %95'ini, takriben eşit miktarlarda bulunan kolesterol ve fosfolipitler oluşturur [2, 5, 6]. Fosfolipitlerin çoğunu fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, sfingomyelin, fosfatidilserin oluşturur. Bir de eser miktarda lisolesitin gibi lisofosfolipitler bulunmaktadır. Tek yağ zincirinden oluşan sfingomyelin ve lisofosfolipitler dışındaki fosfolipitler çift yağ zincirinden meydana gelir. Fosfolipitler eritrosit zarına simetrik dağılmamışlardır [2]. Aminofosfatid fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin ile fosfatidilinositolün %80'i çift katlı lipit tabakanın sitoplazmaya bakan iç katmanında yer alırken kolin içeren lipitler fosfatidilkolin, sfingomyelin çoğunlukla dış katmanda yer alır [2, 6]. Lipitlerin lateral hareketini sınırladığı bilinen kolesterol dış katmanda göreceli olarak zengin olmasına rağmen dış katman lipitlerinin iç katmandaki lipitlere göre lateral hareketleri daha fazladır. Çünkü iç tabakadaki fosfolipitlerin hareketini hücre iskelet proteinleriyle olan etkileşimi sınırlamaktadır [2].

Lipit hareketliliği ve zar deformabilitesi üzerine ek bir etki de iki tabaka arasında düzenli olarak dağılmayan eritrosit fosfolipitlerinde yer alan serbest yağ asitlerinden kaynaklanır. Bir uçtan diğer uca zarında bulunan serbest yağ asitlerinin yaklaşık yarısı doymamıştır. Ancak doymamış yağ asitlerinin zarındaki dağılımı orantılı değildir ve özellikle poliansatüre açıl zincirinin dört ya da daha fazla çift bağları orantısız olarak fosfolipit yapraklarının iç kısmında yer alan fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserinde bulunur. Tersine çoğunlukla dış lipit tabakada yer alan fosfatidilkolin en fazla kısa zincirli doymuş yağ asitleri içermektedir. Sfingomyelin özellikle yirmiden daha uzun yağ asitlerinden zengindir. Sfingomyelinden zengin olan zarlar lesitinden zengin olan zarlardan daha az akışkandır. Sfingomyelin/lesitin oranının artması abetalipoproteinemilerde olur ve eritrosit anormallikleriyle beraberdir.

Eritrosit zarının kolesterol içeriği neredeyse tamamen esterlenmemiş kolesteroldür. Çift katlı lipit zarın her bir tabakasındaki kolesterol dağılımının ölçümü oldukça zordur. Çünkü kolesterolün iki tabaka arasındaki değişimi oldukça hızlıdır. Buna rağmen dış tabakada daha fazla kolesterol olduğuna yönelik çalışmalar vardır. Kolesterol zar akışkanlığı üzerine etki etmektedir. Fosfolipitler ile etkileşir ve “orta jel durumu” diye adlandırılan bir form oluşturur. Böylece sadece fosfolipitden oluşan zarlarla karşılaştırıldığında kolesterol içeren zarlar daha az akışkan ve daha fazla viskozdir. Zarın kolesterol içeriğindeki artış zar deformabilitesini azaltır ve anormal derecede artışlar eritrosit şeklinde bozulmaya yol açar. Sonuçta kırmızı kan hücreleri kolaylıkla dalakta parçalanabilirler.

Glikolipitler (ya da glikosfingolipitler) toplam eritrosit zar lipit içeriğinin küçük bir kısmını oluşturur. Bu glikolipitler sfingomyeline benzer. Eritrositlerde en fazla bulunan glikolipit glikobositdir.

Glikobosit sadece plazma zarında yer alan bir parçadır ve bu açıdan kolesterol ve fosfolipitlerden ayrılır. Glikobosit eritrosit zarının bir karakteristiğidir, ancak bir çok hücrede de tespit edilmiştir [2].

2.1.4. Eritrosit Zarının Protein İçeriği:

Eritrosit zarındaki proteinler; integral (transmembran) proteinler, iskelet proteinleri ve bağlayıcı proteinlerinden meydana gelmiştir. İntegral proteinler çift katlı lipit tabakasında zara dik olacak şekilde yerleşmiştir. İskelet proteinleri zarın iç yüzünü kaplayan bir ağ oluşturmuştur. Bağlayıcı proteinler, integral proteinlerle iskelet proteinlerini birbirine bağlarlar [7].

İntegral (Transmembran) Zar Proteinleri:

Eritrosit zar proteinlerinin büyük bir kısmı zar içinde sinyal ve taşımadan sorumlu integral zar proteinlerinden meydana gelmiştir [3, 5]. İntegral proteinlerinin çoğunluğu çift katlı lipit tabakada köprü oluşturan glikoforinler ve protein bant 3 gibi transmembran glikoproteinlerdir. Bazıları ise eritrosit zarının dış veya iç yüz kenarından sadece lipit çift tabakasının içerisine penetre olurlar [7]. Ekstrasellüler alanda spesifik kan grup antijenlerini eksprese ederler [3]. Tipik bir transmembran glikoprotein, çevre ortamının içerisine karbonhidrat grubunun çıkıntı oluşturmasıyla bir ekstrasellüler alana, hidrofobik amino asitlerinin yüksek içeriğiyle birlikte peptit

segmentlerden oluşan bir intramembranöz alana ve intrasellüler sitoplazma içerisine çıkıntı yapan bir sitoplazmik alana sahiptir. Ayrıca yine tipik olarak zar iskelet ağıyla etkileşim içindedir [6, 7].

İntegral zar proteinleri iki büyük aileden oluşmuşlardır [3, 7].

a. Protein 3:

Protein band 3 yaklaşık 100 kD moleküler ağırlığında bir transmembran glikoproteinidir. 43 kD'luk stoplazmik en uç terminal kısmı ankrin için (ayrıca protein 4.1, protein 4.2, hemoglobin ve bir kısım glikolitik enzimler içinde) bağlanma yeri sağlar [3, 7]. Protein 3 nonkovalent olarak tetramerler oluşturur ve her tetramer bir ankriye bağlanır. Protein 3'ün 52 kD'luk peptidinin C terminali Cl^- - HCO_3^- değiştiricisi için anyon transpot kanalı olarak görev yapar.

Anyon transportunun önemli olduğu böbrek ve tübüllerinde, protein 3'ün noneritroid izoformlarının yer aldığı doku ve organlara örnektir [7].

b. Glikoforinler:

Glikoforinler transmembran siyaloglikoproteinlerdir. Bunlar reseptör fonksiyonu gören bir ekstrasellüler glikozlanmış segmentden, lipit tabakayı geçen bir intramembranöz hidrofobik segmentden ve diğer zar ve sellüler proteinlerle ilişki kuran bir stoplazmik segmentden meydana gelir. Eritrosit hayalet zar jelinin *Periyodik Asit-Schiff* (PAS) boyanması sonucu dört band görülür: Glikoforin A,B,C ve D.

Glikoforin A 36 kD moleküler ağırlığında glikoforin α (alfa) ya da PAS 2 olarak da bilinen glikoforinlerin % 85'le en büyük kısmını oluşturur. Protein 4.1 ve glikoforin A arasındaki ilişki hücre iskelet ağı ve zar lipit tabaka için bir bağlanma bölgesi sağlar. Bu ilişki fosfatidilinositol bağımlı bir ilişkidir.

Glikoforin B PAS 3 ya da glikoforin δ (delta) olarak da bilinir. Moleküler ağırlığı 20 kD'dur, glikoforinlerin %15'ine karşılık gelir.

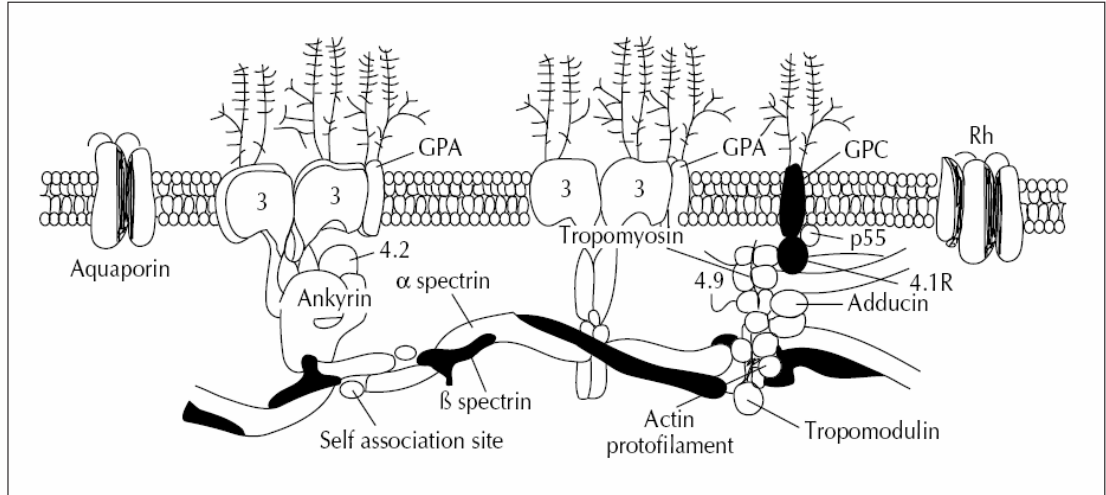
Glikoforin C aynı zamanda PAS 2' ya da glikoforin β (beta) olarak da bilinir. Moleküler ağırlığı 32kD'dur. Glikoforinlerin %4'üne karşılık gelir. Protein 4.1 glikoforin C'yle bağlanarak iskelet ağıyla zar lipit çift tabaka arasında ek bir bağlantı sağlar.

Glikoforin D aynı zamanda glikoforin γ (gama) olarak da bilinir. 23 kD'luk moleküler ağırlığıyla glikoforinlerin % 1'ine karşılık gelir [7].

İskelet proteinleri:

Zar iç yüzeyinde kafes şeklinde uzanıp iskelet ağını oluşturan bu proteinler periferik proteinler olarak da adlandırılırlar [5, 7]. İskelet proteinlerinin bazıları aktin, myozin, tropomyozin, tropomodulin, kalmodulin gibi kasta bulunan kontraktıl proteinlerin izoformlarıdır [6, 7]. Önceleri spektrin gibi diğer zar proteinleri eritrositler için spesifik olduğu düşünölmüştür. Fakat immünolojik ve moleküler biyolojik çalışmalar bu proteinlerin izoformlarının eritrosit dışı hücreler ve dokuların çoğunda da bulunduğunu göstermiştir [7].

Hücre iskeleti bağlayıcı proteinler, protein 4.1 ve ankrin ile transmembran proteinlerine tutunmuştur. Ek olarak protein 4.1 spektrin oligomerleriyle kısa aktin filamentleri arasındaki horizontal ilişkiyi stabilize eder (Şekil 2.2). Birçok ek proteinler hücre iskeletiyle ilgili olarak aktin filamentlerinin reorganizasyonunda yer alırlar. Protein 4.1, ankrin veya spektrininin yokluğu ya da bu proteinlerde meydana gelen mutasyonlar eritrosit şekil veya deformabilitesinin bozulmasına yol açar [8].



Şekil 2.2:Eritrosit zar iskeleti ve taşıyıcı proteinleri. (GPA:Glikoforin A, GPC: Glikoforin C) (Gascard ve Mohandas'tan [8] alınmıştır.)

a. Spektrin:

Spektrin eritrosit zar iskelet ağırlığının yaklaşık dörtte üçünü oluşturan, uzayabilen, esnek çubuk şeklinde moleküller olup, ana iskelet proteinidir [7, 8].

Eritrosit yaşamı boyunca sürekli olarak dinamik şekil değişikliklerine maruz kalır ve farklı özel durumlara adapte olmak zorundadır. Bunun için eritrosit spektrini değişen fonksiyonel ihtiyaçları karşılamak için oluşan değişimlere katlanmak zorundadır. Aynı zamanda spektrin eritrosit zarının reolojik özelliklerinin belirmesinde de çok önemli bir rol oynar. Herediter sferositozda zar spektrin içeriğindeki azalma beta spektrindeki hasar sonucunda oluşur. Zar spektrin içeriğinin düşmesiyle ilişkili olarak eritrosit zarının viskoelastik katsayısında azalma olur ve eritrosit ozmotik frajilitesindeki artışla uyumludur [7].

Spektrin iki uzun zincirden (alt birim) oluşur. Alfa alt birimi 240 kD, beta alt birimi 220 kD moleküler ağırlığındadır. Bu iki birim antiparalel heterodimerler oluşturacak şekilde birbirinin etrafında dönerler ve ayrıca tetramerler de oluştururlar. Spektrin tetramerleri hegzogonal kafes oluşturacak şekilde zarın hemen altında kısa aktin filamentleriyle irtibat halindedirler [5, 7, 8,].

Bütün spektrinler içerisinde yer alan alfa ve beta alt birimlerinin her ikisi de birçok homolog 106 aminoasidin tekrarıyla oluşur (20 ve 18 tekrar). Bu tekrarların her biri üçlü alfa heliksi içerisinde düzenlenir. Eritrosit spektrin moleküllerinin bu organizasyonu özellikle eritrosit zar deformabilitesinde önemli bir rol oynayan mekanik esnekliğini verir.

Eritrosit iskelet ağı, elektron mikroskopuyla incelendiğinde poligon yapıdaki iplikler spektrin moleküllerinden meydana gelir. Spektrin ve diğer zar proteinleriyle bağlayıcı proteinlerin etkileşimi birleşme yerlerini oluşturur. Zarın reolojik özellikleri iskelet protein moleküllerinin mekanik özellikleriyle ilişkilidir, özellikle spektrin ve bağlayıcı proteinler ile ve bitişik molekülleri arasında bağlanma karakterlerine bağlıdır [7].

Yatay olarak spektrin alfa ve beta zincirleri, aktin ve protein 4.1 ile bağlantı kurarlar. Bunların dışında adductin ve dematin proteinleri de yer almaktadır. İskelet, lipid çift tabakaya vertikal olarak tutunmuştur. Bir anyon değiştirici olan AE1 ankrin yardımıyla spektrine tutunmuştur [5].

Alfa spektrin kısmı kalmodulin bağlanma yerini içermektedir. Beta spektrin N terminalli dimerizasyon yeri, aktin ile protein 4.1 için bağlanma alanını içerir. Merkez kısmı ankrin bağlanma bölgesini içerir. C terminal kısmı ise alfa spektrininin

N terminaliyle baş başa ilişkilendirmelerinden sorumludur [8]. Beta spektrin fosforilasyonu arttıkça zar stabilitesinin azaldığı gösterilmiştir [9].

Spektrinin tripsinle sindirimi sonucu alfa alt biriminde beş bölge ($\alpha I-\alpha V$) β alt biriminde dört bölge ($\beta I-\beta IV$) oluşur. Spektrin dimerlerinde αI ile βI bölgeleri arasında bir bağlantı söz konusudur. Herediter eliptositoz ve herediter propoikilositoz hastalarının bir kısmında spektrinin kendi içindeki bu bağlantısında bir defekt vardır. Spektrinin kendi içindeki bu bağlantısına ek olarak glikoforinler ve band 3 ile protein 4.1 arasındaki etkileşim ve spektrin-ankrin-protein 3 ve spektrin-aktin-prtein 4.1 etkileşimi önemlidir [7].

b. Aktin:

Aktin, bütün hücrelerin hücre iskeletinin ana bileşenidir ve bütün kasların kasılabilir kısmının esansiyel bir parçasıdır. Memeli hücrelerinde en azından altı isoformu vardır. Dört tanesi kasın aktin isoformlarıdır. Eritrosit aktini kas dışı β (beta) formudur, çift helikal filament içinde organize olmuştur (F-aktin) ve tropomyozin ile yakın ilişki içindedir. Eritrosit zarında aktinin rolü primer olarak protein 4.1 ve spektrin ile etkileşime girerek üçlü bir kompleks oluşturmaktır. Bu üçlü kompleks spektrin tetramerlerini birleşmesine izin vererek iskelet ağının oluşmasını sağlar.

c. Tropomyozin:

Eritrosit zarında tropomyozin sarmal şeklinde dimerler oluşturarak beta aktinlerin polimerizasyonunu indükler ve aktin ince filamentinin ana oluşunda yatar. Bu ilişki kastaki aktin ve tropomyozin arasındaki ilişkiye benzemektedir. İnsan eritrosit zarında tespit edilen tropomyozin 29 ve 27 kD'luk iki polipeptid ile bir dimer şeklindedir. Eritrosit tropomyozininin F aktine bağlanması bir tropomyozin dimerine 7-8 aktin bağlanması şeklindedir. Bu, zarın F aktin ile nerdeyse kaplanması için yeterlidir. Eritrosit zar iskeletinde böyle 2 tropomyozin molekülü 12-17 monomer uzunluğunda bir kısa aktin filament ile ortak haldedir. Bağlanma magnezyum derişğine hassastır ve belirgin derecede işbirliği göstermektedir. Eritrosit zar tropomyozini muhtemelen mekanik olarak aktin filamentlerinin stabilizasyonunda ve spektrin-aktin arasındaki ilişkide ve regülasyonunda fonksiyon görmektedir.

d. Myozin:

Myozin kasta önemli bir kontraksiyon proteini olması yanında ayrıca eritrositler gibi kas dışı hücrelerde de bulunur. Ancak eritrositlerde bulunan myozin miktarı çok azdır ve görevi tam bilinmemektedir. Muhtemelen eritrosit myozini ATP bağımlı değişmeler için gerekli bir aktomyozin kasılma aparatında tropomyozin ile birlikte fonksiyon görmektedir [7].

Bağlayıcı Proteinler:

Bu proteinler zara paralel bir ağ oluşturan iskelet proteinleri ile çift lipit tabakası içerisinde zara dik olarak yerleşen transmembran integral proteinlerini birbirine bağlayan proteinlerdir. Dolayısıyla iskelet ve integral proteinleriyle etkileşim içindedirler ve üç boyutlu zar protein ağının şekli için dayanak noktalarını oluştururlar. Protein bantları 2.1 (ankrin), 4.1, 4.2 ana bağlayıcı proteinlerdir. Bunlar genellikle iskelet proteinleri içerisinde kabul edilirler [7].

a. Protein 4.1:

Protein 4.1 yaklaşık 80 kD moleküler ağırlığında bir fosfoproteindir [7, 8,]. Hem eritrosit hem noneritrosit hücreler için multifonksiyonel bir protein olarak kabul edilir. İskelet ağında yer alan aktin, spektrin ve stoplazmik transmembran proteinler glikoforin C ve band 3 ile etkileşim içindedir. Protein 4.1 şu yapısal kısımları içerir: 30 kD, 16 kD, 22-24 kD moleküler ağırlıklı kısımlar [7, 8, 10]. Protein 4.1'in 30 kD'luk N terminal kısmı glikoforin C, anyon değiştirici band 3, CD 44, protein 55, kalmodulin, importin alfa, pICI , CASK, matür parazit enfekte eden eritrosit yüzey antijeni, fosfatidilserin ile ilişki sağlar [8, 10]. 10 kD'luk santral kısmı aktin, importin alfa, U2AF ile ve spektrin kuyruğuyla bağlanır [10], böylece eritrosit zarında yer alan aktine spektrin bağlanma afinitesini belirgin bir şekilde artırır. Protein 4.1'in olmadığı durumlarda spektrin-aktin ilişkisi için birliktelik sabiti 10^3 M^{-1} iken, spektrin-aktin-protein 4.1 üçlü ilişki için bu değer 10^{12} M^{-2} 'dir [7]. Son olarak 22-24kD C-terminal kısmı muhtemelen nükleer mitotetik aparat ilişkili protein ve FK 506 bağlayan protein 13 ile bağlanabilir [10, 11].

Protein 4.1'in spektrin ve aktin ile 10 kD'luk bölgesiyle bağlanmakta olduğunu, bunun spektrin-aktin ilişkisi ve eritrosit zar stabilitesi için önemini belirtmiştik. Ayrıca kalsiyumun kalmodulin ile uyumu muhtemelen spektrin aktin

ilişkinin module ederek hayalet eritrosit zarlarını destabilize eder. Kalmodulin protein 4.1'e kalsiyumdan bağımsız olarak bağlanır ve kalsiyum bu ilişkiyi module edebilir. Yine protein 4.1'in 30kD'luk bölümüyle band 3, CD 44, glikoforin C ve p55 ile yaptığı bağlantı ve fonksiyonel ilişkileri kalsiyum ve kalmodulinle module edilir [10].

Zar iskeletinde bağlayıcı bir protein olarak protein 4.1'in önemi birçok transmembran glikoproteinler ile yaptığı bağlantılar sayesinde anlaşılmıştır. Bağlandığı transmembran glikoproteinler arasında glikoforin A, glikoforin C ve protein 3 yer alır, böylece çift lipit tabakada vertikal uzantılara karşı horizontal eşleşmelerle ağ yapılıdır. Protein 4.1, glikoforin A ilişkisinin fosfoinosititler tarafından düzenlendiği düşünülmektedir [7]. Ayrıca protein 4.1 tetramerik band 3 molekülünün stoplazmik kısmıyla ilişkiye girerek ankrinin band 3'e bağlanmasını module eder ve eritrosit zar stabilitesini değiştirir. Protein 4.1 spektrin-aktin ile bağlanması eşzamanlı olarak glikoforin C ve p55 ile bağlanmasına denk gelir. Böylece eritrosit zarı altında bir kompleks oluşturur [10].

Protein 4.1 bir çok dokuda bulunur: Beyin, trombosit, endotel hücreleri, lens hücreleri, fibroblastlar ve lenfoid hücreler. Ancak her dokuda ayrı izoformları bulunur [7].

b. Ankrin

Eritrosit ankrini (protein 2.1) 210 kD ağırlığında küre şeklinde bir proteindir. Spektrini protein 3'e bağlar. Ayrıca diğer integral zar proteinlerini de bağlar. Bir N terminal 89kD'luk zar bağlayıcı kısım (band 3 ile ilişkili), 62 kD'luk spektrin bağlayan kısım ve 55 kD'luk C terminal düzenleyici kısım olmak üzere üç kısımdan oluşur [8, 10]. Spektrin tetramerlerinin her biri iki ankrin bağlanma bölgesine sahiptir. Fosforlanmamış ankrin, bağlanmak için spektrin tetramer ve oligomerlerini spektrin dimerlerine tercih eder.

Hereditör sferositozun bazı vakalarının ankrin geninde bir defektle ilgili olduğu gösterilmiştir. Ankrindeki bir eksiklik ya da instabilite zara spektrin bağlanma stabilitesini azaltarak zar spektrininin azalmasına yol açar. Bu ayrıca spektrin eksikliğinin derecesiyle sferositozun derecesi arasında da bir korelasyon gösterebilir [7].

b. Protein 4.2:

Protein 4.2 insan eritrosit zarının protein ağırlığının yaklaşık % 5'ine karşılık gelir. Protein 4.2 protein 3'ün sitoplazmik kısmıyla ilişkiye girer. Çözeltide ankrin ve protein 4.1'le bağlanır. Protein 4.2 muhtemelen zardaki ankrini stabilize etmekle görevlidir. Protein 4.2 protein 4.1'le birlikte eritrosit olgunlaşma sürecinde sentezlenen son zar proteinlerinden biridir. Protein 4.2 zar proteinleriyle yaptığı bağlantılarla zar iskeleti stabilizasyonunda yer alır. Böylece onları yıkımdan (örneğin proteazlar), ya da çapraz köprüleşmelerden (örneğin stoplazmik transglutaminaz) korur. Protein 4.2'si eksik olan hastaların eritrositleri eliptositotik ve sferositotik şekildedir. Ayrıca ozmotik frajiliteleri artmıştır ve anemi problemleri vardır. Bu anormalliğin muhtemel sebebi protein 4.2 eksikliğinden dolayı iskelet ağının ve zar çift tabaka arasındaki ilişkinin zayıflaması sonucudur.

Protein 4.2 *in vivo* reaktif analogları ayrıca diğer doku ve hücrelerde de yer alır. Bunlar trombosit, beyin ve böbrektir. Muhtemelen eritrosit dışı yapılardaki görevi eritrositlerdeki görevlerinden farklıdır [7].

2.1.5. Eritrosit Zarının Taşıyıcı Proteinleri:

Eritrosit zarından polar olmayan maddeler hızlıca ve kolayca geçiş yapabilirler. Polar maddeler ise taşıyıcı proteinler aracılığıyla zarı geçebilirler. Özellikle sodyum, potasyum gibi tek yüklü katyonların eritrosit zarından geçişleri zordur ve enerji gerektirir. Eritrosit zarında çeşitli katyon taşıyıcıları, anyon taşıyıcısı (band 3), üre, glikoz taşıyıcısı ve su kanalı gibi özel taşıyıcı proteinler bulunur [2].

Eritrosit zarında yer alan major katyon taşıyıcısı, ATP'yi kullanarak hücre içindeki sodyumu dışarıdaki potasyumla değiştiren Na^+ - K^+ aktif transport pompasıdır. ATP'den ADP'ye dönüştürülen her molekül için 3 Na^+ iyonu hücre dışına pompalanır ve 2 K^+ iyonu hücre içine girer. Böylece eritrosit içi katyon derişği (130mM-K^+ , 8mM-Na^+) dengelenir. Çünkü plazmadan eritrosit içine pasif olarak Na^+ girişi olur, tersi K^+ için geçerlidir [2]. Bu pompa aynı zamanda eritrositlerin düşük dinlenme zar potansiyeline de katkıda bulunur. Pompanın her bir döngüsünde eritrosit bir pozitif iyon yitirir. Bu kayıp kısmen bir anyonun (çoğunlukla klor) dışarı çıkmasıyla dengelenir [12].

Band 3 proteini akciğerde eritrositdeki $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anyon değişimini sağlar. Eritrositlerde diğer bir anyon geçişi anyonların net kayıp veya kazanımlarıyla

sonuçlanan yavaş iyonik difüzyondur [13]. Bu geçiş katyon difüzyonundan 100 kat daha hızlıdır ama katyon değişim reaksiyonundan da 10.000 kat daha yavaştır [2].

Aquaporin 1 eritrosit zarında bol miktarda bulunan ve ozmotik su taşınımının %85'inden sorumlu bir su kanalıdır. Aquaporin 1'i olmayan eritrositlerin ömürlerinin daha kısa olduğu belirtilmiştir [14].

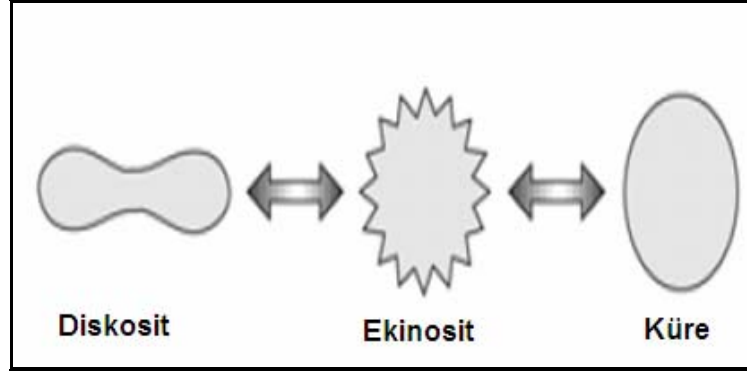
Glikoz taşıyıcısı eritrosit zar proteinlerinin %5'ini yapar. Glikoz bu protein sayesinde kolaylaştırılmış difüzyonla eritrosite girer, eritrosit içinde anaerobik glikoliz için glikoz kaynağını oluşturur. Eritrositin gereksinim duyduğu glikozdan daha fazlası glikoz taşıyıcı protein ile hücre içine taşınmaktadır [15, 16].

Eritrositin ayrıca üre taşıyıcısı vardır. Üre taşıyıcısı eritrositin ozmotik dengesine ve eritrosit zarının deformabilitesine katkı sağlar [17].

2.1.6. Ozmotik Frajlite:

Eritrositler hemoglobinin ozmotik etkisinden dolayı hücre içi sıvıyı artırmaya eğilimlidirler. Ancak bu eğilim normal durumlarda Na^+ - K^+ aktif transport pompasıyla engellenir ve sodyumla birlikte hücre içine giren su, sodyumla birlikte hücreden dışarı atılır. Eğer giren su miktarı pompanın kapasitesini aşarsa, eritrositler şişer ve yuvarlak bir şekil alırlar. Eritrositler hipotonik çözeltilere kondukları zaman su, hızlıca eritrosit zarından geçerek hücrenin şişmesine yol açar. Buna ozmotik şişme denir. Eritrositin önce fincan şeklini sonra da küre şeklini almasını sağlar. Bunun nedeni eritrositin hacmi artarken yüzey alanının aynı kalması veya çok az artmasıdır. Eritrositler küre şekline ulaşıp, kritik bir hacme varduktan sonra hücre zarı parçalanır ve hemoglobin gibi büyük moleküller serbest kalır [2, 18].

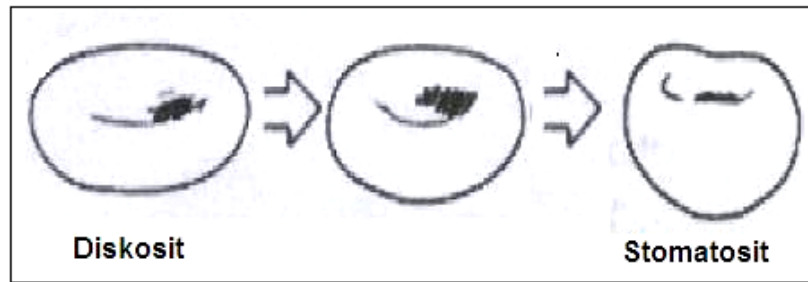
Eritrositi küre şekline dönüştüren iki durum daha vardır. Bir tanesi *diskosit-ekinosit* dönüşümüdür (Şekil 2.3). Hücre içi ATP azalması ve Ca^{+2} artmasına bağlıdır. Eritrosit diskinin önce hatları düzensizleşir, sonra dikensi çıkıntılar (krenasyonlar) oluşur, en son aşamada da eritrosit oval veya küre şeklini alır. ATP yerine konulursa kürenin şekli derece derece normal şekline döner [19]. İkincisi *diskosit-stamatosit* dönüşümüdür (Şekil 2.4). Eritrositler düşük pH'a maruz kaldıklarında oluşur. Eritrositin bir tarafındaki çöküklük azalırken diğer tarafta artar [20].



Şekil 2.3: Eritrositin *diskosit-ekinosit* şekil değişikliği.

Eritrositler, hipertonic çözeltilere konulduklarında ise su kaybederler, hücre küçülür ve kenarlarında dikensi çıkıntılar (krenasyonlar) olur [21].

Ozmotik frajilite testinde, farklı hipotonik derişiklerdeki tuz çözeltilerin içine bırakılan eritrositlerin hemolize karşı direnci ölçülür. Her bir hipotonik derişimdeki eritrositlerin parçalanma miktarı, derişimin içine salınan hemoglobinin kolorimetrik olarak ölçülmesiyle hesaplanır ve eritrositlerin tamamen lizis olduğu en düşük derişimli örnekle karşılaştırılır [21]. Eritrositler % 0,85'lik NaCl çözeltisi içinde hiçbir şekil değişikliğine uğramazlarken, % 0,50-0,45'lik çözeltilerde hemoliz görülmeye başlanır ve % 0,30-0,20'lik NaCl çözeltilerinde ise tüm kırmızı hücreler hemolize uğrar [21, 22].



Şekil 2.4: Eritrositin *diskosit-stamatosit* şekil değişikliği.

Ozmotik frajilitenin kritik belirleyici faktörü eritrositlerin yüzey alanıyla hacmi arasındaki orandır [23]. Küresel hücrelerin yüzey/hacim oranları düşüktür, hipotonik çözeltilerde sınırlı bir genişleme kapasiteleri vardır ve normal bikonkav eritrositlerden daha yüksek NaCl derişiklerinde lizis olurlar. Bu eritrositler için

artmış ozmotik frajiliteye veya azalmış hemolitik dirence sahiptir, denilir. Diğer yandan hipokromik, düz ve yassı hücreler hipotonik çözeltilerde daha büyük genişleme kapasitesine sahiptirler ve normal eritrositlerden daha düşük NaCl derişiklerinde lizis olurlar. Düşük ozmotik frajiliteye veya başka bir söylemle artmış hemolitik dirence sahiptirler [22].

Hereditör sferositoz ve kazanılmış hemolitik anemili hastalarda kırmızı kan hücrelerinin ozmotik frajilitesi artar. Talasemili ve demir eksikliği anemisi olan hastaların mikrositer, hipokromik olan eritrositlerinde ozmotik frajilite azalır. Yeni doğanın hemolitik hastalığı ve splenomegalide de eritrositlerin hemolitik direncinde artış vardır. Hemoglobinopati veya karaciğer hastalığı olan kişilerin çoğunda ve bazı myeloskleroz, lösemi, lenfosarkom, splenektomili hastalarda ozmotik frajilite azalır [21, 24].

2.1.7. Eritrosit Metabolizması:

Başlıca görevi akciğerlerden dokulara O₂ taşımak, dokulardan akciğerlere CO₂ götürmek olan eritrositin metabolizması da buna göre düzenlenmiştir ve diğer vücut hücrelerinden oldukça farklı özellikler içermektedir. Hatta öncü hücresi retikülositden bile oldukça farklıdır. Eritrositlerde diğer hücrelerden farklı olarak ribozom, mitokondri, golgi aparatı ve nukleus bulunmaz. Yapısal olarak sadece sitoplazma ve hücre zarı kalmıştır. Globulin, protein, lipit sentezi yapamaz. Retikülositlerde ise sitoplazma ve hücre zarına ilaveten mitokondri ve RNA kalıntıları bulunur. Globulin, protein, lipit sentezi yapabilirler [25].

Eritrosit dolaşım içinde yüksek gerilim streslerine, ani uzamalara ve katlanmalara maruz kalır. Eritrosit zarı özel yapısı nedeniyle bu etkilere karşı oldukça dayanıklıdır ve zarın bütünlüğünün ve esnekliğinin sürdürülmesi eritrositin dolaşım içinde kalabilmesi için büyük önem taşır. Eritrosit metabolizmasında üretilen enerjinin bir kısmı zarın fonksiyonlarının sürdürülmesi için kullanılır [1].

ATP Üretimi ve Tüketimi:

Eritrositlerde ATP üretimi ve tüketimi retikülositlerden çok daha azdır. Çünkü eritrositlerde mitokondri olmadığı için O₂'i ATP üretimi için kullanamaz. Glikoliz (*Embden-Meyerhof* glikolizi) ATP üretimi için tek yoldur (Şekil 2.5). Eritrositlerde tüketilen glikozun (1,25 mM / litre / saat) % 90'u bu yola girer.

Eritrositlerde ATP üretimi 2 mM /litre /saat, hücre içi derişimi 1-1,5 mM, yarılanma ömrü bir saattir. Retiküositlerde ATP üretimi 120-200 mM/litre/saat, hücre içi derişimi 3-4 mM ve yarılanma ömrü sadece 40 saniyedir.

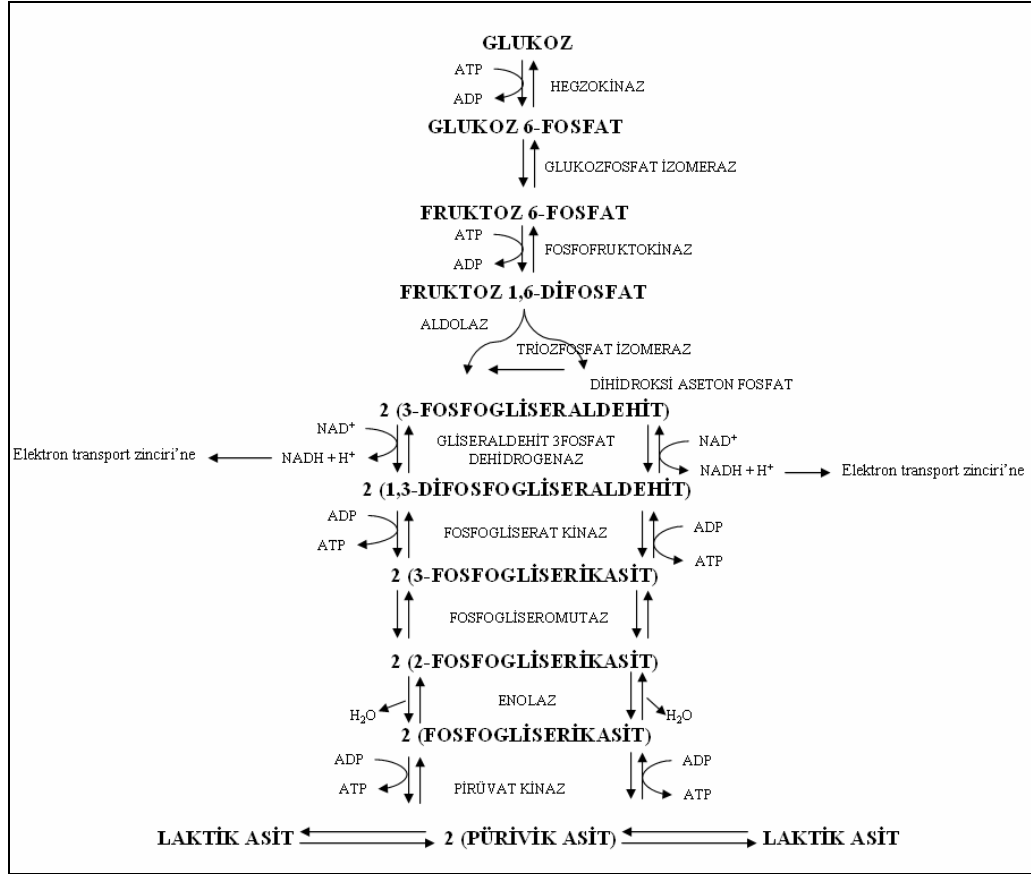
Eritrositlerde ATP asıl olarak zarda iyon taşınmasında kullanılır. Bunun büyük bir kısmı $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ transport pompasında (tüm ATP'nin %30'u) kullanılır. Ca^{+2} taşınmasında kullanılan ATP daha azdır. ATP'nin eritrositlerde ikincil kullanım yeri hücre iskelet elemanlarının kontraksiyonudur. Enerjinin diğer kullanım yeri fosforilasyon reaksiyonlarıdır. Fosforilasyon reaksiyonlarında kullanılan ATP'nin (tüm ATP'nin % 25'i) beşte dördü fosfolipitlerin fosforilasyonunda, geri kalan beşte biri proteinlerin fosforilasyonunda kullanılır. Enerjinin sadece küçük bir kısmı oksidan hasarın tamirinde kullanılır. Retiküositlerde ATP'nin % 30'u globulin sentezinde, % 25'i $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ transport pompasında kullanılır [1, 26-28].

Emden-Meyerhof Glikolizi:

Şekil 2.5'de görüldüğü gibi glikolize giren her mol glikoz için 2 mol ATP, 2 mol indirgenmiş nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) üretilir ve glikoz pirüvata kadar okside edilir. Pirüvat NADH tarafından laktata indirgenebilir. Sabit koşullar altında laktat üretimi 2,3-2,5 mM / litre / saatdir. *Emden-Meyerhof* glikolizinin son ürünleri olan pirüvat ve laktat vücudun diğer kısımlarına metabolizmaları için giderler [1, 25, 29, 30].

NADH; mitokondrisi olan hücrelerde oksidatif fosforilasyona girer, ancak eritrositlerde methemoglobinin indirgenmesinde kullanılır. Hemoglobindeki Fe^{+2} (ferro) oksitlenince Fe^{+3} (ferri) olur ve methemoglobin oluşur. Methemoglobin hemoglobinin % 1'inden az olmalıdır, çünkü oksijen taşıyamaz [1, 29, 30].

Eritrositte hücre içi pH düşerse glikoliz sırasında oluşan ara ürünlerden biri olan 1,3 bifosfogliserat 2,3 bifosfogliserata dönüşür. Böylece hemoglobinin oksijene afinitesi azalır, ama ATP'de üretilmemiş olur. Bu yüzden bu yolağa enerji şalteri, değiştiricisi (*Rapoport Luebering shunt*) denir. 2,3 bifosfogliserat deoksihemoglobine bağlanarak oksihemoglobininin oksijen-Hb dissosiasyon eğrisini sağa kaydırır. 2,3 bifosfogliserat artışı anemiye verilen ilk cevaplardan biridir. Hücre içi derişigi 4 mM/L olduğu zaman aynı hemoglobin derişiginde oksijen salınımını % 40 arttırır [1, 25].



Şekil 2.5: Embden-Meyerhof glikolizi.

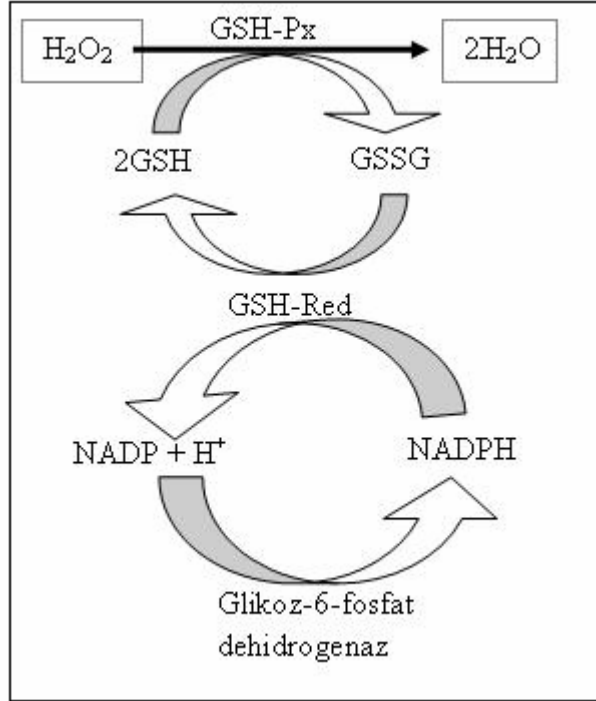
Heksoz Monofosfat (Oksidatif Pentoz Fosfat) Yolu:

İstirahat sırasında glikozun yaklaşık %10'unun yöneldiği bu yolun amacı indirgenme elemanlarını üretmektir. Heksoz monofosfat yolunda her mol glikoz için 2 mol nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) üretilir. NADPH eritrositde glutasyonun indirgenmesinde kullanılır. NADPH ayrıca katalaz aktivitesi için de önemlidir. Bu yolun etkinliği büyük ölçüde NADPH / NADP⁺ (okside nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) oranıyla belirlenir [1, 25].

2.1.8. Eritrositlerde Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri:

Eritrositler önemli bir antioksidan olan glutasyon açısından zengindirler. Glutasyonun fonksiyonel grupları proteinlerin ve diğer makromoleküllerin yüklü kısımlarıyla reaksiyona girerler. En önemli reaktif grup sistein yan zincirinde yer

alan sülfidril grubudur. Bu grup bir elektron donörü gibi davranır. Böylece indirgeme işlemi ve serbest radikal süpürücü etkisini gösterir [25].



Şekil 2.6: Glutasyonun hidrojen peroksit (H₂O₂) detoksifikasyon reaksiyonu. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), indirgenmiş glutasyon (GSH), okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz (GSH-Red).

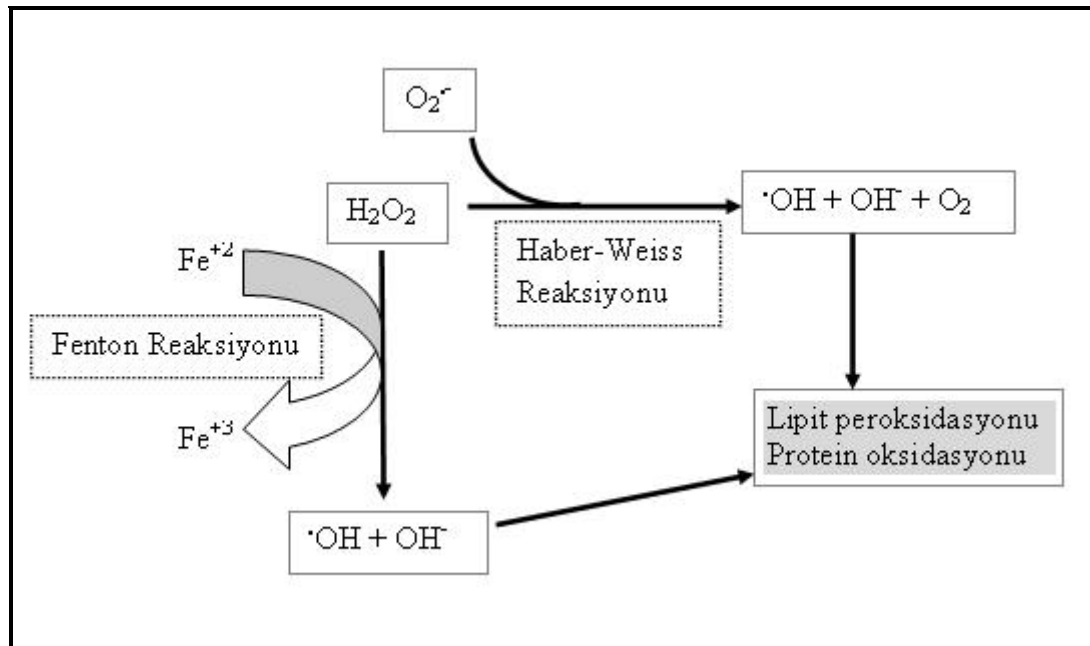
Fizyolojik koşullar altında %95-99 arasında glutasyon (GSH) indirgenmiş halde bulunur. Okside glutasyonun (glutasyon disülfid, GSSG) miktarı oksidatif stres ile artar. Bu iki glutasyon iki enzim ile birbirlerine çevrilirler: glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon redüktaz (GSH-Red). GSH-Px glutasyonun fonksiyonu açısından en önemli reaksiyonu katalizler: hidrojen peroksidin (H₂O₂) ve diğer hidroperoksidazların indirgenmesinde görev alır. Bu süreçte ortaya çıkan GSSG GSH'ye dönüştürülür ve bu reaksiyon GSH-Red ile katalizlenir. Bu GSH-Red reaksiyon için indirgenme eşiti pentoz fosfat yolundan temin edilir (NADPH+H⁺). Pentoz fosfat yolunun anahtar enzimi glüköz-6-fosfat dehidrogenaz enzimidir (Şekil 2.6). Glutasyon GSH-Px enziminin katalizlediği reaksiyon ile Hb, diğer proteinler ve zar içeriklerini oksidasyona karşı korur. GSH-Px enziminin dört alt ünitesinin her

biri birer selenyum atomu içerir. Organik hidroperoksitlerin indirgenmesinde bu selenyum içeriği görev alır [25, 31].

Eritrositleri oksidan hasara karşı korumada yer alan ikinci bir endojen antioksidan da katalazdır (CAT). H_2O_2 detoksifikasyonunda yer alan CAT bu molekülü hücre için zararsız bir molekül olan suya dönüştürür [32].

Eritrosit diğer hücrelerin aksine tüm vücudu dolaşan ve her yere ulaşabilen antioksidan savunma sistemine ait bir hücredir [25]. Bundan dolayı birçok durumda eritrositlerin antioksidan kapasitesi incelenmiştir [32, 33].

Eritrositler ATP döngüsüne göre etkilenen, kısa yaşama sahip hücrelerdir. Pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasında yer alan dengenin bozulması oksidatif stres ile sonuçlanır [34, 35]. Pro-oksidan faktörler ile zayıflatılan antioksidan savunma sistemi sonucunda oksidan stres artar [36].



Şekil 2.7: Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu ile bunların sonucunda lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonunun oluşumu. Superoksit anyonu ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$).

Fenton reaksiyonu olarak bilinen ve geçiş elementlerinden Fe^{+2} etkisi ile H_2O_2 'den en potent serbest radikal olan $\cdot OH$ oluşturan reaksiyon, eğer ortamda yeterince H_2O_2 varsa gerçekleşir [37]. Hem endojen hem de eksojen antioksidan sistemlerden kaçan bu radikal daha toksik bir radikal olan $\cdot OH$ dönüşmesi sonucunda

hücrede reaktif oksijen türevlerinin (ROS) hasarı ile karşılaşılır. Normalde superoksit anyonu ve H_2O_2 orta derecede biyolojik olarak aktif moleküllerdir. Biyolojik olarak aktif olmaları bakır ve

demir moleküllerinin varlığına bağlıdır. Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu $\cdot OH$ oluşumunu gerçekleştiren reaksiyonlardır (Şekil 2.7) [37].

Reaktif oksijen türevleriyle (ROS) oluşan hasarın gösterilmesinde kullanılan en önemli parametrelerden biri lipit peroksidasyon indeksi olan malondialdehittir (MDA) [32]. Diğer önemli hücre elemanlarından olan proteinlerin oksidan hasara maruz kalmaları sonucunda protein oksidasyonu meydana gelir. Protein oksidasyonunu göstermek için kullanılan parametre protein karbonil miktarıdır [38]. Yapılan çalışmalarda lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonunun oksidan hasarın göstergesi olarak kullanıldığı görülmektedir.

2.1.9. Eritrositlerde Oksidatif Stresin Ozmotik Frajiliteye Etkisi:

Eritrositlerde serbest oksijen radikalleri, doymamış yağ asitleri ve proteinlerle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna ve protein yıkımına neden olurlar. Lipit peroksidasyonu eritrosit zar komponentlerinde polimerizasyona yol açar ve en önemli göstergesi de MDA'dır [39-42]. Eritrositlerde oksidatif hasar aynı zamanda globulin ile spektrinin çapraz bağlanmasını uyarır. Eritrosit zarındaki band 3, ankrin, glikoforin gibi bileşenlerin zardaki dağılımını etkiler ve protein hasarına yol açar [39, 43]. Polimerizasyon ve çapraz bağlanma çift katlı lipit zarının iç tabakasında bozulmaya yol açarak eritrositde *diskosit-ekinosit* şekil değişikliğine neden olur. Bu şekil değişikliği eritrosit zarının sertliğini artırır, deformabilitesini azaltır ve eritrositlerin ozmotik frajilitesini artırır [39, 41, 44, 45].

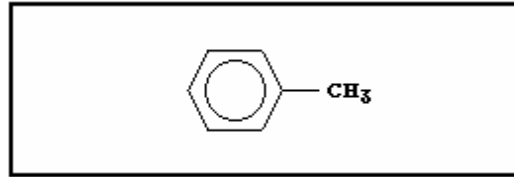
Srouf ve diğ. [46]'nin yaptıkları çalışmada ROS kaynağı H_2O_2 ve askorbat/ Fe^{+2} 'ye maruz bırakılan eritrositlerde lipit peroksidasyonunun göstergesi MDA ve protein hasarının göstergesi alaninin üretimi artmıştır. MDA ve alanin üretimiyle doğru orantılı bir şekilde ozmotik frajilite artmıştır. Oksidatif stresin neden olduğu lipit peroksidasyonunun ozmotik frajiliteyi artırdığını gösteren başka bir çok çalışma da vardır [47-49]. Ancak Allegra ve diğ. [50]'nin yaptığı bir çalışmada altı saat boyunca MDA'ya maruz bırakılan eritrositlerde hemolitik direncin arttığı bildirilmiştir ve bu durum hücrelerden K^+ 'la birlikte H_2O 'nun çıkışıyla açıklanmıştır. Diğer yandan H_2O_2 'e 60 dakika maruz bırakılmadan önce

çeşitli tıbbi bitkilerle korunan eritrositlerde ozmotik frajiliteyle lipit peroksidasyonu ve protein hasarı ilişkisi incelenmiş, protein hasarıyla ozmotik frajilite arasında güçlü bir korelasyon bulunurken, lipit peroksidasyonunun ozmotik frajilitede belirleyici faktör olmadığı kaydedilmiştir [51].

2.2. Toluen:

Toluen, benzene benzer tatlı, keskin bir kokusu olan, uçucu, renksiz, güçlü ışık kırıcı, berrak bir sıvıdır [52, 53]. Bir organik çözücü olarak endüstride kullanılan tinerin temel bileşenidir. Aromatik hidrokarbonlar grubundandır [52]. Bir metil grubunun benzen molekülünün bir hidrojen atomuna yerleşmesiyle oluşur [54]. Kimyasal ismi metil benzendir, kimyasal formülü $C_6H_5CH_3$ 'dür (Şekil 2.8). Toluol, metil benzol, fenil metan, metasit isimleriyle de anılır [54-56].

Toluen $4,4\text{ }^{\circ}C$ ($40\text{ }^{\circ}F$)'nin üstündeki sıcaklıklarda yanıcıdır, ayrıca oda sıcaklığında oldukça tehlikelidir. Uçucudur, buharı havadan ağırdır ve oda tabanında birikebilir. Bir çok organik çözücüyle kolaylıkla karışabilir, fakat suda az çözünür. Yoğunluğu sudan azdır ve su yüzeyinde bir tabaka oluşturur [53].



Şekil 2.8: Toluenin kimyasal yapısı.

Kimyasal Formülü:	C_7H_8
Rölatif moleküler ağırlığı:	92,13
CAS kimyasal adı:	Fenilmetan
CAS kayıt numarası:	108-88-3
RTECS kayıt numarası:	XS 5250000
Genel eş anlamlısı:	Metil benzen
Diğer isimleri:	Metasit, metilbenzol, toluol [54]

Metilsiloheksan (*Methylcyclohexane*) içeren petrol ürünlerinin katalitik olarak dehidrate edilmesiyle ana içeriği toluen olan teknik ürünler elde edilir. Bu ürünlerin saflaştırılması parafin hidrokarbonlar, napthen hidrokarbonlar veya alkoller

ile azeotropic damıtmayla olur. Toluenin saflık derecesi üretim metotlarının çeşitliliğinden dolayı çok değişir [54].

2.2.1. Toluenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri:

Molekül ağırlığı:	92,1 dalton	[53]
Spesifik özgül ağırlık (20 °C):	0,8623	[57]
Dansite (g/mL, 20 °C):	0,8669	[57]
Erime noktası:	-95 °C	[57]
Kaynama noktası (760 mmHg):	110,6 °C (232 °F)	[57]
Gaz özgül ağırlığı:	3,2 (hava=1)	[53]
Buhar basıncı (25 °C):	28,7 mm Hg	[57]
Buhar dansitesi (air = 1):	3,20	[57]
Havada satürasyon yüzdesi:	3,94	[57]
(760 mm, 26 °C)		
Tutuşma sınırı:	1,17 - 7,10	[53, 54]
(Havada yüzde hacmi)		
Kapalı bir kaptaki parlama noktası:	4,4 °C	[53, 54]
Spontan ateş alma noktası:	552 °C	[54]
Çözünürlük:		
Su:	% 0,07 (23 °C)	[53]
İçme suyu (25 °C):	535 mg/litre	[58]
Deniz suyu (25 °C):	380 mg/litre	[58]
Uyarı özelliği:	8 ppm'de duyulabilen tatlı, aromatik koku	[53]

Çevre sıcaklığında berrak, renksiz bir sıvı olan toluenin benzene benzeyen tatlı bir kokusu vardır. Toluen kokusu için havadaki eşik değer 9,4 mg/m³ saptanmıştır [54].

Toluen güçlü oksidan maddelerle reaksiyona girer, okside materyallerden ayrı bir yerde saklanması gerekir [53].

2.2.2. Toluen Üretimi ve Kaynakları:

Primer olarak ham petrolün damıtılmasıyla elde edilen toluen ABD'de en çok üretilen kimyasallar arasında yer alır [53]. 19. yy'nın son kısımlarında kömür karbonizasyonu toluenin ana kaynağını oluşturuyordu. II. Dünya Savaşı'ndan sonra

petrol kaynaklı toluen üretimi giderek arttı ve kömürden üretim giderek düştü. Toluene günümüzde başlıca rafinerilerde (% 87), etilen ve propilen üretimi sırasındaki kaçan buharlardan (% 9) ve (% 4) diğer süreçlerden üretilmektedir. Ayrıca toluenin doğal kaynakları olarak bazı bitki türleri de vardır [54].

2.2.3. Toluene Kullanım Alanları:

Toluene önemli bir kimyasal ürün ve çözücüdür. Diğer çözücüler benzen ve ksilenden çok daha fazla miktarlarda kullanılır. Çözücü olarak boyalarda, mürekkeplerde, incelticilerde (tiner), sıva ve astarlarda, yapıştırıcılarda, verniklerde ve de diğer solvent gerektiren bileşiklerde kullanılır [53, 54]. Oktan miktarını artıran bir komponent olarak (ABD’de yıllık üretilen toluene %95’inden fazlası) benzine karıştırılır. Toluene diisosiyanat, benzoik asit, benzaldehit, ksilen, toluene-sulfonilkloroid gibi kimyasalların büyük miktarlarda organik sentezinde kullanılır. Son olarak özel denatüre alkollerin denatürasyonunda denatüre edici madde olarak kullanılır [54]. Sonuçta toluene boya ve astar kaplama endüstrileri, mürekkep yapımı, yapıştırıcıların içi, kauçuk ve deri endüstrisinin çeşitli dalları gibi geniş kullanım alanları vardır [53, 55, 56].

2.2.4. Toluene İnsana Maruziyet Yolları:

Toluene maruziyet başlıca inhalasyon yoluyla olmak üzere deri, mukoza ve gasrointestinal sistem yoluyla gerçekleşmektedir [59]. Genel popülasyonun toluene maruziyeti nispeten azdır ve kent havasının inhalasyonu, oral alım, toluene deriye veya mukozaya temasıyla olabilir. 1982 yılında atmosferi moniterize ederek elde edilen bilgilerle bütün dünyada kentlerde oturanların oldukça yüksek düzeylerde toluene maruz kaldıkları iddia edilmiştir [60]. Toluene oral alımı toluene içeren içme suyu tüketimi veya toluene içeren sularda yaşayan balıkların tüketimiyle olmaktadır. Deriye temas için ise üç olası yol vardır. Toluene içeren solventlerin, kozmetik ürünlerinin veya taşıt yakıtlarının kullanımınıdır. Kozmetik ürünleri diğer iki kaynakla karşılaştırıldıklarında daha az toluene içermelerine rağmen genel popülasyonun bunlarla maruziyeti daha fazladır [54].

Fakat toluene asıl maruziyet geniş kullanım alanları nedeniyle boya sanayi, ayakkabı üretim merkezleri, petrokimya endüstrisi, matbaacılık, yapıştırıcı üretimi ve farmasötik endüstri gibi birçok iş kolunda çalışanların mesleki maruziyetidir [53,

55, 56]. Bu meslek gruplarında toluene maruziyet genel popülasyondan çok daha fazladır [54].

Toluene maruziyetin çoğu inhalasyonla olur [53, 59]. Toluen kokusu toluenin tehlikeli derişikleri için yeterli bir uyarı sağlamış olmasına rağmen duysal eşik değeri olan 8 ppm derişiginde 15 dakika maruziyet olfaktor yetersizliğe yol açar [53, 54].

Toluen akciğerlerden kolaylıkla ve hızlıca absorbe olur. İnsanlarda inhale edilen toluenin ne kadarının emilime uğradığı farklı yazarlar tarafından farklı bildirilmiştir. Bildirilen bu emilim oranları %40 ile %60 arasında değişmektedir [53, 54, 61-64].

Sıvı toluene maruz kalan deriden toluenin emilime uğradığı gösterilmiştir [65]. Ayrıca sıvı toluenin tekrarlayan veya uzun süren deriye teması çatlaklar ve deri soyulması nedeniyle deriyi hasarlayabilir. Sağlam deriden toluen emilimi yavaş olmasına rağmen perkütan toluen emilimi ciddiye alınacak düzeydedir. Mukoza zarlarına toluen buharı çok hafif irritandır, fakat sıvı toluenin göze sıçraması kornea hasarıyla sonuçlanabilir [53].

Oral yolla alınan toluenin emilimi, solunum yolundan alınan toluenin emiliminden çok daha az olmaktadır [54]. Fakat oral yolla toluenin alınımı inhalasyon yoluyla alınmasındaki gibi vücutta sistemik etkilere yol açabilmektedir [53].

Toluene sekonder kontaminasyon riski vardır. Ancak sadece toluen buharına maruz kalmakla sekonder kontaminasyon riski oluşmaz. Toluen gazının içerisinde bulunan veya sıvı toluenle direkt temas eden elbisenin deriye teması sonucu sekonder kontaminasyon oluşabilir [53].

Çocuklar yetişkenlerle aynı düzey toluen buharına maruz kaldıklarında bu doz onlar için yüksek kabul edilir, çünkü onların akciğer yüzey alanı / vücut ağırlığı ve akciğer dakika hacmi/ vücut ağırlığı daha büyüktür. Ayrıca çocuklar, toluen buharı havadan ağır olduğu için toluen derişiginin daha çok olduğu oda tabanına daha yakın konumda soluk alıp verirler. Çocuklarda toluenin farmakokinetik etkilerinin yetişkinlerden farklı olduğuna dair bir bilgi yoktur. Toluen plasentaya geçebilir ve anne sütüne salınımı vardır [53].

Toluene maruziyet sınırları Şekil 2.9' de gösterilmiştir.

2.2.5. Toluen Metabolizması:

Toluenin arteriyel kan miktarıyla alveoler hava miktarının ilişkisi doğrusaldır. Bundan dolayı alveoler havadaki toluen miktarı arttıkça arteriyel kandaki toluen miktarı artar. Toluene maruziyetin sonlanmasından hemen sonra alveoler havadaki ve arteriel ve venöz kandaki toluen derişği hızla düşer ve daha sonra düşüş oranı giderek azalır [54, 66, 67].

İzin verilen maruziyet sınırı :	200 ppm (8 saatlik çalışma ortalaması)
İzin verilen üst sınır :	300 ppm
Kısa süreli maruziyet sınırı:	500 ppm (10 dakikalık maruziyet)
Yaşamı veya sağlığı tehdit eden anlık sınır :	500 ppm

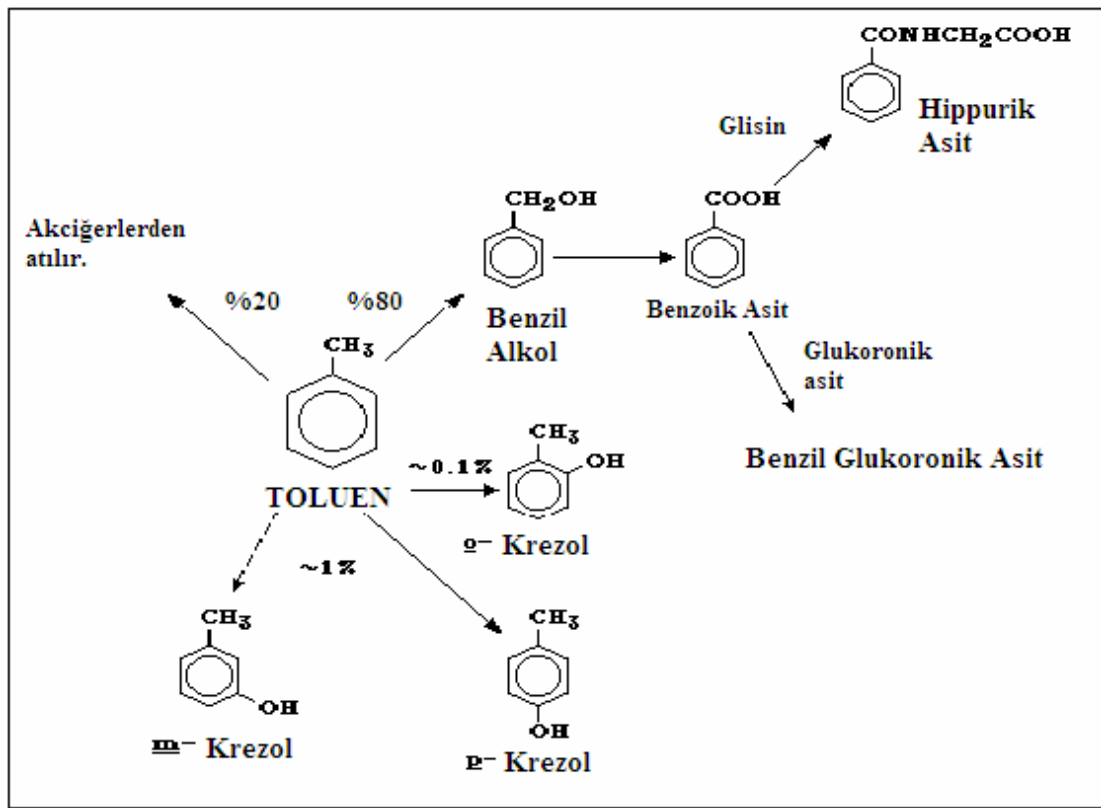
Şekil 2.9: Toluene maruziyet sınırları.

İnhalasyonu takiben toluenin kan düzeyi hızla artar. Kandaki başlangıç yarı ömrü ortalama 4,5 saattir [68]. Eritrositler toluenin tutulması ve taşınmasında önemli bir rol oynar. Toluen kanda başlıca Hb ve plazma proteinleriyle taşınır. Bu durum insan ve sıçan kanında farklılık gösterir. 2 saat süreyle 500 ppm toluen inhale eden sıçanların kanındaki toluenin % 66'sının eritrositlerde bulunduğu, *in vitro* toluene maruziyet ile bu oranın sıçan kanında % 70, insan kanında % 43 kadar olduğu bildirilmiştir [69]. Toluenin vücuttaki dağılımını belirleyen faktör, vücut sıvıları ve dokularındaki toluen çözünürlüğüdür. Lipitte çözünürlüğünün fazla olması nedeniyle yağ dokusu, yağdan zengin dokular ve damarlanması fazla olan dokularda birikir. Karaciğer, böbrek, beyin ve kanda en yüksek konsantrasyonda bulunur [54, 68]. Vücut yağ dokusu fazla olan kişilerde uzamış toluen maruziyetinde toluenin eliminasyonu da uzar [54, 62].

Toluenin metabolizması çok hızlıdır. Toluenin idrarla atılan metabolitlerinden biri olan hippürik asidin idrarla atılımı toluen inhalasyonundan otuz dakika sonra yükselir. Toluene dört saat sürekli maruziyet sonucunda üriner hippürik asit seviyesi (havada ortalama toluen derişği 350mg /m³) kararlı hale ulaşır [54, 67, 70, 71].

Toluen başlıca karaciğerde metabolize olur. Hücrelerde endoplazmik retikulumda bulunan oksidazlar tarafından okside edilerek benzil alkole dönüştürülür. Sonrasında sitoplazmik alkol dehidrogenaz, benzil alkolü benzil

aldehide dönüştürür. Benzil aldehit de aldehit dehidrogenaz ile benzoik aside çevrilir [52, 54]. İn hale ve absorbe edilen toluenin yaklaşık % 80'i benzoik aside dönüşür. Çünkü absorbe edilen toluenin yaklaşık olarak % 20'si akciğerler vasıtasıyla değişmeden atılır [54, 63]. Benzoik asit karaciğer mitokondrial enzimlerinin yardımlarıyla glisinle konjuge edilir ve hippurik asit oluşturulur. Hippurik asit ise idrar ile atılır (Şekil 2.10) [52, 54]. İn hale edilen toluenin % 60-70'i hippurik asit olarak atılır [54]. Toluene farklı derişiklerde maruz kalmış işçilerde hippurik asit atılım düzeyleri geniş bir aralık göstermektedir [54].



Şekil 2.10: Toluene metabolitleri.

Benzoik asidin küçük dozları glukuronik asitle birleşebilir ve idrarda benzil glukuronik asit olarak atılabilir. % 1'den az toluene ise sülfat ve glukuronit birleşikleri orto, meta, para krezol bileşiklerine dönüştürülür ve bu şekillerde idrarla atılır [54, 72].

Bir haftalık maruziyetten sonraki 24 saat içinde toluen ve metabolitleri vücuttan hemen hemen tamamen elimine olurlar. Yağ dokusunda bulunan toluenin yarı ömrü 0,5 ila 2,7 gündür [54].

2.2.6. Toluenin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri:

Toluenin biyolojik etkileri güçlü lipofilik özelliği nedeniyle muhtemelen hücre zarında birikmesine dayanır. Hücre zar transportunu bozar. Bu durumdan ilk etkilenen hücreler merkezi sinir sistemi hücreleridir. Bu özelliği anestetik maddelerle benzerdir [54, 72, 73].

Toluenin akut etkileri alkol intoksikasyonuna benzetilebilir. Öfori, rahavet hissi, baş ağrısı, baş dönmesi, konfüzyon, bulantı, bulanık görme, ataksi, tremor, yargı bozukluğu, halüsinasyonlar, nöbet gibi merkezi sinir sistemi bulgularıyla birlikte ventriküler aritmi, kimyasal pnömoni, solunum depresyonu, bulantı, kusma ve elektrolit dengesizliği görülebilir. Ağır olgularda koma, kovülziyon ve akciğer yetmezliğine bağlı ölümler rapor edilmektedir [53, 54, 59].

Toluenin kronik intoksikasyon bulguları spesifik değildir. Yorgunluk, bitkinlik, iştahsızlık, bulantı, kusma, baş ağrısı, sinirlilik, hafıza kayıpları, konsantrasyon güçlüğü gibi merkezi sinir sistemi şikayetlerinin yanısıra otonomik disfonksiyon, vestibulo-oküler bozukluk, embriyonik, endokrin, renal ve hepatik hasarlara da yol açabilmektedir [56, 59, 74].

Toluene 200 ppm'den daha az kronik maruziyetler baş ağrısı, yorgunluk ve bulantıyla kendini belli eder. Tekrarlıyan 200-500 ppm toluen maruziyetine uğrayan işçilerde koordinasyon (uyum) azalması, unutkanlık ve iştah kaybı bildirilmiştir. Bazı işçilerde geri dönüşümlü optik sinir hasarı gelişebilir. Tinerin kötü kullanımına bağlı kronik toluen maruziyeti kalıcı nöropsikiyatrik bozukluklarla sonuçlanabilir. Kas hasarı, kardiovasküler bozukluklar, renal tubüler hasar ve ani ölüm kronik toluen kötü kullanımında görülmüştür [53].

Merkezi Sinir Sistemine Etkileri:

Toluen merkezi sinir sistemi üzerine depressif etki de, eksitator etki de yapabilir [54, 59]. Toluenin nöron proteinlerinin normal fonksiyonlarına engel olduğu ileri sürülmüştür. Toluen toksitesinin nedeninin toluen metabolitlerine bağlı

olduğu da ileri sürülmüştür. SSS toksitesi genellikle maruziyeti takiben kısa bir süre sonra (30–60 dakika içinde) ortaya çıkar [53].

Toluen insan vücudunda en çok nöron ve glial hücrelerin zarlarını etkiler. Bundan dolayı toluenin esas etkisi SSS üzerinedir. SSS hasarı sonucu en sık görülen sekeller demans ve serebellar fonksiyon bozukluğudur. Uçucu madde bağımlısı kişilerde manyetik rezonans ve bilgisayarlı tomografiyle yapılan incelemelerde beyin kitlesinde azalma, beyaz madde dejenerasyonu, beyaz gri madde ayrımının silinmesi, ventriküllerde genişleme gibi patolojiler gösterilmiştir. Kronik toluen kullanımında SSS'de kalıcı hasar olduğu bildirilmiştir. En sık bilişsel fonksiyonlarda bozulma (demans), serebellar ataksi, optik nöropati, sensorinöral işitme kaybı ve denge bozuklukları gözlenir [75-80].

Solunum Sistemine Etkileri:

Toluen buharına akut maruziyet solunum yolu mukoza zarını hasara uğratar ancak bu etkiler maruziyetden sonraki 6 saat içinde ortaya çıkmaz. Ağır maruziyet akciğerlerde sıvı birikmesi ve solunum durmasına sebep olabilir. Sıvı toluen alınması veya alımından sonra kusulması sırasında pulmoner aspirasyon sonucu kimyasal pnömoni gelişebilir [53].

Kimyasal maddelere maruziyetin yol açtığı reaktif hava yolu disfonksiyonu sendromu veya kimyasal ve iritanlara bağlı astım tipi ortaya çıkabilir [53].

Kardiyovasküler Sisteme Etkileri:

Toluenin yüksek dozları kardiyak bozukluklara yol açabilir. Kalbin epinefrine hassasiyetini artırır, kalp ritmini bozar. Solventlerin kötü kullanımında kardiyak arreste yol açan düzensiz kalp ritmi bildirilmiştir. Sıklıkla şiddetli fiziksel aktiviteden hemen sonra meydana gelir [53].

Kardiyak aritmiler solventin kötüye kullanımına bağlı ölümlere sebep olur. Ancak bu hayvan deneylerinde kardiyovasküler sisteme direkt etki gösterilerek desteklenememektedir. Cevap kişiye göre değişmektedir. 2 saat toluene maruz kalan birisinde sinüs taşikardisi görülürken 3 saat maruz kalan başka bir insanda bradikardi görülmüştür [81-83].

Gastrointestinal Sisteme Etkileri:

Toluen yutulduğu zaman mideyi tahriş eder, bulantı, kusma ve ishale yol açar [53].

Kas ve İskelet Sistemine Etkileri:

29 yaşında 18 yıldır toluen içeren tutkal koklayan bir vakada rabdomyolizin eşlik ettiği kas zayıflığı bildirilmiştir [84].

Karaciğere Etkileri:

Tinerin kötü kullanım sonucu karaciğer hasarı rapor edilmiştir [53].

30-350 ppm arasında mesleki toluen maruziyeti olan çalışmalarda serum enzim seviyelerinde yükselme görülürken [85, 86] bir başka grupta herhangi bir etki görülmemiştir [73, 87].

Matbaa'da çalışan 289 çalışanın 200ppm derişikden daha az bir toluene maruz kalmasına bağılı bilirubin ALP, ALT, AST kan seviyelerinde üst sınırı zorlayan değişiklikler olmuştur ve ALT/AST oranı 1'in üzerinde bulunmuştur [86].

5 yıl boyunca toluene maruz kalan bir boyacıda karaciğerde yağlı dejenerasyon ve lenfosit infiltrasyonu görülmüştür [88].

Renal Sisteme Etkileri:

Şiddetli inhalasyondan sonra idrarda kan ve protein görülebilir. Bu etkiler maruziyetin sonlandırılmasından sonra genellikle kaybolur [53].

Kronik toluen kötüye kullanımı asidoza sebep olabilir ama birçok durumda etkiler geçicidir ve maruziyet azaldığında etkiler geri döner [83, 89, 90].

Metabolik Sisteme Etkileri:

Yüksek doz toluen maruziyeti asit-baz bozukluğuna yol açabilir. Kötü amaçlı tiner kullananlarda elektrolit ve asit-baz bozuklukları renal tubuler asidoz, potasyum ve fosfat yetersizlikleriyle sonuçlanır. Etanol ve aspirin toluenin vücutta yarılanma ömrünü uzatır [53].

Endokrin Sisteme Etkileri:

29 yaşında 18 yıl boyunca toluen kullanan birisi hipotiroidi tanısı almıştır [84]. Beş yıl boyunca tiner (%67 toluen) koklayan 19 yaşında bir kadının otopsisinde

bilateral adrenal hemoraji ve adrenal korteks nekrozuna işaret eden histolojik değişiklikler tespit edilmiştir [91].

Deriye Etkileri:

Toluenin deriyle tekrarlayan veya uzun süren temasları tahrişe yol açabilir. Kızarıklık ve kabarcıklara neden olabilir [53].

Göze Etkileri:

Yaklaşık 300 ppm toluen derişığı gözü tahriş etmeye başlar. İnflamasyon genellikle hafiftir. Toluen gözlere sıçradığı zaman yanma, konjoktivit ve keratit meydana getirebilir [53]. Altı saat boyunca 200ppm veya daha fazla toluene maruz kalanlarda gözde irritasyon bildirilmiştir [83, 92, 93].

Hematolojik Sisteme Etkileri:

İlk kez 1950’li yılların ortalarında toluene kronik mesleki maruziyetin hematolojik anormalliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Günümüzde anemi, lökopeni, hemoglobin (Hb) ve hematokritte (Htc) azalma gibi bu etkilerin çözücünün içinde toluenle birlikte yer alan benzenden kaynaklandığı düşünülmektedir [83]. Toluen veya diğer çözücülerle birlikte toluene maruz kalan işçilerde yapılan bazı araştırmalar hematolojik parametrelerde bulunan anormalliklerin sürekli ve toluenle ilişkili olmadığını bildirmişlerdir [73, 83, 94]. Yine de azalmış lökosit sayısı bazı hayvan çalışmalarında gözlenmiştir [83, 95], fakat diğer bir kısmında da görülmemiştir [96, 97]. Bununla beraber düşüşün geçici olduğuna dair kanıtlarda vardır [83].

Başka bir çalışmada benzen ve toluenin birlikte myelotoksik olduğu görülmüştür. Makrositer ve normositik anemiye, hemoglobin konsantrasyonlarında düşüşe yol açmışlardır. Sıklıkla da anemiye ek olarak görülen nötrofil azalmasına bağlı lökopeniye de neden olmuşlardır. Lenfosit sayılarında ise lenfositoz ile lenfopeni arasında değişen farklı sonuçlar alınmıştır [74].

Tahti ve diğ. [98] küçük deney hayvanlarında 2000 ppm derişikte 48 saatlik toluen inhalasyonunun hematokrit düzeyini artırdığını, 1000 ppm derişigindeki kronik toluen inhalasyonunun ise hematokrit düzeyini etkilemediğini bulmuşlardır.

Kronik toluen inhalasyonunun insanlar üzerinde (100-1000 ppm toluene 1-5 ay maruz kalma ile) karaciğer büyümesine, eritrosit ve lenfositlerin büyümesine yol açtığı gösterilmiştir. Ancak kemik iliği üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir [73].

Toluen metabolitleri *m*- ve *o*-krezolün trombosit agregasyonunu inhibe ederek pıhtı oluşumunu baskılayabileceği ve kanamaya yol açabileceğine dair bilgiler de bulunmaktadır [99].

Genotoksik Etkileri:

Toluene maruz kalan matbaacılarda ve maruziyete uğramayan aynı yerdeki veya yakın bölgelerdeki çalışanlarda periferik lenfositlerin kromozomal kırık analizlerinde kromozomlarda kırıklar gözlenmiştir ve maruz kalanlarda lenfositlerde aberran hücrelere rastlanmıştır [100]. Toluen içeren fabrika havasına maruz kalan ayakkabı yapımında çalışan işçilerin lökositlerinde *Comet* ölçümüyle yapılan bir DNA hasar çalışmasında toluen maruziyetine uğramayan DNA hasarı olan kişilerle kıyaslandığında bir fark olmadığı bulunmuştur [83, 101].

Üreme ve Gelişme Üzerine Etkileri:

Toluenin insan üremesine zararlı olduğu doğrulanmamıştır. Fakat toluenin plesantaya geçtiği ve anne sütüne salındığı bilinmektedir. Hayvan çalışmalarında toluenin fetotoksik olduğu gösterilmiş fakat teratogenik etkisi gösterilmemiştir. Shepard'ın teratogenik ajanslar katalogunda hamileliği sırasında tolueni düzenli olarak kötü kullanan beş annenin çocuğu rapor edilmiştir. Bu çocuklar mikrosefali, SSS fonksiyon bozukluğu, küçük baş ve küçük yüz, karaciğer anomalili olarak doğmuşlardır. Annelerin çoğu hamileliği sırasında alkol de kullanmışlardır. *General Accounting Office* (GAO)' tarafından 1991 yılında yayımlanan "Üreme ve Gelişme Üzerine Etkili Toksikler" listesindende yer alan 30 toksikten biri toluendir [53].

Toluenin Karsinojen Özelliği:

Günde 6,5 saat haftada 5 gün 103 hafta boyunca 0, 600, 1200 ppm toluen uygulanan sıçanlar üzerine yapılan çalışmada 103 hafta sonunda sıçanların hayatta kalma sayıları her bir toluen grubundaki 50 sıçan için erkeklerde 30, 28, 22 dişilerde 33, 35, 30 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar sadece dişi sıçanlarda 1200 ppm doz grubunda görülen bir kaç tümör (1 nasal mukosa squamöz hücreli tümör, 2 adet nadir

böbrek tümörü, 2 adet mide tümörü) dışında herhangi bir organda neoplastik etkiyle ilgili delil olduğunu düşünmemişlerdir [55].

1990 yılında da fareler üzerine yapılan bir çalışmada 103 hafta sonunda kanserle ilgili veya kanserle ilgisiz herhangi bir biyolojik değişiklik görülmemiştir [55]. Sonuçta Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu ve EPA tolueni insanlar için kanserojen olarak sınıflandırmamıştır [53].

2.2.7. Toluenin Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkisi:

Toluenin karaciğer, ince bağırsak, böbrek ve beyin gibi dokularda ROS üretimine ve lipit peroksidasyonuna yol açtığı bilinmektedir [52, 102, 103]. ROS oluşumuna yol açan toluen metabolitleri benzil alkol, benzoik asit ve benzilaldehitdir. En önemlisi benzilaldehitdir [102].

Halifeoğlu ve diğ. [52], en önemli içeriği toluen olan çözücülerle çalışan boyacılarda plazma MDA ve eritrosit SOD, GSH-Px seviyelerinde anlamlı bir artış olduğunu bulmuşlardır. Bu durum boyacılarda lipit peroksidasyonunun arttığı, SOD ve GSH-Px üretiminin uyarıldığı şeklinde yorumlanmıştır. 2002 yılında yine boyacılarda yapılan başka bir çalışmada serum MDA düzeyinde anlamlı bir artış, serum SOD, GSH-Px düzeylerinde anlamlı bir düşüş ve eritrosit katalaz aktivitesinde iki kat artış olduğu bildirilmiştir [104].

Kronik tiner inhale eden adölesanlarda yapılan bir çalışmada eritrosit ve plazma MDA düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Eritrosit SOD aktivitesi yüksek, ancak eritrosit ve plazma GSH-Px aktivitesi düşük bulunmuştur [105].

2.2.8. Toluenin Ozmotik Frajiliteye Etkisi:

Toluen ve diğer organik çözücülerin anesteziğin narkotik özelliklerine benzer birçok özellikleri vardır. Narkotik özellikler taşıyan maddeler düşük derişiklerde eritrositlerin ozmotik direncini artırır [106, 107]. Korpela ve diğ. [108]'nin *in vitro* sıçan eritrositlerinde yapmış oldukları deneylerde toluen 1000 ppm ve üzeri yüksek derişiklerde hemolize neden olurken, 200-500 ppm gibi düşük derişiklerde eritrositlerin ozmotik direncini arttırmıştır. Toluenin ozmotik direnci artırıcı etkisi % 0,30, % 0,35, % 0,40 ve % 0,45'lik NaCl çözeltileri içinde en fazla

% 0,40'lık NaCl çözeltilisinde görülmüştür. Aynı çalışmada toluen inhale eden sıçanların eritrositlerinde de ozmotik fragilitenin azaldığı ve ozmotik direncin arttığı bulunmuştur. Korpela ve Tahti yaptıkları diğer bir çalışmada toluene inhalasyon yoluyla (*in vivo*) maruz kalan sıçanların eritrositlerinde ozmotik direnç artışının maruziyetin sonlanmasından 30 dakika sonra bittiğini, olayın geri dönüşümlü olduğunu bulmuşlardır [108]. İnsan eritrositlerinde ise toluenin ozmotik fragiliteye etkisine dair bir çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Denekler:

Araştırma üç ayrı grup kan örneğiyle yapıldı. Kontrol grubu (n=12), *in vitro* toluen grubu (n=12) ve *in vivo* toluen grubu (n=10).

Ön görüşmeyle bilinen hastalıkları olmadığı ve sigara içmedikleri belirlenen kişiler kontrol grubu ve *in vitro* toluen grubunu, toluene maruz kalan ayakkabı veya boya işçileri *in vivo* toluen grubunu oluşturdu.

3.1.1.Kontrol Grubu:

Ön görüşmeyle bilinen hastalıkları olmadığı ve sigara içmedikleri belirlenen 12 kişi çalışmaya katıldı. Çalıştıkları ortamda toluen tespit edilmeyen denekler “Bilgilendirilmiş Olur Alma” formlarını okuyup imzaladı. Daha sonra deneklerden kan alındı.

3.1.2. *In vitro* Toluen Grubu:

Kontrol grubunu oluşturan 12 kişiden alınan kanlar 300 ppm toluene 30 dakika maruz bırakılarak bu grup oluşturuldu. Bir kişiden alınan kan aynı gün eş zamanlı olarak hem kontrol hem *in vitro* toluen grubu çalışması için kullanıldı.

3.1.3 *In vivo* Toluen Grubu (Mesleksel maruziyet):

Toluene maruz kalan ayakkabı yapımında çalışan 8, plaka basım atölyesinde çalışan 2 işçi çalışmaya katıldı. Çalıştığı ortamda toluen tespit edilen gönüllü, sigara içmeyen işçiler “İşçilerde toluen maruziyetinin izlenmesi” isimli anketi araştırmacıyla birlikte doldurdu. Çalışmaya katılan gönüllü her işçi “Bilgilendirilmiş Olur Alma” formlarını okuyup imzaladı. Daha sonra işçilerden kan alındı.

3.1.4. Anket:

Toluene mesleksel olarak maruz kalan işçilere “İşçilerde toluen maruziyetinin izlenmesi” anketi uygulandı (Ek-1).

3.2. Toluen Ölçümü:

Tüm deneklerin çalıştıkları iş ortamında *Dräger Accuro* (Dräger Safety Inc.) gaz detektör pompasıyla toluen derişği ölçüldü. Ölçüm için toluen 5/b tüpleri kullanıldı. Tüplerin ölçüm aralığı 5-300 ppm’dir.

3.3. Kan Alma:

Denekler oturur pozisyondayken ante-kubital venden kan toplama iğnesinin yardımıyla vakumlu tam kan sayım tüpüne, vakumlu biyokimya tüpüne ve vakumlu heparinli tüpe kan alındı. Tam kan sayım tüpü ve biyokimya tüpü soğuk bir ortamda (+4 °C) Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Acil Laboratuvarına götürüldü. Heparinli tüpten yapılacak ölçümler en geç iki saat içinde gerçekleştirildi ve bu esnada heparinli tüp soğuk bir ortamda (+4°C) tutuldu.

3.4. Tam Kan Sayımı ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü:

Kontrol ve *in vivo* toluen grubunu oluşturan deneklerin tamamında hemogram tüpüne alınan kanda Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Acil Laboratuvarı'nda tam kan sayım parametreleri bakıldı. Tam kan sayım parametreleri şunlardan oluşmaktadır: Eritrosit sayısı, Hb, Htc, eritrositlerde ortalama eritrosit hücre hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), kırmızı hücre dağılım genişliği (RDW), lökosit ve trombosit sayısı. Ölçümler elektronik tam kan sayım cihazıyla yapıldı.

Aynı deneklerden biyokimya tüpüne alınan kanda yine Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Acil Laboratuvarı'nda aşağıdaki biyokimya parametrelerine bakıldı: Alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), kreatinin ve üre. Ölçümler otoanalizör cihazıyla yapıldı.

Laboratuvar sonuçlarında herhangi bir patolojik sonucu olan bireyler deney dışı bırakıldı.

3.5. Ozmotik Frajilite Deneyi:

Stok çözeltisinden hazırlanan farklı derişiklerdeki NaCl çözeltilerinin içine kan örneği eklenip, hemolize uğramış eritrosit hemoglobininin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle saptandı [18].

3.5.1. Stok (*Phosphate Buffered Saline (PBS)*) Çözeltisi:

200 mL. distile su içinde 18,0 g NaCl (Molekül ağırlığı = 58,44g), 2,73g Na₂HPO₄ (Disodyum hidrojen fosfat) (Molekül ağırlığı = 142 g), 0,374g NaH₂PO₄ (Sodyum dihidrojen fosfat) (Molekül ağırlığı = 120 g) çözüldü ve pH (7,4) kontrol edildi. Stok çözeltisi ozmotik olarak %1'lik NaCl çözeltisine eşdeğerdir [18].

3.5.2.Farklı Derişiklerdeki PBS (NaCl) Çözeltileri:

Farklı derişiklerdeki PBS (NaCl) çözeltileri Tablo 3.1.'e göre stok çözeltilisinden hazırlandı.

Tablo 3.1: Farklı derişiklerdeki NaCl çözeltileri.

PBS (NaCl), %	Kör	0,38	0,40	0,42	0,44	0,46	0,48
Distile su, mL	180	124	120	116	112	108	104
Stok çözeltisi, mL	20	76	80	84	88	92	96

3.5.3. Ozmotik Frajlite Ölçümü:

Kör (%0,1), % 0,38, % 0,40, % 0,42, % 0,44, % 0,46, % 0,48 ve stok çözeltilerinden 10'ar mL cam tüplere kondu ve tüpler etiketlendi. *In vitro* toluen grubundaki ölçümler için her bir tüpe 3,5µL (300 ppm) toluen eklendi, tüpler özel yapım cam kapaklarıyla kapatılıp, vortekslendi. Stok çözeltilisinden 9 mL ayrı bir cam tüpe kondu ve tüp etiketlendi. Denekten alınan kanla dolu heparinli tüp santrifüj edilip, serum uzaklaştırıldı. Dipten alınan 1 mL eritrosit 9 mL'lik stok çözeltilisinin üzerine eklendi, üstü parafinle kapatılıp bir kaç kez altyüz edilerek karıştırıldı ve tüpün hematokrit değeri bakıldı. Yaklaşık %10'luk bir hematokrit değeri elde edilememişse işlem tekrarlandı. 10'ar mL'lik kör, % 0,38, % 0,40, % 0,42, % 0,44, % 0,46, % 0,48, stok çözelti tüplerinin her birine % 10'luk eritrosit çözelti tüpünden 250 µL çözelti eklendi ve üstleri parafin veya cam kapakla kapatılıp bir kaç kez altyüz edilerek karıştırıldı. Kör etiketli tüpe küçük bir miktar saponin eklenerek tekrar altyüz edilerek karıştırıldı. Tüpler 37 °C'lik su banyosunun içinde 30 dakika bekletildi ve santrifüj edildi. Çözeltilerin süpernatant kısımlarının optik dansiteleri 540 nm'de Helios Gamma UV-Visible Spektrofotometreyle okundu.

3.5.4. Sonuçların Hesaplanması:

Her bir tüpdeki hemoliz oranı aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\text{Hemoliz yüzdesi} = (\text{Örnek tüpün optik dansitesi} / \text{Kör tüpün optik dansitesi}) \times 100 \text{ [18].}$$

3.6. Kontrol ve *In vitro* Toluen Gruplarında MCV Ölçümü:

Kontrol ve *in vitro* toluen gruplarında ozmotik frajilite ölçümü biten hipotonik derişimli veya stok PBS çözelti etiketli tüplerdeki kanlar kullanıldı. Tüpler parafin veya cam kapaklarıyla kapatılıp, altyüz edilerek karıştırıldı, böylece hemolize uğramamış tüpün dibinde bulunan eritrositlerin çözelti içinde dağılması sağlandı. Çözeltiler Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Acil Laboratuvarı'na götürüldü, elektronik tam kan sayım cihazıyla eritrositlerde MCV bakıldı.

3.7. Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü:

3.7.1. Eritrositlerin yıkanması ve paketlenmesi:

Kontrol ve *in vivo* toluen gruplarında ozmotik frajilite ölçümü sırasında santrifüj edilmiş eritrosit paketi ayrılarak -80° C'lik derin dondurucuya konuldu. Oksidatif stres parametreleri ve antioksidan enzim aktiviteleri ölçülene kadar eritrosit paketleri burada saklandı.

In vitro toluen grubunda ise önce 9 mL stok çözeltisine 3,5µL (300 ppm) toluen eklenip vortekslendi. Daha sonra üzerine 1 mL eritrosit paketi eklendi. Cam kapağıyla kapatılan tüp bir kaç kez altyüz edilerek karıştırıldı, 37 °C'lik su banyosunun içinde 30 dakika bekletildi. Tekrar santrifüj edildi. Çözeltisinin süpernatant kısmı atılıp, tüpün dip kısmından alınan 1 mL kan ependorf tüpe kondu ve etiketlendi. -80 °C'lik derin dondurucuda ölçüm gününe kadar saklandı.

3.7.2. Eritrositlerin Parçalanması ve Sulandırılması:

Yıkanıp paketlenmiş olan eritrositler deney günü -80°C'den çıkarıldı. Çözülen eritrositler 5 kat sulandırılarak soğutulmuş deiyonize su ile patlatıldı. Bu çözelti A çözeltisi olarak adlandırıldı. Beş kat sulandırılan bu eritrosit çözeltisinde malondialdehit ve protein karbonil çalışıldı. Daha sonra A çözeltisi de soğutulmuş deiyonize su ile 10 kat olacak şekilde sulandırıldı. Bu eritrosit süspansiyonunda katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri çalışıldı. Farklı oranlarda sulandırılan her iki eritrosit süspansiyonunda potasyum ferrisiyanit ve potasyum siyanit içeren Drapkin çözeltisi ile spektrofotometrik olarak 540 nm de Hb ölçümü yapıldı [109]. Yapılan ölçümlerde *Shimadzu UV 160 A Visible* Spektrofotometresi kullanıldı.

3.7.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü:

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) enzim aktivitesi Aebi'nin metoduna göre yapıldı [110]. pH'sı 7,5 olan 50 mM fostat tamponuna 240 nm de 0,500 optik dansite (OD) ölçülene kadar H₂O₂ eklendi. H₂O₂ eklenmiş tampona ilave edilen numunede azalan absorbans değerleri zamana karşı kaydedildi. Belli zaman aralığında (1 dakika) tüketilen H₂O₂ hızı k/g Hb olarak ifade edildi ($k = [2,3 \times \log (OD_1/ OD_2)] / \Delta t$). Böylelikle katalaz aktivitesi H₂O₂'nin ortamdaki katalaz tarafından tüketilmesi prensibine göre hesaplandı.

3.7.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Ölçümü:

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9) enzim aktivitesi Paglia ve diğ. [111]'nin metoduna göre ölçüldü. H₂O₂ varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatona (GSSG) yükseltgenmesinin katalizlenmesi prensibine göre, NADPH'nin NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasıyla enzim aktivitesi hesaplandı ve birim zamanda okside olan NADPH'nin mikromol miktarı U/g Hb olarak ifade edildi ($((\Delta A/\Delta t)/6,22 \times 10^{-3}) \times 1,495/0,010$).

3.7.5. Malondialdehit (MDA) Miktarının Ölçümü:

Esterbauer ve Cheeseman'nin metoduna göre spektrofotometrik olarak çalışıldı [112]. Triklor asetik asit eklenen örnekler 95°C de 15 dakika inkübasyondan sonra kar ile soğutuldu ve 3000 rpm de santrifüj sonrası üsteki süpernatant alınarak tiyobarbitürik asit ile 95°C'de reaksiyona girmesi sağlandı. İnkübasyon sonrası soğutulan örnekler suya karşı 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Sonuçlar 532 nm'de $\epsilon=153000$ değeri kullanılarak hesaplandı ve $\mu\text{mol/g Hb}$ olarak ifade edildi ($(A/153000) \times 9 \times 0,1 \times 1.000.000$).

3.7.6. Protein Karbonil (PC) Miktarının Ölçümü:

Protein oksidasyonu ölçümünde kullanılan protein karbonil miktarı, karbonil grubunun 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girerek 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturması prensibine dayanmaktadır [113]. PC ölçümü için örnekler triklor asetik asit eklendi ve 11.000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Tortu üzerine HCl içinde hazırlanan 2,4-dinitrofenilhidrazin eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası etanol-etil asetat çözeltisiyle

yıkandıktan sonra NaOH çözeltisinde 37°C'de çözülerek 360 nm'de suya karşı spektrofotometrede okundu. 360 nm'de $\epsilon=22000$ değeri kullanılarak hesaplamalar yapıldı ve $\mu\text{mol/g Hb}$ olarak ifade edildi ($(A/22000) \times 10 \times 0,1 \times 1.000.000$).

3.8. İstatistiksel Yöntem:

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi Windows uyumlu SPSS® 13.0 ile yapıldı. Grupların dağılımları non-parametrik testlerden “*One-sample Kolmogorov-Smirnov Test*” ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım göstermemesi nedeniyle istatistiksel karşılaştırma için non-parametrik testlerden “*Mann-Whithney U Testi*” kullanıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiksel olarak $P<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. Deneklerin genel özellikleri ise ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir.

3.9. Etik Kurul İzni:

Bu araştırma H. Ü. T. F. Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu'nun 20.03.2006 tarih ve LUT 06/17-36 numaralı kararı ile tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Deneklerin Genel Özellikleri:

Tablo 4.1’de kontrol grubunu (aynı zamanda *in vitro* toluen grubunu), Tablo 4.2’de *in vivo* toluen grubunu oluşturan deneklerin genel özellikleri gösterilmiştir. Kontrol grubunun yaş ortalaması 31 ± 5 yıl, kilo ortalaması 85 ± 11 kg ve boy ortalaması 179 ± 6 cm’dir. *In vivo* toluen grubunun yaş ortalaması 40 ± 9 yıl, kilo ortalaması 78 ± 13 kg ve boy ortalaması 171 ± 6 cm’dir.

Tablo 4.1 Kontrol grubunun genel özellikleri (n= 12).

	Minimum	Maximum	Ortalama \pm standart sapma
Yaş (yıl)	26	40	31 ± 5
Kilo (kg)	67	105	85 ± 11
Boy (cm)	168	189	179 ± 6
ALT (U/L)	15,0	54,0	$30,4 \pm 12,9$
AST (U/L)	17,0	35,0	$25,5 \pm 4,3$
Üre	11,0	19,0	$13,8 \pm 2,7$
Kreatinin	0,7	1,3	$0,9 \pm 0,2$
Lökosit (/dL)	4.700	11.400	6.914 ± 1.804
Eritrosit(/dL)	4.740.000	5.650.000	$5.272.166 \pm 251.341$
Htc (%)	41,9	46,9	$44,6 \pm 1,9$
Hb (g/dL)	14,6	16,7	$15,5 \pm 0,6$

Kontrol grubunu oluşturan deneklerde en düşük eritrosit sayısı $4.740.000/\mu\text{L}$, en yüksek eritrosit sayısı $5.650.000/\mu\text{L}$, ortalama eritrosit sayısı $5.272.166 \pm 251.341/\mu\text{L}$ bulundu. *In vivo* toluen grubunda ise ölçülen en düşük eritrosit sayısı $4.270.000/\mu\text{L}$, en yüksek eritrosit sayısı $5.900.000/\mu\text{L}$, ortalama eritrosit sayısı $5.177.000 \pm 521.814/\mu\text{L}$ olarak ölçüldü.

Tablo 4.2 *In vivo* toluen grubunun genel özellikleri (n= 10).

	Minimum	Maksimum	Ortalama \pm standart sapma
Yaş (yıl)	18	48	40 \pm 9
Kilo (kg)	60	92	78 \pm 13
Boy (cm)	160	180	171 \pm 6
ALT (U/L)	11,3	40,2	27,5 \pm 8,9
AST (U/L)	19,2	76,0	30,8 \pm 16,3
Üre	9,5	17,0	14,3 \pm 2,3
Kreatinin	0,6	1,1	0,8 \pm 0,1
Lökosit (/µL)	4.100	8.800	6.650 \pm 1.403
Eritrosit(/µL)	4.270.000	5.900.000	5.177.000 \pm 521.814
Htc (%)	41,0	48,9	45,33 \pm 2,86
Hb (g/dL)	14,2	16,7	15,61 \pm 0,91

Kontrol grubunun deneklerinde ölçülen en düşük Hb miktarı 14,6 g/dL, en yüksek Hb miktarı 16,7 g/dL ve ortalama Hb miktarı 15,5 \pm 0,6 g/dL idi. *In vivo* toluen grubunda ise en düşük Hb miktarı 14,2 g/dL, en yüksek Hb miktarı 16,7 g/dL ve ortalama Hb miktarı 15,61 \pm 0,91 g/dL bulundu.

4.2. Toluene Maruziyet Miktarı:

Kontrol grubunu oluşturan aynı zamanda *in vitro* deneyler için kan alınan 12 denegın çalıştığı işyerlerinde toluen miktarı “0” olarak ölçüldü.

In vivo toluen grubunu oluşturan 10 denek 8 farklı işyerinde çalışıyordu. Bu işyerlerinde ölçülen en düşük toluen miktarı 20 ppm (76,6 mg) (Tüplerin ölçümünde 1 ppm= 3,83 mg/m³, 1mg toluen/ m³=0,26 ppm) [114], en yüksek toluen miktarı 100 ppm (383 mg) idi. İşçilerden dört tanesinin 75 ppm, dört tanesinin 20 ppm, bir tanesinin 100 ppm ve bir tanesinin 50 ppm toluene maruz kaldığı belirlendi.

4.3 *In vivo* Toluene Grubuna Uygulanan Anket Sonuçları:

Uygulanan anketlerin sonucuna göre işçilerden (*in vivo* toluen grubu denekleri) sekiz tanesi haftada yaklaşık 60 saat, iki tanesi 40 saat çalışmaktaydı. Toluene maruz kaldıkları toplam çalışma süresi ortalama 19,8 yıl olarak hesaplandı. İşçilerden hiçbirinin sigara içmediği, dördünün zaman zaman alkol aldığı, altısının

ise hiç alkol kullanmadığı belirlendi. Deneklerden beş tanesi baş ağrısı, beş tanesi taş düşürme, dört tanesi gün içi yorgunluk, dört tanesi uykuya dalmakta güçlük, üç tanesi dikkati toplamakta güçlük, üç tanesi unutkanlık, bir tanesi öksürükten şikayet etmekteydi.

4.4. Kontrol ve *In vitro* Toluen Gruplarında Ozmotik Frajilite Deney Sonuçları:

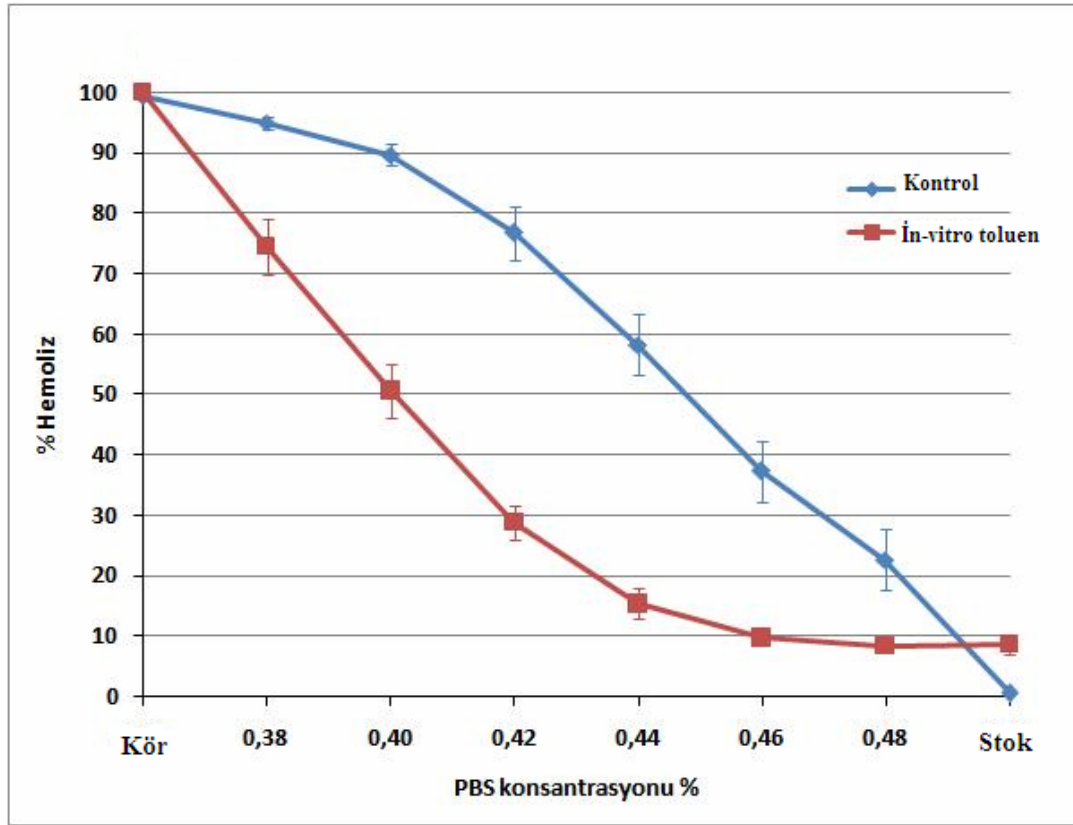
Ozmotik frajilite deney sonuçları karşılaştırıldığında kontrol ve *in vitro* toluen grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Sonuçlar Tablo 4.3 ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Kontrol ve *in vitro* toluen gruplarının eritrosit ozmotik frajilite sonuçları (ortalama \pm standart hata).

PBS derişiği	Kontrol (n=12)	<i>In vitro</i> Toluen (n=12)
% 0,10	99,37 \pm 0,63	100 \pm 0
% 0,38	95,06 \pm 1,05	74,53 \pm 4,67*
% 0,40	89,72 \pm 1,75	50,64 \pm 4,44*
% 0,42	76,7 \pm 4,38	28,78 \pm 2,76*
% 0,44	58,26 \pm 5,08	15,34 \pm 2,49*
% 0,46	37,27 \pm 5,04	9,71 \pm 1,40*
% 0,48	22,67 \pm 5,12	8,29 \pm 0,80*
% 1,00	0,51 \pm 0,11	8,63 \pm 1,59*

* $P < 0,05$ kontrole göre farklı

Kontrol grubunda kör, % 0,38, % 0,40, % 0,42, % 0,44, % 0,46, % 0,48 ve stok PBS çözeltilerinde eritrositlerin hemoliz yüzdesi sırasıyla % 99,37 \pm 0,63, % 95,06 \pm 1,05, % 89,72 \pm 1,75, % 76,7 \pm 4,38, % 58,26 \pm 5,08, % 37,27 \pm 5,04, % 22,67 \pm 5,12 ve % 0,51 \pm 0,11’dir. *In vitro* toluen grubunda aynı PBS çözeltilerinde eritrositlerin hemoliz yüzdesi % 100 \pm 0, %74,53 \pm 4,67, % 50,64 \pm 4,44, % 28,78 \pm 2,76, % 15,34 \pm 2,49, % 9,71 \pm 1,40, % 8,29 \pm 0,80 ve % 8,63 \pm 1,59’dur. Kör çözeltisi dışında tüm çözeltilerde *in vitro* toluen grubunda eritrositlerin hemoliz oranı azalmıştır ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Şekil 4.1’de de toluenin ozmotik frajilite eğrisini sola kaydıracağı görülmektedir.



Şekil 4.1: Kontrol ve *in vitro* toluen gruplarının ozmotik fragilite sonuçları

4.5. Kontrol ve *In vitro* Toluen Gruplarında MCV Sonuçları:

Eritrositlerde MCV değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve *in vitro* toluen grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol ve *in vitro* toluen gruplarında hipotonik derişimli (% 0,44 gibi) çözeltilerden 10 farklı ölçüm ve stok PBS çözeltilisinden 6 farklı ölçüm yapıldı. Hipotonik derişimli çözeltilerden yapılan ölçümlerde kontrol grubunda en düşük MCV değeri 53,2 fL, *in vitro* toluen grubunda en düşük MCV değeri 55,9 fL bulundu. Kontrol grubunda en yüksek MCV değeri 76,7 fL, *in vitro* toluen grubunda en yüksek MCV değeri 72,7 fL idi. On ölçümün ortalaması kontrol grubunda 58,6 fL, *in vitro* toluen grubunda 62,14 fL olarak hesaplandı.

Stok çözeltilerinden yapılan ölçümlerde kontrol grubunda en düşük MCV değeri 67 fL, *in vitro* toluen grubunda en düşük MCV değeri 79,9 fL, kontrol grubunda en yüksek MCV 87,6 fL, *in vitro* toluen grubunda en yüksek MCV değeri

92,5 fL bulundu. Stok çözeltilerinden yapılan altı ölçümün ortalaması kontrol grubunda 80,9 fL, *in vitro* toluen grubunda 85,2 fL olarak hesaplandı.

4.6. Kontrol ve *In vivo* Toluen Gruplarında Eritrositle İlgili Değerler:

Eritrositle ilgili değerler karşılaştırıldığında kontrol ve *in vivo* toluen grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Değerler Tablo 4.4'de görülmektedir.

Tablo 4.4 Kontrol ve *in vivo* toluen gruplarında eritrositlerin özellikleri (ortalama \pm standart hata).

	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)
Kontrol (n=12)	84,90 \pm 0,87	29,49 \pm 0,34	34,71 \pm 0,17	12,95 \pm 0,19
<i>In vivo</i> Toluen (n=10)	87,96 \pm 1,51	30,29 \pm 0,61	34,41 \pm 0,13	13,19 \pm 0,12

Eritrosit özellikleri ortalama \pm standart hata olarak verildi. Kontrol grubunda ortalama eritrosit hacmi (MCV) 84,90 \pm 0,87 fL, ortalama eritrosit hemoglobin (MCH) 29,49 \pm 0,34 pg, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) 34,71 \pm 0,17 g/dL ve eritrosit dağılım genişliği (RDW) % 12,95 \pm 0,19'dur. *İn-vivo* toluen grubunun MCV ortalaması 87,96 \pm 1,51 fL, MCH ortalaması 30,29 \pm 0,61 pg, MCHC ortalaması 34,41 \pm 0,13 g/dL ve RDW ortalaması % 13,19 \pm 0,12'dir.

4.7. Kontrol ve *In Vivo* Toluen Gruplarında Ozmotik Frajilite Deney Sonuçları:

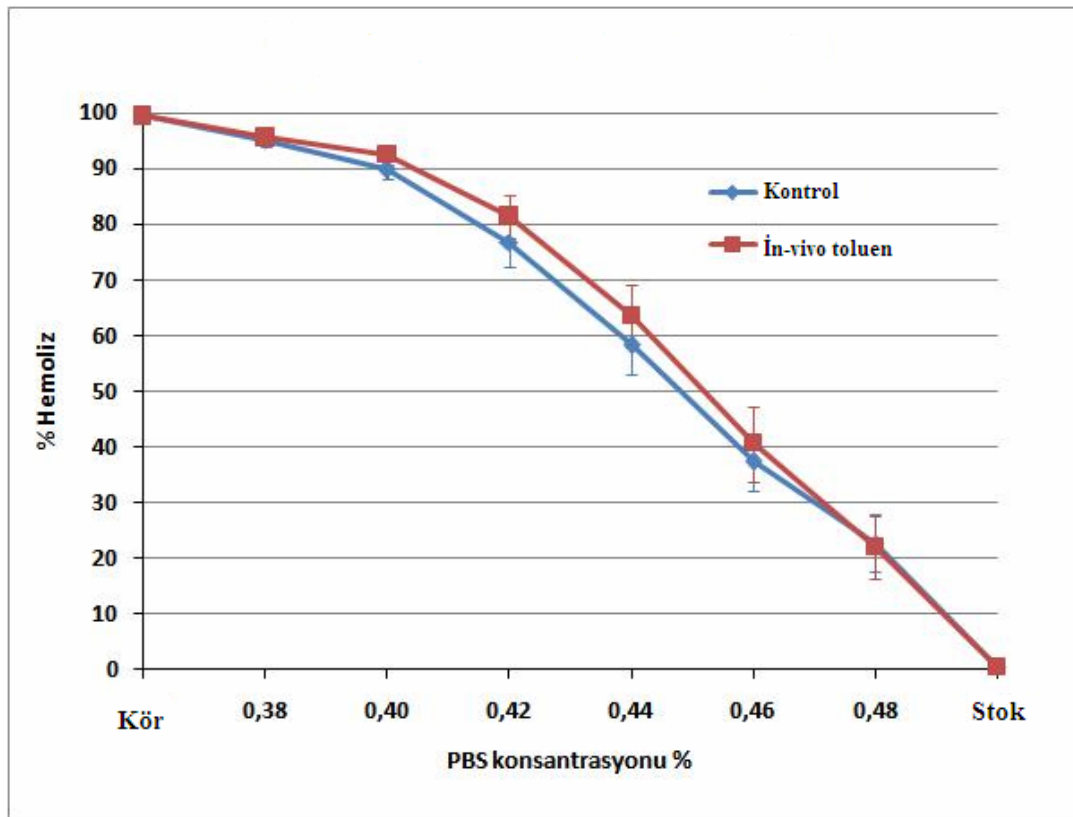
Kontrol ve *in vivo* toluen gruplarında ozmotik frajilite deney sonuçları Tablo 4.5 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda kör, % 0,38, % 0,40, % 0,42, % 0,44, % 0,46, % 0,48 ve stok PBS çözeltilerinde eritrositlerin hemoliz yüzdesi sırasıyla % 99,37 \pm 0,63 (ortalama \pm standart hata), % 95,06 \pm 1,05, % 89,72 \pm 1,75, % 76,7 \pm 4,38, % 58,26 \pm 5,08, % 37,27 \pm 5,04, % 22,67 \pm 5,12 ve % 0,51 \pm 0,11'dir. *In vivo* toluen grubunda kör, % 0,38, % 0,40, % 0,42, % 0,44, % 0,46, % 0,48 ve stok PBS çözeltilerinde eritrositlerin hemoliz yüzdesi sırasıyla % 99,41 \pm 0,42, % 95,57 \pm 1,25, % 92,43 \pm 1,71, % 81,38 \pm 3,92, % 63,46 \pm 5,68, % 40,62 \pm 6,77, % 22,07 \pm 5,69 ve % 0,53 \pm 0,11'dir. Kör, % 0,38, % 0,48 ve stok çözeltilerinde hemoliz yüzdesi kontrol ve *in vivo* toluen grubunda hemen hemen aynıdır. % 0,40, % 0,42, %

0,44 ve % 0,46'lık PBS çözeltilerinde ise *in vivo* tolüen grubunun hemoliz yüzdesinde çok az bir sağa kayma vardır, ama istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 4.5. Kontrol ve *in vivo* tolüen gruplarının ozmotik fragilite sonuçları (ortalama \pm standart hata).

PBS derişiği	Kontrol (n=12)	İşçi (n=10)
% 0,10	99,37 \pm 0,63	99,41 \pm 0,42
% 0,38	95,06 \pm 1,05	95,57 \pm 1,25
% 0,40	89,72 \pm 1,75	92,43 \pm 1,71
% 0,42	76,7 \pm 4,38	81,38 \pm 3,92
% 0,44	58,26 \pm 5,08	63,46 \pm 5,68
% 0,46	37,27 \pm 5,04	40,62 \pm 6,77
% 0,48	22,67 \pm 5,12	22,07 \pm 5,69
% 1,00	0,51 \pm 0,11	0,53 \pm 0,11



Şekil 4.2: Kontrol ve *in vivo* tolüen gruplarının ozmotik fragilite sonuçları.

4.8. Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçüm Sonuçları:

4.8.1. Kontrol ve *In vitro* Toluen Gruplarında Ölçülen Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktivite Sonuçları:

Kontrol eritrositlerinde ve *in vitro* toluene maruz kalan eritrositlerde ölçülen MDA, PC miktarı ile CAT ve GSH-Px aktiviteleri Tablo 4.6'da toplu olarak verilmiştir.

Kontrol eritrositlerinde ortalama MDA seviyesi $0,165 \pm 0,007$ $\mu\text{mol/g Hb}$, toluene *in vitro* ortamda maruz kalan eritrositlerde ortalama MDA seviyesi $0,229 \pm 0,021$ $\mu\text{mol/g Hb}$ bulundu (Tablo 4.6, Şekil 4.3). Kontrol ve *in vitro* toluen grubu eritrositleri arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P < 0,05$).

Tablo 4.6. Kontrol ve *in vitro* toluen gruplarında eritrositlerin MDA, PC miktarları ve CAT, GSH-Px enzim aktivite düzeyleri (ortalama \pm standart hata).

	MDA ($\mu\text{mol/g Hb}$)	PC ($\mu\text{mol/g Hb}$)	CAT (k/g Hb)	GSH-Px (U/g Hb)
Kontrol (n=12)	$0,165 \pm 0,007$	$3,671 \pm 0,227$	$653,6 \pm 68,7$	$90,21 \pm 10,85$
<i>In vitro</i> Toluen (n=12)	$0,229 \pm 0,021^*$	$5,430 \pm 0,650^*$	$455,3 \pm 35,5^*$	$41,11 \pm 2,30^*$

* $P < 0,05$ kontrole göre farklı

Eritrositlerde PC miktarı *in vitro* toluen grubunda ($5,430 \pm 0,650$ $\mu\text{M/g Hb}$) kontrol grubuna ($3,671 \pm 0,227$ $\mu\text{M/g Hb}$) göre daha yüksek bulundu (Tablo 4.6, Şekil 4.4). Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P < 0,05$).

Antioksidan enzimlerden eritrosit CAT aktivitesi kontrol grubu eritrositlerinde $653,6 \pm 68,7$ k/g Hb olarak ölçülürken, *in vitro* toluene maruz kalan eritrositlerde $455,3 \pm 35,5$ k/g Hb oldu (Tablo 4.6, Şekil 4.5). *In vitro* toluene maruz kalan eritrositlerde CAT aktivitesinde gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($P < 0,05$).

Eritrosit GSH-Px aktivitesi kontrol grubunda ortalama $90,21 \pm 10,85$ U/g Hb ve *in vitro* toluene maruz kalan grupta $41,11 \pm 2,30$ U/g Hb olarak ölçüldü (Tablo 4.6, Şekil 4.6). *In vitro* toluene maruz kalan eritrositlerde tespit edilen azalan GSH-

Px aktivitesi kontrol ölçümlerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu ($P<0,05$).

4.8.2. Kontrol ve *In vivo* Toluen Gruplarında Ölçülen Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktivite Sonuçları:

Kontrol ve *in vivo* toluen grubunda eritrosit oksidan-antioksidan parametreleri Tablo 4.7’de toplu olarak gösterilmiştir. Eritrositlerde lipit peroksidasyonunu değerlendirmek için yapılan MDA ölçümleri kontrol grubunda $0,165 \pm 0,007$ $\mu\text{mol/g}$ Hb olarak ölçülürken *in vivo* toluen grubunda $0,232 \pm 0,016$ $\mu\text{mol/g}$ Hb olarak ölçüldü (Tablo 4.7, Şekil 4.3). *In vivo* toluen grubunda görülen yüksek MDA seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklıydı ($P<0,05$).

Diğer bir oksidatif stres parametresi ve protein oksidasyonunun bir göstergesi olan PC miktarı kontrol grubunda $3,671 \pm 0,227$ $\mu\text{mol/g}$ Hb iken *in vivo* toluen grubunda ortalama $7,121 \pm 0,748$ $\mu\text{mol/g}$ Hb ölçüldü (Tablo 4.7, Şekil 4.4). Kontrole göre yüksek olduğu tespit edilen PC miktarları arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($P<0,05$).

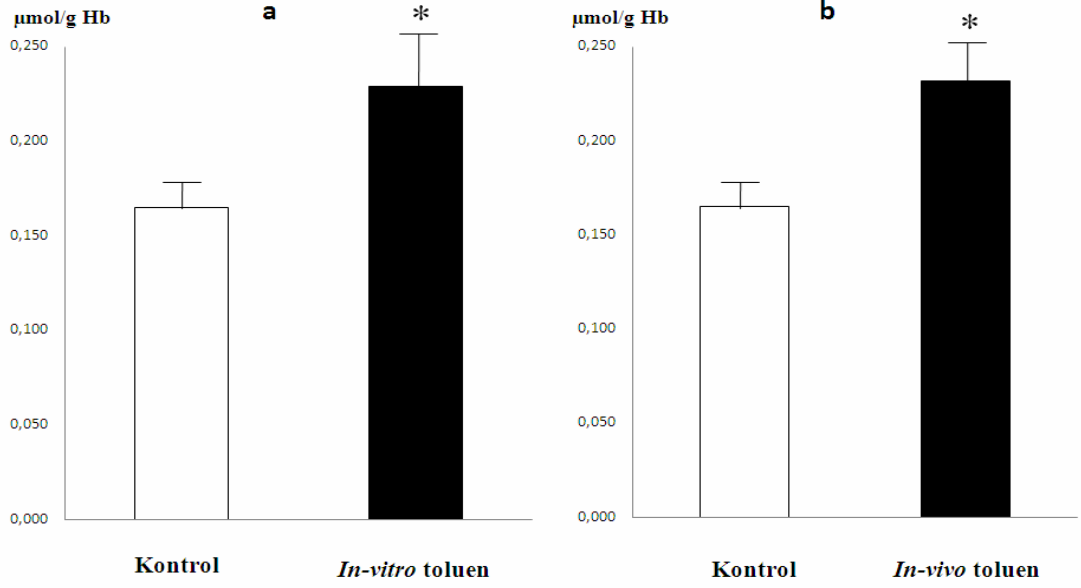
Tablo 4.7. Kontrol ve *in vivo* toluen gruplarında eritrositlerin MDA, PC miktarları ve CAT, GSH-Px enzim aktivite düzeyleri (ortalama \pm standart hata).

	MDA ($\mu\text{mol/g}$ Hb)	PC ($\mu\text{mol/g}$ Hb)	CAT (k/g Hb)	GSH-Px (U/g Hb)
Kontrol (n=12)	$0,165 \pm 0,007$	$3,671 \pm 0,227$	$653,6 \pm 68,7$	$90,21 \pm 10,85$
<i>In vivo</i> Toluen (n=10)	$0,232 \pm 0,016^*$	$7,121 \pm 0,748^*$	$566,8 \pm 35,7$	$45,11 \pm 5,49^*$

* $P<0,05$ kontrole göre farklı

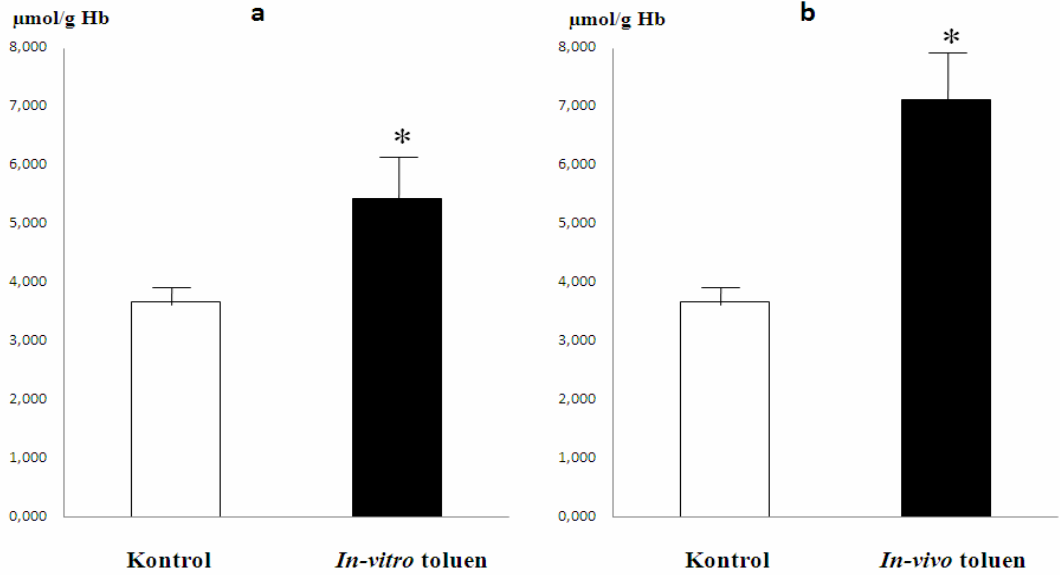
Endojen antioksidan enzimlerden eritrosit CAT aktivitesi kontrol grubunda $653,6 \pm 68,7$ k/g Hb ve *in vivo* toluen grubunda $566,8 \pm 35,7$ k/g Hb olarak ölçüldü (Tablo 4.7, Şekil 4.5). *In vivo* toluen grubunda CAT aktivitesinde gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P>0,05$). Buna karşılık eritrosit GSH-Px aktivitesinin kontrol grubunda ortalama $90,21 \pm 10,85$ U/g Hb, *in vivo* toluen grubunda ortalama $45,11 \pm 5,49$ U/g Hb olduğu tespit edildi (Tablo 4.6, Şekil 4.6). GSH-Px aktivitesindeki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P<0,05$).

MDA Düzeyleri



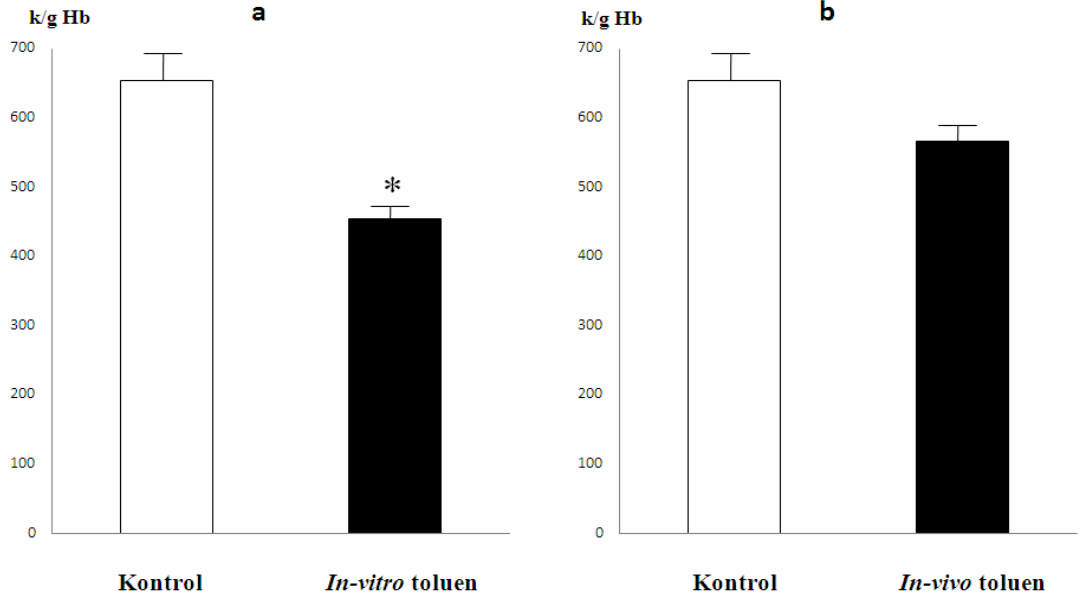
Şekil 4.3: Deney gruplarında eritrosit MDA düzeyleri,
a. Kontrol ve *in vitro* toluen grupları, b. Kontrol ve *in vivo* toluen grupları,
* $P < 0,05$ kontrole göre anlamlı farklı.

Protein Karbonil Düzeyleri



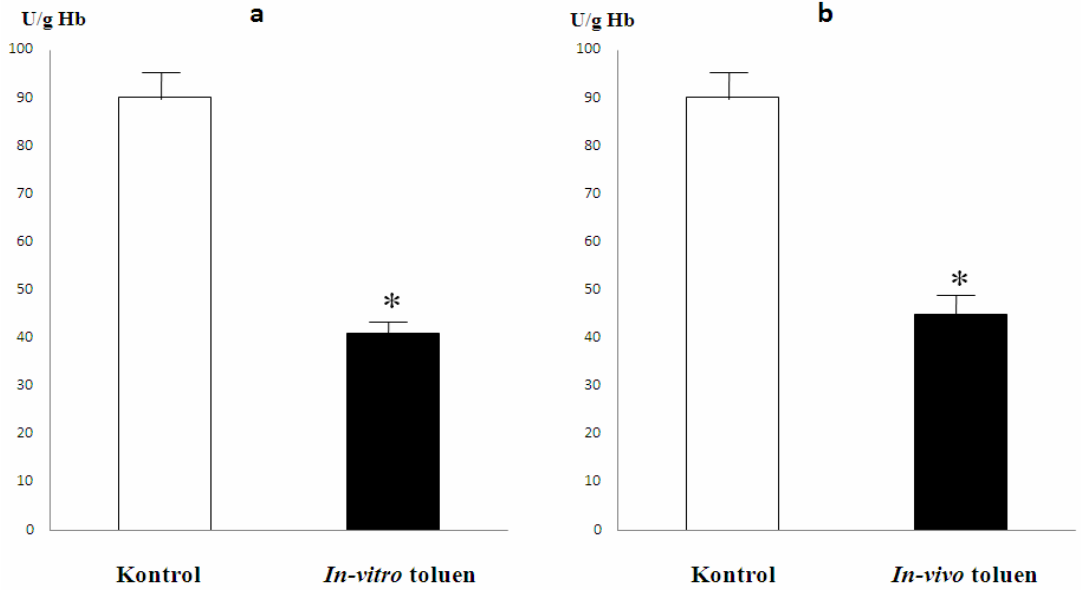
Şekil 4.4: Deney gruplarında eritrosit PC düzeyleri,
a. Kontrol ve *in vitro* toluen grupları, b. Kontrol ve *in vivo* toluen grupları,
* $P < 0,05$ kontrole göre anlamlı farklı.

CAT Enzim Aktiviteleri



Şekil 4.5: Deney gruplarında eritrosit CAT enzim aktiviteleri,
a. Kontrol ve *in vitro* toluen grupları, b. Kontrol ve *in vivo* toluen grupları,
* $P < 0,05$ kontrole göre anlamlı farklı.

GSH-Px Enzim Aktiviteleri



Şekil 4.6: Deney gruplarında eritrosit GSH-Px enzim aktiviteleri,
a. Kontrol ve *in vitro* toluen grupları, b. Kontrol ve *in vivo* toluen grupları,
* $P < 0,05$ kontrole göre anlamlı farklı.

5. TARTIŞMA

Biz çalışmamızda kısa süreli *in vitro* toluen maruziyetinin ve uzun süreli mesleksi maruziyetin insan eritrositlerinde ozmotik frajiliteye etkisini ve bu etkinin oksidatif stresle ilişkisini araştırmayı amaçladık. Bulgularımız, her iki grupta da artan oksidatif stres ve azalan antioksidan enzim aktivitesine rağmen ozmotik frajilitenin bozulmadığını, hatta *in vitro* toluen grubunda azaldığını gösterdi.

Toluen organik bir çözücü olarak çok fazla kullanım alanı olan önemli bir kimyasal üründür. Boya, matbaa, ayakkabı ve deri gibi bir çok endüstri kolunda çalışanlar bu kimyasal ürünle sürekli karşılaşmak zorundadırlar. Toluen insanda pek çok organ sistemini ve dokuyu etkiler. Toluene mesleksi maruziyet genelde inhalasyon yoluyla. Deri aracılığıyla da maruziyet söz konusudur.

Toluen güçlü lipofilik özelliği nedeniyle tüm hücreleri etkileyebilir. En büyük etkisi SSS üzerinedir. İnhalasyonu takiben toluenin kan düzeyi hızla artar. Eritrositler toluenin tutulması ve taşınmasında önemli bir rol oynar. Toluen kanda başlıca Hb ve plazma proteinleriyle taşınır. Bu durum insan ve sıçan kanında farklılık gösterir. 2 saat süreyle 500 ppm toluen inhale eden sıçanların kanındaki toluenin % 66'sının eritrositlerde bulunduğu, *in vitro* toluene maruziyet ile bu oranın sıçan kanında % 70, insan kanında % 43 kadar olduğu bildirilmiştir [69]. Bu durumda eritrositlerin de toluenden etkilenmesi beklenmektedir, ancak eritrositler üzerine etkilerine dair bilgiler sınırlıdır. İnsanlarda kronik toluen inhalasyonunun eritrosit ve lenfosit büyümesine neden olduğu, kemik iliği üzerine ise önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir [73]. Toluen ve metabolitlerinin karaciğer, ince bağırsak, böbrek, beyin gibi dokuların yanısıra eritrositlerde de ROS üretimine ve oksidan strese yol açtığına dair bulgular vardır [52, 102, 103].

ROS, fizyolojik koşullarda hemen hemen bütün hücrelerde üretilmektedirler. Superoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi radikaller üretilmelerinin ardından eğer ortamdaki uzaklaştırılmazlarsa hücre zarı dahil olmak üzere hücre elemanlarında hasara yol açarlar. Hücrelerde ve de eritrositlerde, bu radikalleri detoksifiye edici mekanizmalar yer almaktadır. Detoksifikasyon mekanizmalarında endojen antioksidanlar önemli yer alır. O_2^- radikali ortamda bulunan superoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesiyle H_2O_2 'e dönüştürülür. H_2O_2 eğer H_2O 'ya dönüştürülerek detoksifiye edilmez ise vücutta yer

alan en toksik radikale yani 'OH'e fenton reaksiyonu ile dönüştürülür. Bu son reaksiyon için Fe^{+2} 'ye ihtiyaç vardır. Aslında eritrositler bunun için önemli bir kaynak olmaya aday hücrelerdir. Bundan dolayı fenton reaksiyonunun olmasını engellemenin önemli bir yolu H_2O_2 'in detoksifikasyonudur. Hem CAT hem de GSH-Px enzimleri H_2O_2 'in suya dönüştürülmesi reaksiyonlarında yer alırlar. CAT enzimi H_2O_2 'nin suya detoksifikasyonunu sağlarken, GSH-Px'da benzer şekilde glutatyon indirgenmesi ile bu işi yapar (Bkz. Şekil 2.6). Anlaşılacağı üzere hücre, üretilen ROS ürünlerine karşı endojen antioksidanlar ile bir denge sağlamaya çalışmaktadır [32]. Artan ROS üretiminin bir sonucu olarak antioksidan enzimler tüketilmektedir ve sonuçta daha da toksik bir radikal olan 'OH radikali ile sonuçlanan fenton reaksiyonuna doğru bir yöneliş olmaktadır. Bunun sonucu oksidatif stresin yol açtığı bir dizi hasar meydana gelmektedir. Oksijen radikalleri eritrositlerde çoklu doymamış yağ asitleri ve proteinlerle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonu ve protein yıkımına neden olur [39, 46]. Lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonunun ürünleri oksidatif stresin de önemli göstergeleridir.

Bizim çalışmamızda toluene *in vitro* 300 ppm kısa süreli maruziyetin ve *in vivo* uzun süreli mesleksel maruziyetin eritrosit MDA düzeyini anlamlı olarak artırdığı görüldü. Bu, yüksek doz akut toluene maruziyetin yanısıra çok daha düşük dozda kronik toluen maruziyetinin eritrositlerde lipit peroksidasyonuna neden olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde her iki grupta da protein hasarının göstergesi olan PC düzeyi de eritrositlerde anlamlı olarak yüksek bulundu.

Bu konuda daha önceki çalışmalara bakıldığında boyacılar üzerine yapılan iki çalışmada plazma MDA düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu, Dünderöz ve diğ. [105]'nin araştırmasında ise tiner koklayan adölesanlarda hem plazma hem eritrosit MDA düzeylerinin yüksek bulunduğu görülmektedir [52, 104]. Bizim toluenin eritrosit MDA düzeyine ilişkin sonuçlarımız bu bilgiyle uyumludur. Ancak boyacılar da yapılan her iki çalışmada da deneklerin %70'inden fazlasının, tiner koklayan adölesanların ise tümünün sigara içtiği anlaşılmaktadır. Bizim çalışmamızda ise hiç sigara içmeyen gönüllülerin deneye alınmış olması sigara içmeye bağlı oksidatif etkileri deney sonuçlarından uzaklaştırmaktadır.

Bugüne kadar literatür bilgilerimize göre toluenin eritrosit PC düzeyine etkisine dair yayınlanmış çalışma bulunmamaktadır.

Mesleksel maruziyet veya suistimal nedeniyle toluen soluyan kişilerin eritrositlerinde antioksidan enzim düzeylerine ilişkin farklı sonuçlar bildirilmiştir. Tiner koklayan adölesanlarda plazma ve eritrosit GSH-Px aktivitesinin azaldığı, eritrositlerde SOD aktivitesinin arttığı rapor edilmektedir [105]. Boya işçilerinin eritrositlerinde Halifeoğlu ve diğ. [52] SOD ve GSH-Px aktivitesinin arttığını, Karagözler ve diğ. [104]'i ise yine boyacılar plazmada aynı enzim aktivitelerinin azaldığını, eritrosit CAT aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Toluenin eritrositlerde antioksidan enzimlere etkisine dair *in vitro* çalışma ise bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızda hem *in vitro* hem de *in vivo* toluen grubunda GSH-Px aktivitesinde anlamlı bir düşüş olduğu CAT aktivitesinin ise *in vivo* toluen grubunda anlamlı olmamakla birlikte her iki grupta da kontrole göre düşük olduğu saptandı. Bu durum toluenin eritrositlerde oksidatif stresi artırdığını ve buna bağlı olarak enzim aktivitelerinin azaldığını düşündürmektedir. Daha önceki çalışmalarda çok fazla göz önüne alınmamış olan sigara içmenin oksidan-antioksidan dengesinde neden olabileceği değişiklikler bu çalışmanın sonuçlarını etkilememiştir.

Eritrositlerin özellikle oksidanlara karşı gelişmiş antioksidan sistemleri hem hücre içi hem de zarında yer alan proteinlerin oksidasyonunu engellemeye yöneliktir. Pentoz fosfat yolunda glikoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesiyle oluşan NADPH, GSSG'nun GSH'a indirgenmesinde elektron kaynağıdır. GSH tekrar okside olurken H₂O₂ suya dönüşür. Bu reaksiyonu katalizleyen güçlü bir antioksidan enzim GSH-Px'dir [25]. Ayrıca eritrositler endojen antioksidanlardan CAT'ın önemli miktarda bulunduğu yerlerden biridir [32, 33]. Toluene maruz kalma bu enzim aktivitesini de GSH-Px gibi anlamlı olarak azaltmıştır. Hücre koruma mekanizmalarının artık yetersiz olduğu bu durumda doğal olarak hücreler lipid peroksidasyonuna ve protein oksidasyonuna maruz kalmışlardır.

Uzun süre toluene maruz kalan ayakkabı ve basım atölyesi işçileri kronik toksisitenin etkisi altındadırlar. Bizim sonuçlarımızla artan MDA ve protein karbonil miktarları ile işçilerin eritrositlerinin ciddi bir oksidan hasara maruz kaldıkları sonucuna varabiliriz. İşçi eritrositleri benzer şekilde bozulan bir oksidan-antioksidan denge ile karşı karşıyadırlar. İşçilerin artan protein karbonil ve MDA seviyelerinin yanında anlamlı olarak azalan GSH-Px aktivitesi bizi artan ROS'a karşı koymaya çalışan bir antioksidan mekanizmanın yetersiz kalması sonucuna götürmektedir.

Ayrıca, işçilerin CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir azalma vardır.

Eritrositlerde oksidan stres ve oksijen radikallerinin oluşumu lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, Hb-spektrin çapraz bağlanması ve enzim inaktivasyonuna yol açtığı görülmektedir [39, 44, 46, 115]. Bu değişikliklerin zarın stabilite ve geçirgenliği, hücrelerin deformabilitesini, yaşam süresini ve işlevlerini etkilemesi beklenir. Özellikle lipit peroksidasyonu ile zar yapısı etkilenirken, protein oksidasyonu ile de hem hücre içi hem de hücre zarı elemanları etkilenir. Zar hasarı ozmotik frajilite testi ile gösterilebilir. Lipit peroksidasyonunun ozmotik frajiliteyi artırdığına dair çeşitli araştırmalar bulunmaktadır [47-49]. Oksijen radikali oluşturarak lipit peroksidasyonuna ve protein hasarına yol açacak şekilde H₂O₂ ve askorbat/Fe⁺²'ye maruz bırakılan eritrositlerde ozmotik frajilitenin arttığı, MDA ve alanin oluşumuyla orantılı olarak deformabilitenin bozulduğu görülmektedir [46]. Bu çalışmadaki ozmotik frajilite bulgularını destekler nitelikte Suboh ve diğ. [51]'nin yaptığı araştırmada lipit peroksidasyonunun ozmotik frajilitede belirleyici faktör olmadığı ancak protein hasarının ozmotik frajiliteyi artırdığı belirtilmektedir. Eritrositteki hemoglobin dışı proteinler zarın ve önemli bir oranda zar iskeletindedir. İskelet proteinlerinin eksikliği veya yokluğu durumunda eritrositin normal şekli bozulmakta, zar rijit hale gelmekte ve hemoliz görülmektedir. Ancak başka bir çalışmada altı saat MDA'ya maruz bırakılan eritrositlerde ozmotik frajilitenin azaldığı, aynı zamanda hücre dışına önemli bir K⁺ sızması olduğu görülmüş ve bunun zar proteinlerinde fonksiyon bozukluğuna bağlı olabileceği, artmış ozmotik direncin ise hücre içi K⁺ derişiminin homeostatik korunması amacıyla gerçekleşebileceği öne sürülmüştür [50].

Bu çalışmada *in vitro* toluene maruz kalan insan eritrositlerinde oksidatif strese rağmen ozmotik frajilitenin anlamlı olarak azaldığını, eritrositlerin ozmotik lizise direncinin arttığını gördük. *In vivo* toluen maruziyeti ise eritrosit ozmotik frajilitesinde önemli değişiklik yapmadı. İnsan eritrositlerinde toluenin ozmotik dirence etkisi daha önce çalışılmamıştır. Sıçan eritrositlerinde toluene *in vitro* 30 dakika maruziyet sonucu 1000 ppm'den düşük dozlarda ozmotik frajilitenin azaldığı, 300 ppm'de maksimum olmak üzere 200 ile 500 ppm arasında bu etkinin fazla olduğu, 1000 ppm ve üzerindeki dozlarda ise ozmotik frajilitenin arttığı bildirilmiştir.

Tolueni 7 ve 21 gün boyunca (2000 ppm 6 saat/gün) inhale eden sıçanların eritrositlerinde de ozmotik frajilitenin azaldığı bulunmuştur [107]. Korpela ve Tahti [108], diğer bir çalışmada *in vivo* ortamda, inhalasyon yoluyla 0,5, 1, 1,5 ve 3 saat boyunca kısa süreli 2000 ppm toluene maruz bırakılan sıçanların eritrositlerinde ozmotik frajilitenin azaldığını, ancak maruziyetin bitiminden 30 dakika sonra bu etkinin ortadan kalktığını bulmuşlardır.

Bizim bulgularımızda, Korpela ve diğ. [107]'nin sıçan eritrositlerinde yaptığı çalışmalarla uyumlu olarak *in vitro* ortamda 300 ppm toluen insan eritrositlerinde ozmotik frajiliteyi anlamlı olarak azalttı. Ancak toluene inhalasyon yoluyla *in vivo* ortamda maruz kalan işçilerin eritrositlerinde ozmotik frajilitede anlamlı bir değişiklik olmadı. Akut toluen inhalasyonuna bağlı ölüm vakalarında kandaki toluen miktarı en fazla 79 mg/L (yaklaşık 80 ppm) ölçülmüştür. 38 ppm'e 8 saat maruz kalınması durumunda kan toluen düzeyi 0,59 mg/L'dir [68]. Korpela ve diğ. [107]'nin çalışmasında *in vitro* 50 ppm toluenin de ozmotik direnci artırdığı bildirilmektedir. Bizim *in vivo* toluen grubuna aldığımız işçilerin inhalasyon dozu 20-100 ppm arasında değişiyordu ve eritrositlerin maruz kaldığı toluen olasılıkla oldukça düşük dozdadır. Ancak bu dozda bile anlamlı oksidatif stres artışı olduğunu ve bu oksidatif stres artışının şiddetine bağlı olarak antioksidan enzimlerde dahi hasar meydana geldiğini gördük. Buna rağmen ozmotik frajilitenin normal bulunmuş olması toluenin ozmotik frajilitenin bozulmasını engellediğini düşündürmektedir. Mesleksi olarak maruz kalanların kanında toluen veya idrarda toluen metabolitlerin tayin edilmesi, ayrıca düşük dozlarda toluenin *in vitro* etkisinin çalışılması bu konuya açıklık getirecektir.

Ozmotik frajilite testi eritrositlerin içeriği, şekli ve zar fleksibilitesindeki değişikliklerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır ve eritrositlerin yüzey alanıyla hacmi arasındaki oranın bir göstergesidir. Eğer bu oran düşerse ozmotik frajilite artar, eritrosit yüzey alanı azalmış veya eritrosit hacmi artmış demektir. Ozmotik frajilite azaldığında ise ya eritrosit yüzey alanında bir artış olmalıdır, ya da eritrosit hacminde bir azalma olmalıdır. Eritrositlerin toluene maruziyeti ozmotik frajiliteyi azaltmaktadır, bundan dolayı toluenin eritrosit yüzey alanında bir artışa yol açması veya eritrosit hacminde bir azalmaya yol açması beklenir. Eritrosit yüzey alanının

artması yeni hücre zarı senteziyle mümkün olabilir, ancak eritrositlerde protein veya lipit sentezi olanaksızdır.

In vitro çalışmamızda, toluene kısa süre (30 dakika) maruz kalan eritrositlerin hacimleriyle kontrol grubu eritrositlerin hacimleri arasında anlamlı bir fark olmamasına rağmen toluen grubunun hacimleri daha fazla bulunmuştur. *In vivo* çalışmamızda da *in vitro* çalışma bulgularımızı destekleyecek sonuçlar elde ederek işçilerden aldığımız kanlardaki eritrosit hacimlerinin kontrol grubunu oluşturan kişilerden aldığımız kanlardaki eritrosit hacimlerinden yüksek olduğu bulunmuştur ama bu değerler arasında da anlamlı bir fark yoktur. Eritrositlerde anizositozu gösteren eritrosit dağılım genişliği de normal sınırlarda ancak biraz yüksek bulunmuştur. Bu sonuçları literatür bilgileri de desteklemektedir ve kronik toluen inhalasyonunun eritrositlerin büyümesine yol açtığı belirtilmektedir [73]. Ayrıca toluene inhalasyon yoluyla maruz kalan sıçanların eritrositlerinde gerek maruziyet sırasında gerekse maruziyet sonrasında hacimlerinde anlamlı bir değişiklik bulunmadığı ama anlamlı olmayan hafif bir artışın söz konusu olduğu belirtilmektedir [108].

Sonuç olarak toluene *in vitro* maruz kalan eritrositlerde oluşan ozmotik frajilite azalması eritrosit hacim değişikliğiyle ilişkili değildir. Çünkü böyle bir ilişkinin doğru olabilmesi için eritrosit hacminin azalması gerekirdi. Çalışmamızda ise hem *in vitro* hem *in vivo* deneylerde anlamlı olmayan ve oldukça düşük miktarlarda bir hacim artışı söz konusudur. Yapılan çalışmalar anesteziğler gibi diğer zar stabilize eden ajanların da ozmotik frajiliteyi azalttığını göstermektedir [106, 107, 116]. Anesteziğlerin zar lipitlerinde çözünmek suretiyle zar lipit kalınlığını artırdığı bildirilmiştir [117]. Lipofilik bir molekül olan toluen de zarın lipit kalınlığını ve birlikte zarın yüzey alanını değiştirebilir. Zar yüzey alanının artışı ozmotik frajilitenin azalmasına kısmen açıklık getirebilir. Oksijen radikalleri zar lipit yapısını bozarak eritrositlerde doza bağlı şekilde ekinositik dönüşüme yol açmaktadır. Bu dönüşümün başlangıç safhasında hücre yüzeyinden dışarıya doğru oluşan çıkıntılar yüzey-hacim oranını artırabilir. Anestetik maddelerin yol açtığı zar kalınlaşmasının zar proteinlerini etkileyebileceği de bildirilmektedir [117]. Toluenin eritrositlerde *in vivo* ve *in vitro* olarak zar enzimlerini inhibe ettiğine dair bulgular vardır [118]. Stabilize olan zar, eritrosit zar proteinlerinin temsil ettiği dinamik yapı

görünümünden biraz uzaklaşıp, zarın çift katlı lipit tabakası tarafından temsil edilen fiziksel bir bariyer görünümüne yaklaşıyor olabilir. Bu konularda daha ileri çalışmalara gerek vardır.

Araştırma sonuçlarımız, toluene kısa süreli *in vitro* maruz kalan insan eritrositlerinde oksidatif stresin artmasıyla eş zamanlı olarak ozmotik frajilitenin azaldığını, *in vivo* toluen grubunda değişmediğini göstermektedir. Oksidatif stres artışının eritrositlerde ozmotik frajiliteyi artırmaması toluenin zar stabilize edici özelliğinin baskın geldiğini ve olasılıkla stabilizan ve oksidan etkilerin birbirlerinden bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

Toluene mesleki maruziyetin ozmotik frajiliteyi değiştirmemesi ancak oksidatif strese yol açması eritrositlerin yapı ve işlevleri açısından önemlidir. Başka çalışmalarla eritrosit morfolojisi, enzimleri, methemoglobin miktarı, eritrosit ömrü ve deformabilitesine bakılması işçi ve çevre sağlığı açısından yararlı olacaktır.

Aromatik hidrokarbonlarla karşılaşan petrokimya işçilerinde antioksidanlardan zengin diyetin oksidan-antioksidan dengesini düzelttiği gösterilmiştir [119]. Toluene maruz kalan meslek gruplarında çalışanların da günlük besin alımının antioksidan vitamin ve minerallerle desteklenmesi önerilmelidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar şunlardır:

- *In vitro* kısa süreli toluene maruz bırakılan insan eritrositlerinde ve mesleki nedenlerle inhalasyon yoluyla kronik olarak *in vivo* toluene maruz kalan kişilerin eritrositlerinde sırasıyla lipit peroksidasyonu ve protein hasarının göstergesi olan MDA ve PC düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
- Mesleki maruziyet grubunda CAT aktivitesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber her iki grupta da eritrositlerde CAT ve GSH-Px aktivitesinin azaldığı görülmüştür.
- Toluene mesleki olarak kronik maruziyet ve *in vitro* kısa süreli maruziyet eritrositlerinde lipit peroksidasyonu ve protein hasarına yol açmakta, antioksidan kapasiteyi azaltmakta ve hücrenin savunma mekanizmasını zayıflatmaktadır.
- Toluenin yol açtığı oksidatif strese maruz kalan eritrositlerde artması beklenen ve zar stabilizasyonunun bir göstergesi olan ozmotik frajilite *in vitro* toluen grubunda azalmış, *in vivo* grupta ise değişmemiştir. Bu durumda toluenin zar stabilize edici özelliğinin ozmotik direnci koruduğu hatta güçlendirdiği anlaşılmaktadır. Frajilitedeki azalmanın eritrosit hacmiyle ilişkili olmadığı görülmüştür.
- Sonuçta toluene maruz kalan her iki grupta da eritrositlerin oksidatif stresle karşılaştığı buna karşılık zar stabilitesinin bozulmadığı görülmektedir. Ancak eritrosit zar geçirgenliği, deformabilite ve hücre işlevleri açısından daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır. İzin verilen sınırlarda bile toluene mesleki maruziyet eritrosit işlevleri ve eritrositlerin reolojik davranışı açısından özellikle egzersiz gibi doku oksijen ihtiyacının arttığı durumlarda veya dolaşım bozukluklarında, eritrosit hastalıklarında önemli olabilir. Bu konunun araştırılması işçi ve çevre sağlığı açısından yararlı olacaktır.
- Toluene maruz kalan meslek gruplarında çalışanlara oksidan hasarın engellenmesi amacıyla antioksidan içeriği zenginleştirilmiş diyet verilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. M. L. A. Sivilotti, , *Oxidant Stress and Haemolysis of the Human Erythrocyte*. *Toxicol Rev*, 2004. 23(3): p. 169-188.
2. M. J.Telen, R.E.Kaufman, *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10 ed, ed. J.Foerster, Richard Lee, J. Luekens, F. Paraskevas, J. P. Greer, G. M. Rodgers. Vol. 10. 1999, Baltimore: Williams and Wilkins, p.193-205.
3. M. Ross, P.Wojciech, *Nervous Tissue, Histology a Text and Atlas*. 2003: Lipincott, Williams and Wilkins.
4. B.S. Bull, D.Brailsford, *Red Blood Cell Membranes: Structure, Function, Clinical Implications*, ed. J.C.Parker, P. Agre. 1989, New York and Basel: Markel Dekker, p.401-416.
5. M. F. McMullin, *The molecular basis of disorders of the red cell membrane*. *J Clin Pathol*, 1999. 52: p. 245-248.
6. M. Nakao, *New insights into regulation of erythrocyte shape*. *Current Opinion in Hematology*, 2002. 9: p. 127-132.
7. S. Chien, L.A.Sung, *Molecular basis of red cell membrane rheology. Part 1*. *Biorheology*, 1990. 27: p. 327-344.
8. P. Gascard, N.Mohandas, *New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells*. *Current Opinion in Hematology*, 2000. 7: p. 123-129.
9. S. Manno, Y.Takakuwa, K. Nagao, N. Mohandas, *Modulation of Erythrocyte Membran Mechanical Function by B- Spectrin Phosphorylation and Dephosphorylation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270 (10): p. 5569-5665.
10. Y.Takakuwa, *Regulation of red cell membrane protein interactions: implications for red cell function*. *Current Opinion in Hematology*, 2001. 8: p. 80-84.
11. L. D. Walensky, P.Gascard, M. E. Fields, S. Blackshaw, J. G. Conboy,N. Mohandas, S. H. Snyder, *The 13-kD FK506 Binding Protein, FKBP13, Interacts with a Novel Homologue of the Erythrocyte Membrane Cytoskeletal Protein 4.1*. *The Journal of Cell Biology*, 1998. 141(1): p. 143-153.
12. J. F. Hoffman, J. Kaplan, T. J. Callahan, *The Na:K pump in red cells is electrogenic*. *Fed Proc*, 1979. 38 (11): p. 2440-2441.
13. M. J. Tanner, *Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE1)*. *Semin Hematol.*, 1993. 30 (1): p. 34-57.
14. John C. Mathai, S.Moris, Barbara L. Smith, Gregory M. Preston, Narla Mohandas, Myra Collins, Peter C. M. van Zijls, Mark L. Zeidel, Peter Agre, *Functional Analysis of Aquaporin-1 Deficient Red Cells*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996. 271 (3): p. 1309-1313.
15. D. L. Baly, R. Horuk, *The biology and biochemistry of the glucose transporter*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1988. 947 (3): p. 571-590.

16. J. Elbrink, I.Bihler, *Membrane transport: its relation to cellular metabolic rates*. Science, 1975. 20 (188 (4194)): p. 1177-1184.
17. J. Brahm, *Urea Permeability of Human Red Cells*. The Journal of General Physiology, 1983. 82: p. 1-23.
18. W. J. Williams, E.Beutler, A. J. Erslev, M. A. Lichtman, E. Beutler, *Hematology*. 4. Ed. ed. 1991. 1726-1727.
19. G. Brecher, M.Bessis, *Present Status of Spiculed Red Cells and Their Relationship to the Discocyte-Echinocyte Transformation: A Critical Review*. Blood, 1972. 40(3): p. 333-344.
20. R. I. Weed, M.Bessis, *The Discocyte-Stomatocyte Equilibrium of Normal and Pathologic Red Cells*. Blood, 1973. 41 (3): p. 471-475.
21. A. Simmons, *Hematology. A Combined Theoretical and Technical Approach*, ed. Ed. Vol. 19, 1997, p. 283-286.
22. M.T. Elghetany, F.R.Dawey, *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 19. ed, J.B. Henry, 1996, p. 634.
23. W.J.Williams, E.Beutler, A. J. Erslev, M. A. Lichtman, *Hematology*. 4. Edition International edition ed. 1991. p. 564-565.
24. B. F. Rodak, *Hematology Clinical Principles and Applications*. 2. Edition ed. 2002. p. 268-269.
25. W. G. Siems, O.Sommerburg, T. Grune, *Erythrocyte free radical and energy metabolism*. Clinical Nephrology, 2000. 53 (Suppl.1): p. 9-17.
26. M. Müller, W.Siems, F. Buttgereit, R. Dumdey, S. Rapoport, *Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumour cells*. Eur. J. Biochem., 1986. 161: p. 701-705.
27. W. Siems, M.Müller, R. Dumdey, H. Holzutter, J. Rathmann, S. Rapoport, *Quantification of Pathways of Glucose Utilization and Balance of Energy Metabolism of Rabbit Reticulocytes*. Eur. J. Biochem, 1982. 124: p. 567-576.
28. W. Siems, W. Dubiel, R. Dumdey, M. Muller, S. Rapoport, *Accounting for the ATP-consuming processes in rabbit reticulocytes*. Eur. J. Biochem., 1984. 139: p. 101-107.
29. A. J. Vander, J.H.Sherman, D. S. Luciano, *İnsan Fizyolojisi ve Vücut Fonksiyon Mekanizmaları (Çeviri)*. 1994, İstanbul: Bilimsel ve Teknik Yayınlar Çeviri Vakfı. p. 93-98.
30. R. K. Murray,D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, *Harper'in Biokimyası (Çeviri)*. 1996, İstanbul. Barış Kitabevi. p. 783-787.
31. F. Weitzel, A.Wendel, *Selenoenzymes Regulate the Activity of Leukocyte 5-Lipoxygenase via the Peroxide Tone*. The Journal of Biological Chemistry, 1993. 268 (9): p. 6288-6292.
32. E. Fadilloğlu, H. Erdoğan, *Effects of erdosteine treatment against doxorubicin-induced toxicity through erythrocyte and plasma*

- oxidant/antioxidant status in rats*. Pharmacological Research, 2003. 47: p. 317-322.
33. S. Ozgocmen, H.Kaya, E. Fadillioglu, Z. Yilmaz, *Effects of calcitonin, risedronate and raloxifene on erythrocyte antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis*. Arch Med Res, 2007. 38: p. 196-205.
 34. I. Ceballos-Picot, V. Witko-Sarsat, M. Merad-Boudia, A. T. Nguyen, M. Thévenin, M. Chantal Jaudon, J. Zingraff, C. Verger, P. Jingers, B. Descamps-Latscha, *Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. 21 (6): p. 845-853.
 35. E. Peuchant, M-C. Delmas-Beauvieux, L. Dubourg, M-J. Thomas, A. Perromat, M. Aparicio, M. Clerc, C. Combe, *Antioxidant effects of a supplemented very low protein diet in chronic renal failure*. Free Radical Biology and Medicine, 1997. 22 (1/2): p. 313-320.
 36. J. Himmelfarb, K. A. Aulth, D. Holbrook, D A. Leeber, R. M. Hakim, *Intradialytic granulocyte reactive oxygen species production: A prospective crossover trial*. Journal of the American Society of Nephrology, 1993. 4 (2): p. 178-186.
 37. G. Poli, G. Leonarduzzi, F. Biasi, E. Chiarotto, *Oxidative Stress and Cell Signalling*. Current Medicinal Chemistry, 2004. 11: p. 1023-1042.
 38. H. Erdogan, E.Fadilloğlu, M. Yagmurca, M. Ucar, M.K. Irmak., *Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine*. Urol Res, 2006. 34: p. 41-46.
 39. D. Chiu, F.Kuypers, B. Lubin, *Lipid peroxidation in human red cells*. Semin Hematol., 1989. 26 (4): p. 257-276.
 40. K. Jain Sushu, P.Hochstein, *Polymerization of membrane components in aging red blood cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1980. 92 (1): p. 247-254.
 41. S. K. Jain, N.Mohandas, M.R. Clark, S.B. Shohet, *The effect of malonyldialdehyde, a product of lipid peroxidation, on the deformability, dehydration and ⁵¹Cr-survival of erythrocytes*. Br J Haematol., 1983. 53 (2): p. 247-255.
 42. K.J.Sushu, *The Accumulation of Malonyldialdehyde, a Product of Fatty Acid Peroxidation, Can Disturb Aminophospholipid Organization in the Membrane Bilayer of Human Erythrocytes*. The Journal of Biological Chemistry, 1984. 259 (6): p. 3391-3394.
 43. E Shinar, E.Rachmilewitz, *Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia*. Semin Hematol., 1990. 27 (1): p. 70-82.
 44. L. M. Snyder, N.L.Fortier, J. Trainor, J. Jacobs, L. Lob, B. Lubin, D. Chiu, S. Shohet, N. Mohandas, *Effect of Hydrogen Peroxide Exposure on Normal*

- Human Erythrocyte Deformability, Morphology, Surface Characteristics, and Spectrin-Hemoglobin Cross-linking*. J. Clin. Invest., 1985. 76: p. 76.
45. J. Stuart, G.B.Nash, *Red cell deformability and haematological disorders*. Blood Reviews, 1990. 4 (3): p. 141-147.
 46. M. A Srour, Y. Y. Bילו, M. Juma, M. R. Irhimeh , *Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation*. Clinical Hemorheology and Microcirculation., 2000. 23: p. 13-21.
 47. S. K. Jain, *Hyperglycemia Can Cause Membrane Lipid Peroxidation and Osmotic Fragility in Human Red Blood Cells*. The Journal Biological Chemistry, 1989. 264 (35): p. 21340-21345.
 48. E. Brzezińska-Slebodzińska, *Erythrocyte osmotic fragility test as the measure of defence against free radicals in rabbits of different age*. Acta Vet Hung., 2001. 49 (4): p. 413-419.
 49. U. K. Senturk, F.Gündüz, O. Kuru, M.R. Aktekin, D. Kipmen, O. Yalcin, M. Bor-Kucukatay, A. Yesilkaya, O. K. Baskurt, *Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats*. Journal of Applied Physiology, 2001. 91: p. 1999-2004.
 50. M. Allegra, C.Gentile, L. Tesoriere, M.A.Livrea, *Protective effect of melatonin against cytotoxic actions of malondialdehyde: an in vitro study on human erythrocytes*. Journal of Pineal Research, 2002. 32: p. 187-193.
 51. S. M. Suboh, Y. Y. Bילו, T. A. Aburjai, *Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes*. Phytotherapy Research, 2004. 18: p. 280-284.
 52. İ. Halifeoğlu, H. Canatan, B. Üstündağ, N. İlhan, F. İnanç., *Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner*. Cell Bioch. Funct., 2000. 18: p. 263-267.
 53. www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg56.pdf, *Toluene CAS 108-88-3; UN 1294*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
 54. www.inchem.org/pages/ehc.html, *Environmental Health Criteria 52, Toluene, Geneva*. International Programme On Chemical Safety (IPCS), INCHEM Home, 1986.
 55. D. Mc Gregor, *The Genetic Toxicology of Toluene*. Mutat. Research, 1994. 317: p. 213-228.
 56. W. Tassaneeyakul, D. J. Birkett, *Human Cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m- and p-xylene*. J. Pharm. Exp. Therp., 1996. 276 (1): p. 101-108.
 57. R. C. Weast, *CRC handbook of chemistry and physics*. 58th ed. 1977, Cleveland, Ohio: Chemical Rubber Co.

58. C. Sutton, J.A. Calder, *Solubility of Alkylbenzenes in Distilled Water and Seawater at 25.0 °C*. Journal of Chemical and Engineering Data, 1975. 20 (3): p. 320.
59. S. Akgür, P. Öztürk, Y. Kurtulmuş, H. Karali, S. Ertürk, *Medicolegal aspects of blood-urine toluene and urinary ortho-cresol concentrations in toluene exposure*. Turk J Med Sci, 2001. 31: p. 415-419.
60. R. Brodzinsky, H. B. Singh, *Volatile organic chemicals in the atmosphere: An Assessment of available data (Final Report, Sep. 1980 - Dec. 1982)*. 1982.
61. A. Csanady, J. G. Filser, *The relevance of physical activity for the kinetics of inhaled gaseous substances*. Arch. Toxicol., 2001. 74: p. 663-672.
62. C. H. Pierce, R. Dills, G. W. Silvey, D. A. Kalman., *Partition coefficients between human blood or adipose tissue and air for aromatic solvents*. Scand J Work Environ Health., 1996. 22 (2): p. 112-118.
63. K. Nomiyama, H. Nomiyama, *Respiratory elimination of organic solvents in man. Benzene, toluene, n-hexane, trichloroethylene, acetone, ethyl acetate and ethyl alcohol*. Int Arch Arbeitsmed., 1974. 32 (1): p. 85-91.
64. D. Paustenbach, Y. Alarie, T. Kule, N. Schachter, R. Smith, J. Swenberg, H. Witschi, S. B. Horowitz, *A Recommended Occupational Exposure Limit For Formaldehyde Based On Irritation*. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1997. 50: p. 217-263.
65. T. Dutkiewicz, H. Tyras, *The quantitative estimation of toluene skin absorption in man*. Int Arch Arbeitsmed., 1968. 24 (3): p. 253-257.
66. A. Sato, T. Nakajima, Y. Fujiwara, K. Hirosawa, *Pharmacokinetics of benzene and toluene*. International Archives of Occupational and Environmental Health, 1974. 33 (3): p. 169-182.
67. H. Veulemans, R. Masschelein, *Experimental human exposure to toluene*. International Archives of Occupational and Environmental Health, 1978. 42 (2): p. 91-103.
68. www.nhtsa.dot.gov/people/injury/research/job185drugs/toluene.htm, *Drugs and Human Performance Facts Sheets Toluene*. National Highway Traffic Safety Administration, 2004.
69. C-W. Lam, T.G., J. F. Boyd, A. L. Pierson, *Mechanism of Transport and Distribution of Organic Solvents in Blood*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1990. 104: p. 117-129.
70. K. Nomiyama, H. Nomiyama, *Three fatal cases of thinner-sniffing, and experimental exposure to toluene in human and animals*. International Archives of Occupational and Environmental Health, 1978. 41 (1): p. 55-64.
71. M. Ogata, T. Taguchi, *Quantitative analysis of urinary glycine conjugates by high performance liquid chromatography: excretion of hippuric acid and methylhippuric acids in the urine of subjects exposed to vapours of toluene and xylenes*. International Archives of Occupational and Environmental Health, 1986. 58 (2): p. 121-129.

72. W. Woiwode, K. Drysch, *Experimental Exposure to Toluene: Further Consideration of Cresol Formation in Man*. Occupational and Environmental Medicine [BR. J. IND. MED.], 1981. 38 (2): p. 194-197.
73. H. Ukai, T. Watanabe, H. Nakatsuka, Satoh, *Dose dependent increase in subjective symptoms among toluene exposed workers*. Environ. Researc., 1993. 60: p. 274-289.
74. P. Moszczynski, J. Lisiewicz, *Hematological indices of peripheral blood in workers occupationally exposed to benzene, toluene and xylene*. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.B, 1983. 178: p. 329-339.
75. Neil L. Rosenberga, M.C.Spitzza, Christopher M. Filleya, Kathleen A. Davisb, Herbert H. Schaumburgc, *Central nervous system effects of chronic toluene abuse-Clinical, brainstem evoked response and magnetic resonance imaging studies*. Neurotoxicology and Teratology, 1988. 10 (5): p. 489-495.
76. S. Kamran, R. Bakshi, *MRI in chronic toluene abuse: low signal in the cerebral cortex on T2-weighted images*. Neuroradiology, 1998. 40 (8).
77. C. M. Filley, R. K. Heaton, N. L. Rosenberg, *White matter dementia in chronic toluene abuse*. Source Neurology, 1990. 40 (3): p. 532-534.
78. A. Ehyai, F. R. Fremon, *Progressive optic neuropathy and sensorineural hearing loss due to chronic glue sniffing*. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 1983. 46 (349-351).
79. B.P. Damasceno, E. M. Capitani, *Cerebellar atrophy related to chronic exposure to toluene*. Arq Neuropsiquiatr., 1994. 52 (1): p. 90-92.
80. C. M. Filley, W.Haliday, B. K. Kleinschmidt-Demasters, *The Effects of Toluene on the Central Nervous System*. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 2004. 63 (1): p. 1-12.
81. J.E. Gibson, J.F.Hardisty, *Chronic Toxicity and Oncogenicity Bioassay of Inhaled Toluene in Fischer-344 Rats*. Fundam. Appl. Toxicol., 1983. 3: p. 315-319.
82. J.V. Bruckner, R. G. Petersonb, *Evaluation of toluene and acetone inhalant abuse II. Model development and toxicology*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1981. 61 (3): p. 302-312.
83. www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.pdf, *Toxicological Profile For Toluene*. 2000, September: U.S. Department Of Health And Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
84. J. J. Hong, J. L. Lin, M. S. Wu, C. C. Huang, R. Verberckmoes, *A chronic glue sniffer with hyperchloraemia metabolic acidosis, rhabdomyolysis, irreversible quadriplegia, central pontine myelinolysis, and hypothyroidism*. Nephrology Dialysis Transplantation, 1996. 11: p. 1848-1849.
85. B. G. Svensson, G.Nise, E. M. Erfurth, H. Olsson, *Neuroendocrine effects in printing workers exposed to toluene*. Br J Ind Med., 1992. 49 (6): p. 402-408.

86. P. Guzelian, S. Mills, H. J. Fallon, *Liver structure and function in print workers exposed to toluene*. J Occup Med., 1988. 30(10): p. 791-796.
87. I. Lundberg, M. Haykansson, *Normal serum activities of liver enzymes in Swedish paint industry workers with heavy exposure to organic solvents*. Br J Ind Med., 1985. 42 (9): p. 596-600.
88. S. Shiomi, T. Kuroki, T. Kuroda, T. Ueda, S. Nishiguchi, K. Kobayashi, H. Ochi, *Absence of hepatic uptake of Tc-99m phytate in a man with chronic toluene hepatotoxicity*. Clin Nucl Med., 1993. 18 (8): p. 655-666.
89. R. Patel, J. J. Benjamin, *Renal disease associated with toluene inhalation*. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology., 1986. 24 (3): p. 213-223.
90. M. Kamijima, Y. Nakazawa, M. Yamakawa, E. Shibata, N. Hisanaga, Y. Ono, M. Toida, Y. Takeuchi, *Metabolic acidosis and renal tubular injury due to pure toluene inhalation*. Archives of Environmental Health, 1994. 49 (5): p. 410-413.
91. Y. Kamijo, K. Soma, I. Hasegawa, T. Ohwada, *Fatal bilateral adrenal hemorrhage following acute toluene poisoning: A case report*. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 1998. 36 (4): p. 365-368.
92. I. Andersen, G.R.Lundqvist, L. Ihave, O.F. Pedersen, D.F. Proctor, M. Vaeth, D.P. Wyon, *Human response to controlled levels of toluene in six-hour exposures*. Scand J Work Environ Health., 1983. 9 (5): p. 405-418.
93. J. Baelum, I. B. Andersen, G.R. Lundqvist, L. Ihave, O.F. Pedersen, M. Vaeth, D.P. Wyon, *Response of solvent-exposed printers and unexposed controls to six-hour toluene exposure*. Scand J Work Environ Health., 1985. 11 (4): p. 271-280.
94. H. Tähti, S. Karkkainen, K. Pyykkö, E. Rintala, M. Kataja, H. Vapaatalo, *Chronic occupational exposure to toluene*. International Archives of Occupational and Environmental Health, 1981. 48(1): p. 61-69.
95. T. Hobara, H. Kobayashi, E. Higashihara, T. Kawamoto, T. Sakaidoi, *Acute effects of 1,1,1-trichloroethane, trichloroethylene, and toluene on the hematologic parameters in dogs*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1984. 13 (5): p. 589-593.
96. A. Ono, K. Sekita, Y. Ogawa, A. Hirose, S. Suzuki, M. Saito, K. Naito, T. Kaneko, T. Furuya, K. Kawashima, K. Yasuhara, K. Matsumoto, S. Tanaka, t. Inoue, Y. Kurokawa, *Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats*. J Environ Pathol Toxicol Oncol., 1996. 15 (1): p. 9-20.
97. R. Poon, I. Chu, S. Bjarnason, M. Potvin, R. Vincent, R.B. Miller, V.E. Valli, *Inhalation toxicity study of methanol, toluene, and methanol/toluene mixtures in rats: effects of 28-day exposure*. Toxicol Ind Health., 1994. 10 (3): p. 231-245.
98. H. Tahti, R.K. Aaran, H. Vapaatalo, *A study on short-term and long-term toluene inhalation in rats*. Meth and Find Exptl Clin Pharmacol, 1983. 5(10): p. 667-671.

99. C. Chan, Y. Wang, W. Lan, L. Chen, Y. Chen, B. Lin, M. Chang, J. Jeng, *Inhibition of cyclooxygenase activity, platelet aggregation and thromboxane B2 production by two environmental toxicants: m and o-cresol*. Toxicology, 2005. 208: p. 95-104.
100. D. Pelclova, P. Rassner, J. Picková, *Chromosome aberrations in rotogravure printing plant workers*. Mutat Res., 1990. 245 (4): p. 299-303.
101. M. Pitarque, A. Vaglenov, M. Nosko, A. Hirvonen, H. Norppa, A. Creus, R. Marcos, *Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents*. Mutat Res., 1999. 441 (1): p. 115-127.
102. J. M. Cara, P.L. Carl, C. B. Stephen, *Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation*. Biochemical Pharmacology, 1991. 42 (4): p. 879-882.
103. J. M. Cara, D. A. James, C. B. Stephen, *Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism*. Biochemical Pharmacology, 1993. 46 (1): p. 103-110.
104. A. Karagözler, N. Mehmet, K. Batçioğlu, *Effects of Long-Term Solvent Exposure on Blood Cytokine Levels and Antioxidant Enzyme Activities in House Painters*. Journal of Toxicology and Environmental Health, 2002. 65: p. 1237-1246.
105. R. Dündaröz, T. Türkbay, C. Akay, Ü. Sarıcı, A. Aydın, M. Denli, E. Gökçay, *Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescents with inhalant abuse*. The Turkish Journal of Pediatrics, 2003. 45: p. 43-45.
106. P. Seeman, J. Weinstein, *Erythrocyte Membrane Stabilization by Tranquilizers and Antihistamines*. Biochemical Pharmacology, 1966. 15: p. 1737-1752.
107. M. Korpela, H. Vapatalo, H. Tahti, *Effect of toluene on the hemolytic resistance of rat erythrocytes*. Toxicology Letters, 1983. 17: p. 253-257.
108. M. Korpela, H. Tahti, *Follow-up the antihemolytic effect of toluene inhalation in rats*. Toxicology Letters, 1984. 21: p. 15-19.
109. J.V. Dacie, J. M. Lewis, *Practical Haematology*. 1984, New York: Churchill Livingstone. 32.
110. H. Aebi, *Catalase*. Methods of Enzymatic Analysis., 1974: p. 673-677.
111. D. E. Paglia, W. N. Valentine, *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. J Lab Clin Med, 1967. 70: p. 158-170.
112. H. Esterbauer, K. H. Cheeseman, *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*. Methods in Enzymology, 1990. Oxygen radicals in biological systems. 186: p. 407-421.
113. R. L. Levine, D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel, E. R. Stantman, *Determination of carbonyl content in*

- oxidatively modified proteins*. Methods in Enzymology, 1990. 186, Oxygen radicals in biological systems.: p. 464-478.
114. *Toluen 5/b Drager tube Instruction for Use*. 5th Ed. ed. 2002.
 115. J. Van der Zee, J.V.S., J. F Koster and T. Dubbelman, *Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butyl hydroperoxide-derived radicals*. Biochimica et Biophysica Acta, 1989. 980: p. 175-180.
 116. S. L. Cassidy, J.A.H., S. Hafizi, *Antagonist Studies Using The Erythrocyte Osmotic Fragility Membrane Stabilization Assay*. Toxic. in Vitro, 1989. 3 (1): p. 1-5.
 117. O. Kayaalp, *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 10. Baskı ed. 2002. s. 772-774.
 118. M. Korpela, H. Tahti, *The effect of in vitro and in vivo toluene exposure on rat erythrocyte and synaptosome membrane integral enzymes*. Pharmacol Toxicol., 1988. 63(1): p. 30-32.
 119. T. Georgieva, A.M., T. Panev T. Popov, *Possibilities to control the health risk of petrochemical workers*. Int Arch Occup Environ Health, 2002. 75 (suppl): p. 21-26.

Ek 1.

.../.../2005

İŞÇİLERDE TOLUEN MARUZİYETİNİN İZLENMESİ ANKET FORMU

1- Adı-Soyadı:

2- Cinsiyet:

4- Kilo:

3- Yaş:

5- Boy:

6- Mesleği/yaptığı iş:

7- Kaç yıldır bu işyerinde çalışıyorsunuz?

8- Haftada kaç gün çalışıyorsunuz?

9- Günde kaç saat çalışıyorsunuz?

10- Gün içinde hangi saatler arasında çalışıyorsunuz?

11- Ortalama haftada çalışma saati:

12- Yapıştırıcı / boya inceltici olarak ne kullanıyorsunuz?

13- Kaç yıldır bu yapıştırıcıya/incelticiye maruziyetiniz var?

14- Sigara içme alışkanlığı:

Hiç içmedim

Bir süre içtim

Zaman:

Miktar:

Halen içiyorum

Zaman:

Miktar:

15 -Alkol içiyor musunuz?:

Hayır

Evet

Zaman:

Miktar:

16-Herhangi bir hastalığınız var mı?

Hayır

Evet

Hangi hastalığınız var?

17-Sürekli kullandığınız bir ilaç var mı?

Hayır

Evet

Varsa neler?.....

18- Ailenizde, yakın akrabalarınızda kronik-ırsi bir hastalık var mı?

Hayır Evet

Hangi hastalıklar var?.....

19-Baş ağrınız var mı?

Hayır Evet

Tipi: Zonklayıcı
 Sıkıştırıyor gibi
 Şimşek çakar gibi
 Kask geçirmiş gibi

Sıklığı: Nadiren
 Haftada 1-2 gün
 Her gün

Süresi: Dakika
 Saat

Yeri:

Baş ağrınıza puan verecek olsanız kaç puan verirsiniz? (0 = hiç yok, 10 = en şiddetli)

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

20- Denge bozukluğunuz oluyor mu?

Hayır Evet

Tipi: Kendim dönüyorum
 Etrafım dönüyor

Süresi: Saniye
 Dakika
 Saat
 Gün

Denge bozukluğunuza puan verecek olsanız kaç puan verirsiniz? (0=hiç yok, 10 = en şiddetli)

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

21- Özel eşyalarınızı (cep telefonu, gözlük, anahtar, cüzdan gibi) bir yerlerde unutmuşsunuz?

Hayır Evet

Sıklığı: Bazen Sık Çok sık

Unutkanlığınıza puan verecek olsanız kaç puan verirsiniz? (0 = hiç yok, 10 = en şiddetli)

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

22- Gün içinde kendinizi yorgun hissettiğiniz oluyor mu?

Hayır Evet

Sıklığı: Bazen Sık Çok sık

Yorgunluğunuza puan verecek olsanız kaç puan verirsiniz? (0 = hiç yok, 10 = en şiddetli)

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

23- Gazete-kitap okurken veya birisini dinlerken dikkatinizi toplayamadığınız oluyor mu?

Hayır

Evet

Sıklığı: Bazen

Sık

Çok sık

Konsantrasyon bozukluğunuza puan verecek olsanız kaç puan verirsiniz?

(0 = hiç yok, 10 = en şiddetli)

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

24- Uykuya dalmakta güçlük çektiğiniz veya gün içinde uyukladığınız oluyor mu?

Hayır

Evet

Sıklığı: Bazen

Sık

Çok sık

Uyku bozukluğunuza puan verecek olsanız kaç puan verirsiniz? (0 = hiç yok, 10 = en şiddetli)

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Çalışma ortamı: