



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TİNER İLE RAT BEYNİNDE OLUŞTURULAN OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE MELATONİN VE ERİTROPOETİNİN ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. SİBEL KUZUGÜDEN
KAYSERİ-2007



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

TİNER İLE RAT BEYNİNDE OLUŞTURULAN OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE MELATONİN VE ERİTROPOETİNİN ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. SİBEL KUZUGÜDEN

Danışman

Doç. Dr. FİGEN NARİN

KAYSERİ 2007

TEŐEKKÜR

Her Őeyden önce her zaman yanımda olan ve her sıkıntımı paylaşan anneme, eŐime, aileme; tezimin her aŐamasında yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım sayın Doç. Dr. Figen Narin'e ve DEKAM personeline çok teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.SELÜLOZİK TİNER.....	3
2.1.1.Farmakokinetik Ve Metabolizma.....	5
2.1.2.Tinerin Neden Olduğu Serbest Oksijen Radikallerinin (SOR) Oluşumu:.....	6
2.2.SERBEST RADİKAL NEDİR?	7
2.2.1.Serbest Radikallerin Tanımı,Oluşumu Ve Etkileri.....	7
2.2.2.Serbest Radikal Kaynakları.....	8
Endojen Serbest Radikal Kaynakları:	8
Eksojen Serbest Radikal Kaynakları:	10
2.3. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ:	11
2.3.1.Süperoksit radikali	11
2.3.2. Hidrojen Peroksit	12
2.3.3 Hidroksil Radikali.....	12
2.3.4. Hipoklorit Asit	12
2.3.5. Singlet Oksijen.....	13
2.4. REAKTİF NİTROJEN RADİKALLERİ VE NİTRİK OKSİT (NO).....	13
2.4.1. Peroksinitrit (ONOO ⁻).....	16
2.5.OKSİDATİF HASAR.....	17
2.5.1.Lipidlerde Oksidatif Hasar.....	17
2.5.2.Proteinlerde Oksidatif Hasar	20
2.5.3.Nükleik Asitlerde Oksidatif Hasar	20
2.5.4.Karbohidratlarda Oksidatif Hasar	21
2.6.ANTİOKSİDAN NEDİR	21
2.6.1.Enzimatik Antioksidanlar	21
Süperoksit Dismutaz (SOD):	22
Katalaz (CAT).....	23
Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px).....	23
Sitokrom Oksidaz.....	24
2.6.2.Non-Enzimatik Antioksidanlar.....	24
Vitamin E.....	24
Vitamin A	24
Vitamin C (Askorbik Asit).....	24
Melatonin (MEL).....	24
Eritropoetin	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
4. BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR.....	65
7. KAYNAKLAR	67
8. EKLER	75
9. TEZ ONAY SAYFASI.....	79

KISALTMALAR

BHT:	Bütile hidroksitoluen
CYP 450:	Sitokrom P 450
cGMP:	Siklik Guanozin Monofosfat
EPO:	Eritropoietin
ETZ:	Elektron Transport Zinciri
GABA:	Gama aminobütirik asit
GSH:	Redükte glutatyon
GSH-Px:	Glutatyon peroksidaz
GSSG:	Okside glutatyon
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
HO:	Hidroksil radikali
HOCl:	Hipokloröz asit
4-HNE:	4- hidroksinonenal
HPLC:	Yüksek performanslı likid kromatografisi
LDL :	Düşük dansiteli lipoprotein
LPO :	Lipid peroksidasyonu
MDA:	Malondialdehit
MEL:	Melatonin
NADPH:	Redükte Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO:	Nitrik oksit
NO ₂ :	Nitrojen dioksit
N ₂ O ₃ :	Dinitrojen trioksit
NOS:	Nitrik oksit sentaz
NO ₂ ⁺ :	Nitril katyon
3- NT:	3- Nitrotirozin
O ₂ :	Moleküler Oksijen
O ₂ ⁻ :	Süperoksit radikali
ONOO ⁻ :	Peroksinitrit
ONOOH :	Peroksinitröz asit
SOR:	Serbest Oksijen Radikalleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
TSE:	Türk Standartları Enstitüsü
XO:	Ksantin Oksidaz

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1: Serbest Radikallerin Endojen Ve Egzojen Kaynakları.....	9
Tablo 2: Oksijenden Oluşan Toksik Metabolitler	13
Tablo 3: Reaktif Nitrojen Radikalleri	15
Tablo 4: Rat Ağırlıkları	50
Tablo 5: Çalışma Grupları GSH-Px Plazma ve Doku Aktiviteleri	51
Tablo 6: Çalışma Grupları Plazma ve Doku SOD Aktiviteleri	52
Tablo 7: Çalışma Grupları Plazma ve Doku 3-NT Düzeyleri	52
Tablo 8: Çalışma Grupları Plazma ve Doku MDA Düzeyleri.....	53

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1: Hippürik Asit	6
Şekil 2: Serbest Oksijen Radikallerinin Neden Olduğu Klinik Tablolar	11
Şekil 3: Nitrik Oksit'in Oluşumu ve Bazı Fonksiyonları	14
Şekil 4: 3-NT Oluşumu.....	17
Şekil 5: Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistemin Dengesi Hücrenin Kaderini Belirler	17
Şekil 6: Lipid Peroksidasyonunun Kimyasal Yolu ve Oluşan Ürünler	19
Şekil 7: MDA'nın Yapısı	20
Şekil 8: Enzimatik Antioksidanlar ve Etki Mekanizmaları.....	22
Şekil 9: Melatoninin Yapısı	25
Şekil 10: Melatonin Sentezi	26
Şekil 11: Eritropoetin Etki Mekanizması	27
Şekil 12: Ksantin-Ksantin Oksidaz Sisteminde NBT Redüksiyonunun SOD İle İnhibisyon Grafığı	35
Şekil 13 : Logaritmik SOD İnhibisyon Grafığı.....	35
Şekil 14: 0,125 µmol/L 3-NT Standart Kromotogramı.....	38
Şekil 15: 1 µmol/L 3-NT Standart Kromotogramı.....	38
Şekil 16: 10 µmol/L 3-NT Standart Kromotogramı.....	39
Şekil 17: Pik Alanlarına Göre 3-NT Standart Grafığı.....	39
Şekil 18: Tiner Verilen Rata Ait Gözlenebilir 3-NT Kromotogramı	40
Şekil 19: Tiner Verilen Rata Ait 3-NT Standardı Eklenmiş Kromotogram.....	40
Şekil 20: Kontrol Grubu Rata Ait 3-NT Bulunamayan Kromotogram.....	41
Şekil 21: Kontrol Grubu Rata Ait 3-NT Standardı Eklenmiş Kromotogram.....	41
Şekil 22: 0,5µmol/L konsantrasyonlu MDA Standardı	43
Şekil 23: 1µmol/L konsantrasyonlu MDA Standardı.....	44
Şekil 24: 5 µmol/L konsantrasyonlu MDA Standardı.....	44
Şekil 25: 20 µmol/L konsantrasyonlu MDA Standardı	45
Şekil 26: 30 µmol/L konsantrasyonlu MDA Standardı	45
Şekil 27: Pik Alanlarına Göre doku MDA Standart Grafığı	46
Şekil 28: Pik Alanlarına Göre plazma MDA Standart Grafığı.....	46
Şekil 29: Tiner Grubunda 5 Nolu Rata Ait MDA Kromotogramı	46
Şekil 30: Protein Standart Grafığı.....	48

TİNER İLE RAT BEYNİNDE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE MELATONİN VE ERİTROPOETİNİN ETKİSİ

ÖZET

Amaç: Tiner (TİN) çok geniş kullanımı olan endüstriyel bir solventtir. Sanayide yaygın kullanım alanı olan sellülozik tinerin son yıllarda ülkemizde, özellikle de adölesan çağındaki çocuklar arasında giderek artan uyuşturucu amaçlı kullanımı, ciddi sağlık ve sosyal sorun haline gelmiştir.

Organik solventlerin hücre hasarındaki toksik etkilerini reaktif oksijen ürünleri oluşumu yolu ile gösterdikleri konusunda bazı kanıtlar mevcuttur.

Bu çalışma, rat modeli kullanılarak, tiner inhalasyonu ile, fonksiyonel nörotoksisite oluşturmak; bu ratlarda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunun varlığını araştırmak, toksisitenin oksidatif stresle ilişkili olup olmadığını belirlemek ve melatonin (MEL) ve eritropoietinin (EPO) nörotoksisite oluşumu üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapıldı.

Gereç Yöntem: Erkek Sprague-Dawley ratlar her biri 10 rat içeren dört gruba ayrılarak çalışmaya alındı. Ratların üç grubuna 30 gün boyunca günde 1 saat 3000 ppm tiner

buharı uygulandı. Tiner uygulanan gruplardan birine 10 mg/kg MEL enjekte edildi (TİN+MEL) . Diğer tiner verilen gruba da 1500 Ü/kg olacak şekilde EPO enjekte edildi (TİN+EPO). Kontrol grubuna aynı süre taze hava uygulandı ve 2 ml/kg serum fizyolojik enjekte edildi.30 gün sonunda plazmaları alınan ratlar sakrifiye edilerek beyin dokuları çıkarıldı. Elde edilen plazma ve beyin homojenatlarında malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), nitrotirozin (3-NT) seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Tiner grubunda MDA seviyeleri ve SOD aktivitelerinin arttığı, GSH-Px aktivitelerinin azaldığı ve 3-NT 'nin varlığı tespit edildi. TİN+MEL ve TİN+EPO gruplarında, MDA seviyelerinin belirgin şekilde azaldığı, SOD aktivitelerinin nispeten azaldığı, GSH-Px aktivitelerinin belirgin şekilde arttığı ve 3-NT'nin oluşmadığı da tespit edildi.

Sonuç: Bu çalışmada tinerin beyin dokusu ve plazmada oksidatif stresi arttırdığı bulundu. Bulgularımıza göre tiner toksisitesinin oksidatif stres oluşumunda önemli rol oynadığı; tinerle birlikte melatonin ve eritropoetin kullanımının tinere bağlı yan etkileri önleyebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, eritropoietin, melatonin, oksidatif stres, tiner.

**THE EFFECT OF MELATONIN AND ERYTHROPOIETIN
ON THE OXIDATIVE STRESS, INDUCED
BY THINNER INHALATION IN RAT BRAIN**

ABSTRACT

Aim: Thinner (TIN) is a widely used industrial solvent. There is increasing concern about involuntary exposure of industrial workers and abuse of paint thinner among young snuffers has become a social and public health problem.

There is some evidence that organic solvents may express their toxicity by the way of reactive oxygen species which induce cell damage.

This study was planned to make functional neurotoxicity by using thinner inhalation in rat model, to investigate protein oxidation, and lipid peroxidation in thinner exposed rats and whether the toxicity may be related to oxidative stress and

also to define the effects of melatonin (MEL) and erythropoietin (EPO) on neurotoxicity .

Materials and methods: Male Sprague-Dawley rats were divided into four groups each consisting of ten animals. Three groups of rats were exposed to 3000 ppm thinner fumes 1 h/day for 30 days. One of the thinner-exposed group was injected 10 mg/kg body weight MEL daily (TIN+MEL). Another thinner-exposed group also was injected 1500 U/kg body weight EPO daily (TIN+EPO). Control group of rats exposed to fresh air, were injected 2 ml SF/kg/ day. After 30 days, plasma obtained all rats were decapitated and brain tissues were removed. The levels of malondialdehytis (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), nitrotyrosine (3-NT) were measured in plasma and brain homogenates.

Results: MDA levels and SOD activities were increased, GSH-Px activities were decreased and the presence of 3-NT was determined in plasma and tissue samples in thinner group. In TIN+MEL group and TIN+EPO group, MDA levels decreased significantly, SOD activity tended to be lower, GSH-Px activity increased significantly and 3-NT was not occurred.

Conclusion: It was shown that thinner elevates the oxidative stress in plasma and brain tissues. According to our findings; oxidative stress may have an important role in thinner toxicity, the usage of MEL and EPO together with thinner may be propose to prevent thinner's side effects.

Key Words: Antioxidants, erythropoietin, melatonin, oxidative stres, thinner.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Organik çözücüler, günlük yaşamda sık karşılaşılan materyallerdir. Evlerde ve bir çok endüstriyel iş kolunda kullanılan sıvı maddelerdir. Sayıları gün geçtikçe artmaktadır. 1880 yılında yirmi civarında çözücü biliniyorken, artık sayıları bini aşmıştır. Bu çözücüler başlıca; boya incelticisi olarak, kuru temizleme sıvılarında, cilalarda ve yapıştırıcılarda bulunmaktadır. Bu materyallerin sağlık üzerine olan olumsuz etkileri göz ardı edilmektedir (1).

Değişik iş kollarında yaşamın her alanına girmiş olan bu organik çözücülerle uzun süreli ve düşük dozda temas (özellikle solunum, deri ve oral yolla) söz konusudur. Madde bağımlıları tineri yüksek dozda ve inhalasyon yolu ile almaktadırlar. Tiner ucuz, ulaşılması kolay ve yasak olmayan bir materyaldir. Bu özelliklerinden dolayı sıklıkla düşük sosyoekonomik seviyedeki kişiler, uyuşturucu materyal olarak tineri tercih etmektedirler (1). İngiltere’de yapılan bir araştırmada uçucu madde bağımlılığının özellikle 20 yaş altında olduğu ve erkeklerde daha sık rastlandığı belirlenmiştir (2).

Organik solventlerin hücredeki toksik etkilerini; sitokrom P 450 (CYP 450)’ye bağlı monooksijenazın arttırılması ve süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) oluşumu yoluyla gösterdikleri bildirilmiştir. Organik çözücülerin serbest radikal üretimini ve lipid peroksidasyonunu (LPO) arttırdığı rapor edilmiştir (3). Serbest oksijen radikalleri (SOR) nükleik asitler, serbest aminoasitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar

ve bağ dokusu makromolekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün sınıflara dahil bileşiklerle reaksiyona girerek, reversibl veya irreversibl hasara neden olmaktadır (4). Ayrıca serbest radikallerin iltihap, iskemi ve reperfüzyon, kanser ve yaşlanma gibi temel hastalık proseslerinde çok büyük öneme sahip oldukları, bu konulardaki çalışmalar ilerledikçe daha iyi anlaşılmaktadır (4). Canlı organizmalar, oldukça reaktif olan ve hemen hemen tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek zarar meydana getirme potansiyeline sahip olan bu yapıları etkisiz hale getirmek üzere savunma mekanizmalarına ihtiyaç duyarlar. İnsan organizmasını serbest radikal hasarından koruyan enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalar mevcuttur. Canlı hücreleri serbest radikallerin hasarından koruyan başlıca enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) dır. Non-enzimatik mekanizmalar arasında ise başlıca, E ve C vitamini, glutatyon (GSH), melatonin (MEL) ve ürik asit bulunmaktadır (5). Melatonin en önemli endojen antioksidanlar arasında yer almaktadır (6). Eritropoietin ise nöroprotektif etkisi yeni keşfedilen ve bilinmeyen pek çok yönü olan bir ajandır. Etkilerinden birisi de oksidatif hasarı önlemesidir (7).

Organik çözücülerin sağlık üzerinde yarattığı olumsuz etkiler önem verilmesi gereken bir konudur. Bu kadar yaygın olarak karşılaşılan tiner üzerine yapılan çalışmaların artması ve zararlı etkilerinin belirlenmesi önemli bir sosyal görevdir. Tinerin sağlık üzerine olan etkilerinin belirlenmesi; bu konuda toplumun, ailenin ve fertlerin bilgilendirilmesi gereklidir. Tiner özellikle beyine etkilidir ve bu etkiler kapkaç, gasp, cinayet gibi pek çok sosyal probleme de yol açmaktadır. Bu çalışmada; tinerin zararlı etkilerini SOR oluşumu yoluyla yapıp yapmadığı; bu etkilerin melatonin ve eritropoietinle önleyip önleyemeyeceğimizi araştırmayı planladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.SELÜLOZİK TİNER

Ülkemizde bulunan tiner genellikle boya tineri olarak adlandırılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal özellikleri Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından belirlenmektedir. Selülozik ve sentetik olmak üzere iki çeşit tiner bulunmaktadır (8).

Selülozik tiner; bünyesinde hidrokarbonlar, esterler, glikol eterler, ketonlar ile alkoller bulunduran ve nitro-selüloz esaslı olup; her türlü boyaların, verniklerin vizkozitelerini düşürerek uygulama kolaylığı sağlamak için kullanılan çözücüdür (9). Boya tineri, kimyasal yapısından dolayı saf bir madde olarak tanımlanamaz ve deneysel çalışmalarda gerçek konsantrasyonunun belirlenmesi çok zordur. Boya tinerinin, yapılan gaz kromatografik analizinde 200'den fazla aromatik ve alifatik maddenin karışımından oluştuğu ortaya çıkarılmıştır (10).

TSE'ye göre selülozik tinerin asetik asit oranı en çok % 0.03; toplam hidrokarbon miktarı en çok % 56; aromatik hidrokarbon oranı en az % 30; alifatik hidrokarbon oranı en çok % 25; alkoller, esterler, ketonlar ve glikol eterlerin oranı ise en az % 44 olmalıdır. Benzen ve klorlu hidrokarbonlar ise bulunmamalıdır (9). İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü tarafından selülozik tinerin içeriği de Carabez ve ark. (9) yaptığı gibi gaz kromatografisi metodu ile analiz edilmiştir. Sonuçlara göre Türkiye'de kullanılan tiner, yaklaşık olarak %63 oranında toluen, %13 aseton, %10 izobutil asetat, %7,5 izobutanol

ve %6.5 oranında butilglükol içermektedir. Tinerin etkilerinden en çok sorumlu olanı toluendir . Diğerleri bu etkileri aktive ederler (11)

Toluen: Toluen, benzen halkasına metil grubu eklenmesi ile elde edilen aromatik bir hidrokarbondur. Benzen ile karşılaştırıldığında daha fazla yağda çözünen ve daha az uçucu olan bu molekül yanıcı olması yanında patlayıcıdır. Naftenden zengin petrol ürünlerinden ve kömürden hidroformasyon ile üretilir. Renksizdir ve karakteristik bir kokusu vardır. Endüstride boya, vernik, zambak ve cilalarda çözücü olarak sıklıkla kullanılır. Toluenin karsinogenik etkisi yoktur. Teratojenik olduğu ve plasentadan geçtiği bilinmektedir (10).

Aseton: Genel olarak izopropil alkolün dehidrojenasyonu sonucu elde edilir. Uçucu ve yanıcı olmasının yanı sıra tipik bir kokusu vardır. Kimyasal ve farmakolojik işlemlerde, tekstilde, tinerde, yapışkanlarda, temizlik malzemelerinde ve laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Nitroselüloz, asetilen, reçine, yağ, selüloz asetatta çözücü olarak yer almaktadır. Akut ve kronik toksisitesi çok nadir olup, yan etkileri azdır. Toksik etkisi sindirim ve inhalasyon yoluyla meydana gelir. Bütün vücut sıvılarına yayılır (10).

İzobutil-asetat: İzobutil alkol ve asetik asitten elde edilir. Oksitleyici maddelerin varlığında veya orta derecede ısıtıldığında yanıcı olup, buharı patlayıcıdır. Organik maddelerde çözücü ve tatlandırıcı olarak veya birçok karışımda butil asetat ve metil izobutil keton yerine kullanılabilir. İzobutil asetatin yüksek konsantrasyonlarda narkotik etkisi olup; gözlerde, burun ve boğazda irritasyon yapar. İntoksikasyon şiddetli ise baş ağrısı, bulantı, kusma, baş dönmesi, santral sinir sistemi depresyonu ve bilinç kaybı gözlenir. İzobutil asetatin karsinogen veya mutajen olmasına dair bir bilgi yoktur (10).

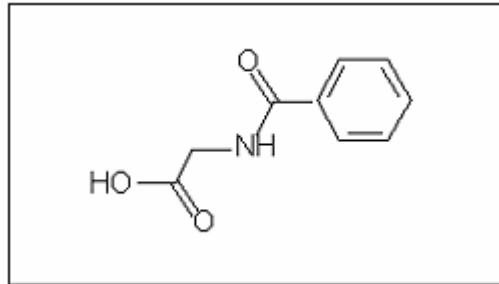
İzobutanol: Butiraldehidin alkole indirgenmesiyle meydana gelen izobutanol yanıcı bir maddedir. Cilalarda, butil asetatla birlikte nitro selüloz yapımında veya yağlarda, reçinelerde, verniklerde, formaldehid köpüğünde çözücü olarak kullanılır. Antibiyotiklerin, hormonların ve vitaminlerin farmakolojik sentezinde de kullanılmaktadır. İdrarda metabolitleri olan asetik asit, asetaldehit, izobutilaldehit ve izovalerik asit şeklinde atılır. İnhalasyonu ve deri emilimi fazla toksik değildir. Ancak; göz üzerinde şiddetli toksik etkileri bulunmaktadır. Karaciğer, kalp ve böbreklerde yağ birikimine neden olup, karaciğer üzerinde karbontetrakloridin etkisini artırır (10).

2.1.1.FARMAKOKİNETİK VE METABOLİZMA

İnhalan maddelerin en toksiklerinden biri olan tiner, vücuda solunum yoluyla alındıktan 10 saniye sonra bronşlardan atardamar kanına karışmaktadır. Kan yoluyla tüm vücuda yayılmakta; adipoz dokuda, yüksek yağ içeren dokularda ve vasküler dokularda birikmektedir. Uzun süreli tiner kullanımının akciğer, karaciğer ve beyin dokularında kalıcı hasarlara yol açtığı gösterilmiştir (3, 12, 13).

Toluen, kan yoluyla dokulara ulaştıktan sonra, çeşitli enzimatik etkileşimlerle diğer bileşiklere dönüşmektedir. Vücuda giren toluen; ilk olarak karaciğerde bulunan sitokrom P-450 (CYP-450) enzimleri ile etkileşerek yan zinciri hidroksillenmekte ve benzil alkole dönüşmektedir. Daha sonra alkol dehidrogenaz enzimi ile oksitlenerek, benzaldehide ve aldehid dehidrogenaz etkisi ile benzoik aside transforme olmaktadır. Oluşan bu benzoik asidin, idrar yoluyla vücuttan atılması için bir dönüşüme daha ihtiyacı vardır. Benzoik asit glisin ile birleşerek temel idrar metaboliti olan hippürik asidi oluşturur. Vücuda giren toluenin %60-70'i 24 saat içinde hippürik aside dönüştürülerek idrar yoluyla vücuttan atılmakta, %10-20'si de solunum ve terleme ile deriden atılmaktadır (14). Yarı ömrü 0,5-3 gündür (15).

İnhalan maddelerin kötüye kullanımı en yaygın olarak 11-17 yaş arasında gözlenir ve 13-15 yaşları arasında pik yapar . Başlangıç yaşı genellikle 9-15 arasında olmakla birlikte, 2-6 yaşlarında bile başlayan olgular bildirilmiştir. Erkeklerde daha sıktır. Yağda çözünen organik maddelerden oluşan uçucu maddelerin hepsi kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçerek, bilinç düzeyini etkiler. İnhalanların merkezi sinir sistemindeki farmakolojik etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak; alkole benzer biçimde, nöronal hücre membranının akışkanlığını ve beyin gama aminobütirik asit (GABA) düzeylerini arttırarak etki gösterebileceği öne sürülmüştür. Etkileri birkaç dakikadan birkaç saate kadar devam edebilir. İdrarda hippurat/ kreatinin oranının 1gr/gr'ın üstünde olması tiner kullanımını düşündürebilir; ancak, benzoik asit gibi gıda koruyucuların yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceği de unutulmamalıdır (15,16)



Şekil 1: Hippürik Asit

Dağılımı ve Etkileri: Tinerin akut etkileri keyif verici olup; öfori, zindelik, ajitasyonu takiben gevşeme, baş dönmesi, görsel ve işitsel halüsinasyonlar, yorgunluk ve uyku hali şeklinde gözlenir. Ayrıca kullanım sırasında öksürme, tükürük miktarında artış, deride kızarma, bulantı, kusma, fotofobi, oryantasyon bozukluğu, diplopi, ataksi, konuşmada bozulma, reflekslerde azalma ve nistagmus ortaya çıkar (17). Kronik kullanımı sonrası aşırı kilo kaybı, yorgunluk, hırçın davranışların yanı sıra santral sinir sisteminde, kalpte, karaciğerde, akciğerlerde ve böbreklerde kalıcı hasarlar oluşur (1,13,17). Tiner, inhalasyonundan sonra, lipid yönünden zengin olan santral sinir sisteminde daha fazla toplanarak hasar oluşturur (15).

Tinerin dokular üzerinde yarattığı etki histopatolojik olarak incelendiğinde; santral sinir sisteminde intersinaptik aralığın mesafesinde artma, postsinaptik membran dansitesinde ve sinaps aralığındaki veziküllerin sayısında azalma, ayrıca optik sinir miyelin kılıfında ayrılmalar bulunmuştur. Diğer bir çalışmada, altmış gün inhalasyon sonrası periferik miyelinli sinir liflerinin boyut ve kalınlıklarında değişiklikler tespit edilmiş, miyelin kılıfta ödem, aksonlarda incelme gözlenmiştir. Doksan gün sonrasında ise sinir liflerinde atrofi saptanmıştır (9,15).

Çözücü inhalasyonunda majör risk ani ölümdür. Muhtemel sebepler vagal stimülasyon, anoksi, solunum depresyonu ve kardiyak aritmilerdir. Kardiyak aritmiler en sık ölüm nedenidir. Tiner; serebellar bozukluklar, aritmi, optik nöropati, nöropsikiyatrik bozukluklar, periferik nöropati ve akut kas güçsüzlüğüne yol açmaktadır (2,18).

2.1.2.TİNERİN NEDEN OLDUĞU SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ (SOR)'NİN OLUŞUMU:

Organik solventlerin hücre hasarındaki toksik etkilerini, CYP-450'ye bağlı monooksijenazı arttırmak suretiyle, SOR oluşumu yolu ile gösterdikleri de bildirilmiştir (Omtia mattia). Oluşan süperoksit anyonu, ferril ve hidroksil iyonları gibi SOR'nin LPO'nu başlattığı bilinmektedir. Membranlarda LPO oluşması; akışkanlık azalmasına, membrana bağlı proteinlerin hücre içi Ca^{2+} düzeyi artışına, Ca^{2+}/Mg^{2+} ATP-az aktivitesi artışına ve bunların sonucunda membran fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Peroksidatif hasarlarda artma, antioksidan kapasitede ise azalma tiner inhalasyonunun doğurduğu önemli komplikasyonlardandır (19-21).

2.2.SERBEST RADİKAL NEDİR?

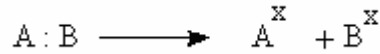
2.2.1.SERBEST RADİKALLERİN TANIMI, OLUŞUMU VE ETKİLERİ:

Atomlar, nötron ve protondan oluşan bir çekirdek ve bu çekirdeğin çevresinde dönen elektronlardan oluşurlar. Her türden kimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Atom çekirdeğinin çevresindeki, elektronların bulunduğu boşluğa da orbital denir. Her bir orbitalde spinleri birbirine zıt ($\uparrow\downarrow$) olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşleşmiş veya ortaklanmış elektronlar denir (22).

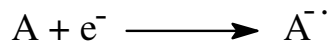
Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulduklarında bozular. Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır . Başka bir ifadeyle serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir (22,23).

Serbest radikaller başlıca üç yolla meydana gelirler (23):

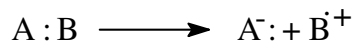
a- Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Bu kovalent bağların ayrışması enerji isteyen bir olaydır ve ısı, elektromagnetik radyasyon gibi kuvvetlerle meydana gelebilir. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektronlar bulunan iki adet yüksek reaktiviteli serbest radikal oluşur:



b-Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi veya transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi sonucunda, dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa; bu tür indirgenme, radikal oluşumuna sebep olur:



c- Kovalent bağlı normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya molekülün heterolitik bölünmesi sonucunda radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybetmesi sonucunda, dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa; radikal formu oluşur. Bu durumda serbest radikal değil, iyonlar meydana gelir:



Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidirler. Zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde de önemli rol oynarlar. Moleküler oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunludur. Hücre

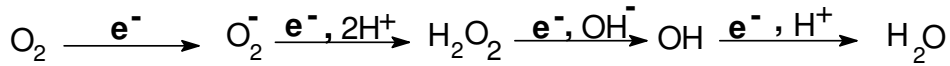
farklılaşması ve apoptoz, mikroorganizmalara karşı savunma, steroid yapıda çok sayıdaki bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için, serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur (23, 24).

2.2.2. SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI

Biyolojik sistemlerde, serbest radikal oluşumu normal metabolik olayların seyri esnasında meydana geldiği gibi, organizmanın çeşitli dış etkenlere maruz kalmasıyla da oluşabilir. Bu nedenle serbest radikal kaynakları, endojen ve ekzojen olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (25) (Tablo 1).

Endojen Serbest Radikal Kaynakları:

Elektron Transport Zinciri (ETZ): Mitokondri çok küçük bir organel olmasına rağmen, hücre için önemi büyüktür; çünkü enerji üretimini ve hücre solunumu sağlar. Fizyolojik şartlarda ETZ ye giren oksijenin %1-3'ü $O_2^{\cdot-}$ e dönüşmektedir (25). Mitokondri iç zarında $O_2^{\cdot-}$ nin dismutasyonu ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumu ilk kez 1971 yılında Loschen ve Flohe (26) tarafından gösterilmiştir:



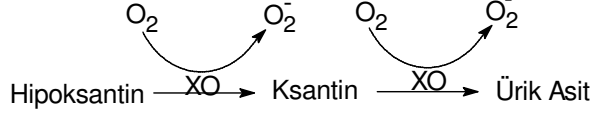
Sitokrom P 450 (CYP 450): Endoplazmik retikulumda bulunan bir enzim sistemidir. Kimyasal ajanlardan serbest radikal oluşturmasında en önemli mekanizma, ksenobiyotiklerin mikrozomal CYP 450 sistemi ile detoksifikasyonudur. Bu sistem ,moleküllere bir elektron ilavesi ile veya molekülden bir elektron çıkararak toksik metabolitleri normal ürünlere çevirir. Bu oksidasyon-redüksiyon olayları sırasında elektronlar O_2 'e akarak $O_2^{\cdot-}$ meydana getirebilir (27).

Tablo1: Serbest Radikallerin Endojen ve Ekzojen Kaynakları.

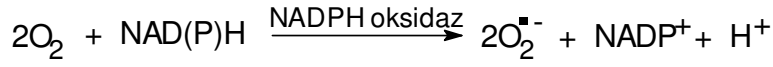
ENDOJEN KAYNAKLAR	
Mitokondrial elektron transport zinciri	
Mikrozomal elektron transport zinciri	
Oksidan enzimler	
	1. ksantin oksidaz
	2. indolamin dioksijenaz
	3. triptofan dioksijenaz
	4. siklooksijenaz
	5. lipooksijenaz
	6. monoaminooksidaz
fagositik hücreler	1. nötrofiler
	2. monosit ve makrofajlar
	3. eozinofiller
	4. endotelial hücreler
otooksidasyon reaksiyonları	
EKZOJEN KAYNAKLAR	
Diyetsel:	
	1. doymamış yağ asitleri ve hayvansal proteinler bakımından zengin, sebze ve meyve bakımından fakir beslenme
	2. obezite
	3. aşırı demir ve bakır alımı
	4. gıdaların uygun olmayan koşullarda hazırlanması ve saklanması
	5. alkol
Çevresel	1. iyonize radyasyon
	2. hava kirliliği
	3. sigara
	4. asbest , pestisitler gibi kirleticiler
	5. güneş ışığı
	6. ısı şoku
	7. stres
İlaçlar:	
	1. antineoplastik ajanlar (adriamisin)
	2. glutatyon tüketen ilaçlar (asetaminofen)

Araşidonik asit metabolizması: Mikrozomal ve plazma membranı tarafından radikal üretiminin önemli enzimleri olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz (araşidonik asit metabolizması) aktivitesi, serbest oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asit salınımına yol açar. Araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest ara ürünleri meydana gelmektedir (28).

Ksantin Oksidaz (XO): Çok yönlü ve hemen hemen bütün canlı türlerinde bulunan XO, pürinlerin hidrosilasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Hipoksantin, oksijen varlığında XO ile ksantine oksitlenir; ksantin ise aynı enzimle tekrar oksitlenerek ürik asidi oluşturur. Her iki adımda da $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 radikalleri oluşur (29).



NADPH oksidaz: Özellikle fagosit ve lenfositlerde bulunan bu enzim mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma elemanıdır ve plazma membranının dış yüzeyinde yerleşmiştir. Bir mikroorganizma ile karşılaşıldığında nötrofiller aktive olarak lizozomal içeriklerini dışarıya vermeye başlarlar. SOR oluşumu ile birlikte mitokondri dışındaki oksijenin tüketiminde bir patlama gösterirler ve mikroorganizma yok edilir. Bu olaya “solunum patlaması” adı verilir ve bu olaydan sorumlu olan enzim NADPH oksidazdır (4, 22).



Peroksidomlar: Özellikle karaciğerde bulunmakla beraber diğer bütün organlarda da mevcuttur. Yüksek miktarda oksidaz içerdiklerinden dolayı, çok önemli hücre içi H_2O_2 kaynağıdır. Ancak peroksidomlarda katalaz aktivitesi de çok yüksek olduğu için H_2O_2 'in zararlı etkisi kısmen ortadan kaldırılır (22,30).

Diğer: Organizmada potansiyel serbest radikal kaynağı olan bu enzim ve sistemler dışında; askorbik asit, tiyoller, hidrokinoonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiopterinler ve antibiyotikler gibi indirgenmiş elektron transferi yapan çözümlü hücresel bileşiklerin otooksidasyonu da $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikali oluşur (28).

Ekzojen Serbest Radikal Kaynakları:

Organizmadaki serbest radikal reaksiyonlarını artıran ekzojen kaynaklar; diyetel, çevresel ve ilaçlar olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Doymamış yağ asitleri, dayanıklı olmayıp kolayca otooksidasyona uğramaktadırlar. Yüksek kalorili diyet özellikle mitokondri kaynaklı serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır (4, 22, 25).

Diyetsel Fe ve Cu içeriğindeki artış, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarını hızlandırmaktadır. Gıdaların uygun olmayan koşullarda hazırlanması ve saklanması da radikal reaksiyonları için uygun ortam yaratmaktadır (31).

Fazla miktarda ve uzun süre alkol alımı, sigaranın gerek dumanı gerekse katranı çeşitli radikallerin oluşmasına neden olmakta ve organizmanın antioksidan kapasitesini azaltmaktadır. Ozon, azot dioksit, kükürt dioksit, hidrokarbonlar ayrıca asbest ile ksenobiyotikler, önemli birer çevre sorunu ve radikal kaynağı olabilmektedirler (4, 25).

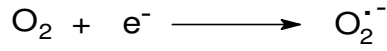
SOR'un; Şekil 2'de de gösterildiği üzere birçok organ ve sistemleri etkileyen pek çok hastalığın patogeneğinde etkili olduğu öne sürülmektedir (4, 31):



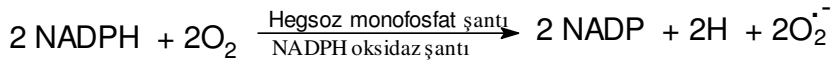
Şekil 2: Serbest Oksijen Radikallerinin Neden Olduğu Klinik Tablolar

2.3. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

2.3.1.SÜPEROKSİT RADİKALI: Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali, $O_2^{\cdot-}$ dir. $O_2^{\cdot-}$, kimyasal olarak oksijen molekülüne bir elektronun eklenmesi ile oluşur (31, 32).



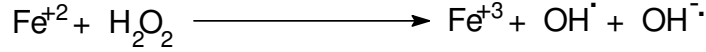
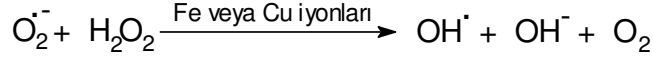
Bu reaksiyon, elektronların mitokondride solunum zincirlerindeki taşıyıcılardan sızması ve direkt olarak oksijene geçmesi ile meydana gelebilir. $O_2^{\cdot-}$ in en önemli kaynağı polimorfonüveli lökositler (PMNL) dir. PMNL'lerdeki üretim, membrana bağlı redükte NADPH oksidaz şantı veya heksoz monofosfat şantının bir sonucudur (31, 32).



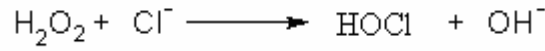
2.3.2 HİDROJEN PEROKSİT: H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonundan sonra NADPH oksidaz şantından PMNL'ler tarafından üretilir. Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin esas üretimi; $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu ile olup, iki $O_2^{\cdot-}$ yapılarına iki hidrojen atomu alarak H_2O_2 ve O_2 oluştururlar. Bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) adı verilen enzim tarafından katalizlenir (23). H_2O_2 , birçok fizyolojik fonksiyonu olan zayıf bir oksidandır. Hücre membranları arasında serbest olarak difüze olabilme yeteneği mevcuttur. H_2O_2 , fizyolojik pH ve ısıda, metal iyonları yokluğunda oldukça stabil olması yanında, özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur (31, 32). Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında LPO gibi radikal

tepkimleri başlatabilir. Bu reaksiyona Fenton Reaksiyonu adı verilir (33). Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir (31,32).

2.3.3. HİDROKSİL RADİKALİ (OH \cdot): Bilinen en reaktif oksidandır. Yarılanma ömrü çok kısadır. Haber-Weiss reaksiyonu ile veya Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 'ten meydana gelir (33).



2.3.4. HİPOKLORÖZ ASİT (HOCl): Enzimatik olarak, nötrofiller tarafından üretilen, güçlü bir oksidandır. Fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktif nötrofiller, makrofajlar ve eozinofiller HOCl'i üretirler. Özellikle H_2O_2 üzerine myeloperoksidaz'ın etkisi ile nötrofillerde oluşur. Hücre dışına salınan antibakteriyel bir ajandır. Ancak çok düşük konsantrasyonlarda bile belirli protein fonksiyonlarını bozabilme yeteneğindedir. Yüksek konsantrasyonlarda hücre lizisi oluşturabilir. α 1-antitripsini okside ve nötrofil kollajenazını aktive etme yeteneğinde olan HOCl, temizleyici antioksidanlar olan albümin ve askorbik asit ile uzaklaştırılır (34).



2.3.5. SİNGLET OKSİJEN: 1O_2 gerçek bir radikal değildir ve eşleşmemiş elektron içermez.. Diğer reaktif oksijen türleri ile karşılaştırıldığında oldukça zararsızdır. 1O_2 , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünden ters yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi ile oluşabileceği gibi, $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ve H_2O_2 'in HOCl ile reaksiyonu sonucunda da meydana gelebilir. Tablo 2'de serbest oksijen radikalleri görülmektedir (35).

Tablo 2: Oksijenden Oluşan Toksik Metabolitler

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH^{\cdot})	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Hidroperoksi radikali (HO_2^{\cdot})	Hipokloröz asit (HOCl)
Alkoksi radikali (LO^{\cdot})	Singlet oksijen (1O_2)
Peroksi radikali (LOO^{\cdot})	Ozon (O_3)
Tiyl radikali (RS^{\cdot})	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)
Nitrik oksit (NO)	

2.4. REAKTİF NİTROJEN RADİKALLERİ VE NİTRİK OKSİT (NO)

NO, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyonu içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan önemli bir pro-oksidatif ve antioksidatif sinyal molekülü olması yanında, çok reaktif bir radikaldir (36, 37).

Yarı ömrü çok kısa olan (10-20 sn) lipofilik özellikteki bu serbest radikal; nitrik oksit sentaz (NOS) adı verilen enzim tarafından yarı- esansiyel ve bazik yan zincirli bir amino asit olan L-argininin guanido nitrojeninden oluşmaktadır. Bu reaksiyonda O₂ ve NADPH'a ihtiyaç duyulmaktadır. Tetrahidrobiopterin, FMN, FAD ve hem; bu enzimin kofaktörleri olup, reaksiyon sonucunda Şekil-4'te gösterildiği gibi L-sitrullin ve NO açığa çıkar (36, 37).

NOS enziminin iki ana formu izole edilmiştir.

1-Yapısal (constitutive, cNOS).

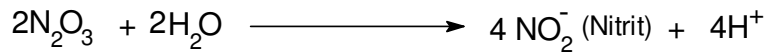
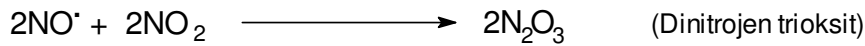
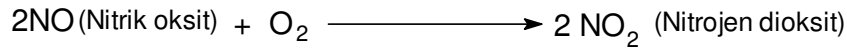
Nöronal (nNOS, Tip 1 NOS)

Endotelyal (eNOS, Tip 3 NOS)

2-İndüklenebilen (Inducible, iNOS, Tip 2 NOS).

Bu izoenzimlere özgü genler kromozom 7 (endotelyal NOS-eNOS), 12 (noral NOS-nNOS) ve 17 (indüklenebilen NOS-iNOS) üzerinde bulunmuştur (37).

Önceleri taşıdığı ortaklanmamış elektronu nedeniyle serbest radikal olduğu için zararlı bir molekül olarak nitelendirilen NO'nun, aslında kan basıncını ve vazodilatasyonu dengede tutan önemli bir molekül olduğu yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir. NO'nun birçok memeli hücre ve dokusunun fonksiyonlarını düzenlemede rol aldığı da bilinmektedir (38). NO, H₂O'da az çözünen, lipofilik, basit gaz yapısında, kolay difüze olabilen, bir adet eşleşmemiş elektron içeren, Fe, Co, Cu gibi geçiş metalleri ile reaksiyona giren; O₂, O₂⁻ ve H₂O ile reaksiyona girerek sonuçta sırasıyla NO₂ (nitrojen dioksit), peroksinitrit (ONOO⁻) ve nitrat / nitrit (NO₃⁻ / NO₂⁻) oluşturma eğilimine sahip bir moleküldür(25, 38).



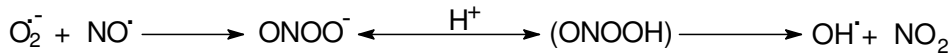
Biyolojik sistemler yapılarında +1 den +5 'e kadar değişen, farklı oksidasyon durumlarında nitrojen atomu bulduran çeşitli nitrojen oksitlere maruz kalırlar. Bu türlerden genellikle reaktif nitrojen türleri olarak söz edilir. Biyolojik sistemlerde oluşturulabilen çeşitli reaktif nitrojen türleri Tablo3'te özetlenmiştir (39).

Tablo-3:Reaktif Nitrojen Radikalleri

+1	Nitroksil Anyonu	NO ⁻
+2	Nitrik Oksit	NO
+3	Nitrozil Katyonu	NO ⁺
	Nitröz asit / Nitrit	HNO ₂ / NO ₂ ⁻
	Peroksinitröz asit/	ONOOH /
	Peroksinitrit	ONOO ⁻
	Dinitrojen Trioksit	N ₂ O ₃
	Nitrojen Dioksit	NO ₂
+4	Dinitrojen Tetraoksit	N ₂ O ₄
+5	Nitrik Asit / Nitrat	HNO ₃ / NO ₃ ⁻
	Nitril Katyonu	NO ₂ ⁺

2.4.1. PEROKSİNİTRİT (ONOO⁻) :

ONOO⁻, NO'nun O₂⁻ ile invivo reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir türevidir (40). NO ve O₂⁻'nin ONOO⁻'e göre nispeten daha dayanıklı olmalarına karşılık, ONOO⁻ daha reaktiftir. Normal koşullarda, SOD, oluşan tüm O₂⁻'yi dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir fakat, O₂⁻ düzeyi çok artmışsa ya da fazla miktarda NO radikali meydana gelmişse, ONOO⁻ oluşur (41). Çünkü NO ve O₂⁻ konsantrasyonlarındaki her 10 katlık artış için ONOO⁻ oluşumunda artış 100 kattır. ONOO⁻, konjugatı olan ONOOH ile bir denge halindedir. ONOOH, bir saniyeden az olan yarılanma ömrü ile anstabil ve hızla OH⁻ benzeri reaktiviteye sahip bir tür oluşturmak için parçalanır (42).

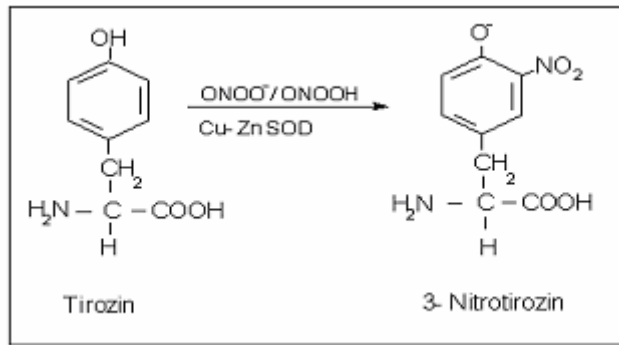


ONOO⁻, eşlenmemiş elektron içermemesi nedeniyle serbest radikal değildir. Çok güçlü oksidan olması; dekompozisyonuyla OH⁻ benzeri ürün oluşması ve nitrokarbonat anyonu gibi çeşitli reaktif türlere kaynak oluşturmasıyla açıklanabilir. ONOO⁻ direkt olarak oksidatif DNA hasarına yol açmaktadır. LPO'yu başlatması, tiyoller, sülfidler, askorbat, proteinler ve karbohidratları okside etmesi, güçlü oksidan olduğunun kanıtıdır. Tüm transport proteinlerinin ve enzimlerin okside olması LPO'yla birlikte hücre hasarının ortaya çıkışını hızlandırır. ONOO⁻ tiyoller ve askorbatın oksidasyonu dışında alfa-tokoferol harcanmasını artırır. Bu şekilde antioksidan tüketimine yol açması, organizmadaki oksidan dengesini sadece oksidanları arttırarak değil de antioksidanları azaltarak da bozduğunun bir göstergesidir (41, 42).

3- Nitrotirozin (3-NT); reaktif nitrojen radikalleri ile serbest veya proteinlere bağlı tirozinlerin reaksiyonu sonucu oluşan stabil bir son ürün olarak tanımlanmıştır (43).

Tirozin artıklarının peroksinitrit ile aromatik yan zincir üzerinden nitratlanabileceği, ilk defa Ischiropoulos ve ark (7) tarafından gösterilmiştir.

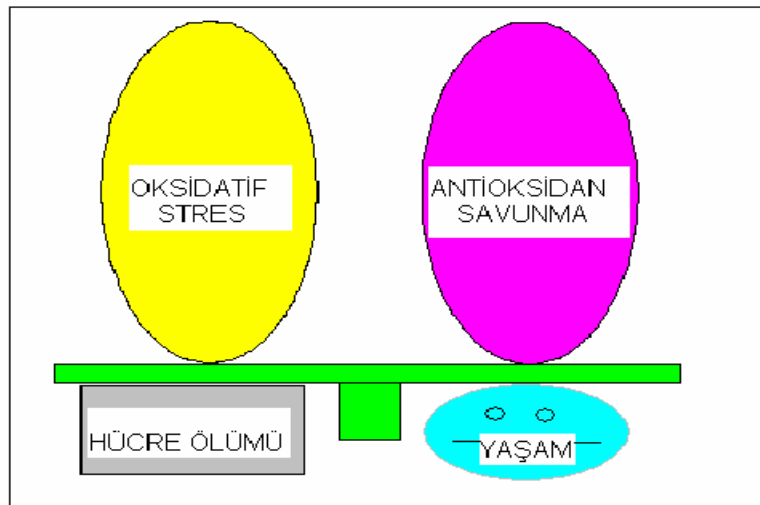
3-NT, çeşitli deteksiyon tekniklerinin kullanımı ile biyolojik örneklerde saptanmıştır. ONOO⁻ ile muamele edilmiş proteinlere karşı yükselmiş poliklonal ve monoklonal antikolar, doku bölümlerinde 3-NT'yi tespit etmek için çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Fizyolojik şartlar altında 3-NT, ONOO⁻'in tirozine veya tirozin rezidüleri içeren peroteinlere eklenmesi sonucu oluşturulur ve nitrasyonun hızı çoğunlukla geçiş metal iyonları veya belirli metalloproteinlerin (Cu-Zn SOD gibi) varlığında yükselir (Şekil- 5) . 3-NT, ONOO⁻ tutulumunun bir indeksi olarak kullanılabilir (40).



Şekil-4: 3-NT Oluşumu

2.5.OKSİDATİF HASAR

Aerobik yaşam, reaktif oksijen türlerinin devamlı olarak üretilmesi ve bunların benzer bir hızla antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılması ile karakterizedir. Hafif bir egzersiz bile oksidatif stres meydana getirebilir. Dengenin sağlanabilmesi için antioksidanların sürekli olarak rejenerasyonu zorunludur ve bu ihtiyaç karşılanamaz ise, oksidatif hasar oluşur. (Şekil6) (45).



Şekil 5: Oksidatif Stres Ve Antioksidan Sistemin Denge Hücrenin Kaderini Belirler.

2.5.1.LİPİDLERDE OKSİDATİF HASAR

Tüm biyolojik zarlar; poliansatüre yağ asitleri ile amfipatik lipidler ve zar proteinlerinin birleşmesinden oluşur. LPO, hücre membranında bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksit, alkol, aldehid, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli zararlı ürünlere dönüşmesidir. Yani LPO, doymamış yağ asitlerinin serbest radikallere ve oksijene bağımlı hasarıdır (25).

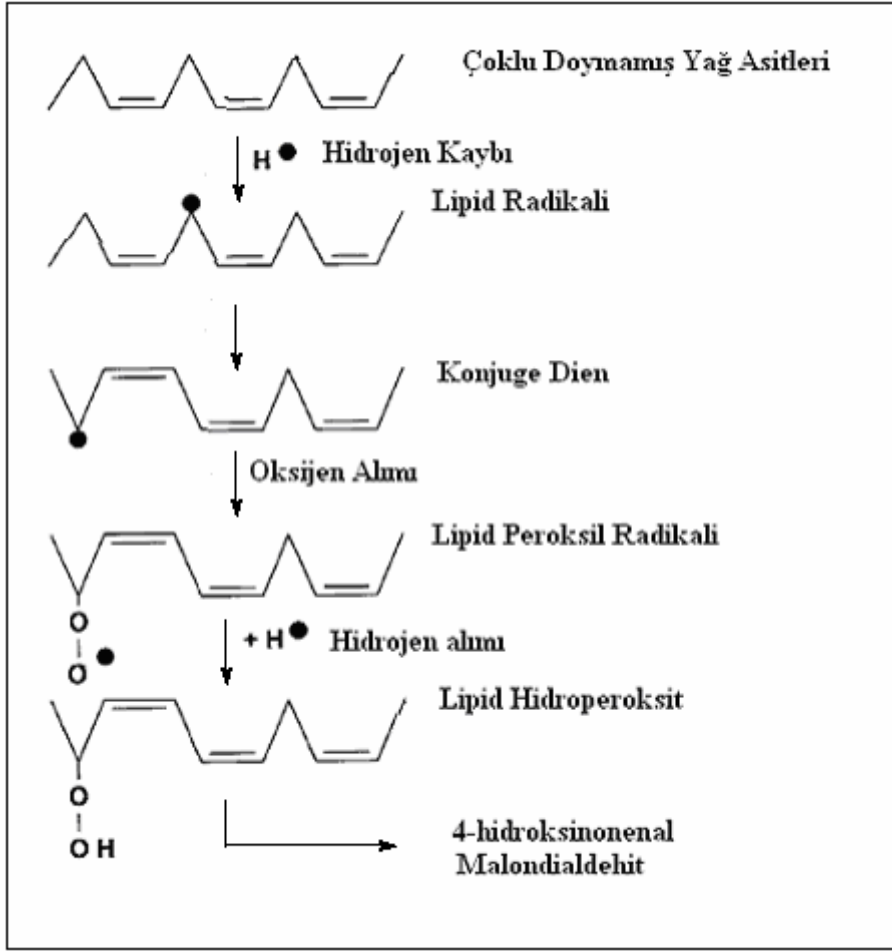
LPO işlemi bir reaksiyonlar zinciri olup; başlama, ilerleme ve sonlanma olarak tanımlanabilecek üç aşamada gerçekleşmektedir (46).

1-Başlama: LPO tepkimeleri metal katalistlerin varlığında, serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asiti zincirinin α -metilen gruplarından bir hidrojen uzaklaştırması ile başlamaktadır. Uzaklaşan hidrojen atomu sebebiyle, karbon atomu üzerinde ortaklaşmamış bir adet elektron kalır ki bu da yağ asidi zinciri üzerinde radikal olmasına neden olur. Oluşan lipid radikali kararsız bir bileşiktir. Molekül stabil duruma gelebilmek için molekül içi bağlarını tekrar düzenler ve konjuge dien yapısına dönüşür. Bu konjuge dien, fizyolojik koşullarda oksijen ile birleşmeye eğilimli olduğundan reaksiyon sonucu okside olur ve peroksi radikalini oluşturur (23, 46).

2- ilerleme: Lipid peroksi radikali, membran yapısında bulunan diğer çoklu doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksite dönüşür. Böylece tek bir substrat radikal diğer yağ asitlerini tetikleyerek birden çok lipid hidroperoksit oluşmasına sebebiyet verir. Böylelikle tek bir başlangıç olayı, yağ asit zincirlerinin binlerce lipid hidroperoksit şekline dönüşmesi ile sonuçlanır. Bu tetikleme olayının ne zaman sona ereceği ortamda bulunan oksijen ve antioksidan miktarına bağlıdır (23,46).

3-Sonlanma: LPO, lipid hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşikler ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi halinde sonlanır. Bununla birlikte, ilerleme reaksiyonları zincir reaksiyonlarını kıran bir antioksidan tarafından lipid perokside bir hidrojen atomu verilmesi ile de tamamlanabilir (46).

LPO hücresel komponentlere en çok zarar veren reaksiyonlardan biridir. Reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerden en önemlileri; malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE)'dir (12, 46) (Şekil 7).

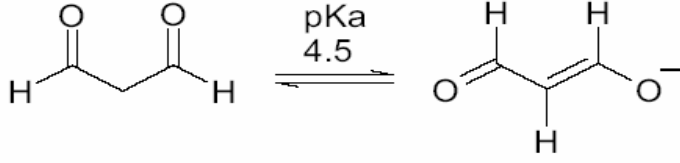


Şekil 6 : Lipid Peroksidasyonunun Kimyasal Yolu ve Oluşan Ürünler.

MDA; linolenik asit (18:3) ve araşidonik asit (20:4) gibi üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin oksidatif bozunması sonucu oluşan, tiyobarbiturik asit ile ölçülebilen bir üründür. Bu yöntem, lipid peroksit seviyelerinin ölçümünde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik kantitatif bir indikatörü değildir, fakat; LPO' nun derecesi ile koreledir (4, 46) (Şekil 8).

Peroksidasyonla oluşan lipid peroksitleri ve MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirir. Ayrıca DNA'nın nitrojen bazlarıyla reaksiyona girmektedir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. MDA, uzun ömrü ve yüksek reaktivitesi ile hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara yol açmaktadır. Bunun yanı sıra membranın akıcılığının azalmasına, membran fonksiyonlarının

yavaşlamasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktif olmasına ve de Ca^{2+} iyonları üzerine geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır (4, 46).



Şekil 7: MDA'nın Yapısı.

2.5.2.PROTEİNLERDE OKSİDATİF HASAR

Proteinler hücrenin yapı taşıdır, ayrıca önemli biyokimyasal reaksiyonlarda görevli enzimlerin yapı taşıdır. Proteinler yaklaşık yirmi amino asitten oluşmuştur. Serbest oksijen radikalleri, proteinlerde de yapısal değişiklikler meydana getirebilir. Ancak serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler, serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin ölçülmesi ile proteinlerin oksidatif hasarı ölçülebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda; proteinlerde fragmantasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Enzimler protein yapısında olduklarından, enzim aktivitelerinde değişiklikler ortaya çıkar (28, 47).

2.5.3.NÜKLEİK ASİTLERDE OKSİDATİF HASAR

DNA; hücrenin genetik materyalidir. Ayrıca proteinleri kodlayan DNA'nın fonksiyon bozukluğu veya inaktivasyonu, kodladığı proteinleri etkiler (47). OH^\cdot , deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer bu radikal, DNA'nın yakınında meydana gelirse, pürin ve pirimidin bazlarını etkileyerek mutasyonlara neden olur. Nükleik asitlerde, doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer. 1O_2 'nin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. O_2^\cdot güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre

çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (31).

2.5.4.KARBOHİDRATLARDA OKSİDATİF HASAR

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler, fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak, O_2^- ve H_2O_2 'i meydana getirirler. Okside olan glukoz, proteinlerle reaksiyona girerek glikozilasyon ve glikasyon ürünlerini oluşturur (31).

2.6.ANTİOKSİDAN NEDİR ?

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (28, 48).

Antioksidanlar, bir oksidatif dizide farklı seviyelerde etki edebilirler. LPO' ya karşı etkilerini:

- 1-Lokalize oksijen konsantrasyonlarını azaltarak,
- 2-OH⁻ gibi hidrojen atomlarını ayırabilme yeteneğine sahip türlerin temizlenmesi ile peroksidasyonun başlamasını önleyerek,
- 3-Peroksitler oluşturmak için membran lipidleri ile direkt olarak reaksiyona girebilen singlet oksijeni temizleyerek veya bastırarak,
- 4-Yapılarındaki metal iyonlarını bağlayarak,
- 5-Alkoller gibi radikal olmayan ürünlerine dönüştürülmesi ile peroksitlerin alıcısı olarak,
- 6-Zincir uzatan radikaller (peroksi veya muhtemelen alkoksi) ile reaksiyona girip zincirleri kırmak suretiyle, yağ asidinin kenar zincirinden devamlı hidrojen ayrımını engelleyerek, gösterirler.

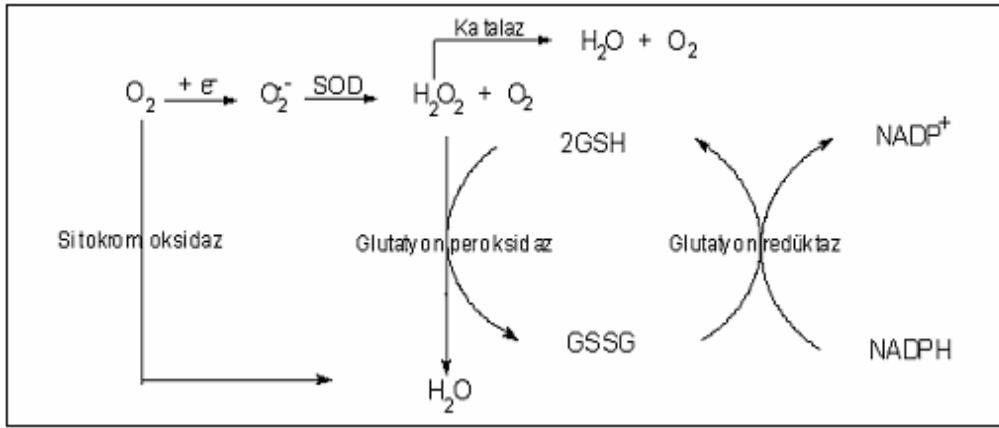
1, 2, 3, 4 ve 5.tip mekanizmalar ile LPO' yu inhibe eden antioksidanlar, önleyici antioksidanlar olarak adlandırılırlar. altıncı tip mekanizma ile etki oluşturan antioksidanlar ise, zincir kıran antioksidanlar olarak bilinirler.

Antioksidanları enzimatik ve nonenzimatik olarak iki ana başlık altında incelemek mümkündür (4, 48):

2.6.1.ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

Hücre içerisindeki antioksidan savunmanın belkemiğini oluşturan enzimatik antioksidanlar, aktif merkezlerinde Cu, Zn, Mn, Fe, Se gibi metalleri içerirler. Düzeyleri

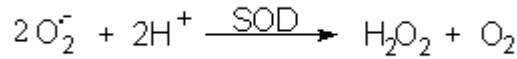
genetik kontrol altındadır. Hücre içerisinde fazla miktarda bulunanları; SOD, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px)'dir (Şekil 9) (4).



Şekil 8: Enzimatik Antioksidanlar ve Etki Mekanizmaları.

SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) :

SOD (E.C.1.15.1.1); İki molekül O₂⁻ 'nin iki molekül proton ile reaksiyona girerek H₂O₂'ye dönüşümünü katalizler. İki serbest oksijen radikalini, radikal olmayan moleküllere dönüştürdüğünden, antioksidan sisteminin en önemli öğelerinden biri olarak bilinir. İnsan vücudunda 3 farklı SOD enzimi vardır;



CuZn-SOD: Sitoplazmada lokalizedir. Aktif bölgesinde kofaktör olarak bakır ve çinko bulunur. En fazla bulunan ve antioksidan savunmada ana rolü oynayan enzimdir. Disülfit köprüsü ile bağlanan birbirinin aynı iki alt üniteden oluşmuştur ve her alt ünite birer atom Cu⁺² ve Zn⁺² içermektedir (24).

EC-SOD: Vasküler endotele bağlı olarak bulunan ekstrasellüler SOD'ın kofaktörleri bakır ve çinkodur. CuZn-SOD ve EC-SOD'ın aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur (24).

Mn-SOD: Mitokondride ve hücre komponentlerinde bulunur. Kofaktörü mangandır (24).

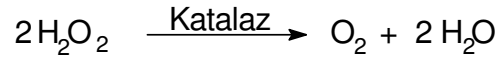
Bu üç enzimde beyinde farklı bölgelerde farklı oranda dağılmıştır. Cu-Zn SOD, özellikle astrositlerde; Mn-SOD, nöron ve spinal korda; EC-SOD ise ekstrasellüler matrikste bulunmaktadır. Mn-SOD, O₂⁻ normal koşullarda mitokondride oluştuğu için,

SOR oluşumuna karşı beyni koruyan en önemli enzimdir (49). Mikroglial hücrelerde, oligodendrositlerde ve endotelial hücrelerde Mn-SOD ve Cu-Zn SOD aynı oranda ama zayıf aktivite gösterir. Bu da oligodendrositlerin oksidatif hasara karşı daha savunmasız olduğunu açıklar. Mikroglial hücreler bu hasara daha dirençlidir, çünkü bu hücrelerde GSH-Px aktivitesi yüksektir. EC-SOD, damar düz kaslarında oldukça fazladır ; NO biyoyararlanımında , serebral vasküler biyoloji ve vazomotor disfonksiyonda rol oynar (50).

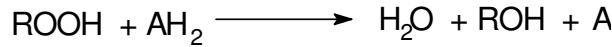
KATALAZ (CAT) :

H₂O₂, bir radikal olmamasına rağmen, reaktivitesi en fazla olan reaktif oksijen türü olan OH⁻ in öncüsüdür ve bu nedenle birçok reaktif oksijen türünden daha fazla oksidatif hasara neden olur. CAT (E.C.1.11.1.6), solunum yapan tüm organizmalarda bulunan ve iki fonksiyon gösteren bir enzimdir (5, 48).

1-H₂O₂'nin O₂ ve H₂O vermek üzere ayrıştırılması (zehirsizlendirme reaksiyonu)

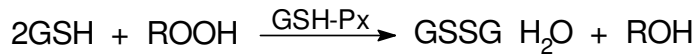
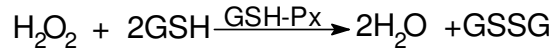


2-Bir mol peroksitin parçalanması ile oluşan reaksiyon sonucunda, metanol, etanol, formik asit veya fenollerin yükseltgenmesi (5, 48).



GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-Px):

GSH-Px (E.C.1.11.1.9); H₂O₂ ve lipid peroksitlerin indirgenmiş (redükte) glutatyonla (GSH) reaksiyona girerek, H₂O ve yükseltgenmiş (okside) glutatyon (GSSG) oluşmasını katalizleyen enzimdir (51).



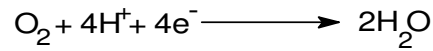
Bu enzimin varlığı ilk defa Mills (51) tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Endotel hücrelerinde özellikle akciğerde etkili bir enzimdir. Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında, % 25-40'ı ise mitokondride bulunur. Aktivitenin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (52).

GSH-Px, yaklaşık olarak 85000 D molekül ağırlığında, dört eşit subunitten oluşan, mol başına 4 atom selenyum içeren bir enzimdir. Enzimin aktif bölgesinde selenosistein bulunur. İnsan dokularında iki GSH-Px formu belirlenmiştir:

Se-bağımlı GSH-Px: Substrat olarak hem H₂O₂' yi, hem de organik hidroperoksitleri kullanır(5, 52).

Se-bağımsız GSH-Px: Substrat olarak organik hidroperoksitleri kullanır, H₂O₂ yıkılımını kataliz etmez. (5, 52).

SİTOKROM OKSİDAZ: Sitokrom oksidaz, mitokondrial ETZ'nin son parçasıdır ve elektronların son alıcı olan oksijene transferinden sorumludur. Bu bölgede taşınmış olan elektronlar, O₂ ve serbest protonlar; H₂O oluşturmak için bir araya gelirler. Diğer bir deyişle, bu reaksiyon ile süperoksit detoksifiye edilir (28).



2.6.2. NON-ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

VİTAMİN E: İnsan dokularında en fazla bulunan ve yağda eriyen non enzimatik antioksidan α -tokoferol, membranlarda ve lipoproteinlerde zincirleme LPO'yu engelleyen esas antioksidandır. Reaksiyon bir peroksi radikali ile tokoferolün, organik bir hidroperoksit ve tokoferil radikali meydana getirmesi ile sonuçlanır (5, 33).

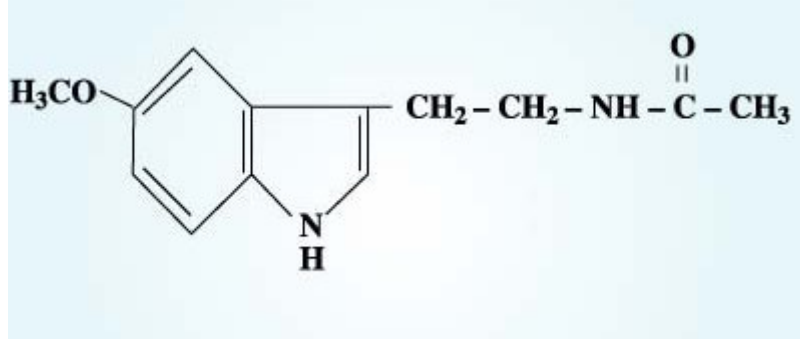
VİTAMİN A: A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten, bitkilerdeki kloroplast membranının bir bileşenidir. Yağda çözünen vitaminlerden ilk bulunanıdır. Bir antioksidan olan β -karoten, konjuge alkil yapısı taşıyan serbest organik peroksit radikallerinin ortadan kaldırılmasında etkilidir. Düşük oksijen kısmi basıncında β -karoten, peroksit radikallerinin dokularda tutulmasından sorumludur (52).

VİTAMİN C (ASKORBİK ASİT): C vitamini bir ketolaktondur. Doku ve plazmada çoğunlukla askorbat şeklinde bulunur. Organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. O₂⁻ ve OH⁻ ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Tokoferoksil radikalının α -tokoferol'e redüklenmesini sağlar (53).

MELATONİN (MEL):

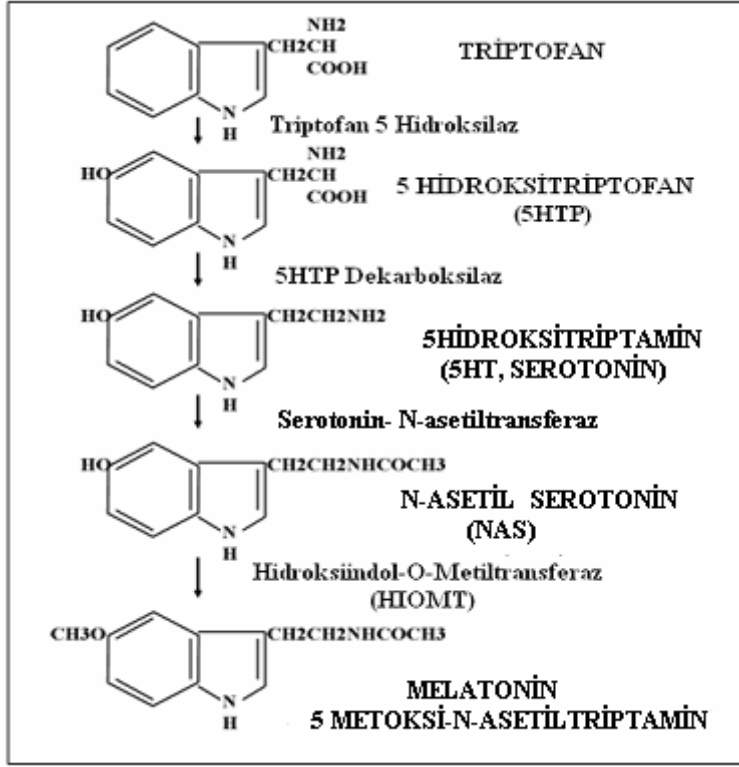
MEL (5-metoksi-N-asetiltriptamin, Şekil 10) pineal bezde sentezlenen ve antioksidan etkileri olan bir nörohormon olarak bilinmektedir (6). MEL'in organizmada varlığı ilk defa 1959'da Lerner (54) ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. İnsanda ve sıçanda MEL sekresyonunun karanlıkta arttığı ve ışığa maruz kalmakla inhibe olduğu bilinmektedir. MEL harika madde olarak ifade edilerek, uykusuzluğun ve üreme

fonksiyonlarının düzenlenmesinde; yaşlanmanın, kanserin ve serbest radikallerin toksik etkisinin geciktirilmesinde etkili olarak kabul edilmiştir (55, 56).



Şekil 9: Melatoninin Yapısı

Melatonin Sentezi ve Metabolizması: Pineal bezde MEL sentezi sirkadiyen bir ritm gösterir ve karanlık faz boyunca maksimum noktasına ulaşır. Bu ritm suprakiazmatik nukleuslar tarafından algılanan ışık-karanlık dönüşümü ile sağlanır. Karanlığın başlamasıyla birlikte sinir uçlarından noradrenalin salgılanır; bu da pinealositlerdeki β -adrenerjik reseptörleri uyarır. Adenilat siklaz aktivitesinin artmasıyla oluşan cAMP, N-asetiltransferaz (NAT) sentezini uyarır. NAT'ın enzimatik aktivitesinin gece boyunca artışı serotonin düzeylerini düşürür, buna bağlı olarak N-asetilserotonin ve MEL düzeylerini artırır (hardeland). Sistemik dolaşımdan triptofanın pinealosite aktif geçişi, MEL sentezinin başlangıç basamağını oluşturur. Triptofan, önce triptofan hidroksilaz ile orto pozisyonundan hidroksitriptofana dönüşür. Bunu aromatik amino asit dekarboksilazların kataliz ettiği dekarboksilasyon reaksiyonu izler. Oluşan ürün önemli bir biyolojik amin olan 5-hidroksitriptamin (serotonin)'dir. Serotonin, NAT ve hidroksi indol O-metil transferaz (HIOMT)'ın birbirini takip eden aktiviteleri ile melatonine dönüşür (Şekil 11) (57).



Şekil 10: Melatonin Sentezi.

Melatoninin antioksidan etki mekanizması: MEL'in; prekürsörleri olan triptofan ve 5-OH triptaminin antioksidan aktivitesi gösterilmiştir. Bu aktivite, SOR'yi yakalayabilen indol yapısına bağlıdır (58). MEL'in antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir (59):

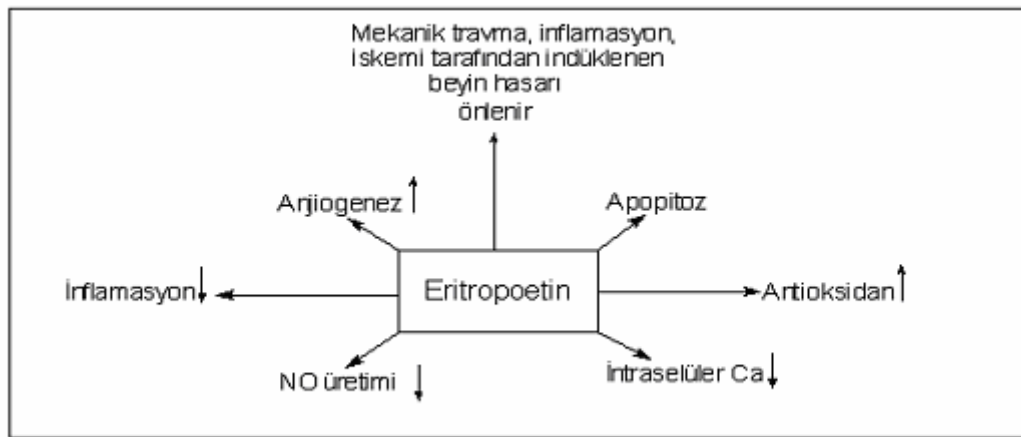
A- Direkt antioksidan etki: MEL'in OH^\cdot , H_2O_2 , ONOO^\cdot , HOCl gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir. MEL'in antioksidan özelliği, yapısında bulunan indol halkasından kaynaklanmaktadır (59).

B- Antioksidan Enzim Aracılı Etki: Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki MEL'in, SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve γ -glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir (55, 59).

C- Prooksidan Enzim Aracılı Etki: Melatoninin bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir. In vivo ve in vitro şartlarda NO ve daha ileri aşamada ONOO^\cdot oluşumuna neden olan NOS aktivitesinin, fizyolojik MEL konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir (55, 59).

2.6.2.5. ERİTROPOİETİN: Eritropoietin (EPO), eritropoezi regüle eden 30,4 kDA ağırlığında bir glikoproteindir (60). İnsan EPO'nun 165 amino asitten oluşan amino asit dizisi 1985 yılında ilk kez bildirilmiştir. EPO'nun %40'ı karbohidrat yapısındadır. EPO üretimi başlıca fetal karaciğer ve erişkin böbrekte (korteksteki peritübüler hücreler) sentezlenir. Karaciğer (az miktarda), kemik iliği, dalak, GIS, kalp, akciğerler, testis, overler ve merkezi sinir sisteminde de sentezi bulunmaktadır. Tüm eritrositlerin %1'i her gün yıkılmakta ve bu yıkım sağlıklı kişilerde retikülositler tarafından yerine konmaktadır. Oksijen azlığı EPO salınımını arttırmaktadır. EPO aktivitesi, hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptör ile gerçekleşmektedir (61).

EPO, aynı zamanda, sinir sisteminde varlığı ve nöroprotektif etkisi son yıllarda gösterilmiş olan hematopoetik bir sitokin hormondur. EPO ve reseptörü hem merkezi, hem de periferik sinir sisteminde bulunmakta ve hipoksi gibi uyarılarla ekspresyonları artmaktadır. Değişik *in vitro* çalışmalarda değişik nöron gruplarında nörotrofik etkisi ve çeşitli hasar modellerinde *in vitro* koruyucu etkisi gösterilmiş olan EPO'nun etki mekanizmaları kesin belli değildir. Hücre canlılığını arttırıcı sinyalleri modüle eden antiapoptotik, anti-oksidan, anti-inflamatuvar ve kalsiyum ile glutamat metabolizmaları üzerine düzenleyici etkilerinin, nöroprotektif etkisine aracılık edebileceği düşünülmektedir (Şekil-12). EPO antioksidan etkisini NO miktarını azaltarak ayrıca SOD, GSH-Px, katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak da gerçekleştirmektedir (7).



Şekil 11: Eritropoietinin Etki Mekanizması.

Rekombinant insan eritropoietini (rHuEPO) rekombinant DNA teknolojisi ile üretilir. EPO ile aynı amino asit dizilimi ve etkiye sahiptir (7).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

3.1.GEREÇ:

Biyokimyasal ölçümlerde Merck ve Sigma marka analitik saflıkta ve/veya HPLC grade kimyasal maddeler kullanıldı.

Deneylerde HPLC cihazı (Jasco), spektrofotometre (Shimadzu UV 1601), derin dondurucu (BOSCH, PHILCO), homojenizatör (Hydalgo), soğutmalı santrifüj (Sigma 3K 30), hassas terazi (Sartorius; AND GR), pH metre (HANNA HI 9321), su banyosu (Kötterman), etüv (Dedeoğlu), vorteks (Elektromag, velp scientifica 2x³), kronometre, otomatik (Socorex, microlit) ve cam pipetler, sonikatör (Virsonic 50), Millex-HV örnek süzme filtresi (sellüloz asetat 0.2 ve 0.45 µm), anestezi odacığı (anesthesia chamber, Ejaj International INC® USA), kapaklı polistren ve cam tüpler, beher, mezür ve balon jojeler kullanıldı.

Cam malzemeler ve polistren tüpler, deiyonize su ile yıkanıp bir gün %20 HNO₃ çözeltisinde bekletildikten sonra, üç kez Tip 1 sudan geçirilerek demineralize edildi (62). Hazırlanan reaktiflerin dayanıklılık sürelerine dikkat edildi. Tüm çözeltiler her çalışma öncesi yenilendi.

Melatonin Hazırlanması:

MEL (Sigma M-5250), absöü etil alkol içinde (100mg/ml) çözüldükten sonra, günlük dozlar ayrı tüplere konuldu ve -80°C de dondurularak saklandı. Günlük doz, uygulamadan önce dondurucudan çıkarıldı ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanıldı.

Melatonin Uygulaması: 10mg/kg/gün (farmakolojik doz: 2.5-10 mg/kg)

Eritropoietin Hazırlanması: EPREX 10000 U/ml 6 Flakon ratların ağırlıklarına göre 1500 U/kg gün olacak şekilde insülin enjektörü ile uygulandı.

Çalışma Grubu: Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde yetiştirilen, Sprague-Dawley cinsi, 280-365 gr ağırlığında 4-5 aylık, 40 adet erkek rat kullanıldı.

Çalışma Planı: Çalışma kapsamına alınan 40 rat her grupta 10 adet olacak şekilde, dört gruba bölündü ve tartılarak ağırlıkları belirlendi.

- 1) Tiner grubu (T; n=10)
- 2) Melatonin grubu (TİN+MEL; n=10)
- 3) Eritropoietin grubu (TİN+EPO; n=10)
- 4) Kontrol grubu (K; n=10)

Birinci gruba; 30 gün boyunca, günde bir saat tiner inhale ettirildi. İkinci gruba; tiner inhalasyonu yanında, 10 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonla MEL, üçüncü gruba; tiner inhalasyonu ile birlikte günlük toplam doz 1500 U/kg olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonla EPO verildi. Dördüncü grup olan kontrol grubuna ise aynı süre boyunca taze hava solutularak, 2 ml serum fizyolojik enjekte edildi. İlk üç gruba uygulanan tiner inhalasyonu için; 60x27x27 cm ebatlarında şeffaf plastikten yapılmış anestezi odacığı (anesthesia chamber, Ejaj International INC® USA) kullanıldı. Hayvanların dışarıdan gözlemlenebildiği kapalı alanın yüzeyi cam olan dikdörtgenler prizması şeklinde ve dışarıdaki hava ile izolasyonu olan bir yapıda idi. Tiner olarak selülozik tiner tercih edildi. Uçucu bir materyal olan tiner, deney kabının içinde dağılım sonucu denekler tarafından inhale edildi. İşlem izole bir alanda uygulandığı için deney kabı dışındaki canlılarla direkt bir temas olmayacak şekilde düzenlendi. İşlem sonunda kap içindeki hava açık alanda atmosfere karıştırıldı. Tinerin yanıcı ve patlayıcı olması nedeniyle, çalışma alanına ateşle yaklaşılmadı ve çalışma alanının etrafında elektrik ile çalışan herhangi bir

cihaz bulunmasına izin verilmedi. İçerideki gaz konsantrasyonu (toluen) 3000 ppm olacak şekilde ayarlandı ve bu konsantrasyon gaz dedektörü ile takip edildi. Tiner inhalasyonu dışında ratlar 12 saat gece 12 saat gündüz ayarlı ortamda standart pellet yemle ve musluk suyu ile beslendi, normal oda sıcaklığı (22 ± 1 °C) ve neminde bulunan ortamda tutuldu. 30 gün sonunda ketamin anestezisi ile uyutulan ratların intrakardiyak kanları alındıktan sonra, sakrifiye edilerek beyin dokuları çıkarıldı. Tüm çalışma örnekleri analize kadar -80°C 'de bekletildi.

3.2.YÖNTEM

Plazma Numunelerinin hazırlanması:

Heparinli tüpe alınan kan örnekleri 4°C 'de santrifüj edilerek süpernatanı alındı.

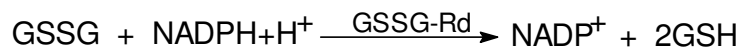
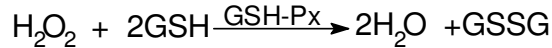
Beyin Dokusu Homojenizasyonu

Beyin korteksi -80°C 'den çıkarıldıktan sonra buzu çözülmeden kesilerek tartıldı ve 0.05 M pH 7,4'lük fosfat tamponu ile 1/4 (w:v) olacak şekilde hazırlandı. Teflon homojenizatörde buz içinde homojenizasyonun ardından yine buz içinde 30 sn 25 pulsar'da sonike edildi. 1/10 (w/v) fosfat tampon ile dilüe edildikten sonra tüplere alınarak 13200 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı.

Ayrılan doku süpernatanı GSH-Px, SOD, 3-NT, MDA ve protein ölçümlerinde kullanıldı. Alikotlar halinde dondurularak saklanan plazma örneklerinde de aynı parametreler çalışıldı ve ölçümlerde kullanılan tüm metodlar için plazma havuzları oluşturularak değişme katsayısı (CV) değerleri hesaplandı.

3.2.1. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ

Prensip: GSH-Px tarafından katalizlenen reaksiyonda GSH'nın H_2O_2 ile oksidasyonu sonucu oluşan GSSG'nin glutatyon redüktaz (GSSG-Rd) kataliziyle tekrar GSH'a dönüşmesi sırasında tüketilen NADPH konsantrasyonu üzerinden 340 nm'de oluşan absorbans azalmasının 4 dk boyunca izlenmesi prensibine dayanır (63).



Reaktifler:

- 1) 0.05 M Fosfat tamponu, pH 7 (5mM EDTA içerir)
- 2) 0.15 M GSH
- 3) 8.4 mM NADPH
- 4) 100 U/mg protein /ml GSSG-Rd (Sigma, G-1762)
- 5) 112.5 mM NaN₃
- 6) 2.2 mM H₂O₂ (Taze hazırlanır)

Çalışma:

GSH-Px aktivitesi tayin edilecek beyin doku numuneleri seyreltilmemiş süpernatana, plazma numuneleri de yine seyreltilmeden çalışıldı.

	Kontrol	Numune (plazma-doku süpernatanı)
Çalışma tamponu	2,63 ml	2,63 ml
NADPH	0,10 ml	0,10 ml
GSSG-Rd	0,01 ml	0,01 ml
NaN ₃	0,01 ml	0,01 ml
GSH	0,10 ml	0,10 ml
Numune	-	0,05 ml
Tip1 su	0,05 ml	-
Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı.		
H ₂ O ₂	0,1 ml	0,1 ml
25 °C'de 4 dk boyunca enzim aktivitesindeki düşüş Tip 1 su körüne karşı 340 nm dalga boyunda izlendi.		

Hesaplama:

Her numune ve kontrol tüpü için, 2. ve 4.dk OD değerleri kullanılarak, $\Delta OD / dk$ değerleri hesaplandı. Daha sonra numune $\Delta OD / dk$ değerlerinden kontrol değerleri çıkarılarak net $\Delta OD / dk$ değerleri elde edildi.

$$\Delta OD_{\text{numune}} = \Delta OD - \Delta OD_{\text{kontrol}}$$

Bir ünite GSH-Px, standart deney şartlarında 1.0 mikromol NADPH'ın oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı (U/L= $\mu\text{mol NADPH} / dk/L$) (63).

NADPH'ın molar absorptivite katsayısı(ϵ)= $6,22.10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak, plazma ve doku numunelerinin net $\Delta\text{OD} / \text{dk}$ değerlerinden, ünite birimine geçildi.

$$\text{Ü/L} = \frac{\Delta\text{OD}/\text{dk}}{\epsilon} \times \frac{\text{Total hacim (ml)}}{\text{Numune hacmi (ml)}} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} \times \frac{1}{1000 \text{ ml}}$$

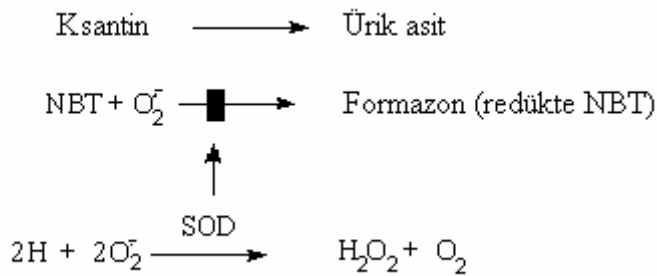
$$\text{Ü/L} = \frac{\Delta\text{OD}_{\text{numune}}}{6,22.10^3} \times \frac{3}{0,05} \times \frac{10^6}{1000}$$

Doku GSH-Px aktivitesi, Lowry (64) yöntemine göre protein miktarının hesaplanmasından sonra, miligram protein başına (Ü/ mgr protein) spesifik aktivite cinsinden verildi. Plazma GSH-Px aktiviteleri ise, Ü/L olarak hesaplandı.

GSH-Px aktivitesi tayini için CV değeri %3,84 olarak bulundu.

3.2.2. SUPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ

Prensip: Ksantin'in XO ile reaksiyonu sonucu oluşan $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin nitroblutetrazolium (NBT) ile renkli formazon meydana getirmesi prensibine dayanır. Numune ortamındaki SOD aktivitesinin miktarına göre NBT'la oluşan renk, numune içermeyen köre göre azalır. Ortamdaki SOD aktivitesi fazla olursa renk o derece azalacaktır. SOD aktivitesi, tepkimede NBT redüksiyonunun % inhibisyon derecesine göre ölçülür (65).



Reaktifler:

1. 0.01 M Fosfat tamponu, pH 7
2. 0.3 mM Ksantin
3. 1 g/L BSA
4. 150 µM NBT
5. 0.4 M Sodyum karbonat
6. 0.6 mM EDTA
7. 0.8 mM CuCl₂
8. 167 Ü/L XO (Sigma X-1875) (2 M soğuk amonyum sülfat içinde hazırlanır.)
9. 2 M Amonyum sülfat
10. 2.8 mg/ml SOD (Sigma S-2515) (stok standart)

Beyin Doku Numunelerinin Hazırlanması: Doku homojenatlarından elde edilen süpernatantlar 0.01 M fosfat tamponu (pH 7) ile 10 kez dilüe edilerek SOD tayininde kullanıldı.

Plazma Numunelerinin hazırlanması: Plazma, 1/10 oranında SF ile dilüe edildikten sonra, Mn-SOD'u ortamdan uzaklaştırmak için; 1,0 ml dilüe süpernatant üzerine kloroform/etanol (3/5 v/v) karışımı eklendi ve 1 dk boyunca vortexle karıştırıldı. Tüpler daha sonra 4°C'de 13000 rpm'de 60 dk santrifüj edilerek, 0,5 ml süpernatant SOD tayininde kullanıldı.

Standart Serinin Hazırlanması: Stok standart 2.8 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde, Tıp1 suyla çözüldü. Elde edilen standart 0.01 M fosfat tamponu ile 7.81 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 ng/ml SOD içerecek şekilde çalışma standartları hazırlandı ve 0.5 ml alınarak numune gibi çalışıldı.

Çalışma:

	Kontrol	Standart	Numune (plazma- süpernatant)
Ksantin	1,0 ml	1,0 ml	1,0ml
NBT	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Sodyum karbonat	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
EDTA	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
BSA	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
Numune	-	-	0,5 ml
Tampon	0,5 ml	-	-
Standart	-	0,5 ml	-
25 °C 'de 5 dk süreyle inkübasyona bırakıldı. Deney tüplerine daha sonra eşit aralıklarla olacak şekilde:			
Ksantin oksidaz	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
Eklenerek 25 °C 'de 20 dk tekrar inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için eşit aralıklarla olacak şekilde:			
CuCl ₂	1ml	1 ml	1ml
İlave edilerek formazon oluşumundan kaynaklanan renk şiddeti 560 nm dalga boyunda Tip 1 su körüne karşı spektrofotometrede okundu.			

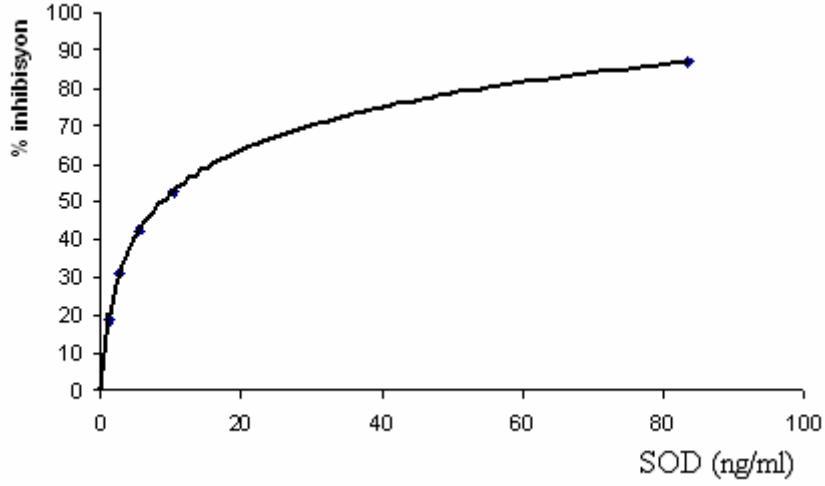
Hesaplama:

SOD içermeyen ve maksimum formazon oluşumu görülen (OD=0,250) kontrol tüpünden faydalanılarak standart ve numunelerin %inhibisyon değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı.

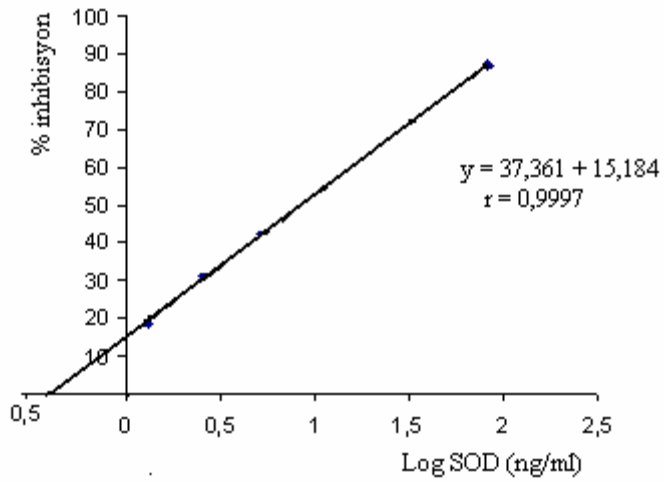
$$\frac{\text{Kontrol OD} - \text{Numune OD}}{\text{Kontrol OD}} \times 100 = \% \text{ inhibisyon}$$

% inhibisyon değerinden U/ml SOD miktarını hesaplayabilmek için SOD standart konsantrasyonuna göre standartın % inhibisyonu elde edilerek, yarı logaritmik SOD standardı grafiği çizildi (Şekil 13). Grafikten hesaplama yapabilmek için % inhibisyon değerlerine karşı, SOD konsantrasyonlarının logaritmik değerleri kullanılarak, doğrusal bir grafik elde edildi (şekil 14).

Bir ünite SOD, standart deney şartlarında, NBT redüksiyon hızını %50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlandı (65).bu çalışmada %50 inhibisyon yapan SOD konsantrasyonu (1 ünite SOD), 9,5 ng/ml olarak bulundu.



Şekil 12: Ksantin-Ksantin Oksidaz Sisteminde NBT Redüksiyonunun SOD ile İnhibisyon Grafiği.



Şekil 13: Logaritmik SOD İnhibisyon Grafiği.

Çizilen grafikler yardımıyla, numunelere ait inhibisyon değerlerinden; plazma SOD aktiviteleri Ü/ml olarak, doku SOD aktiviteleri ise; Lowry (64) metoduna göre hesaplanan total proteine göre Ü/g protein cinsinden hesaplanarak verildi.

SOD aktivitesi tayini için CV değeri %3,51 olarak bulundu.

3.2.3. 3-NİTROİROZİN ÖLÇÜMÜ

Prensip: Biyolojik materyalde bulunan total proteinin, asidik ortamda prepsitasyonu; ve daha sonra hidroliz edilmesi ile serbest hale gelen 3-NT içeriğinin, standartla kalibre edilen HPLC sisteminde doğrudan tayin edilmesi esasına dayanmaktadır (40, 65).

Ölçümde Kullanılacak Olan HPLC sistemi:

HPLC Modeli	Jasco JC 980
Detektör	uv/vıs (Jasco JC 975)
Mobil Faz	%8 Metanol içeren 50 mmol/L sodyum asetat / 50 mmol/L sitrat tampon, pH:3.1
Analitik Kolon	Supelco C ₁₈ 5 µm reverse-phase kolon, 25cm x 4,6 mm
Koruyucu Kolon	Spherisorb ODS-2, , C ₁₈ 5 µm reverse-phase cartridge
Dalga Boyu	274 nm
Akış Hızı	1.0 mL/dakika
Örnek Hacmi	70 µL
Çalışma Süresi	17 dakika
Sensitivite	0,1 µmol/L
Numune Loopu	100 µL
Enjeksiyon sistemi	Rheodyne Injector
Bilgisayar Ünitesi	Kromotografi programı ile donanımlı

Mobil Faz: 50 mM Sodyum asetat / 50 mM sitrat / % 8 metanol içerecek şekilde hazırlandı ve pH:3.1'e ayarlandı. Hazırlanan mobil faz, daha sonra 0.45 µm'lik sellüloz asetat filtreden süzüldü.

Reaktifler:

- 1.50 mM Sodyum asetat
2. 50 mM Sodyum sitrat
3. Metanol (HPLC grade)

4. %10 TCA

5. 6 N HCL

6. 6 N NaOH

7. 0,01 N HCl

8.1,0 mM 3-NT standardı : 1,0 mM 3-NT stok standarttan 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 µmol/L konsantrasyonlarda olacak şekilde 0.01 N HCl içerisinde çalışma standartları hazırlandı.

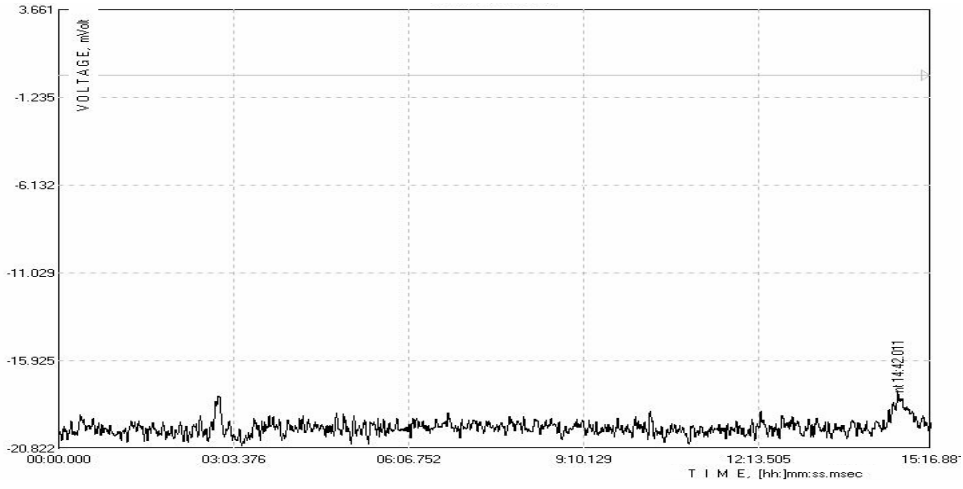
Çalışma:

	Beyin Dokusu Süpernatanı /Plazma (Seyreltilmemiş)
Numune	300 µl
TCA	300 µl
3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrıldı, çökelek kısmının üzerine,	
6 N HCl	1 ml
İlave edildi; tüpler vorteksledi, sonike edildikten sonra hidroliz tüplerine alındı. Etüvde 105 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün etüvden çıkarılan örnekler çeşme suyunda soğutuldu.	
NaOH	1 ml
Eklenerek,vorteksledi, 5 dk 3000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant 0.20 µm çapındaki filtrelerden süzülerek HPLC sistemine 70 µl enjekte edilerek çalışıldı	

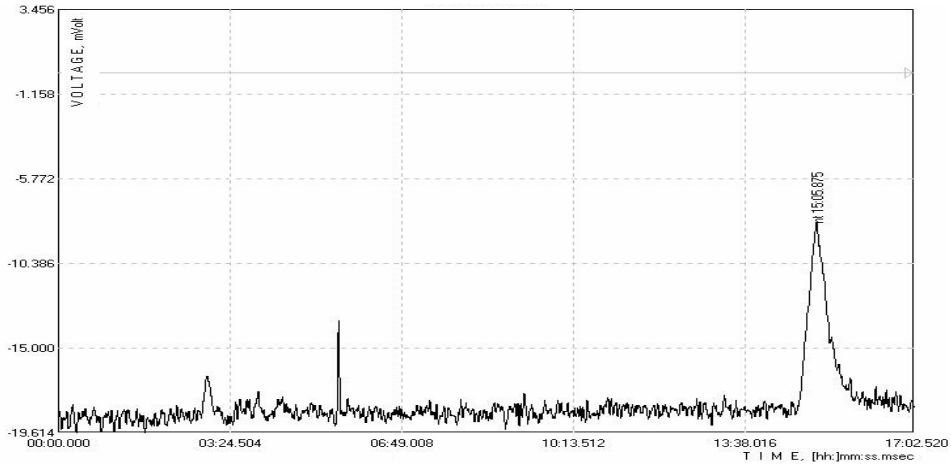
Hesaplama:

Standart çalışmalarından elde edilen pik alanları esas alınarak çizilen standart eğrisine göre, bilinmeyen örneklerin pik alanlarından konsantrasyonları hesaplandı. Plazma ve doku örneklerinin ölçüme hazırlanması sırasında yapılan işlemlere karşılık gelen dilüsyon faktörleriyle çarpılarak, gerçek plazma ve doku seviyeleri bulundu.

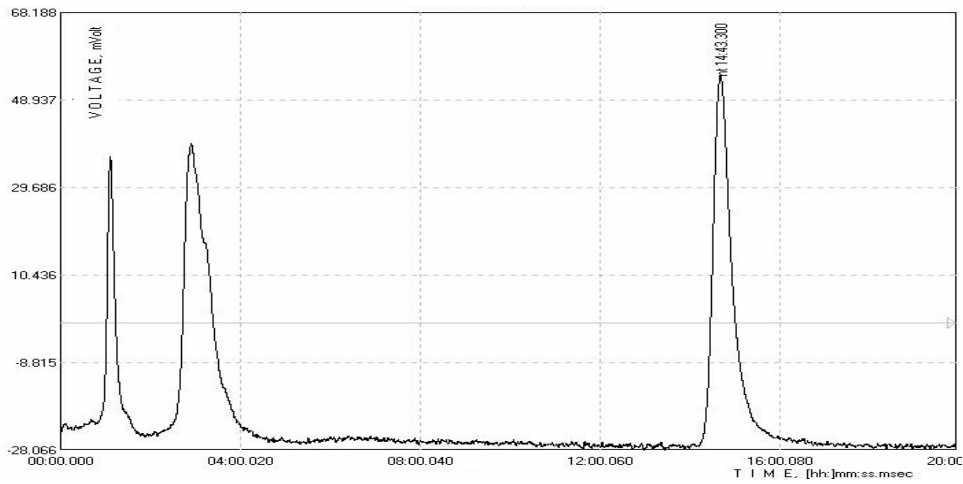
3-NT seviyeleri, plazmada µmol/L ve dokuda µmol/g protein şeklinde verildi.



Şekil 14: 0,2 µmol/L 3-NT Standart Kromotogramı.

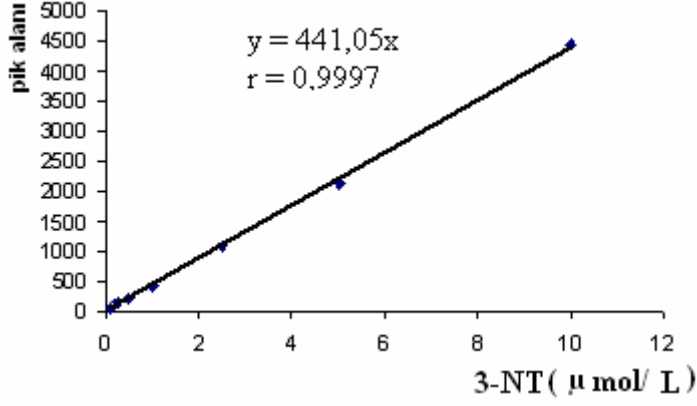


Şekil 15: 1 µmol/L 3-NT Standart Kromotogramı.



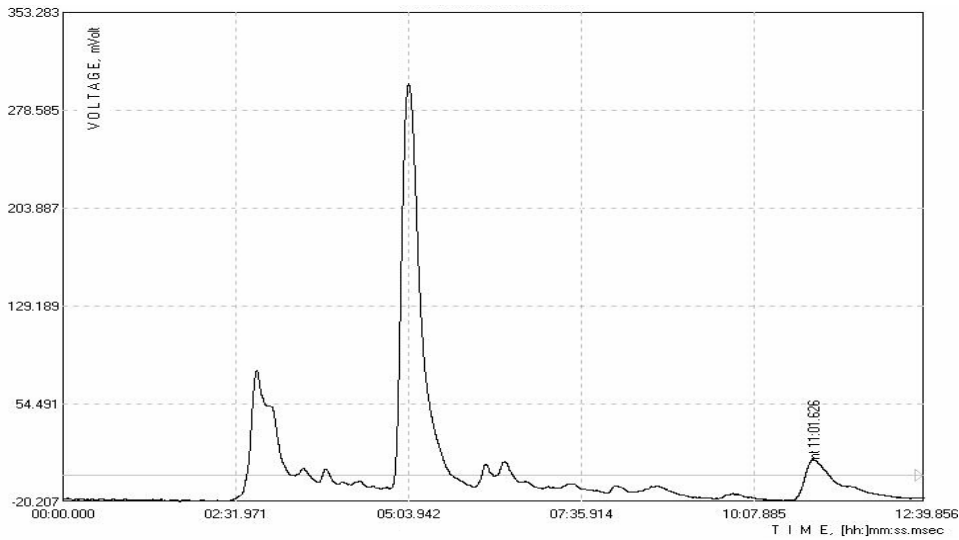
Şekil 16: 10 µmol/L 3-NT Standart Kromotogramı.

Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen pik alanları kullanılarak, 3-NT standart seri grafiği çizildi (Şekil 18).

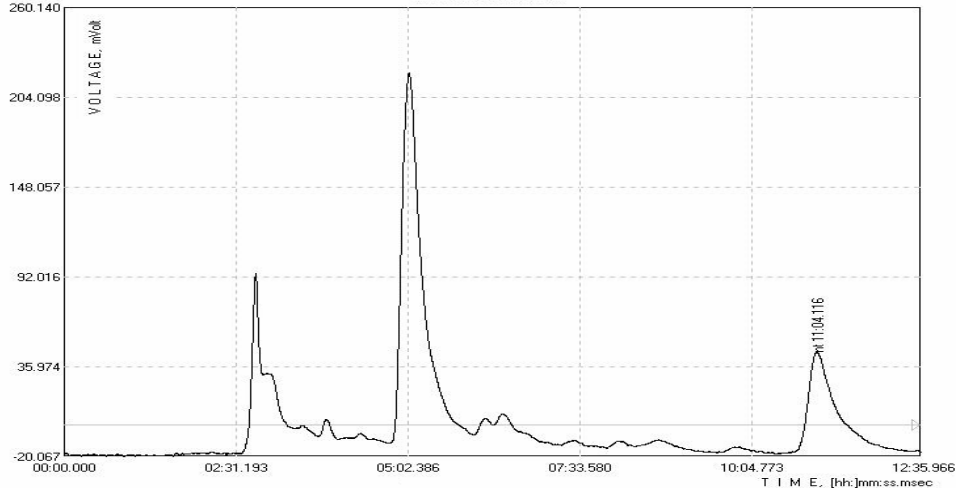


Şekil 17: Pik Alanlarına Göre 3-NT Standart Grafiği.

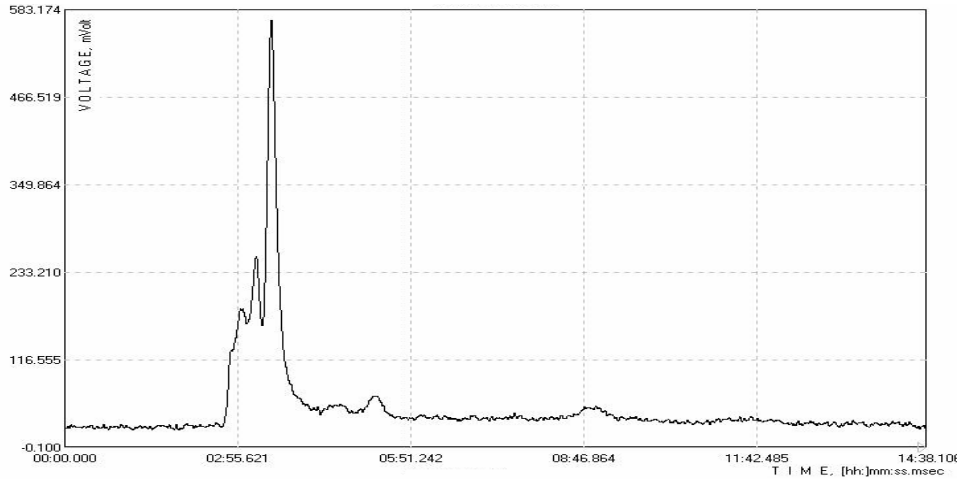
Hidrolizatların vermiş olduğu piklerin doğru olarak seçilebilmesi için 1/1 oranında 1 µmol/L 3-NT standardı ilave edilen örnekler, sisteme ikinci defa enjekte edildi. Böylece, standart/ hidrolizat pikleriyle karşılaştırılan örneklere ait seçilmiş piklerin çıkış zamanı, teyit edilmiş oldu.



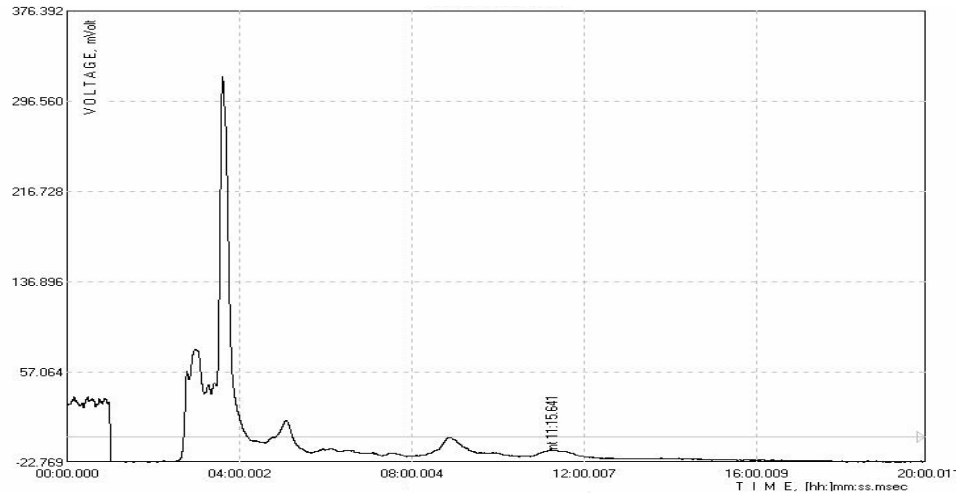
Şekil 18: Tiner Verilen Rata Ait Gözlenebilir 3-NT Kromotogramı



Şekil 19: Tiner Verilen Rata Ait 3-NT standardı eklenmiş Kromotogram



Şekil 20: Kontrol Grubu Rata Ait 3-NT Bulunamayan Kromotogram.



Şekil 21: Kontrol Grubu Rata Ait 3-NT Standardı Eklenmiş Kromotogram.

3-NT aktivitesi tayini için CV değeri %3,8 olarak bulundu

3.2.4.MDA ÖLÇÜMÜ:

Prensip: MDA'nın TBA ile oluşturduğu renkli kompleksin verdiği floresansın, fluorometrik dedektörle 553 nm (emisyon) ve 515 nm (eksitasyon)'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (67).

Ölçümde Kullanılacak Olan HPLC sistemi:

HPLC Modeli	Jasko JC
Dedektör	Floresans dedektör
Mobil Faz	pH:6,8 50 mmol/L K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ tampon, metanolle 40:60 (v/v) olacak şekilde karıştırıldı
Analitik Kolon	Supelco C ₁₈ 5 µm reverse-phase kolon, 25cm x 4,6 mm
Koruyucu Kolon	Spherisorb ODS-2, , C ₁₈ 5 µm reverse-phase cartridge
Dalga Boyu	Eksitasyon: 515 Emisyon: 553
Akış Hızı	1.5 mL/dakika
Örnek Hacmi	20 µL
Çalışma Süresi	10 dakika
Numune Loopu	100 µL
Enjeksiyon sistemi	Rheodyne Injector
Bilgisayar Ünitesi	Kromatografi programı ile donanımlı

Mobil Faz: K₂HPO₄ / KH₂PO₄ 50 mmol/L konsantrasyonda (pH:6,8) olacak şekilde hazırlandı.Tampon saf metanolle 40:60 (v/v) oranında karıştırıldı. Hazırlanan mobil faz daha sonra 0.45 µm'lik sellüloz asetat filtreden süzüldü.

Reaktifler:

1. % 0,05 Bütil hidrokstitoluen (BHT) (%95'lik alkol içinde)
2. 440 mM Fosforik asit
3. 42 mM TBA
4. N-Butanol
5. 50 mM K₂HPO₄
6. 50 mM KH₂PO₄
7. Metanol (HPLC grade)
8. 5 mM 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP), %97'lik: 5 mM TEP içeren standart solüsyonu kullanılarak plazma için 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 5 µmol/L; beyin dokusu için 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 30 µmol/L konsantrasyonlarda olacak şekilde % 40lık HPLC grade etanol solüsyonu içerisinde çalışma standartları hazırlandı.

Çalışma:

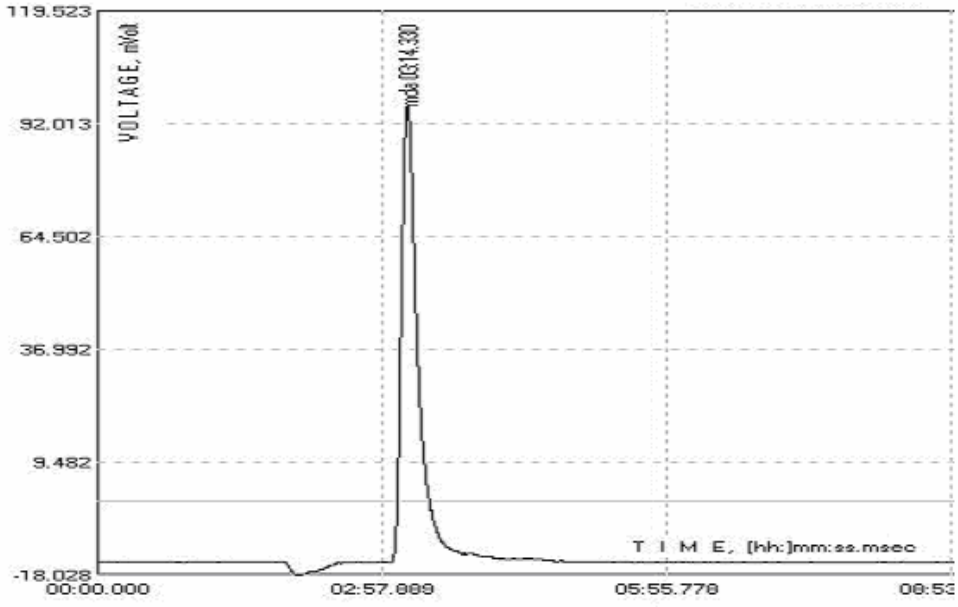
	Kör	Standart	Numune
Numune	-	-	50µl
%40 etanol	50µl		
Standart		50µl	
BHT	50µl	50µl	50µl
Fosforik asit	400µl	400µl	400µl
TBA	100µl	100µl	100µl
15 sn vortekslendikten sonra 60 dk 95 °C 'de inkübasyona bırakıldı.			
n-Butanol	250µl	250µl	250µl
Eklendikten sonra, 10 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi			
Süpernatant HPLC sistemine 20µl enjekte edildi			

Hesaplama:

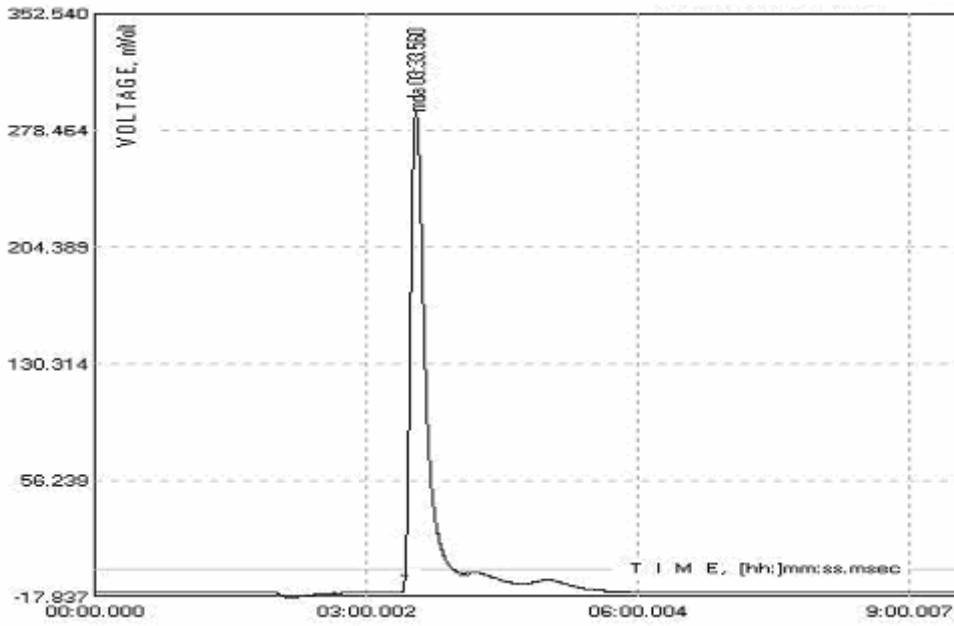
Standartların her biri, numune gibi aynı işlemlere tabi tutulduktan sonra, elde edilen pik alanları esas alınarak çizilen standart eğrisine göre, bilinmeyen örneklerin pik alanlarından konsantrasyonları hesaplandı.

Plazmada µmol/L , dokuda µmol/mg protein şeklinde verildi.

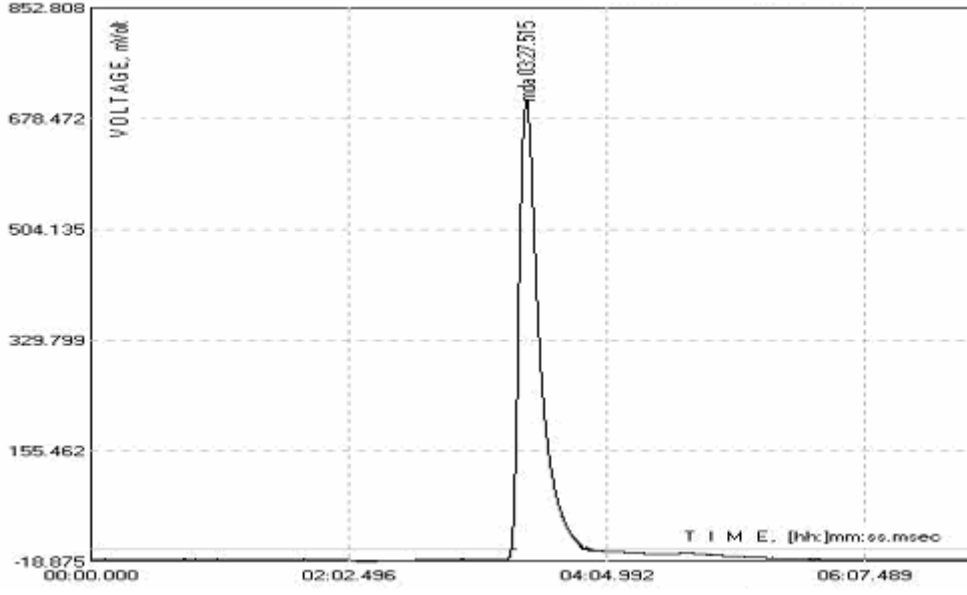
MDA Standart Serisine Ait Kromotogramlar :



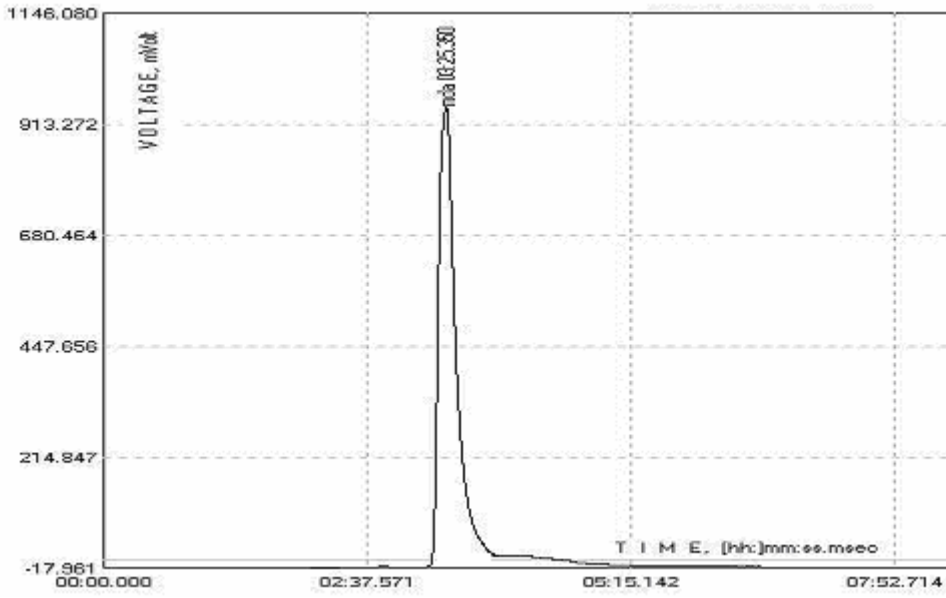
Şekil 22: 0,5 µmol/L konsantrasyonlu MDA standardı



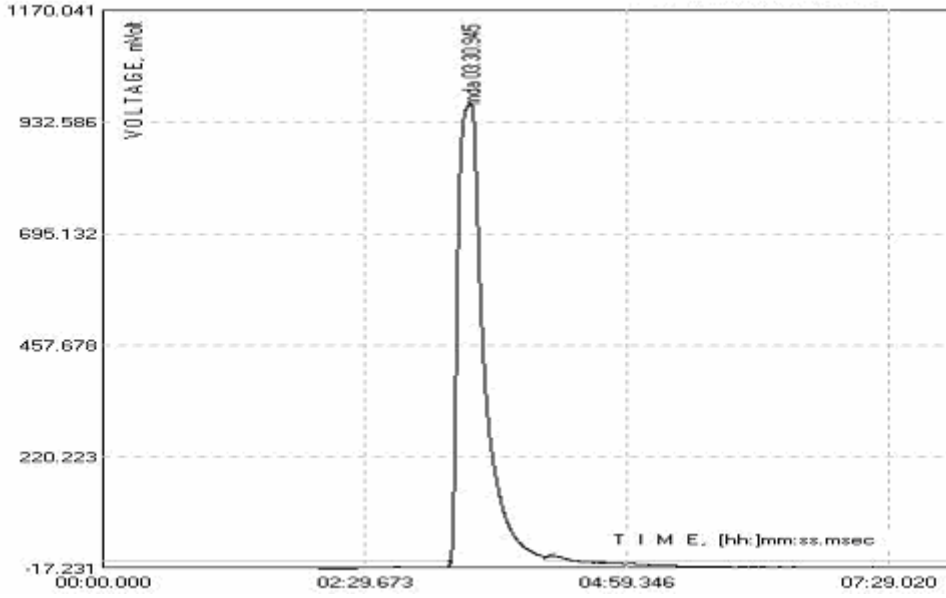
Şekil 23: 1 µmol/L konsantrasyonlu MDA standardı



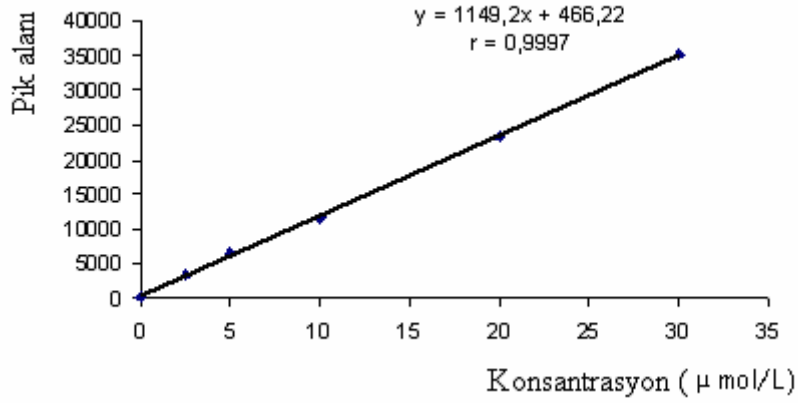
Şekil 24: 5 µmol/L konsantrasyonlu MDA standardı.



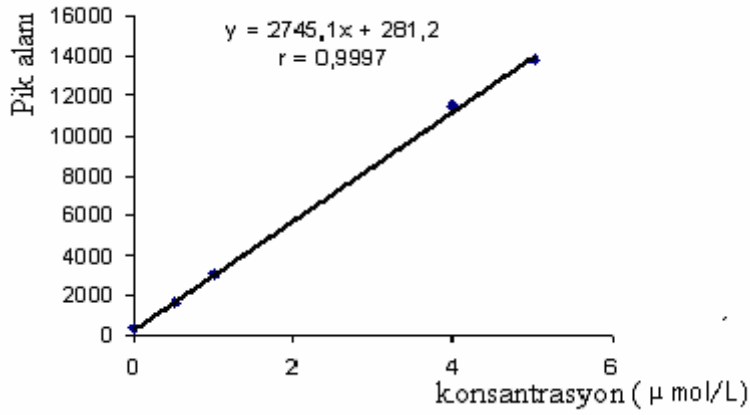
Şekil 25: 20 µmol/L konsantrasyonlu MDA standardı.



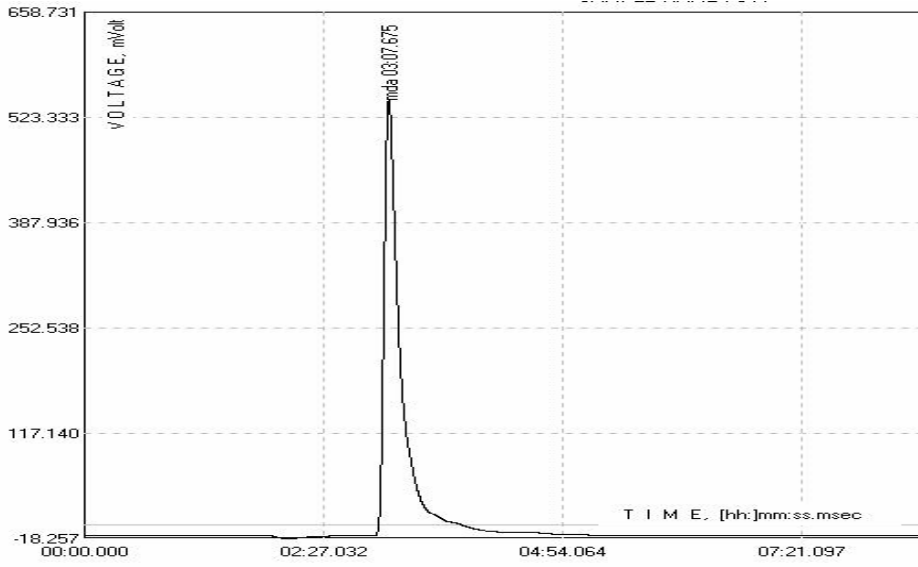
Şekil 26: 30 µmol/L konsantrasyonlu MDA standardı



Şekil 27: Pik Alanlarına Göre doku MDA Standart Grafiği.



Şekil 28: Pik Alanlarına Göre plazma MDA Standart Grafiği



Şekil 29: Tiner Grubunda 5 Nolu Rata Ait MDA Kromotogramı.

MDA ölçümü için CV değeri % 4,6 olarak bulundu.

3.2.5.PROTEİN ÖLÇÜMÜ:

Prensip: Bu metod hem biüretojen güçle (alkali ortamda bakır sülfat), hemde fosfotungstomolibdik ayıracı üzerindeki tirozin ve triptofan aminoasitlerinin, indirgeyici gücüyle çözeltideki proteinin prensibine dayanır (64).

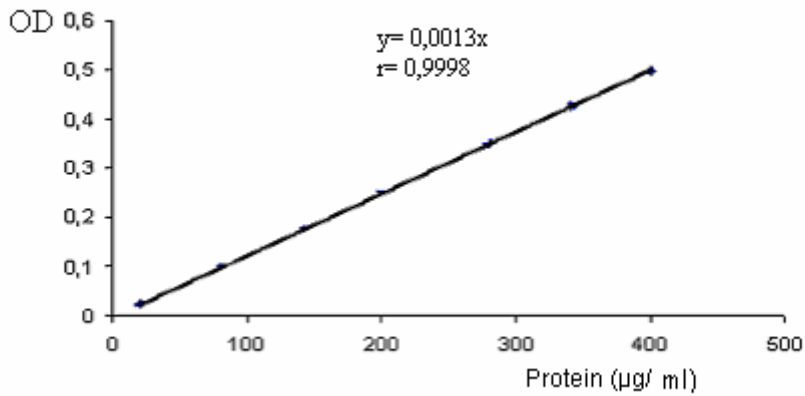
Reaktifler:

1. Alkali tartarat: 20 g Na_2CO_3 ve 0,5 g $\text{Na}^+\text{-K}^+$ tartarat 0,1 N NaOH ile litreye tamamlanır.
2. CuSO_4 : %0,1'lik hazırlanır.
3. Çalışma ayıracı (Taze hazırlanır):
Alkali tartarat ve CuSO_4 50/1 oranında karıştırılır.
4. Folin-Ciocalteu ayıracı:
5. Protein standardı: 250 mg/100 ml bovin serum albümin (BSA) 20, 80, 140, 200, 340, 400 $\mu\text{g/ml}$ protein içerecek şekilde dilüe edilerek çalışma standartları hazırlandı.

Çalışma:

	Standart	Kör	Numune
Seyreltilmiş süpernatant(1/50, v/v)	-	-	0,3 ml
Standart (ml)	0,3 ml	-	-
Tip 1 su	-	0,3 ml	-
Çalışma ayıracağı	3 ml	3 ml	3 ml
15 dk inkübasyon sonrasında			
Folin-Ciocalteu ayıracağı	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
Eklenerek, 30 dk inkübasyondan sonra 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu.			

Hesaplama: Standart grafiğe göre değerlendirildikten sonra yapılan dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplandı. Beyin dokusu mg /ml olacak şekilde dönüşüm yapıldı.



Şekil 30: Protein Standart Grafiği.

Protein ölçümü için CV değeri %2,65 olarak bulundu.

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Ratlardan elde edilen biyolojik materyalde çalışılan parametrelerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS for Windows 10.0 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı:

Veriler analiz edilmeden önce normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ile test edildi. Beyin MDA, Plazma MDA, Plazma GSH-Px değişkenleri normal dağılıma uygun bulundu. Diğer değişkenlere dönüşüm yapıldı. Dönüşüm sonucunda (Log10) beyin SOD değerleri normal dağılıma uygunluk gösterdi, ama plazma SOD ve beyin GSH-Px normal dağılıma uygunluk göstermedi.

Normal dağılımda olan değişkenlere parametrik testlerle tek yönlü varyans analizi, göstermeyenlere Kruskal-Wallis varyans analizi yapıldı. Bu analizler sonucunda önemli bulunan değişkenlere çoklu karşılaştırma testlerinden (post hoc) Kruskal-Wallis için Dunn's ve Tek Yönlü Varyans Analizi için Tukey testi yapıldı.

Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

Bu çalışmada, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde bulunan Sprague Dawley türü 4-5 aylık ve 300-380 gram ağırlığında olan 40 erkek rat kullanıldı. Her biri 10 rat içeren üç çalışma grubuna 30 gün süreyle tiner inhale ettirildi. Tiner inhalasyonunun yanısıra TİN+EPO grubuna aynı süre 1500 Ü/kg EPO, TİN+MEL grubuna da 10mg/kg olacak şekilde MEL intraperitoneal enjekte edildi. K grubuna SF enjekte edilerek aynı süre taze hava solutuldu. Bir ay sonunda ketamin anestezisiyle uyutulan ratlardan intrakardiyak kan alındıktan sonra, sakrifiye edilerek beyinleri çıkartıldı. Fosfat tampon kullanılarak homojenize edilen beyin dokuları ve ayrılan plazmalar çalışma gününe kadar -80° C’da muhafaza edildi.

Plazma ve beyin dokusunda yapılan biyokimyasal çalışmalara ait bütün veriler, Ek Tablo da gösterildi. Bu veriler kullanılarak, hesaplanan her bir grubun ortalama değerleri (aritmetik ortalama ve standart sapma; $X \pm SD$) ve yapılan istatistiki karşılaştırmalar tablolar (Tablo 4-8)’da gösterildi. Çalışma gruplarını oluşturan rat sayıları, tablolarda ‘n’ olarak verildi. İstatistiki karşılaştırmalarda, anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

RAT AĞIRLIĞI:

Belli aralıklarla ölçülen rat ağırlıkları tablo 4’de gösterildi

Tablo 4: Rat Ağırlıkları

RAT AĞIRLIĞI	0. GÜN	10. GÜN	20. GÜN	30. GÜN
KONTROL	308 ± 12	315 ± 14	326 ± 9	334 ± 10*
TİNER	299 ± 29	288 ± 24	269 ± 34	250 ± 41*
TİN+ MEL	306 ± 28	304 ± 29	300 ± 32	297 ± 32
TİN+ EPO	310 ± 29	307 ± 28	302 ± 34	295 ± 31

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: 0. gün (*) ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Ratların ağırlıkları belli aralıklarla ölçüldüğünde sadece kontrol grubu ratlarda ağırlık artışı olduğu gözlemlendi. Tiner verilen grupta ratların giderek zayıfladığı; TİN + MEL ve TİN + EPO gruplarında ratların kilo kaybettiği ama bu kaybın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu.

4.2.PLAZMA VE BEYİN DOKUSU BULGULARI:

Çalışma bitiminde ratlardan elde edilen plazma ve doku numunelerinde SOD, GSH-Px aktiviteleri, 3-NT ve MDA düzeyleri ölçüldü.

4.2.1.Plazma ve Beyin Dokusu Glutatyon Peroksidaz Aktiviteleri:

Çalışma gruplarının plazma ve beyin dokusu GSH-Px aktiviteleri Tablo 5’de gösterildi:

Tablo 5: Çalışma Grupları Plazma ve Doku GSH-Px aktiviteleri.

Parametre	Gruplar			
	KONTROL (n=10)	TİN (n=10)	TİN + EPO (n=10)	TİN +MEL (n=10)
Plazma				
GSH-Px (U/L)	0,59 ± 0,12** 0,57(0,44-0,38)	0,38± 0,11* 0,37(0,19-0,80)	0,59 ± 0,15** 0,59(0,44-0,94)	0,51 ± 0,10** 0,50(0,39-0,75)
Beyin				
GSH-Px (U/ mg protein)	0,08 ± 0,01** 0,08(0,06-0,12)	0,05 ± 0,01* 0,05(0,04-0,08)	0,07± 0,04** 0,05(0,02-0,14)	0,07 ± 0,02** 0,07(0,02-0,09)

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular : K=kontrol grubu ; *= tiner grubu ile, diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Çalışma gruplarının plazma ve doku GSH-Px aktiviteleri arasında karşılaştırma yapıldığında tiner kullanımının GSH-Px aktivitelerini diğer gruplara göre anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi. Diğer üç grup arasında istatistiksel olarak fark olmadığı bulundu (p<0,05).

4.2.2. Plazma ve Beyin Dokusu SOD Aktiviteleri:

Çalışmamızda SOD aktiviteleri incelenerek gruplardan elde edilen sonuçlar Tablo6'de gösterildi:

Tablo 6: Çalışma Grupları Plazma ve Doku SOD aktiviteleri.

Parametre	Gruplar			
	KONTROL (n=10)	TİN (n=10)	TİN+ EPO (n=10)	TİN+ MEL (n=10)
Plazma SOD (U/ml)	20,7 ±7,8** 20,0 (7-35)	33,3± 6,2* 34,9(19-39)	27,3 ± 8,08** 31,8(13-36)	25,2±6,6** 24,7(14-37)
Beyin SOD (U/g protein)	66,4 ±32,4** 52,2 (30-126,)	121,8 ± 70,2* 110,4 (48-211)	86,8 ± 27,3** 85,5(32-134)	72,8 ±37,1** 58,3(33-143)

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular : K=kontrol grubu ; *= tiner grubu ile, diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Çalışma gruplarının plazma ve doku SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında Tiner grubunda, kontrol grubuna göre aktivitenin istatistiksel olarak anlamlı artmış olduğu gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı değişiklik bulunmadı ($p>0,05$).

4.2.3. Plazma ve Beyin Dokusu 3-NT Düzeyleri:

Bu çalışmada 3-NT miktarları plazma ve doku homojenatlarında HPLC yöntemi ile ölçüldü. Sonuçlar Tablo 7’de da gösterildi:

Tablo 7 : Çalışma Grupları Plazma ve Doku 3-NT Düzeyleri.

Parametre	Gruplar			
	KONTROL (n=10)	TİN (n=10)	EPO (n=10)	TİN+MEL (n=10)
Plazma 3-NT($\mu\text{mol/L}$)	0	46,89 \pm 12,81 35,60(26,18-61,78)	0	0
Beyin 3NT ($\mu\text{mol/g protein}$)	0	43,30 \pm 12,86 42,64(25,1-57,60)	0	0

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular : K=kontrol grubu ; *= tiner grubu ile, diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Tiner uygulamasının sonlandırılmasının ardından protein oksidasyonunun göstergesi olan, ayrıca tek başına NO^- ve O^- ‘den daha güçlü bir oksidan olan 3-NT oluşumu gözlemlendi. Tiner yanında MEL ve EPO verilen gruplarda 3-NT oluşmadığı; yani MEL ve EPO’nun protein oksidasyonuna karşı plazma ve beyin dokusunda koruyucu olduğu gözlemlendi. K grubunda da 3-NT oluşumu bulunmadı ($p<0,05$).

4.2.4. Plazma ve Beyin Dokusu MDA Düzeyleri:

Çalışma gruplarının plazma MDA düzeyleri Tablo 8’de gösterildi:

Tablo 78: Çalışma Grupları Plazma ve Doku MDA Düzeyleri.

Parametre	Gruplar			
	KONTROL (n=10)	TİN (n=10)	TİN + EPO (n=10)	TİN + MEL (n=10)
Plazma	0,86 ± 0,06*	2,24 ± 0,38 ^K	1,46 ± 0,41 ^{*,K}	1,34 ± 0,34 ^{*,K}
MDA(μmol/L)	0,86(0,73-0,96)	2,08(1,49-3,13)	1,52(0,53-2,04)	1,34(0,84-1,93)
Beyin MDA				
(μmol /mg protein)	1,97 ± 0,49*	3,13 ± 1,26 ^K	1,29 ± 0,58*	1,90 ± 0,41*
	1,97(1,22-2,66)	2,91(1,53-5,66)	1,27(0,56-2,65)	2,00(1,09-2,42)

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular : K=kontrol grubu ; *= tiner grubu ile, diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Çalışma gruplarının plazma ve doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, T grubunda diğer gruplara göre LPO'da anlamlı artış olduğu (p<0,05); tiner inhalasyonu ile beraber MEL ve EPO kullanımının LPO oluşumunu önemli oranda baskıladığı gözlemlendi.

5. TARTIŞMA

Yaşamın her alanına girmiş olan ve çok çeşitli alanlarda kullanılan tinerin özellikle solunum, deri ve oral yolla teması söz konusudur. Endüstride ve boya işlerinde sık kullanılan tinerin son yıllarda, madde bağımlıları tarafından narkotik olarak kullanımları da dikkat çekmektedir. Tinerin, endüstride ve diğer alanlarda güvenli kullanım miktarları belirlenmiş olup uygulamada bu sınırlara bağlı kalınmaktadır. Ancak maddenin uyuşturucu olarak kullanımı engellenememekte ve gün geçtikçe artmaktadır (1,2). Ankara Madde Bağımlılığı Araştırma ve Eğitim Merkezi (AMATEM)'nden alınan bilgilere göre; tiner genellikle düşük sosyoekonomik çevrede , özellikle de selülozik tiner şeklinde kullanılmaktadır. Ucuz, ulaşılması kolay ve yasak olmayan tineri madde bağımlıları yüksek dozda ve inhalasyon yolu ile almaktadırlar (13).

Tinerin kaza sonucu oral alımı sonrası ölen bir erkeği, vak'a olarak yayımlayan Ameno ve ark (68), toluen konsantrasyonunun en çok karaciğerde, onu takiben pankreas, beyin, kalp, kan, yağ ve serebrospinal sıvıda olduğunu tesbit etmiştir. Paterson ve Sarvesvaran (69) ise inhalasyon yoluyla zehirlenip ölen 16 yaşındaki bir erkeğin otopsisinde toluenin sırasıyla en çok beyin, karaciğer ve kanda biriktiğini yayımlamıştır. Ayrıca yapılan hayvan çalışmalarında da tinerin lipofilik olması sebebiyle özellikle yağ dokusundan zengin olan beyinde biriktiği ve zararlı etkilerini bu dokuda gösterdiği bildirilmiştir (12, 15, 19).

Tinerin beyine olan etkilerini incelemek için yapılan deneysel çalışmalarda, intraperitoneal ve oral uygulamaların dışında; selülozik tinerin, sokak çocuklarında kullanımına benzer şekilde, ratlara yüksek dozda inhalasyonu yapılmaktadır. Çalışmamızda tiner, ratlara fiziksel temas olmaksızın günde bir saat yüksek doz inhale ettirildi. Tiner inhalasyonu süresince, önce; ratların hareketlerinin yavaşladığı, yürüme zorluğu çektikleri, soluk alış verişlerinin derinleştiği, çalışmanın sonuna doğru ratların agresifleştiği gözlemlendi. Ayrıca ratlarda ağırlık kaybı olduğu bulundu. Bu bulguların tinerin nörotoksik etkisinin işaretleri olabileceği düşünülebilir.

Deneysel çalışmalarda tiner dozu genelde içerisinde en yüksek konsantrasyonda bulunan toluen üzerinden hesaplanır. Daha önce yapılan çalışmalarda toluen çeşitli dozlarda ve sürelerde kullanılmıştır. Rebert ve ark (70) 1989'da 500-16000 ppm tolueni tek doz uygulamışlar ve beyinde potansiyel nörotoksik etki gözlemlemişlerdir. Gibson ve Hardesty (71) ise 0, 30, 100 ve 300 ppm tolueni 2 yıl uygulamışlar ama hiçbir toksik etkiye rastlamamışlardır. Bu çalışmalar tinerin 500-16000 ppm arasında uygulanabileceğini göstermektedir. Ancak çok yüksek dozların ani ölüme sebep olabileceği de unutulmamalıdır (12, 19). Bu çalışmada tiner en çok kullanılan konsantrasyonda, yani 3000 ppm olacak şekilde inhale ettirilmiştir.

Tiner inhalasyonu sonucu vücutta oluşan toksik maddeler, CYP-450 ile zararsız hale getirilmektedir. Ancak yüksek doz ve uzun süre kullanım, CYP-450'ye bağlı monooksijenazı arttırarak ve SOR oluşumunu aktive ederek, enzim indüksiyon sınırını aşınca vücutta biriken toksik metabolitler hücreye zarar verirler (3, 19, 20). Vücutta meydana getirdiği diğer etkileri de hipoksi, asidoz ve aşırı glutamat birikimidir (72).

Organizmada oksidatif hasardan en çok etkilenen doku beyindir. İnsanda beyin vücut ağırlığına göre yüzde ağırlığı yaklaşık iki iken kullandığı oksijen oranı tüm oksijenin yüzde yirmisidir. Bu nedenle de oksijenin yan ürünlerinin oluşturduğu toksisite beyinde diğer dokulardan daha süratle ortaya çıkabilir. Beyinde dopamin oksidasyonu gibi bazı spesifik nörokimyasal reaksiyonlarla aşırı endojen SOR üretilir. Bunların dışında; nöronların membran alanının sitoplazmik hacime oranının yüksek olması; aksonların morfolojisinin periferal hasara oldukça yatkın olması; üstelik nöron hücrelerinin çoğalamaması, hasar gören hücrelerin kendini yenileyememesi gibi mekanizmalar sebebiyle beyin dokusu fazla etkilenir (73).

Doğal olarak bunun sonucunda antioksidan savunma sisteminin de beyinde daha güçlü olması beklenirken, tam tersi görülmektedir. Önemli antioksidan enzimler beyinde düşük

düzyededir (74). Ayrıca demir ve askorbik asidin konsantrasyonu da yüksek olup serbest demir gerek tek başına, gerekse askorbik asitle birlikte oksidan madde üretir. Beyinde, oksidatif hasarın kolaylıkla başlayıp, kendi kendine ilerlemesine uygun bileşikler olan doymamış yağ asitlerinin konsantrasyonunun yüksek olması da önemli bir etkidir. Bütün bu olumsuzlukların yanında beyin fizyolojik bir engel olan kan-beyin bariyeri ile korunmaktadır. Bu engel, bir yandan toksinlerin merkezi sinir sistemine girmesini önlerken, diğer taraftan aynı sınırı antioksidan maddeler için de koymaktadır. Ancak tinerin kan-beyin bariyerini geçebildiği ve esas etkisini yağ dokusundan zengin beyinde oluşturduğu bilinmektedir (3, 9, 19, 20).

Vücuda inhalasyonla alınan tiner karaciğerde bulunan CYP-450 enzimleri ile etkileşerek yan zinciri hidrosillenmekte ve benzil alkole dönüşmektedir. Daha sonra alkol dehidrogenaz enzimi ile oksitlenerek, benzaldehide ve aldehid dehidrogenaz etkisi ile benzoik aside transforme olmaktadır (75). Yüksek doz ve uzun süre tiner inhalasyonu CYP-450'ye bağlı monooksijenazı arttırarak, SOR oluşturmaktadır.

Organik solventlerin SOR yolu ile doku hasarı patogenezindeki değişikliklerini inceleyen çalışmaların sayısı, çok fazla değildir ve bu konu gittikçe önemi artan sosyal bir problem olmaktadır. SOR oluşumu sonucu bütün moleküller hasar görse de lipidler daha sık hedeflenir. Bu durumun, lipidlerin çift bağlar içermesiyle ve hücre membranlarında her zaman mevcut olmalarıyla ilgili olduğuna inanılır (76). Membranlar, oksidatif stresten önemli ölçüde sorumlu olan poliansatüre yağ asitlerinden zengin olup SOR'un lipidleri perokside etmesiyle doku hasarı oluşur, LPO'nun son ürünlerinden birisi tiyobarbiturik asit ile ölçülebilen MDA'dır (12, 77). Bu yöntem, lipid peroksit seviyelerinin ölçümünde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik kantitatif bir indikatörü değildir, fakat; LPO' nun derecesi ile korelidir (46). Ölçümünde spektrofotometre veya HPLC kullanılır. Çalışmamızda daha spesifik bir yöntem olan HPLC tercih edildi (67).

Baydas ve ark (56, 78), tinere maruz kalan ratlarda yapmış oldukları çalışmalarda tinerin sinir sisteminde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olduğunu tespit etmişlerdir. 45 gün süreyle yüksek konsantrasyonda (3000 ppm) tinere maruz bırakılan ratların tüm beyin bölgelerinde LPO ürünleri olan MDA ve 4-hidroksialkenlerin (4-DHA) anlamlı bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca tinerin bilişsel davranışlarda olumsuz yönde değişime ve oksidatif stresin artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Karagözler ve ark (79), uzun süre çözücü etkisine maruz kalan boyacıların kanında MDA ve sitokin düzeylerini inceleyerek belirgin bir şekilde artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Halifeoğlu ve ark (80), çalışmalarında da tiner ile çalışan işçilerde tinerin lipid peroksidasyonuna ve antioksidan enzimlere etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada oksidatif hasar göstergesi olarak plazma MDA düzeylerini ölçerek numune grubunu kontrol grubu ile kıyasladıklarında; tiner ile çalışanların MDA düzeylerinde belirgin bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Ulakoğlu ve ark(13), yapmış oldukları çalışmada ratları beş hafta boyunca tinere maruz bırakmışlar ve tiner teneffüsü süresince lipid peroksidasyon ürünlerinde (MDA ve 4-DHA) anlamlı artışlar gözlemlemişlerdir. Tinere maruz kalmanın; akciğer parankimasında ödem oluşmasına, vücut sıcaklığında değişikliğe, hem akciğer hem de diğer organlarda sürekli ve ölümcül hasarlara sebep olabileceğini bildirmişlerdir.

Dündaroz ve ark (81), tiner soluyan çocuklarda tinerin lipid peroksidasyonuna etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada tiner soluyan çocukların eritrosit ve plazma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Bozic ve ark (82); 3, 7 ve 11 gün toluen uyguladıktan sonra ratların eritrositlerini incelemişler ve sonuç olarak toluenin oksidatif stresi ve MDA oluşumunu indüklediğini; savunma olarak da kemik iliğinde lökosit öncüllerinin ve kan seruloplazmininin arttığını bildirmişlerdir.

Ilgazlı ve ark (83), tiner teneffüsünün MDA seviyelerine etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada ratları 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 hafta boyunca günde iki kez birer saat tiner solumaya maruz bırakmışlardır. Akciğer dokularındaki MDA seviyesinde 2. haftadan itibaren başlayan artışın 8. ve 12. haftada en yüksek seviyelere çıktığı gözlemlemişlerdir.

Mattia ve ark (3, 19, 20), *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarında, intraperitoneal olarak uyguladıkları toluen etkisiyle beyin, karaciğer, böbrek ve akciğer dokularında SOR oluşumunun hızlandığını ve LPO'nun arttığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar toluen ile birlikte metabolizma ürünleri olan benzil alkol ve benzaldehidin de beyin mitokondri fraksiyonlarında ileri düzeyde SOR oluşumunu hızlandığını göstermişlerdir. Toluenin bu etkisini, karışık fonksiyonlu oksidaz ve aldehid dehidrogenaz tarafından katabolizması sonucu, açığa çıkan süperoksid anyonunun artışına bağlamışlardır. Yaptığımız çalışmada kullanılan tiner bileşiminin en yoğun kısmını oluşturan (63%) ve dolayısıyla toksik

etkisinin de en yüksek olduğu düşünölen toluen inhalasyonu sonucunda elde edilen LPO bulguları, yukarıda bahsedilen çalışmaların yanı sıra; Mattia ve ark'nın (3, 19, 20) yaptıkları çalışmalarla da uymaktadır. Ancak solventlerin çok düşük konsantrasyonlarda bile karışım halinde bulduklarında, birbirleriyle sinerjik etki gösterdiklerini ve hatta birbirlerinin toksik etkilerini arttırabildiklerini de göz önünde bulundurmak gerekir.

Normalde vücutta oksidatif stres ile antioksidanlar arasında bir denge mevcuttur. Bu dengenin bozulması sonucu biriken SOR çok çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (4, 5). Çalışmamızda MDA yanında antioksidan enzimlerden olan SOD ve GSH-Px aktiviteleri ölçölerek tinerin bu enzimlere olan etkisinin incelenmesi amaçlandı. Benzer çalışmalara bakıldığında:

Halifeoğlu ve ark (84), tiner ile çalışan işçilerde bu solventin antioksidan enzimlere olan etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında artmış SOD, azalmış GSH-Px aktiviteleri bulmuşlardır. Baydas ve ark (78) da, 45 gün süreyle yüksek konsantrasyonda (3000 ppm) tinere maruz bırakılan ratlarda tinerin beynin hiçbir bölgesinde SOR'nin detoksifikasyonuna katılan ve GSH-Px için substrat olan glutasyon seviyelerine gözlenebilir bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Ayrıca yine Baydaş ve ark (12) tiner uyguladıkları ratlarda beyinde antioksidan enzimlerden olan SOD aktiviteleri ve glutasyon düzeylerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Ilgazlı ve ark (83) da günde 2 kez birer saat tiner inhale ettirdikleri ratlarda kanda 12 hafta boyunca değişimleri incelemişler; ancak SOD aktivitelerinde artış ve glutasyon seviyelerinde azalma olmakla birlikte anlamlı değişiklik saptayamamışlardır. Karagözler ve ark (79) boyacılar da yaptıkları bir çalışmada kanda SOD ve GSHPx aktivitelerinin azaldığını bulmuşlardır.

Dündaröz ve ark (81), tiner soluyan çocuklarda antioksidan sisteme olan etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmalarında tiner soluyan çocukların eritrosit ve plazma SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre daha yüksek ama GSH-Px aktivitelerini düşük bulmuşlardır. Öztecan ve ark (85) tiner uyguladıkları ratlarda beyin ve karaciğerde SOD ve GSH-Px aktivitelerini araştırmışlar beyinde GSH-Px ve SOD aktivitelerini düşük; karaciğerde düşük SOD artmış GSH-Px aktiviteleri bulmuşlardır.

Tiner ve toluen uygulayarak SOD ve GSH-Px aktivitelerini araştıran çalışmalarda yukarıda belirtildiği gibi farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunların bazılarında SOD ve GSH-Px aktiviteleri artmış, bazılarında azalmış; hatta değişmemiştir.

Oksidatif strese karşı savunma sistemlerinin ilk adımı; oluşan $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'e çevrilmesidir. İkinci adım GSH-Px ve CAT'la H_2O_2 'nin nötralize edilmesidir.

GSH-Px, vücudun bütün doku ve hücrelerinde bulunmakla birlikte dokulara göre aktivitelerinde farklılıklar gösteren bir enzimdir. Beyindeki aktivitesi diğer bazı dokulara göre daha azdır (86). İnsan beyni ve fare beyninde yapılan çalışmalarda SOD aktivitelerindeki artışın GSH-Px aktivitelerinde artışa neden olmadığı ve GSH-Px aktivitelerinde artış olmaksızın SOD aktivitelerindeki artışın LPO' na neden olduğu gösterilmiştir (87-89). H_2O_2 'in detoksifikasyonunda GSH-Px'in yanında CAT' da rol alır. GSH-Px, düşük H_2O_2 konsantrasyonları mevcut olduğunda daha etkin iken; katalaz, özellikle H_2O_2 miktarının aşırı arttığı durumlarda devreye girerek büyük bir spesifiklikle bu molekülü suya çevirir (73). Çalışmamızda SOD aktivitelerinin tiner uygulanan grupta beyin dokusu ve kanda anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. SOD enziminin artması; aşırı oluşan $O_2^{\cdot-}$ 'nin SOD ile nötralize edildiğini; bu sebeple ortamda H_2O_2 miktarının çok arttığını göstermektedir. Ancak diğer bir antioksidan olan GSH-Px aktiviteleri incelendiğinde kanda ve beyinde anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. H_2O_2 'nin su ve oksijene bozunmasını sağlayan GSH-Px aktivitelerinin azalmış olması, hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 birikimi olasılığını akla getirmektedir. H_2O_2 hücreler için toksik etkiye sahip reaktif bir oksijen bileşiğidir. Ayrıca oluşan aşırı H_2O_2 'in aktive olan CAT ile su ve oksijene dönüşmesi olasılığını da düşündürmektedir. Ancak CAT aktiviteleri incelenmediği için bunu tam olarak açıklayamadık.

H_2O_2 'in SOD enzimini inaktive ettiğine dair çok sayıda çalışma vardır. Bu inaktivasyonun muhtemel bir mekanizması SOD'ın serbest radikal oluşturan Fenton Reaksiyonunda, demirin yerine geçen bakır nedeniyle bu radikale hassas olmasındandır. Ama bu enzimler aynı zamanda direkt veya dolaylı olarak birbirlerini inaktivasyondan da korurlar. Böylece radikallerin sürekli arttığı bir üretim hızı ile geri dönüşümsüz bir otokatalitik süreç ve hücre ölümü meydana gelir (90).

Yapılan bütün çalışmalar ve çalışmamız göstermektedir ki; antioksidan sistem çeşitli durumlara farklı yanıtlar verebilmektedir. Şahin (91) yaptığı çalışmada ratlara farklı stresler uygulamış ve beyin dokusunda SOD ve GSH-Px aktivitelerinin farklı şekilde etkilendiğini gözlemlemiştir. Ayrıca Lesiuk ve ark (92) karbon tetraklorür uyguladıkları ratların beyin, karaciğer, böbrek ve kalp dokularında SOD ve GSH-Px aktivitelerinin farklı olduğunu bildirmişlerdir. Venditti ve ark (93) da oksidatif hasara olan yatkınlığın dokuya göre değiştiğini belirtmişler ve antioksidan kapasiteye göre organları karaciğer>

kan> kalp> kas olarak sıralamışlardır. Bizim çalışmamızda plazma ve doku değerlerinin paralellik göstermediği saptandı ve bu bulgunun antioksidan kapasitenin dokulara göre farklılık göstermesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Ancak bu çalışmaların çoğunda ortamda bulunan lipidlerin etkilenmesiyle LPO oluşmaktadır. Bunun sebebinin, lipidlerin çift bağlar içermesiyle ve hücre membranlarında her zaman hazır bulunmalarıyla ilgili olduğuna inanılır (76).

Çalışmamızdaki SOD ve GSH-Px aktivitelerinin diğer çalışmalarla çelişmesinin sebebi tiner uygulanma süresi ve incelenen dokuların farklılığı olabilir. Oluşan aşırı $O_2^{\cdot-}$ kompanse edilebilir olarak SOD aktivitelerini arttırmakta ancak oksidan etkinin devam etmesi ile kullanıma bağlı olarak zamanla aktiviteleri azalmaktadır.

Normal koşullarda, organizmadaki SOD aktiviteleri, oluşan tüm $O_2^{\cdot-}$ 'ni dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir fakat, süperoksit düzeyleri çok artmışsa ya da fazla miktarda NO^{\cdot} meydana gelmişse $ONOO^{\cdot}$ oluşumu gözlenir. $ONOO^{\cdot}$ oluşumu için gerekli reaksiyon hızının ($6,7 \times 10^9 M^{-1}$) yüksek olması önemlidir. Bu hız $O_2^{\cdot-}$ 'i ortamdaki temizleyecek enzim olan SOD'un reaksiyon hızının yaklaşık dört kat üzerindedir. Diğer bir deyişle, patolojik durumlarda $ONOO^{\cdot}$ oluşumu kaçınılmazdır. Ayrıca artmış $O_2^{\cdot-}$; $ONOO^{\cdot}$ oluşumu yoluyla hem daha toksik bir radikal oluşturmakta hem de NO^{\cdot} 'in yararlanımını azaltmaktadır (94).

Normal bireylerin plazmalarında ve dokularında 3-NT düzeyleri saptanamayacak konsantrasyonlardadır. Ancak bazı hastalık durumlarında plazma, idrar ve doku örneklerinde 3-NT seviyeleri tespit edilebilecek düzeylerde bulunabilir. Fakat bunun için örneklerin, ölçüm öncesi uygun bir şekilde hazırlanması gerekmektedir (40, 66).

3-NT'in, $ONOO^{\cdot}$ oksidasyonunun stabil son ürünü olmasına bağlı olarak, 3-NT konsantrasyonu NO^{\cdot} bağımlı in vivo hasarın tespitinde kullanışlı bir marker'dır. Bugünkü bilgilere göre, $ONOO^{\cdot}$ tek başına NO ve $O_2^{\cdot-}$ 'den daha güçlü bir oksidan ve sitotoksik mediatördür (41).

3-NT ölçümleri için monoklonal ve poliklonal antikorların kullanıldığı immünolojik (95), gaz kromatografi-kütle spektrofotometrik (96) ve değişik dedektörlerin (elektrokimyasal, floresans, UV) kullanıldığı HPLC gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Biz bu yöntemler arasında, 3-NT ölçümünde yaygın olarak kabul edilen UV dedektörlü HPLC yöntemini tercih ettik (66).

Çalışmamızda tiner grubunda 3-NT oluşumu gözlemlendi. Buna bağlı olarak ratlara uygulanan tinerin yüksek SOD ve düşük GSH-Px aktiviteleriyle de desteklendiği gibi, ONOO⁻ sentezini artırdığı ve protein yapılarındaki tirozil artıklarını nitratlayarak, 3-NT türevlerini oluşturduğu düşünülebilir. Başka bir ifadeyle tinerin oksidatif protein hasarına yol açtığı ve bu nedenle tinere bağlı nörotoksik yan etkilerin ortaya çıkmasında, protein oksidasyonunun da önemli bir yeri olduğu vurgulanabilir. Yapılan literatür araştırmasında; tiner kullanımında 3-NT oluşumunu araştıran tek çalışmada da, tinerin beyinde 3-NT oluşumuna yol açtığı bulunmuştur (97).

Serbest radikallere karşı vücutta üretilen endojen ve ayrıca eksojen antioksidanlar da mevcuttur. Bu antioksidanların etkileri çeşitli durumlar dışında tiner veya toluen kullanımında da araştırılmıştır. Coşkun ve ark (98) günde 8 saat 3000 ppm toluen uyguladıkları ratların siyatik sinirlerini homojenize ederek MDA düzeylerini ve SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada toluenin MDA düzeylerini arttırdığı, SOD, GSH-Px aktivitelerini azalttığı ve CAT aktivitelerini etkilemediği gözlemlenmiştir; Ayrıca GSH-Px aktivitelerini güçlendiren ve lipoksijenaz yolunu inhibe eden selenyumlu bir bileşik olan ebselenin, toluenin toksik etkilerini geri çevirdiği bulunmuştur. Dillioğlugil ve ark (99) başka bir antioksidan olan N-asetilsisteinin (NAC) tiner uyguladıkları ratlarda akciğer üzerine koruyuculuğunu araştırmışlar ve sonuç olarak NAC'nin oksidatif stresi ve LPO'yu azalttığını gözlemlemişlerdir.

Bir başka önemli antioksidan MEL'dir. Çeşitli antioksidanların gücünü belirlemek amacıyla yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, MEL'in en güçlü antioksidanlardan biri olduğunu göstermektedir. Askorbat, alfa-tokoferol ve GSH gibi zincir reaksiyonlarını kırabilen diğer antioksidanlardan farklı olarak, yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu peroksil radikalini yakalayarak sonlandırmaktadır (58).

Deneysel çalışmalarda oksidatif hasar oluşturmak için kullanılan toksik maddelerin dozu oldukça yüksek tutulduğundan melatoninin de ancak farmakolojik dozlarda etkin olabilmesi mümkün görülmektedir. Çalışmamızda tinere bağlı serbest radikal hasarının oluşabilmesi için yüksek tiner dozları uygulanan deney hayvanlarına MEL, 10 mg/kg olarak uygulanmıştır. Literatürde 1 mg/kg'dan 20 mg/kg'a kadar değişen miktarlarda eksojen melatonin dozu bildirilmektedir. Düşük dozlar daha çok kronik, yüksek dozlar ise akut enjeksiyonlarda uygulanmıştır. Bizim kullandığımız doz, fizyolojik dozun birkaç katıdır. Melatonin dozu konusunda farklı görüşler mevcuttur. Ancak MEL, nontoksik ve dokulara çok iyi difüze olabildiği için 300 mg'lık dozlar da bile kullanılabilir (6).

Kazem ve ark (100) ve De La Lastra ve ark (101) MEL için en iyi antioksidan dozunun 20 mg/kg olduğunu bildirmişlerdir. Tütüncüler ve ark (102) hipoksi oluşturulan ratlara 10 mg/kg ve 20 mg/kg MEL uygulayarak, melatonin dozunun lipid peroksidasyonu oluşumu ve antioksidan enzimlere olan etkilerini incelemişler ve dozun antioksidan etkide önemli olmadığını bulmuşlardır. Ancak bu konu ve MEL dozuna ilişkin ileri çalışmalar gerekmektedir.

MEL direkt radikal süpürücü etki ile, indirekt spesifik melatonin reseptörleri aracılığı ile ve antioksidan enzimleri aktive ederek ya da pro-oksidatif enzimleri inhibe ederek doku koruyucu özellik gösterir. MEL' in enzimleri nasıl aktive ettiği tam olarak bilinmemekle birlikte, GSH-Px'in ve $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonunda en büyük rol oynayan SOD'un mRNA'sını arttırdığı bildirilmiştir (86). MEL, H_2O_2 'in hücre içi konsantrasyonunu azaltır, ayrıca indol nükleusun yan zincirindeki metoksi ve asetil grupları OH^{\cdot} radikalinin giderilmesinde rol oynar ve bir elektron verip OH^{\cdot} i nötralize ederek toksik olmayan indolil kation radikale (melatonin) dönüşür (103). 5-OH-triptofan, 5-OH-triptamin ve serotonin ile kıyaslandığında, melatoninin, NO oluşumunu azaltan en güçlü indol olduğu saptanmıştır. *In vitro* şartlarda melatoninin doza bağımlı bir şekilde, $ONOO^{\cdot-}$ 'in yol açtığı oksidasyonu önlediği ve ayrıca kendisi nitrasyona uğrayarak $ONOO^{\cdot-}$ 'i detoksifiye ettiği; *in vivo* enflamasyon modelinde de 3-NT oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (59).

MEL verilerek pek çok dokuda oksidatif strese bağlı zararlı etkilerin önlenildiği gösterilmiştir. Narin ve ark (104) kalpte iskeminin zararlı etkilerinin, Halıcı ve ark (105) kasta iskemik hasarın, Tütüncüler ve ark (102) beyinde hipoksi sonucu oluşan etkilerin MEL ile önlenilebildiğini bildirmişlerdir.

Yapılan literatür araştırmasında Baydaş ve ark (12, 56, 78) yaptıkları çalışmalarda tinerin etkilerini ve bunun melatoninle önlenilebilirliğini araştırmışlar ve melatoninin tiner verilmesi sonucunda oluşan radikal/ antioksidan dengesizliğini, ayrıca bilişsel ve kognitif fonksiyonları düzelttiğini gözlemlemişlerdir. Si Woo Bae (106) de toluen uygulanan ratlarda melatoninin MDA oluşumunu ve AST , ALT aktivitelerini azaltarak toluene bağlı hepatotoksisiteyi önlediğini bildirmiştir.

Çalışmamızda 10 mg/ kg melatonin kullanımı ile ratlarda kilo kaybının ve MDA oluşumunun azaldığı, antioksidan ve H_2O_2 yıkıcı bir enzim olan GSH-Px aktivitesinin arttığı gözlemlendi. MEL verilen grubun SOD aktivitelerinin kontrol grubuna yaklaşması MEL'in zararlı $O_2^{\cdot-}$ oluşumunu azalttığına bir göstergesi olarak düşünülebilir. Tinerle birlikte melatonin verilen ratlarda 3-NT oluşumu da gözlemlenmedi. Yapılan bir

çalışmada MEL'in peroksi radikalini tutmadığı, sadece metal iyonunun katalizlediği oksidasyonları inhibe ettiği bildirilmiştir (107). Ancak bu çalışma bu çalışmada dahil olmak üzere pek çok çalışma ile çelişmektedir.

EPO; diyaliz hastalarında eritropoezisi düzenlemek amacıyla kullanılan nöroprotektif etkisi yeni keşfedilmiş bir glikoproteindir. EPO'nun anjiogenezisi arttırarak ve apopitozisi önleyerek kanser oluşumunu indüklediğini veya varolan tümörün gelişimine sebep olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte kanser ve hemodiyaliz hastalarında yaşam kalitesini arttırmak amacıyla kullanılan elzem bir moleküldür (61). Nöronlarda reseptörleri olduğu ve nöron koruyucu etkisi son yıllarda keşfedilen EPO'nun çok az bir kısmı (%1), kan beyin bariyerini geçebilmesi sebebiyle nöroprotektif etkisinin gözlenebilmesi için yüksek dozda kullanılması gerekmektedir. 1000-5000 U/kg'a kadar kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (60, 61). Yapılan çalışmalarda antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuvar, kalsiyum ve glutamat metabolizmaları üzerine modüle edici etkileri bulunmuştur (7, 61). EPO'nun NO miktarını azalttığı ayrıca SOD, GSH-Px, katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (149).

Bu konuda yapılan literatür taramasında EPO'nun hipoksi, etanol kullanımı, Parkinson, spinal kord travması, NO hasarı, subarahnoid hemoraji, glutamat toksisitesi gibi durumlarda antioksidan ve nöroprotektif etki gösterdiği bulunmuştur (7,108). Ancak yapılan araştırmada tiner inhalasyonunun beyinde olan etkilerini önlemek için EPO tedavisinin kullanımına rastlanılmadı. Çalışmamızda EPO 1500 Ü/kg intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Ratların sakrifiye edildikten sonra incelenmesi sırasında angiogenezisin arttığı ve polistemik oldukları gözlenmiştir. Bu bulgular EPO'in angiogenezisi arttırdığına yönelik çalışmalara paralel olarak bulunmuştur. TİN+EPO grubu ratlarda ölçülen ağırlık, GSH-Px ve SOD aktiviteleri , EPO'nun kullanımı ile tinerin meydana getirdiği oksidatif stresin önlenebilirliğinin ve nöroprotektif etkinin göstergesi olabilir. TİN+EPO grubunda MDA oluşumunun azalması yanında, 3-NT oluşumunun da gözlenmemesi NO miktarının ve O_2^- oluşumunun azaldığını desteklemektedir.

Tinerin, santral sinir sistemi üzerinde akut olarak deprese edici bir etkisi olduğu bilinmektedir. Semptomlara örnek olarak, baş ağrısı, dizziness, ilerleyen bir ataksi, konsantrasyon bozukluğu verilebilir. Kronik etki olarak ise geçici serebellar ataksi, kronik ensefalopati (tremor, ataksi, emosyonel labilite, baş ağrısı, mental durumda

değişiklikler), kognitif disfonksiyon, psikomotor bozulma gözlenir. Periferik sinir sistemi üzerine ise sinir iletiminde bozulma ve periferik nöropati yapıcı etkileri mevcuttur (1, 3, 19). Tiner kullanımı gittikçe artan orandadır ve beyin etkilenmesi sonucunda tiner kullananlarda suç işleme oranı çok artmaktadır (72). Bu sebeple tinere bağlı oluşan oksidatif stresin ve beyin hasarının önlenmesi konusu gittikçe önem kazanmaktadır. Alınacak önlemlerin başında organik solvente maruz kalınan işyerlerinde maske kullanımının zorunlu hale getirilmesi, işçilerin ve tedavi edilen bağımlıların antioksidan vitamin ve madde ihtiyaçlarının karşılanması ve daha da önemlisi bu kişilere zararlı organik maddeleri solumanın sağlık için olumsuz etkileri olacağı anlatılması yanında eğitim programları düzenlenmesi de gelmelidir. EPO ve MEL’de tiner kullanan kişilerin tedavisinde beyin hasarının önlenmesinde kullanılacak bir ajan olabilir ancak bu konuda yeni araştırmalara gerek duyulmaktadır.

Yüksek doz tiner inhalasyonunun beyinde yarattığı komplikasyonların diğer hayati organlarda da kalıcı ve ölümcül olabilecek hasarları ortaya çıkarabileceği düşünülerek, ülkemizde gençler arasında hızla yaygınlaşmakta olan tiner ve benzeri maddelerin uyuşturucu amaçlı kullanımının eğitici ve yasal önlemlerle engellenmesini umut etmekteyiz.

6. SONUÇLAR

- Tiner verilen grupta plazma ve doku MDA düzeylerinde anlamlı artış olması, tinere bağlı beyin hasarının patogeneğinde lipid peroksidasyonunun rolü olduğu görüşünü desteklemektedir.
- Tiner verilen grupta plazma ve dokuda 3-NT oluşumu gözlenmesi tinere bağlı hasarın patogeneğinde protein oksidasyonunun rolü olduğu görüşünü desteklemektedir.
- Tiner verilen grupta plazma ve doku SOD düzeylerinde anlamlı oranda artış saptandı, bu bulgu $O^{\cdot -}$ radikali oluşumunun artışı ve H_2O_2 oluşumunun arttığını desteklemektedir.
- Tiner verilen grupta plazma ve doku GSH-Px aktivitelerinde anlamlı oranda azalma saptandı, bu bulgu tinere bağlı nörotoksisite oluşumunda antioksidan enzimlerin azalmasının rolü olduğu görüşünü desteklemektedir.
- Farmakolojik dozda kullanılan melatoninin, beyin ve plazma MDA düzeylerini anlamlı oranda azalttığı, SOD aktivitesinde azalma ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı artış sağladığı ve 3-NT oluşumu olmadığı gözlendi. Bu bulgular tinere bağlı oksidatif stres oluşumunu melatoninin engellediği görüşünü desteklemektedir.
- Yüksek doz eritropoietin kullanımı ile beyin ve plazma MDA oluşumunun azaldığı; GSH-Px aktivitesinin anlamlı olarak arttığı, SOD aktivitesinin anlamlı azaldığı belirlendi. 3-NT oluşumunun da eritropoietin kullanımı ile önlendiği gözlendi. Bu bulgular eritropoietinin etkilerini antioksidan savunmayı güçlendirerek yaptığı ve nöroprotektif etkisi olduğu görüşünü desteklemektedir.

7. KAYNAKLAR:

1. Flanagan RJ, Ruprah M, Meredith TJ, Ramsey JD. An introduction to clinical toxicology of volatile substances. *Drug Saf* 1990; 5: 359-83.
2. Ramsey J, Anderson R, Bloor K, Flanagan RJ. An introduction to the practice, prevalence and Chemical Toxicology of volatile substance abuse. *Human Toxicol* 1989; 8: 261-9.
3. Mattia CJ, LeBel CP and Bondy SC. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 879-82.
4. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-45.
5. Halliwell, B., Gutteridge, JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
6. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26: 1141-55.
7. Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U et al. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 160: 146–56.
8. Tiner-selülozik. Türk Standartları Enstitüsü. TS 9720/Ocak 1992.
9. Carabez AT, Sandoval F, Palmat L. Ultrastructural changes of tissues produced by inhalation of tinner in rats. *Microscopy Research and Technique* 1998; 40: 56-62.
10. Allen R, Kidd H, Lyons G, Templer S, Hannat M. Solvents. In: Walsh D, Editör. *Chemical Safety Data Sheets* (3. Edition). Athenaeum Press Newcastle-UK 1992; 1-4: 190-5, 303-5.
11. Vural N. Toksikoloji (1. Baskı). Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1996; 453-81.
12. Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS et al. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett* 2003; 137:169-74.

13. Ulakoğlu EZ, Saygı A, Gümüştaş MK, Zor E, Akkaya A, Kökoğlu E. The effect of chronic thinner inhalation on lipid peroxidation in rat lung and liver. *Cerrahpaşa J Med* 1998; 29: 75-8.
14. Eisenberg DP. Neurotoxicity and mechanism of toluene abuse. *Einstein Quart J Biol Med* 2003; 19: 150-9.
15. C M. Filley, W Halliday, B. K. Kleinschmidt-Demasters. The Effects of Toluene on the Central Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63 1: 1-12.
16. Altındağ A, Özkan M, Oto R. İnhalanla ilişkili bozukluklar. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2001;11:143-8.
17. Meadows R, Verghese A. Medical complications of glue sniffing. *South Med J* 1996; 89: 455-62.
18. Ulakoğlu E Z, Saygı A, Gümüştaş M K. Alterations in süperoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled liver lungs:relationship between histopatologic properties. *Pharmacol Res* 1998; 38: 209-14.
19. Mattia C J, Adams JD, Bondy S C. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 103-10.
20. Mattia C J, Ali S F, Bondy S C. Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Mol Chem Neuropathol* 1993; 3: 313-28.
21. Lebel CP, Schatz RA,. Altered synoaptosomal phospholipid metabolism after toluene. Possible relationship with membrane fluidity, Na⁺, K⁺ -adenosine triphosphate and phospholipid metylation. *J Pharmacol Exp Ther* 1990 ; 253: 1189-97.
22. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc* 1987; 46: 13-26.
23. Cheeseman, KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bulletin*1993; 149: 481-93.
24. Bergendi L , Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 1999; 65: 1865-74.
25. Valko M, Rhodes Cj, Moncol J, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stres- induced cancer. *Chem Biol İnteract* 2006; 160: 1-40.
26. G. Loschen, B. Flohe. Chance respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett* 1971; 18: 261–3.
27. Bondy SC, Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 155-9.

28. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza Basım, Yayım ve Dağıtım AŞ. Konya. 1995; 13-31, 32-37, 42- 61.
29. Borges F, Fernandes E, Roleira F: Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem* 2002; 9: 195–217.
30. Freeman Ba, Crapo JD: Biology of disease, Free radicals and tissue injury. *Lab invest* 1982; 47: 412-26.
31. Halliwell B. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol* 1984; 62: 71-7.
32. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species in living systems: source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-21.
33. Halliwell B, Gutteridge B. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 1992; 27: 108-12.
34. Southorn PA., Powis G.: Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-9.
35. Foote CS, Shook FC, Abakerli RB. Characterization of singlet oxygen. *Methods Enzymol* 1984; 105: 36-47.
36. Archer S. Measurement of nitric-oxide in biological models. *FASEB J* 1993; 7: 349–60.
37. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG, Nitric oxide synthesis: structure, function and inhibition, *Biochem J* 2001; 357: 593–615.
38. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-Nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329: 2002-12.
39. Robbins RA, Grisham MB. Nitric Oxide. *Int J Biochem Cell Biol.*1997; 29: 857-60.
40. Yaman H, Unlu A , Karabıçak U, Cimen B et al. Measurement of 3-Nitrotyrosine by high performance liquid chromatography. *T Clin Med Res* 2000; 18: 26-30.
41. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med* 2004 ; 35 : 83-9.
42. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244-50.
43. Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW. Peroxynitrite: A biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 179-86.
44. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckmann JS. Peroxynitrite formation from macrophage derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 446-51.
45. Cochran CG. Cellular injury by oxidants. *Am. J. Med* 1991; 92: 235-305.

46. Gutteridge JMC: Lipid Peroxidation and Antioxidants as biomarkers of Tissue Damage. Clin Chem 1995; 41:1819-28.
47. Wu D, Cederbaum A.I. Alcohol, oksidative stres and free radical damage. Alcohol Res Health 2003; 27: 277-84.
48. Frei B. Reactive oxgen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. Am J Med 1994; 26: 5-12.
49. Khan JY, Black SM. Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. Pediat Res 2003; 54: 77-82.
50. Chapple ILC: Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. J Clin Periodontol.1997; 24: 287-96.
51. Mills GC. Hemoglobin catabolism. glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J Biol Chem 1957; 229: 189-197.
52. Malone WF Studies evaluating antioxidants and beta carotene as chemopreventives. Am J Clin Nutr 1991; 53: 305-13.
53. Carr A C. Carr BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (Vitamin C) and a-Tocopherol (Vitamin E). Circ Res 2000; 87: 349-54.
54. Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. Structure of melatonin. J Am Chem Soc 1959; 81: 6084-90.
55. Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr Rev 1991; 12 : 151-80.
56. Baydas G, Ozveren F, Akdemir I, Tuzcu M, Yasar A. Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin. J Pineal Res 2005; 39: 50-6.
57. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. Neurosci Biobehav Rev 1993; 17: 347-57.
58. Leon J, Castroviejo D, Sainz R, Mayo J, Tan DX, Reiter R. Melatonin and mitochondrial function. Life Sci 2004; 75: 765-90.
59. Karbownik M, Reiter R. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. PSEMB 2000; 225: 9-22.
60. K Maiese, F Li and Z Z Chong. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? Trends Pharmacol Sci 2004; 25: 577-83.
61. Jelkman W. Erythropoietin: Structure, control of production, and function. Physiol Rev 1992; 72: 449-89.

62. Aras K, Erşen G. Klinik Biyokimya (5. Baskı). AÜ Basımevi, Ankara 1975; 17-18.
63. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
64. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement with the phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
65. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34:13: 497-500.
66. Du M, Wu W, Ercal N, Ma Y. Simultaneous determination of 3-nitro tyrosine, o-, m-, and p-tyrosine in urine samples by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection with pre-column cloud point extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 803: 321-9.
67. Agarwal R, Chase SD. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatog* 2002; 775: 121-6.
68. Ameno K, Kiriu T, Fuke C et al. Regional brain distribution of toluene in rats and in a human autopsy. *Arch Toxicol* 1992; 66:153-6.
69. Paterson SC, Sarvesvaran R. Plastic bag death: a toluene fatality. *Med Sci Law* 1983; 23: 64-6.
70. Rebert CS, Matteucci MJ, Pryor GT. Multimodal effects of acute exposure to toluene evidenced sensory-evoked potentials from Fischer-344 rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 34:757-68.
71. Gibson JE, Hardisty JF. Chronic toxicity and oncogenicity bioassay of inhaled toluene in Fischer-344 rats. *Fund Appl Toxicol* 1983; 3:315-19.
72. Iqbal N. Neurotoxic effects of inhalants. *Annals of Saudi Medicine* 2001; 21: 216-18.
73. Akyol Ö. Şizofrenide oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004; 5: 15-25.
74. Bondy SC. The Relation of oxidative stress and hyper excitation to neurological disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 270: 349-55.
75. Koyuncuer A. Uçucu madde entoksikasyonlu hastalara ilk yaklaşım. *STED* 2004; 10: 366-70.
76. McMichael M, Moore R. Ischemia reperfusion injury pathophysiology, parts I. *Vet Emerg Crit Care* 2004; 14: 231-41.
77. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 510-15.

78. Baydas G, Ozveren F, Tuzcu M, Yasar A. Effects of thinner exposure on the expression pattern of neural cell adhesion molecules, level of lipid peroxidation in the brain and cognitive function in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 512: 181-87.
79. Karagozler AA, Mehmet N, Batcioglu K. Effects of long-term solvent exposure on blood cytokine levels and antioxidant enzyme activities in house painters. *J Toxicol Environ Health* 2002 13; 65: 1237-46.
80. Halifeoğlu İ, Karataş F, Üstündağ B, Canatan H, İlhan N. Tiner ile çalışan kişilerde tiner solumanın antioksidan vitaminler üzerine etkisi. *Turk J Biochem* 1999; 24: 29-33.
81. DüNDAROZ MR, TÜRKDAY T, AKAY C, SARICI SU, AYDIN A, DENLİ M, GÖKÇAY E. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescents with inhalant abuse. *Turk J Pediatr* 2003; 45: 43-5.
82. Bozic T, Stevanovic J, Kovacevic J et al. Toluene Mediated Oxidative Stress And Granulo-Monocytopenia. *Acta Veterinaria (Beograd)* 2003; 53 4: 201-10.
83. Ilgazli A, Sengul C, Maral H, Ozden M, Ercin C. The effects of thinner inhalation on superoxide dismutase activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. *Clin Chim Acta* 2004; 343:141-4.
84. Halifeoglu I, Canatan H, Ustundag B, Ilhan N, Inanc F. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. *Cell Biochem Funct.* 2000; 18: 263-7.
85. Oztezcan S, Türkoglu UM, Toker G, Uysal M. Effects of acute and chronic thinner administration on liver and brain lipid peroxidation and antioxidant system in rats. *Research Communication in Alcohol and Substances of Abuse* 1997; 18: 109-14.
86. Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res* 2000; 28: 89-96.
87. Brooksbank BW, Balazs R. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Brain Res* 1984; 318:37-44.
88. De Haan JB, Newman JD, Kola I. Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Brain Res Mol Brain Res* 1992; 13: 179-87.
89. Uysal N, Gönenç S, Sönmez A, Aksu İ ve ark. Adölesan sıçan beyinde antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon düzeyleri. *Ege Tıp Dergisi* 2005; 44: 75-9.
90. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990; 51: 283-97.

91. Sahin E, Gumuslu S. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res* 2004; 155: 241-8.
92. Szymonik-Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Slomka M, Madro A, Celinski K, Wielosz M. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication.. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 309-15.
93. Venditti P, Balestrieri M, De Leo T, Di Meo S. Free radical involvement in doxorubicin-induced electrophysiological alterations in rat papillary muscle fibres. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 695-702.
94. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxy nitrite. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 385-91.
95. Khan J, Brennan DM, Bradley N, Gao B, Bruckdorfer R, Jacobs M. 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem J* 1998; 330: 795-801.
96. Shigenaga MK, Lee HH, Blount BC, Christen S, Shigeno ET, Yip H, Ames BN. Inflammation and NO_x- induced nitration: Assay for 3-Nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3211-16.
97. Riegel AC, Ali SF, Torinese S, French ED. Repeated exposure to the abused inhalant toluene alters levels of neurotransmitters and generates peroxy nitrite in nigrostriatal and mesolimbic nuclei in rat. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1025: 543-51.
98. Coskun O, Yuncu M, Kanter M, Buyukbaş S. Ebselen protects against oxidative and morphological effects of high concentration chronic toluene exposure on rat sciatic nerves. *Eur J Gen Med* 2006; 3: 64-72.
99. Dillioglugil MO, Ilgazli A, Maral H, Sengul C, Ozdemir G, Ercin C. Protective effects of N-acetylcysteine on the peroxidative changes of rat lungs exposed to inhalation of thinners. *Respirology* 2005; 10: 615-19.
100. Kazez A, Demirbağ M, Ustündağ B, Ozercan IH, Sağlam M. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 2000 Oct; 35: 1444-48.
101. De La Lastra CA, Cabeza J, Motilva V, Martin MJ. Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pineal Res* 1997; 23: 47-52.
102. Tütüncüler F, Eskiocak S, Başaran UN, Ekuklu G, Ayvaz S, Vatansever U. The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage. *Pediatr Int* 2005; 47: 434-9.

103. Şahna E, Deniz E, Aksulu H E . Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı ve melatonin. Anadolu Kardiyol Derg 2006; 6: 163-8.
104. Narin F, Başarslan F, Akgün H, Akın A, Baykan A, Saraymen R, et all. Hipoksi İle Oluşturulan Myokardiyal Hasar Üzerine Melatoninin Etkisi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2004; 13: 64-72.
105. Halici M, Narin F, Turk CY, Saraymen R, Baykan A, Kabak S. The effect of melatonin on plasma oxidant-antioxidant skeletal muscle reperfusion injury in rats. J Int Med Res 2004; 32: 500-6.
106. Si Woo Bae, In Sook Yon. The beneficial effect of melatonin for toluene hepatotoxicity in rats. J Biomed Lab Sci 2001; 7: 99-102.
107. Antunes F, Barclay CRL, Ingold KU, King M, Norris QJ, Scaiano JC, Xi F. On the antioxidant activity of melatonin. Free Radic Biol Med 1999; 26: 117-28.
108. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. Proc Natl Acad Sci U S 1998; 95: 4635-40.
109. Eskiocak S, Tutunculer F, Basaran UN, Taskiran A, Cakir E. The effect of melatonin on protein oxidation and nitric oxide in the brain tissue of hypoxic neonatal rats. Brain Dev 2007; 29: 19-24.

Ek Tablo 1: Kontrol Grubunun Plazma GSH-Px, SOD, MDA, 3-NT Düzeyleri

Rat No	GSH-Px (Ü/L)	SOD (Ü/L)	MDA (µmol/L)	3-NT (µmol/L)
1	0,59	7,68	0,81	0
2	0,6	19,47	0,9	0
3	0,5	19,47	0,91	0
4	0,53	20,54	0,96	0
5	0,44	22,84	0,86	0
6	0,45	31,41	0,91	0
7	0,55	15,33	0,82	0
8	0,8	20,54	0,81	0
9	0,72	14,93	0,86	0
10	0,71	34,94	0,73	0

Ek Tablo 2: Tiner Grubunun Plazma GSH-Px, SOD, MDA, 3-NT Düzeyleri

Rat No	GSH-Px (Ü/L)	SOD (Ü/L)	MDA (µmol/L)	3-NT (µmol/L)
1	0,24	25,40	2,80	42,36
2	0,3	34,94	1,90	50,24
3	0,53	33,13	1,60	55,42
4	0,47	37,84	2,50	51,12
5	0,39	38,85	1,49	26,18
6	0,36	34,94	1,94	28,24
7	0,45	39,90	3,13	60,75
8	0,19	34,94	2,98	45,92
9	0,34	19,47	1,82	61,78
10	0,52	34,02	2,23	46,84

Ek Tablo 3: TİN+MEL Grubunun Plazma GSH-Px, SOD, MDA, 3-NT Düzeyleri

Rat No	GSH-Px (Ü/L)	SOD (Ü/L)	MDA (µmol/L)	3-NT (µmol/L)
1	0,45	26,08	0,84	0
2	0,48	31,41	0,99	0
3	0,44	20,00	1,18	0
4	0,75	37,84	1,06	0
5	0,54	29,79	1,43	0
6	0,56	25,40	1,28	0
7	0,56	23,45	1,42	0
8	0,55	20,00	1,77	0
9	0,41	14,54	1,52	0
10	0,39	24,08	1,93	0

Ek Tablo 4: TİN+EPO Grubunun Plazma GSH-Px, SOD, MDA, 3-NT Düzeyleri

Rat No	GSH-Px (Ü/L)	SOD (Ü/L)	MDA (µmol/L)	3-NT (µmol/L)
1	0,94	34,02	1,89	0
2	0,68	32,26	1,32	0
3	0,63	33,13	1,6	0
4	0,55	31,41	1,52	0
5	0,45	36,84	0,53	0
6	0,44	32,26	1,52	0
7	0,44	19,47	2,04	0
8	0,67	21,09	1,58	0
9	0,58	13,78	1,36	0
10	0,61	18,96	1,21	0

Ek Tablo 5: Kontrol Grubunun Doku GSH-Px, SOD, MDA, 3-NT Düzeyleri

Rat No	GSH-Px (Ü/mg prot)	SOD (Ü/g prot)	MDA (µmol/mgprot)	3-NT (µmol/g prot)
1	0,12	118,57	1,22	0
2	0,087	50,81	1,47	0
3	0,1	126,18	1,77	0
4	0,08	84,98	1,97	0
5	0,06	56,22	1,48	0
6	0,1	48,70	2,17	0
7	0,08	46,661	2,66	0
8	0,07	30,61	1,97	0
9	0,08	53,69	2,56	0
10	0,08	47,91	2,43	0

Ek Tablo 6: Tiner Grubunun Doku GSH-Px, SOD, MDA, 3-NT Düzeyleri

Rat No	GSH-Px (Ü/mg prot)	SOD (Ü/g prot)	MDA (µmol/mgprot)	3-NT (µmol/g prot)
1	0,04	150,59	5,66	27,1
2	0,087	68,00	3,98	47,3
3	0,06	89,65	2,99	53,44
4	0,04	62,30	2,36	43,15
5	0,06	256,11	1,53	25,14
6	0,04	48,32	2,84	27,68
7	0,06	57,03	3,28	57,6
8	0,04	211,31	1,67	46,63
9	0,05	131,20	2,68	55,81
10	0,06	141,48	4,36	49,22

Ek Tablo 7: TİN+MEL Grubunun Doku GSH-Px, SOD, MDA, 3-NT Düzeyleri

Rat No	GSH-Px (Ü/mg prot)	SOD (Ü/g prot)	MDA (µmol/mgprot)	3-NT (µmol/g prot)
1	0,02	85,1	1,92	0
2	0,09	143,7	2,01	0
3	0,09	58,2	2,02	0
4	0,07	58,3	1,60	0
5	0,09	58,4	1,42	0
6	0,06	46,7	1,09	0
7	0,06	48,0	2,42	0
8	0,06	62,07	2,01	0
9	0,07	33,7	2,22	0
10	0,09	133,7	2,3	0

Ek Tablo 8: TİN+EPO Grubunun Doku GSH-Px, SOD, MDA, 3-NT Düzeyleri

Rat No	GSH-Px (Ü/mg prot)	SOD (Ü/g prot)	MDA (µmol/mgprot)	3-NT (µmol/g prot)
1	0,07	93,04	0,96	0
2	0,05	98,69	2,65	0
3	0,02	32,15	1,41	0
4	0,05	134,94	1,34	0
5	0,06	70,14	1,28	0
6	0,04	85,63	1,69	0
7	0,05	82,21	0,82	0
8	0,14	72,39	0,56	0
9	0,14	113,86	0,91	0
10	0,08	85,46	1,27	0

Ek Tablo 9: Çalışma grubundaki Ratların ölçülen Ağırlıkları

GRUPLAR	0. gün ağırlık	30. gün ağırlık
T1	289	216
T2	278	258
T3	283	200
T4	331	303
T5	348	334
T6	284	219
T7	260	225
T8	275	236
T9	335	263
T10	313	247
K1	313	333
K2	314	344
K3	317	325
K4	312	330
K5	300	336
K6	335	349
K7	302	326
K8	298	336
K9	295	318
K10	296	352
M1	281	267
M2	303	279
M3	320	277
M4	278	297
M5	298	271
M6	299	289
M7	338	332
M8	293	316
M9	285	281
M10	367	370
E1	279	275
E2	313	309
E3	356	347
E4	363	349
E5	298	268
E6	300	284
E7	287	265
E8	302	287
E9	329	300
E10	281	266

TC.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Sibel KUZUGÜDEN'e ait "TİNER İLE RAT BEYNİNDE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE MELATONİN VE ERİTROPOETİNİN ETKİSİ " adlı çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

İmza

Prof. Dr. Muzaffer Üstdal (Başkan) İmza

Prof. Dr. Kader Köse İmza

Prof. Dr. Sabahattin Muhtaroglu İmza

Doç Dr. Figen Narin (Danışman) İmza

Doç. Dr. Mustafa Kula İmza